

**INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA – INPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA NO
TRÓPICO ÚMIDO – PPG/ATU**

**DISTRIBUIÇÃO DE *MATING-TYPE* EM *Fusarium decemcellulare*
Brick AGENTE CAUSAL DE SUPERBROTAMENTO EM
GUARANAZEIRO (*Paullinia cupana* var. *sorbilis* H.B.K.)**

VANESSA KELLEN DE SOUZA SIQUEIRA

**Manaus, Amazonas
Fevereiro, 2016**

VANESSA KELLEN DE SOUZA SIQUEIRA

**DISTRIBUIÇÃO DE *MATING-TYPE* EM *Fusarium decemcellulare*
Brick AGENTE CAUSAL DE SUPERBROTAMENTO EM
GUARANAZEIRO (*Paullinia cupana* var. *sorbilis* H.B.K.)**

ORIENTADOR: GILVAN FERREIRA DA SILVA
Coorientador: Rogério Eiji Hanada

Dissertação apresentada ao
Instituto Nacional de
Pesquisas da Amazônia como
parte dos requisitos para
obtenção do título de Mestre
em Agricultura no Trópico
Úmido.

**Manaus, Amazonas
Fevereiro, 2016**

FOLHA DE APROVAÇÃO

A Banca Julgadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

TÍTULO: "DISTRIBUIÇÃO DE MATING TYPE EM *Fusarium decemcellulare* Brick AGENTE CAUSAL DE SUPERBROTAMENTO EM GUARANAZEIRO (*Paullinia cupana* var. *sorbilis* H.B.K.)"

AUTOR:

VANESSA KELLEN DE SOUZA SIQUEIRA

BANCA JULGADORA:

Kedma da Silva Matos

KEDMA DA SILVA MATOS, Dra. (EMBRAPA)
(Membro)

Antônia Queiroz Lima de Souza

ANTÔNIA QUEIROZ LIMA DE SOUZA, Dra. (UFAM)
(Membro)

Rudi Emerson de Lima Procópio

RUDI EMERSON DE LIMA PROCÓPIO, Dr. (UEA)
(Membro)

Manaus, 19 de fevereiro de 2016.

À todos da minha família e ao meu pai Rubem (in memoriam).

DEDICO

Agradecimentos

Primeiramente, agradeço a Deus pelo o Dom da Vida e as bênçãos concedidas. Ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA, em especial ao programa de Pós-Graduação em Agricultura no Trópico Úmido, pela oportunidade concedida para a realização do Mestrado, aos professores pelo conhecimento transmitido, a infraestrutura e ao suporte financeiro.

À Fapeam – Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado do Amazonas, pela concessão da bolsa de estudos.

Aos doutores, Gilvan Ferreira e Rogério Hanada, pela atenção e orientação; Á pós-doutora, Dra. Kedma Matos, pela orientação e ajuda no desenvolvimento do trabalho, pela paciência e amizade;

Ao Laboratório de Fitopatologia, em especial ao técnico Luiz Alberto Guimarães Assis – “Tirico”, pela ajuda com as coletas.

Ao Laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Amazônia Ocidental, pela estrutura e permissão para execução aos trabalhos. Em especial, aos técnicos, pela ajuda e orientação. E também aos amigos adquiridos ao longo da vida acadêmica, importantes no decorrer nesse tempo de aprendizado, com apoio nas horas difíceis e paciência. Em especial, as parceiras de sempre Ariane, Kely, Laís e Rebeca. Enfim, a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a conclusão desse trabalho, muito obrigada!

RESUMO

Fusarium decemcellulare é o agente causal de superbrotamento em guaranazeiro, atualmente uma das principais doenças fúngicas da cultura no Estado do Amazonas. Embora considerada zona sem ocorrência da doença por anos, em 2013 foi detectada pela primeira vez no Estado da Bahia, principal produtor de guaraná no Brasil. Dependendo do tecido atacado, o superbrotamento apresenta três diferentes sintomas: galhas no caule, multiplicação das gemas vegetativas e hipertrofia floral. Considerada por muitos anos uma doença secundária e sem importância para a cultura do guaranazeiro, poucos estudos foram realizados sobre este patossistema nos últimos 30 anos. A análise da distribuição na população dos idiomorfos *MAT-1* e *MAT-2* é fundamental para a inferência da dinâmica e do potencial de variação genética de um patógeno e o grau de risco para o hospedeiro. Este trabalho teve como objetivo analisar a distribuição de *mating-type* em *F. decemcellulare* e estimar o número efetivo da população do patógeno nas principais áreas produtoras de guaraná no estado do Amazonas. Dos diferentes sintomas de superbrotamento em guaranazeiro, foram obtidos e caracterizados 285 isolados. Destes 165 apresentaram o idiomorfo *MAT-1* e 120 *MAT-2*. Diferente de outras espécies hospedeiras de *F. decemcellulare*, em guaranazeiro não houve ocorrência de isolados homotáticos e a maioria dos municípios produtores de guaraná analisados apresentaram número efetivo de população superior a 80%, mostrando um equilíbrio na frequência dos idiomorfos *MAT-1* e *MAT-2*, sugerindo a possibilidade de reprodução sexuada no campo.

Palavras-chaves: gene *MAT*, heterotalismo, homotalismo, superbrotamento.

ABSTRACT

Fusarium decemcellulare is the main causal agent supersprouting in guarana, currently one of the major fungal diseases of culture in the State of Amazonas. Although considered free zone the disease years ago, in 2013 the disease was first detected in the State of Bahia, the main producer of guarana in Brazil. Depending the attacks area, supersprouting features three different symptoms: galls on stems, multiplication of vegetative buds or floral hypertrophy in inflorescences. Considered by many years a disease secondary and unimportant for the guarana crop, few studies have been conducted on this pathosystem the past 30 years. The analysis of distribution in *MAT*-1 and *MAT*-2 idiomorphs population is critical for the inference of the dynamics and potential of genetic variation of a pathogen and the degree of risk to the host. This work aimed to analyze the distribution of *mating-type* in *F. decemcellulare* and to estimate the effective number of the pathogen population in the main producing areas of guarana in the state of Amazonas. Of the different symptoms of supersprouting, 285 isolates were obtained and characterized. Of these, 165 presented the idiomorph *MAT*-1 and 120 *MAT*-2. Unlike other host species of *F. decemcellulare*, in guarana there was no occurrence of homothallic isolates and most producing cities of guarana analyzed had an effective population number over than 80%, showing a balance in the frequency of the idiomorphs *MAT*-1 and *MAT*- 2, suggesting the possibility of sexual reproduction in the field.

Keywords: *MAT* gene, Heterothallism, Homothallism, Supersprouting.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Determinação de *mating-type* com os *primers* específicos desenhados para *F. decemcellulare*, através da visualização dos produtos da PCR em gel de agarose. A. Determinação do idiomorfo *MAT*-1-1-3 com 591pb; B. Determinação do idiomorfo *MAT*-1-2-1 com 400 pb. M – marcador 1Kb Plus Fermentas.35

Figura 2 Análise de Máxima Verossimilhança de sequências do gene *MAT* 1-1 (*MAT* 1-1-1, *MAT* 1-1-2 e *MAT* 1-1-3) de isolados de *Fusarium*. Isolados de *F. decemcellulare*: heterotático (F307) e homotático (NRRL 13412). Números nos ramos indicam os valores de *bootstrap*.39

Figura 3 Análise de Máxima Verossimilhança de sequências do gene *MAT* 1-2 (*MAT* 1-2-1 e *MAT* 1-2-3) de isolados de *Fusarium*. Isolados de *F. decemcellulare*: heterotático (F200) e homotático (NRRL 13412). Números nos ramos indicam os valores de *bootstrap*.40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Lista dos <i>primers</i> desenhados e de referência utilizados para determinação de <i>mating-type</i> em <i>Fusarium decemcellulare</i>	27
Tabela 2 Números de acessos do GenBank de gene <i>MAT</i> para análise filogenética.	30
Tabela 3 Distribuição dos isolados de <i>F. decemcellulare</i> obtidos dos sintomas de superbrotamento do guaranazeiro em diferentes municípios do Amazonas.	31
Tabela 4 Determinação de <i>mating-type</i> de <i>F. decemcellulare</i> nos municípios produtores de guaranazeiro no Amazonas.	34
Tabela 5 Proporção de <i>mating-type</i> de <i>F. decemcellulare</i> nos municípios no Estado do Amazonas e tamanho efetivo da população.....	37

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1 O guaranazeiro	14
2.1.1 Produção de guaranazeiro	15
2.2 Superbrotamento no guaranazeiro	15
2.3 <i>Fusarium decemcellulare</i>	16
2.3.1 Doenças causadas por <i>Fusarium decemcellulare</i>	17
2.4 Reprodução sexual – <i>Mating-types</i>	18
2.4.1. Tamanho efetivo da população	20
3. OBJETIVOS.....	23
3.1 Objetivo geral	23
3.2 Objetivos específicos	23
4. MATERIAL E MÉTODOS	24
4.1 Local do experimento.....	24
4.2 Obtenção dos isolados de <i>Fusarium decemcellulare</i>	24
4.3 Culturas monospóricas	24
4.4 Extração de DNA	25
4.5 Determinação de <i>mating-types</i> por PCR.....	25
4.5.1 <i>Primers</i> degenerados.....	25
4.5.2 <i>Primers</i> específicos.....	26
4.6. Cálculo do tamanho efetivo da população	28

4.7 Análise filogenética de <i>Fusarium decemcellulare</i> com base nos genes MAT	28
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
5.1 Obtenção dos isolados de <i>Fusarium decemcellulare</i>	31
5.2 Distribuição de <i>mating-type</i> em <i>Fusarium decemcellulare</i> isolado de guaranazeiro	32
5.3 Distribuição de <i>mating-type</i> por localidade e tamanho efetivo da população	36
5.4 Análise Filogenética de <i>Fusarium decemcellulare</i>	37
6. CONCLUSÃO	41
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42
8. ANEXOS	52

1. INTRODUÇÃO

O guaranazeiro (*Paullinia cupana* var. *sorbilis* H.B.K.) é um dos mais importantes produtos agrícolas do Estado do Amazonas, contribuindo para o desenvolvimento de pequenos agricultores e sendo fonte de renda direta e indiretamente de milhares de pessoas (Pereira 2005). Em setembro/2013, a área estimada colhida foi de 11.491 hectares no território nacional. O Estado da Bahia é o primeiro produtor nacional com 74% da produção, seguido dos Estados do Amazonas, Acre, Mato Grosso, Pará e Rondônia (IBGE 2013).

Atualmente, o Amazonas é o segundo maior produtor do país e os principais municípios produtores são Maués, Presidente Figueiredo, Urucará, Boa Vista do Ramos, Parintins e Itacoatiara (Embrapa 2013). Na agroindustrialização do guaraná, os produtos finais de maior difusão e aceitação pelo mercado brasileiro e estrangeiro são os refrigerantes gaseificados à base de guaraná (O'Dea 2003; Oliveira *et al.* 2005; Ray *et al.* 2005).

O cultivo do guaraná constitui uma excelente atividade para obtenção de renda, e contribui de forma significativa para fixação do homem no campo diminuindo o êxodo rural (Pereira *et al.* 2007). Entretanto, um dos fatores limitantes à produtividade e a expansão da guaranicultura é a suscetibilidade das plantas às doenças e pragas, com destaque para a doença superbrotamento, causada por *Fusarium decemcellulare* Brick que pode afetar as plantas desde o estágio de muda até a fase adulta, com sintomas em ramos novos e inflorescências, ocasionando grandes perdas na produtividade (Pereira 2005; Araújo 2006).

Mesmo com tamanha relevância econômica da doença para a cultura do guaranazeiro no Amazonas, ainda pouco se conhece sobre a biologia reprodutiva, variabilidade genética, estrutura da população ou sobre o potencial evolutivo e risco deste patógeno (Atroch 2007). A identificação de espécie biológica por meio de cruzamentos em laboratório pode ser útil quando não há marcadores morfológicos suficientes para delimitar espécies (Leslie 2006). Existem evidências de que *F. decemcellulare* representa um complexo de espécies com diferença filogenética entre isolados homotáticos e heterotáticos (Guimarães 2013). Assim, uma clara

identificação molecular por PCR dos *Mating type* é útil e pode auxiliar nos cruzamentos entre os isolados de *F. decemcellulare*.

O sistema de cruzamento entre fungos é denominado de *mating type*, consiste em um loco *MAT* e que apresenta dois idiomorfos, *MAT-1* e *MAT-2*. Os genes do loco *MAT* possuem regiões conservadas entre espécies distantes, que codificam proteínas denominadas HMG-box (*high mobility group*) e α -box que regulam todo o processo de reprodução sexual. Em espécies heterotáticas o cruzamento ocorre entre isolados de *mating types* opostos, enquanto que em espécies homotáticas, os isolados são autoférteis (Leslie e Summerell 2006).

Estudos baseados em determinação de *mating type* e cruzamentos têm sido utilizados para delimitar espécies dentro de *Gibberella fujikuroi species complex* (GFSC), composto por distintas espécies filogenéticas e biológicas anteriormente denominadas apenas como *Fusarium moniliforme* Sheldon (Leslie e Summerell 2006). Além disso, esses estudos permitem obter conhecimento sobre o nível de troca genética entre as populações de fungos, sendo fundamental para o conhecimento sobre a variedade genética do patógeno e para estudos de resistência e melhoramento genético (Leslie 1995).

Primers degenerados foram desenvolvidos para determinar *mating type* em várias espécies de *Fusarium* (Kerényi *et al.* 2004). Esses *primers* foram testados em *F. decemcellulare*, entretanto, somente o idiomorfo *MAT-2* foi amplificado. E com o objetivo de conhecer o potencial de reprodução sexual de diferentes populações, o tamanho efetivo da população pode fornecer uma estimativa para populações que o acasalamento ocorre de forma aleatória no campo (Caballero 1994). Nesse sentido, este estudo teve como finalidade analisar a distribuição de *mating type* e estimar o número efetivo da população de *F. decemcellulare*, obtido de plantas sintomáticas de superbrotamento em guaranazeiro no Estado do Amazonas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O guaranazeiro

A *Paullinia cupana* var. *sorbilis* H.B.K. é uma planta nativa da região amazônica e popularmente conhecida como guaranazeiro, sendo seus frutos, o guaraná, o produto de interesse (Ângelo et al. 2008). Ela foi encontrada primeiramente na região compreendida entre os rios Amazonas, Madeira, Maués e Paraná do Ramos, no rio Negro e na bacia superior do Orenoco (Guaraná 1985). Existem duas variedades: *Paullinia cupana*, típica e *Paullinia cupana* var. *sorbilis*, cultivável.

O guaranazeiro, pertencente à família Sapindaceae, com 140 gêneros e cerca de 1.500 espécies conhecidas (Botany 2007). É uma espécie que pode ser arbustiva em campo aberto e trepadeira na mata, com nome originado do termo indígena “uaranã”, que significa árvore que sobe apoiada em outra, cultivada inicialmente na Amazônia pelos índios Sateré-Mawé (Embrapa 2013).

A planta é caracterizada como arbusto subereto, quando cultivado em condições de campo, com altura em média de 2 metros. Nas matas, cresce na forma de liana até atingir a copa das árvores, podendo chegar até 10 metros de altura. Possui folhas grandes, de verde acentuado, com inflorescência pendente composta separadamente de flores masculinas e femininas numa relação de 5:1, frutificando em cachos. O fruto é redondo, preto e brilhante, assumindo a forma de uma cápsula deiscente de 1 a 3 válvulas, portando uma semente cada. Quando maduro, torna-se vermelho ou amarelo e faz surgir o arilo, substância branca que envolve parte da semente (Ângelo et al. 2008).

O cultivo de guaraná desenvolve-se bem em climas tropicais chuvosos, mas deve ser plantado em solos profundos com boa drenagem, pois não tolera áreas encharcadas. O plantio deve ser realizado em regiões de regime pluviométrico bem definido, com chuvas bem distribuídas ao longo do ano e precipitações anuais iguais ou superiores a 1.400 mm (Nascimento Filho 2000). O período de floração é de julho-setembro, e a frutificação ocorre de novembro a janeiro (Embrapa 2013).

2.1.1 Produção de guaranazeiro

O Brasil é o único produtor de guaraná do mundo, em termos comerciais. Os Estados do Amazonas e da Bahia possuem a maior área plantada do fruto nas suas respectivas regiões. No Amazonas, o guaranazeiro é cultivado tanto por grandes como por pequenos produtores (IBGE 2010).

Em agosto de 2013, o Brasil teve o total de sua safra com 3.611 toneladas, onde a Bahia contribuiu com 74% da produção, e o Amazonas com apenas 18% (LSPA 2013). Em razão dessa expansão, a cultura vem sendo submetida a diferentes condições de cultivo. Além disso, o melhoramento genético da espécie tem focado na obtenção de clones com alta produtividade e resistência a doenças (Nascimento Filho e Atroch 2002). O município de Maués/AM é o centro de diversificação genética do guaranazeiro e já foi o maior produtor de sementes de guaraná do Brasil nos anos 80 (Vidal 2005).

Entre os fatores de produção que desfavorecem ou limitam o cultivo e a produção do guaraná no Amazonas, destacam-se as enfermidades, causada por inúmeros patógenos que podem atingir tanto parte aérea quanto radicular da planta e causam diferentes tipos de doenças. As duas doenças mais comuns na cultura são a antracnose, causada pelo fungo *Colletotrichum guaranicola* Albuquerque e o complexo superbrotamento causado pelo fungo *Fusarium decemcellulare* (Duarte e Albuquerque 1999; Pereira 2005).

2.2 Superbrotamento no guaranazeiro

O superbrotamento no guaranazeiro foi reportado pela primeira vez na década de 80, e o agente etiológico foi identificado como *F. decemcellulare* (Santos 1983). Desde então, essa doença no Amazonas vem ocasionado grandes perdas econômicas aos produtores (Gasparotto 2006).

Araújo *et al.* (2006) observou em viveiro e no campo uma variação de sintomas da doença, que foi denominada como complexo superbrotamento e ocorre em diferentes órgãos da planta. No entanto, nenhum estudo foi realizado para determinar criteriosamente se são causados pelo mesmo agente etiológico.

As plantas afetadas pela doença apresentam pelo menos três sintomas característicos dependendo do tecido infectado:

1- Hiperplasia da gema vegetativa: superbrotamento de gemas vegetativas caracteriza-se pelo aparecimento de várias brotações a partir de uma gema, resultando na proliferação de ramos vegetativos e/ou inflorescências, ocorrendo no primeiro momento à proliferação de gemas vegetativas para só então surgir de forma excessiva à proliferação das inflorescências. Fisiologicamente ocorre a multiplicação exagerada de células meristemáticas (hiperplasia) e expansão anormal das células (hipertrofia), seguida do secamento da área afetada com posterior morte dos tecidos.

2- Hipertrofia floral: As flores adquirem um aspecto de cálice entumecido, o que impede a polinização floral. Sintoma este que predomina no segundo semestre do ano, causando a morte dos tecidos e o secamento das inflorescências.

3- Galha: Esse sintoma pode surgir nas gemas terminais de plantas jovens, ou nas gemas de entrenós de plantas adultas, onde ocorre a formação de uma massa compacta e desorganizada de brotos de tamanho reduzido, semelhante aos sintomas das galhas causadas por *Agrobacterium tumefaciens* (Simth e Townsend) Conn. em pessegueiro e roseira. As galhas se disseminam por toda a planta, nas regiões do caule e em galhos com gemas dormentes, causando o secamento da região envolta da galha.

2.3 *Fusarium decemcellulare*

Fusarium decemcellulare Brick [teleomorfo *Albonectria rigidiuscula* (Berk. & Broome) Rossman & Samuels], pertencente à família Nectriaceae, pode ser endófito ou patogênico a diversas plantas em mais de 80 espécies de plantas em regiões tropicais e subtropicais (Guu *et al.* 2007; Rossman *et al.* 2001; Summerell *et al.* 2010; Farr e Rossman 2016).

A colônia de *F. decemcellulare* no meio de cultura batata dextrose ágar (BDA) apresenta pigmentação vermelho carmim após três a cinco dias. Possui micélio aéreo cotonoso onde são produzidos em monofiálides microconídios hialinos, que podem ser formados em cadeia ou em “falsas cabeças”, com formato

oval, medindo 10-15 x 3-5 µm. Os macroconídios são formados a partir dos conidióforos em arranjos de esporodóquios de coloração amarelada, são curvos, cilíndricos a fusóides com uma parede grossa exterior, exceto para a ponta curvada e célula pé, apresentam de 7 – 10 septos e medem 55-130 x 6-10 µm (Leslie e Summerell 2006).

O teleomorfo *A. rigidiuscula* é caracterizado pelo ascoma subgloboso, amarelo ou branco, que não muda de cor em solução de KOH e tem pequenas papilas na superfície ascomatal. Possui ascos clavados, normalmente com quatro a oito ascósporos, elipsoides, hialinos, com três septos e levemente estriados medindo 22-28 x 7-10 µm (Rossman *et al.* 1999).

2.3.1 Doenças causadas por *Fusarium decemcellulare*

Segundo Farr e Rossman (2016), *F. decemcellulare* foi registrado em mais de 80 hospedeiros diferentes. Em 1982 foi relatado pela primeira vez em Miami nos Estados Unidos em *Mangifera indica* L., onde foram observadas galhas grandes em plantas localizadas no pomar da USDA (*United States Department of Agriculture*) (Ângulo e Villapudua 1982). Já em *Theobroma cacao* Linn. (cacau), o sintoma característico da doença é o intumescimento anormal das almofadas florais e excessiva produção de botões florais, impedindo o desenvolvimento do fruto (Dalla e Camargo 1997).

No Brasil, *F. decemcellulare* já foi reportado em diversas espécies hospedeiras de norte ao sul do Brasil. No município de Icoaraci – Pará, foram identificadas plantas de *Averrhoa bilimbi* L. (limão-de-Caiena) manifestando sintomas de superbrotamento nas inflorescências a partir do eixo floral, desenvolvendo-se também sintomas tanto no tronco como nos ramos. O isolamento do patógeno revelou a presença de fungos morfologicamente semelhantes a *F. decemcellulare* (Bastos e Santos 2001).

Em Goiás, Minas Gerais e Distrito Federal, a doença causada por *F. decemcellulare* em *Annona squamosa* L. (pinha) é denominada de cancrose e é uma das principais doenças da cultura. Caracteriza-se pela formação de cancrios nos órgãos lenhosos da planta nos diferentes estádios de desenvolvimento, causando

morte nas plantas na fase juvenil e em plantas adultas ocasiona rachaduras longitudinais e deformações nos galhos, tornando a planta improdutiva ou levando a morte (Junqueira *et al.* 2001).

Nos municípios da região alta do Vale do Taquari – Rio Grande do Sul, foi registrado a doença podridão-de-raízes nas áreas de cultivo de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. (erva-mate). Segundo um levantamento feito pelos técnicos da EMATER – Bases de Dados da Pesquisa Agropecuária, cerca de 10% das ervas estavam afetadas com a doença que foi atribuída a cinco espécies de *Fusarium* diferentes, dentre elas *F. decemcellulare* (Poletto *et al.* 2006).

Nos anos de 2002 e 2003, observaram-se sintomas de cancrose em *Cedrelinga catenaeformis* Ducke no Equador, através do isolamento de tecidos sintomáticos, identificou-se a presença de *F. decemcellulare* (Lombarad *et al.* 2008). Em 2012, Sfalzin caracterizou isolados de *F. decemcellulare* associados ao cacaueiro, agente causal da galha-floral, com utilização de análises filogenéticas. E recentemente, Guimarães (2013) também analisou uma coleção contendo 67 isolados com características morfológicas de *F. decemcellulare*, obtidos de diferentes hospedeiros e substratos, como cacaueiro, guaranazeiro, mangueira, espatódea (*Spathodea campanulata* P. Beauv), pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.), solo e serrapilheira, onde foi possível observar a presença de espécies biológicas e filogenéticas distintas.

2.4 Reprodução sexual – *Mating-types*

A terminologia utilizada para descrever um sistema de cruzamento entre fungos, assim como nos demais eucariotos, é denominada de *mating-type* (tipos de acasalamento), presente no ciclo de reprodução sexual (Leslie e Summerell 2006). Em ascomicetos filamentosos, o sexo é determinado geneticamente por uma região específica no genoma conhecido como o loco *MAT*, responsável pelo controle da iniciação sexual de produção de ascósporo. (Lee *et al.* 2008). Em vez de alelos, o termo idiomorfo é usado para descrever a porção do loco *MAT* específico para cada tipo de cruzamento, devido à sua diferente organização (Metzenberg e Glass 2005).

O mecanismo básico de *mating-type* consiste de um loco *MAT* e dois idiomorfos, *MAT-1* e *MAT-2*, sequências não relacionadas presentes na mesma posição do cromossomo. Os genes do loco *MAT* possuem regiões conservadas entre espécies distantes, que codificam proteínas denominadas de α -box (*MAT-1*) e HMG-box (grupo de alta mobilidade) família de proteínas de ligação de DNA, correspondente ao *MAT-2* (Debuchy *et al.* 2010). A ocorrência de idiomorfos distintos em um parceiro e não no outro, os tornam sexualmente distintos (Leslie e Summerell 2006).

Os produtos traduzidos de *MAT 1-1-1* e *MAT 1-2-1*, os grandes motores de comunicação sexual (Turgeon 1998), são de reguladores de proteínas que contêm regiões conservadas do domínio α -box e do HMG-box, respectivamente. Estas proteínas atuam como fatores de transcrição e regulam feromônio precursor e genes de receptores de feromônio em ascomycetos heterotálicos (Debuchy 1999; Pöggeler e Kück 2000; Kim e Min 2004).

Esses genes (*MAT*) do *mating-type* são encontrados em um único loco genômico e, geralmente, flanqueados pela DNA lyase (APN2) e pelo gene que codifica a SLA2 (Debuchy *et al.* 2010). O gênero *Fusarium* é caracterizado por apresentar uma variedade de estilos de vida sexual: assexuado, homotálico e heterotálico (Lee *et al.* 2008). Espécies homotálicas contêm tanto *MAT 1-1-1* e *MAT 1-2-1* no loco *MAT*, e são capazes de auto-fertilidade. Em contraste, espécies com uma organização heterotálica, contem apenas um dos dois genes *MAT* e, geralmente, deve cruzar com um indivíduo de *MAT* oposto (Debuchy *et al.* 2010). Em *Fusarium* existem dois idiomorfos, designados *MAT 1-1* e *MAT 1-2*. O *MAT1-1* contém três genes (*MAT 1-1-1*, *MAT 1-1-2*, e *MAT 1-1-3*) e o *MAT1-2* possui dois genes (*MAT 1-2-1* e *MAT 1-2-3*). As espécies homotálicas podem ter todos os genes *MAT*, ligadas no mesmo genoma (Yun *et al.* 2000; Martin *et al.* 2011). É necessária a comunicação entre feromônio entre parceiros de acasalamento em espécie heterotálicas (Bistis 1998). Em contrapartida, em espécies homotálicas, a expressão do precursor de feromônio e genes de receptor de feromônio não é essencial para o desenvolvimento sexual, embora estes genes sejam controlados pelo loco *MAT* (Kim *et al.* 2008; Lee *et al.* 2008).

Recentemente, Hughes *et al.* 2014, analisaram a organização dos locos *MAT1-1* e *MAT1-2* em sete espécies de *Fusarium* que causam síndrome da morte

súbita em soja (SDS) ou podridão na raiz do feijão (BRR). A organização do loco *MAT* é semelhante à de outros ascomicetos heterotáticos em conteúdo gênico, sintonia, número e posição de intron. Sendo semelhante a outros estudos com *Fusarium* spp. heterotáticos, onde o idiomorfo *MAT1-1* contem os genes *MAT1-1-1*, *MAT1-1-2* e *MAT1-1-3*, enquanto o idiomorfo *MAT1-2* contem o gene *MAT1-2-1*, bem como o recentemente identificado *MAT1-2-3* (Martin *et al.* 2011).

Para o sucesso no cruzamento em ascomicetos, além da compatibilidade entre os idiomorfos *MAT*, é importante a fertilidade dos isolados parentais. Isolados que têm a habilidade de formar peritécios são denominados “fêmea fértil”, enquanto os isolados capazes de produzir gametas férteis, tipicamente na forma de conídios, são denominados de “macho fértil”. E os hermafroditas são os que apresentam habilidade de produzir peritécios e conídios tanto como parental feminino ou masculino. Em laboratório, cruzamentos podem ser realizados controlando o papel de cada parental e sua habilidade em produzir peritécios ou gametas (Leslie e Summerell 2006).

Técnicas a partir de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) foram desenvolvidas para facilitar a determinação de *mating-types* e, assim, o reconhecimento de isolados potencialmente compatíveis que podem ser usados em cruzamentos. Após determinar os *mating-types*, o cruzamento é realizado somente com isolados opostos (Covert *et al.* 1999; Steenkamp *et al.* 2000). *Primers* degenerados foram desenvolvidos para determinar *mating-type* em várias espécies de *Fusarium*. Esses *primers* foram testados em *F. decemcellulare*, entretanto, somente o idiomorfo *MAT-2* foi amplificado. Provavelmente, pode ocorrer divergência de sequências mesmo em regiões conservadas para as diferentes espécies do gênero *Fusarium* (Steenkamp *et al.* 2000; Kerényi *et al.* 2004). Além disso, os *primers* são degenerados, ou seja, não são específicos para determinar o *mating-type* em *F. decemcellulare*.

2.4.1. Tamanho efetivo da população

Além do *mating-type*, a natureza do sexo, masculino, feminino e hermafrodita, dos participantes no acasalamento, confere uma maior complexidade

à interação. A estrutura reprodutiva feminina geralmente tem função limitada à reprodução sexual, enquanto o gameta masculino geralmente não é limitado. O hermafrodita, autoestéril, é capaz de produzir gametas masculinos e elaborar a estrutura reprodutiva feminina (Leslie e Klein 1996). Em teoria, as funções do sexo masculino ou do sexo feminino podem ser perdidas independentemente para gerar isolados que são apenas macho, fêmea, ou a geração de hermafroditas em equilíbrio, dependendo da história da população e da estabilidade ambiental (Nauta e Hoekstra 1992).

A diversidade genética é geralmente mais predominante em populações que sofrem reprodução sexual, do que em populações que se reproduzem eminentemente de forma assexual (Milgroom e Peever 2003). As populações de patógenos que sofrem frequente recombinação apresentam uma maior chance de superar os genes de resistência do hospedeiro, do que os patógenos estritamente assexuados, assim como, maior capacidade de desenvolver resistência a fungicidas (McDonald e Linde 2002).

Comparar o tamanho de diferentes populações de fungos no campo pode ser difícil, mas, o tamanho efetivo da população pode fornecer uma estimativa do tamanho relativo de uma população, para populações que o acasalamento ocorre de forma aleatória no campo. Num contexto de genética de população, o tamanho efetivo da população é normalmente utilizado na avaliação de populações de campo, devido, muitas vezes o acasalamento ocorre de forma aleatória, e nem todos os membros da população deixam o mesmo número de descendentes (Caballero 1994).

O conceito de tamanho efetivo da população foi aplicado em estudos de genética de populações de espécies do gênero *Fusarium*, com equações propostas por Leslie e Klein em 1996. Onde o tamanho efetivo da população [N_e] nas espécies *Gibberella fujikuroi* species complex, foi determinada com base em: (a) número de estirpes de diferentes tipos [$N_e (M_T)$], expressos como uma percentagem da contagem real, e (b) número de estirpes do sexo masculino e hermafroditas [$N_e (f)$], expressa como uma percentagem da contagem real (Leslie e Klein 1996; Britz *et al.* 1998).

As equações utilizadas para calcular o tamanho efetivo da população dependem das restrições colocadas sobre a população, devida a sua estratégia

reprodutiva (Caballero 1994). A frequência relativa dos idiomorfos do tipo de acasalamento e hermafroditas, afeta a facilidade com que a população pode passar pelo ciclo sexual. Máximas de tamanhos efetivos nestes fungos ocorrem quando os alelos do tipo de acasalamento estão presentes numa razão de 1:1 (Britz *et al.* 1998).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Analisar a distribuição de *mating-type* em isolados de *Fusarium decemcellulare*, obtidos de guaranazeiros com sintomas de superbrotamento cultivados nos municípios do Estado do Amazonas.

3.2 Objetivos específicos

- 1 – Desenvolver *primers* específicos para determinar os idiomorfos *MAT-1* e *MAT-2* em *F. decemcellulare*.
- 2 – Analisar a distribuição de *mating-type* e tamanho efetivo da população dos isolados de *F. decemcellulare* obtidos nos municípios produtores de guaranazeiro.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local do experimento

O experimento foi conduzido no Laboratório de Biologia Molecular na Embrapa Amazônia Ocidental, localizado na rodovia AM 010, km 29, em Manaus – AM.

4.2 Obtenção dos isolados de *Fusarium decemcellulare*

Foram realizadas coletas de plantas de guaranazeiro com sintomas de superbrotamento durante o período de floração (julho a setembro de 2014), em sete municípios produtores de guaraná no Estado do Amazonas: Maués, Boa Vista do Ramos, Itacoatiara, Itapiranga, Urucará, São Sebastião do Uatumã e Rio Preto da Eva (Anexo A). Os demais isolados foram provenientes da Coleção do Laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Amazônia Ocidental, coletados na área experimental da Embrapa (Manaus) e também Fazenda Jayoro no município de Presidente Figueiredo (Anexo B). As amostragens coletadas foram por delineamento ao acaso.

O isolamento indireto foi realizado a partir de assepsia com desinfestação superficial (etanol 70%, hipoclorito de sódio 2,5% e lavagem em água destilada) dos tecidos vegetais do guaranazeiro (Schulz e Boyle 2005) e transferidos para o meio batata dextrose ágar (BDA). As placas foram mantidas em BOD a 25 °C com fotoperíodo de 12 horas por três dias. As culturas com morfologia típica de *F. decemcellulare* foram transferidas para placas de Petri contendo meio *Synthetic Nutrient-poor Agar* (SNA) para obtenção das culturas monospóricas.

4.3 Culturas monospóricas

Os microconídios foram transferidos para microtubos, com auxílio de uma agulha histológica, contendo 2 mL de água destilada estéril e submetidos a agitação.

Em seguida, 20 µL da suspensão foi plaqueada com auxílio de alça de *Drigalski* em placas de *Petri* contendo meio ágar-água (AA). As placas foram incubadas em BOD a 25 °C com fotoperíodo de 12 horas por 12 horas. Após a incubação, com o auxílio de microscópio estereoscópico e em condição asséptica, foram selecionados de cada isolado três microconídios germinados após 24 horas, transferidos para placa contendo meio SNA e mantidas em BOD a 25 °C e com fotoperíodo de 12 horas durante três dias. Após o desenvolvimento das colônias, foi selecionada uma colônia e transferida para placa com meio SNA e mantida em BOD a 25 °C por sete dias. Os isolados foram preservados em água destilada esterilizada pelo método de *Castellani* e armazenados a 10 °C (Castellani 1939).

4.4 Extração de DNA

O DNA dos isolados de *F. decemcellulare* foram extraídos a partir dos isolados monospóricos, crescidos em meio líquido de extrato de Malte 4% por três dias a 100 rpm a 25 °C em um agitador orbital, para a produção de biomassa. A biomassa foi filtrada e a extração do DNA foi realizada utilizando-se o tampão CTAB seguindo o protocolo descrito por Doyle e Doyle (1987).

4.5 Determinação de *mating-types* por PCR

4.5.1 Primers degenerados

Inicialmente, foram testados os *primers* degenerados desenhados por Kerényi *et al.* 2004 para o *MAT-2 fusHMGfor* (CGACCTCCCAAYGCTACAT) e *fusHMGrev* (TGGGCGGTACTGGTARTCRGG) (260pb) e foram desenhados novos *primers* degenerados neste trabalho para a amplificação dos idiomorfos *MAT-1*, utilizando-se os *primers fusALPHAfor* (CGCCCTCTKAAYGSCTTCATG) e *fusALPHArev* (GGARTARACYTTAGCAATYAGGGC) (200pb).

As reações de PCR foram realizadas com um volume final de 20 µL, com 1µL de *primers* (0,25 µM), tampão 10X (500 mM KCl; 100 mM Tris-HCl pH 8,4; 1%

Triton X-100), 1,2 µL MgCl₂ (1,5 mM), 0,4 µL dNTP (0,2 mM), 0,05 U/µL Taq polimerase, 20 ng/µL de DNA. As condições dos ciclos foram: desnaturação inicial de 94 °C por 30 segundos; 30 ciclos de desnaturação (94 °C por 30 segundos), anelamento (60 °C por 30 segundos) e extensão (72 °C - 90 segundos); e extensão final em 70 °C por 1 minuto.

Os fragmentos amplificados de isolados de *F. decemcellulare* selecionados foram clonados com o kit CloneJET PCR Cloning (Thermo Scientific), segundo as recomendações descritas pelo fabricante. Os clones foram selecionados por PCR de colônia para confirmação de cada fragmento, para extração de plasmídeo, purificados para sequenciamento, usando o kit *BigDye® Terminator v3.1* e sequenciados em um sequenciador 3500 Genetic Analyser. Os alinhamentos das sequências de nucleotídeos foram realizados através do programa MEGA v.6 (Tamura *et al.* 2013).

4.5.2 Primers específicos

Oligonucleotídeos específicos para *MAT-1* e *MAT-2* foram obtidos via clonagem e sequenciamento conforme descritos acima, e com base nas sequências obtidas do genoma em andamento de *F. decemcellulare* (isolados F200 e F307 de guaranazeiro e NRRL 13412 de cafezeiro) (Tabela 1).

O produto da PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 1,5 % para a visualização da amplificação. O comprimento dos fragmentos amplificados foi comparado com o marcador Fermentas 1 Kb.

Tabela 1 Lista dos *primers* desenhados e de referência utilizados para determinação de *mating-type* em *Fusarium decemcellulare*.

MATING TYPE	PRIMERS	ORIENTAÇÃO	SEQUÊNCIA (5'-3')	Nº DE BASES	pb	REFERÊNCIAS	OBS.
MAT-1	FDC MAT 1.1.1	<i>Forward</i>	ACGCTTTCATGGCTTTTCG	19	190	Neste trabalho	Desenhado a partir do <i>primer</i> degenerado.
		<i>Reverse</i>	GCCCATTTGTTGCGATTATG	20			
	FDC MAT 1.1.3	<i>Forward</i>	TGCTTTGACTTCTGGATTCTCA	22	591	Neste trabalho	Desenhado a partir do genoma de <i>F. decemcellulare</i> .
		<i>Reverse</i>	CCCAAATTCGAGGTCCCTAT	20			
MAT-2	FDC MAT 1.2.1	<i>Forward</i>	ATGAGCTCCTTCACTGGCGC	20	300	Neste trabalho	Desenhado a partir do genoma de <i>F. decemcellulare</i>
		<i>Reverse</i>	CCATTGCCGTCAAGAGCAAAC	21			
	FDC MAT 1.2.3	<i>Forward</i>	ACAGTCATGGCTGGAATGCA	20	400	Neste trabalho	Desenhado a partir do genoma de <i>F. decemcellulare</i> .
		<i>Reverse</i>	CCCACCCCAAATCACCTGAAT	21			
	fusALPHA	<i>Forward</i>	CGACCTCCCAAYGCTACAT	19	260	Kerényi <i>et al.</i> 2004	<i>Primer</i> degenerado
		<i>Reverse</i>	TGGGCGGTACTGGTARTCRGG	21			

4.6. Cálculo do tamanho efetivo da população

As equações de tamanho efetivo da população (N_e), propostas por Leslie e Klein (1996) com base na razão de *mating type* dentro da população, foi determinado pela equação: $N_{e(mt)} = (4 N_{MAT-1} N_{MAT-2}) / (N_{MAT-1} + N_{MAT-2})$, onde N_{MAT-1} foi o número de isolados com o idiomorfo *MAT-1* e N_{MAT-2} é o número de isolados que possuem o idiomorfo *MAT-2*. Esta equação, primeiramente, foi proposta por Wright (1931) para diplóides com dois sexos distintos, usada para calcular o tamanho da população em fungos ascomicetos se ambos os tipos de acasalamento não forem igualmente frequentes.

4.7 Análise filogenética de *Fusarium decemcellulare* com base nos genes *MAT*

Os genes do *MAT-1* e *MAT-2* obtidos a partir do genoma dos isolados de F307 (*MAT-1*) e F200 (*MAT-2*) de guaranazeiro, e um isolado homotático NRRL 13412 obtidos de cafezeiro com sintomas de superbrotamento, foram utilizados para comparar as relações filogenéticas dentro do gênero *Fusarium*. Com o intuito de confirmar as relações filogenéticas obtidas a partir dos genes de *mating type* em *F. decemcellulare*, também foi utilizado o gene *fator de alongação 1-α* (TEF 1-α). Nas análises, foram utilizadas sequências de referências adquiridas a partir do GenBank (Tabela 2).

A amplificação do fragmento do gene que codifica o *fator de alongação 1-α*, foi realizada com os *primers*: Ef-1 for (ATGGGTAAGGAGGACAAGAC) e Ef-2 rev (GGAAGTACCAGTGATCATGTT) gerando um fragmento de 691 pb (O'Donnell *et al.* 1998). As amplificações foram realizadas em termociclador *Thermal Cycler, Applied Biosystems*, nas seguintes reações: 94 °C por 1 minuto; 34 ciclos de 94 °C por 30 segundos; 62 °C por 45 segundos; 72 °C por 1 minuto e 72 °C por 5 minutos (O'Donnell *et al.* 1998).

Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (1,5 %), com 3 µL de corante *Green GoTaq Flexi Buffer*, a 150 V por hora e 30 minutos, em tampão TBE (Tris-base e EDTA pH 8,0). Os géis de agarose foram corados em solução de brometo de etídio (5 µg mL⁻¹), visualizados em

transiluminador com luz ultravioleta e fotografado no equipamento Sistema de Fotodocumentação *L-Pix Chemi.purificados*.

Os fragmentos foram purificados para sequenciamento, usando o kit *BigDye® Terminator v3.1* e sequenciados em um sequenciador 3500 *Genetic Analyser*. Os alinhamentos das sequências de nucleotídeos foram realizados através do programa MEGA 6, utilizando-se a ferramenta CLUSTALW (Thompson; Higgins; Gibson 1994), implementado pelo programa MEGA v.6 (Tamura *et al.* 2013).

As análises filogenéticas foram realizadas pelo método de *Máxima verossimilhança*, utilizando o modelo evolutivo Kimura-2 parâmetros, através do programa MEGA v.6 (Tamura *et al.* 2011) e ramos internos foram avaliados com 1000 repetições de *bootstrap*. Sequências da espécie de *F. oxysporum* (AB011379 e AB011378) foram utilizadas como *outgroups* para o gene *MAT*.

Tabela 2 Números de acessos do GenBank de gene *MAT* para análise filogenética.

Espécies	MAT-1	MAT-2
<i>Fusarium azukicola</i>		KF706655.1
<i>Fusarium crassistipitatum</i>		KF706654.1
<i>Fusarium nygamai</i>	JF776866.1	JF776867.1
<i>Fusarium phaseoli</i>	KF706647.1	
<i>Fusarium brasiliense</i>	KF706648.1	
<i>Fusarium fujikuroi</i>	AF100925.1	JF776857.1
<i>Fusarium mangiferae</i>	JF776872.1	JF776873.1
<i>Fusarium oxysporum</i>	AB011379.1	AB011378.1
<i>Fusarium sacchari</i>	JF776854.1	JF776855.1
<i>Fusarium subglutinans</i>	JF776862.1	JF776863.1
<i>Fusarium tucumaniae</i>	KF706646.1	KF706656.1
<i>Fusarium virguliforme</i>	KF706651.1	
<i>Gibberella circinata</i>	JF776868.1	JF776869.1
<i>Gibberella intermedia</i>	JF776858.1	JF776859.1
<i>Gibberella konza</i>	JF776870.1	JF776871.1
<i>Gibberella thapsina</i>	JF776864.1	JF776865.1
<i>Gibberella moniliformis</i>	JF776852.1	JF776853.1
<i>Gibberella zeae</i>	AF318048.1	

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Obtenção dos isolados de *Fusarium decemcellulare*

Foram obtidos 285 isolados de *F. decemcellulare* de guaranazeiro a partir tecidos com sintomas de superbrotamento oriundos dos principais municípios produtores no Amazonas (Maués, Boa Vista do Ramos, Itacoatiara, Itapiranga, Urucará, São Sebastião do Uatumã, Presidente Figueiredo, Rio Preto da Eva e Manaus). O maior número de isolados foi obtido do município de Manaus, seguido pelo município de Maués que é o principal município produtor de guaraná da região norte (Tabela 3).

Tabela 3 Distribuição dos isolados de *Fusarium decemcellulare* obtidos de sintomas de superbrotamento em guaranazeiro nos diferentes municípios do Amazonas.

LOCAL DE ORIGEM	Nº DE ISOLADOS
Itapiranga	3
Presidente Figueiredo	6
Rio Preto da Eva	16
S. Sebastião do Uatumã	16
Itacoatiara	18
Boa Vista do Ramos	34
Urucará	45
Maués	49
Manaus	98
Total	285

5.2 Distribuição de *mating-type* em *Fusarium decemcellulare* isolado de guaranazeiro

O *mating-type* dos 285 isolados de *F. decemcellulare* foi determinado com os *primers* desenhados para *MAT-1* e *MAT-2* (Tabela 1). Todos os isolados obtidos foram identificados como heterotáticos, sendo 165 *MAT-1* e 120 *MAT-2*.

Visando garantir uma maior confiabilidade, todos os isolados foram analisados com base em dois genes para cada idiomorfo. Para o *MAT-1*, foram usados genes *MAT 1-1-1* e *MAT 1-1-3* e para o *MAT-2*, foram usados os genes *MAT 1-2-1* e *MAT 1-2-3* (Figura 1).

O idiomorfo *MAT-1* é relativamente mais complexo e apresenta três diferentes genes (*MAT-1-1-1*, *MAT-1-1-2* e *MAT-1-1-3*), sendo que *MAT-1-1-1* codifica uma proteína α -box com funções importantes na formação de peritécios e ascósporos. Os genes *MAT-1-1-2* e *MAT-1-1-3* aumentam a eficiência dos cruzamentos, mas não estão diretamente ligados à produção de peritécios e ascósporos. Já o idiomorfo *MAT-2*, contém dois transcritos (*MAT-1-2-1* e *MAT-1-2-3*) contendo somente a proteína HMGbox, que desempenha papel importante na ascosporogênese e na determinação de cruzamentos específicos (Yun *et al.* 2000).

Em guaranazeiro houve somente a ocorrência de isolados heterotáticos. Sendo o idiomorfo *MAT-1* encontrado em maior número na maioria dos municípios analisados.

Diferente de outros hospedeiros em guaranazeiro, não foram identificados isolados homotáticos (que apresentam genes para ambos idiomorfos no mesmo isolado). Guimarães (2013) realizou o teste de patogenicidade com os isolados heterotáticos e homotáticos inoculados em sementes de cacaueiro e apenas os isolados heterotáticos induziram sintomas de galha. Outros testes de patogenicidade com isolados de *F. decemcellulare* já foram realizados com sucesso em outros estudos e demonstraram que apenas isolados heterotáticos foram patogênicos (Ford *et al.* 1967). No complexo *Fusarium solani*, tem sido observado situação semelhante, onde na maioria dos casos, as populações patogênicas são heterotáticas ou não possuem teleomorfo conhecido (Ploetz 2006).

Em outros patossistemas, há estudos realizados para verificar a associação entre os *mating-types* e virulência como em *Mycosphaerella graminicola* em trigo,

onde um grande número de isolados oriundos de diversas regiões geográficas e genótipos do hospedeiro, foi observado que o *MAT-1* mostrou-se consistentemente mais virulento do que *MAT-2* (Zhan *et al.* 2007).

As populações de patógenos com reprodução sexuada geralmente exibem um elevado grau de diversidade e conseqüentemente maior risco de quebra da resistência no hospedeiro. Já em patógenos assexuados, a diversidade genética é distribuída entre linhagens clonais (McDonald e Linde 2002). Patógenos com sistemas de reprodução mistos, constituem o mais alto risco de evolução. Durante o ciclo sexual, muitas novas combinações de genótipos são criadas através de recombinação. Estes genótipos recombinados podem ser diferentes em ambientes diferentes, podendo incluir novos genes de resistência a fungicidas ou antibióticos. Combinações de genótipos que são mais aptas são mantidas juntas por meio de reprodução assexuada e pode aumentar a uma frequência alta em clones selecionados (Venturini *et al.* 2011; McDonald e Linde 2002).

Tabela 4 Determinação de *mating-type* de *F. decemcellulare* nos municípios produtores de guaranazeiro no Amazonas.

N° Isolados	Localidade	<i>Mating type</i>	
		<i>MAT 1</i>	<i>MAT 2</i>
3	Itapiranga	1	2
6	Presidente Figueiredo	3	3
16	Rio Preto da Eva	7	9
16	S. Sebastião do Uatumã	7	9
18	Itacoatiara	9	9
34	Boa Vista do Ramos	20	14
45	Urucará	22	23
49	Maués	27	22
98	Manaus	69	29
TOTAL		165	120

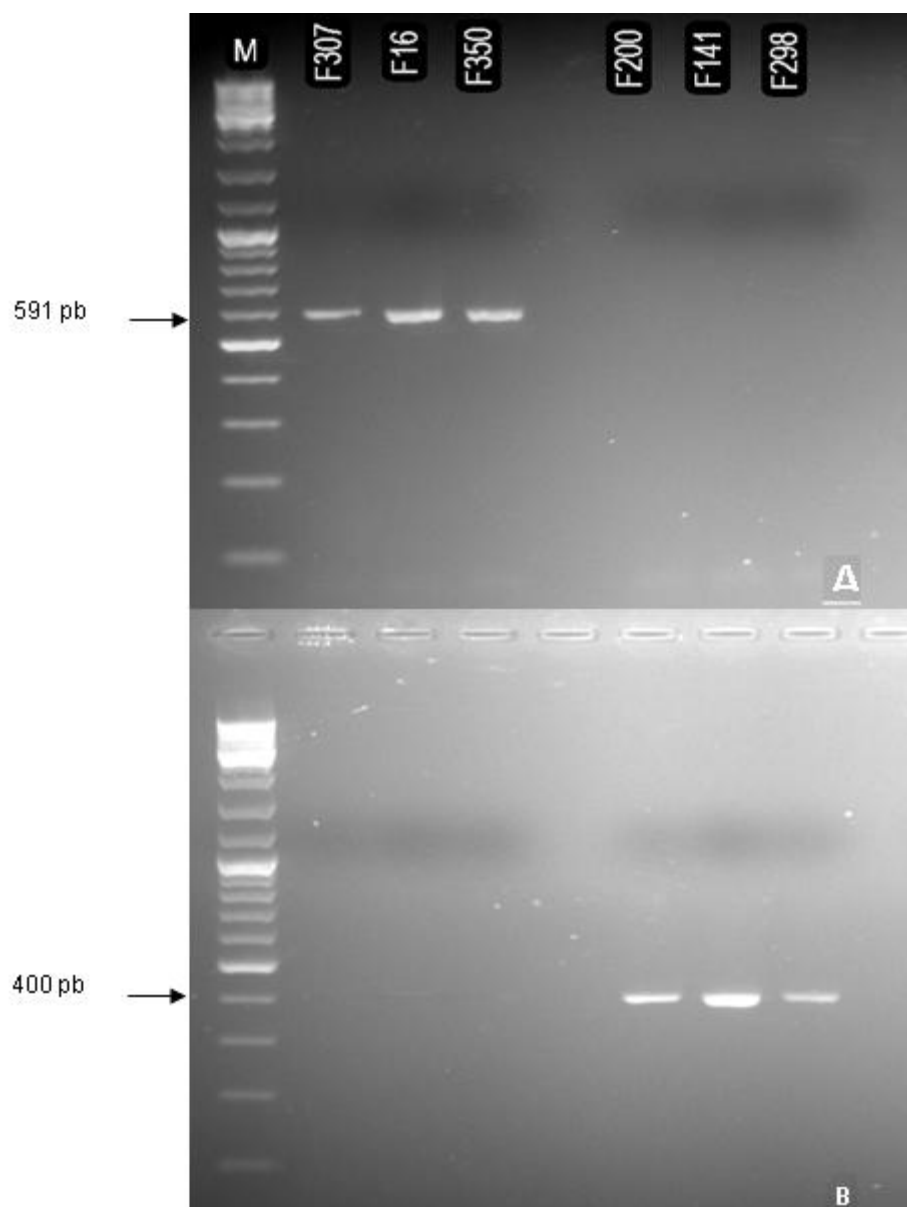


Figura 1 Determinação de *mating-type* com os *primers* específicos desenhados para *F. decemcellulare*, através da visualização dos produtos da PCR em gel de agarose. **A.** Determinação do idiomorfo *MAT-1-1-3* com 591pb; **B.** Determinação do idiomorfo *MAT-1-2-1* com 400 pb. **M** – marcador 1Kb Plus Fermentas.

5.3 Distribuição de *mating type* por localidade e tamanho efetivo da população

A partir da análise do sistema de *mating-type* em *F. decemcellulare*, foi possível verificar a proporção de cada idiomorfo nos nove municípios produtores de guaranazeiro no Estado do Amazonas e o tamanho efetivo das populações, expresso em porcentagem do número total de indivíduos *MAT*-1 e *MAT*-2 de cada população (Tabela 5).

Dos 285 isolados de *F. decemcellulare* heterotáticos encontrados neste estudo, a razão na proporção de *mating-type* variou de acordo com os municípios, sendo a menor proporção encontrada em Manaus N_e de 83% (69:29) (Tabela 5). Entretanto, vale ressaltar que esta discrepância pode ter ocorrido porque a maioria dos isolados foram obtidos em casa de vegetação, não representando portanto as condições encontradas no campo.

O N_e é maior quando os dois alelos *MAT* estão presentes na mesma frequência, ou seja, 50%, mesmo que haja desvios altamente significativos em relação a razão esperada 1:1, não reduzirá mais de 10% em relação ao N_e esperado se os alelos *MAT* estiverem em frequências iguais (Leslie e Summerell 2006). Assim, em guaranazeiro a frequência relativa dos diferentes *mating-type* parecem não reduzir o tamanho efetivo da população (N_e). Este resultado é semelhante ao encontrado em *Gibberella fujikuroi* (Leslie e Klein 1996; Mansuetus 1997).

Os nove municípios analisados, apresentaram o número efetivo da população de *F. decemcellulare* superior a 80%, mostrando um equilíbrio na frequência de tipo de acasalamento e sugerindo a possibilidade de reprodução sexuada no campo. Com isso, pode ocorrer recombinação genética nessas populações e consequente aumento na diversidade genética e virulência do patógeno. Aparentemente, existe uma tendência de maior fertilidade da população em latitudes menores com clima tropical (Gomes 2013).

O sistema de *mating-type* em *Fusarium* serve, principalmente, para impedir a autofertilização. A expectativa para acasalamento aleatoriamente em populações é que ambos os alelos *MAT* estará presente nas frequências iguais, mas essa expectativa não é sempre encontrada, sugerindo que a reprodução assexuada é

bastante importante em muitas populações, mesmo que os membros dessa população sejam capazes de reprodução sexual (Leslie e Summerell 2006).

Tabela 5 Proporção de *mating-type* em *Fusarium decemcellulare* nos municípios no Estado do Amazonas e tamanho efetivo da população.

Origem dos isolados	Total de isolados	Proporção <i>mating type</i> (MAT-1 : MAT-2)	Nº efetivo da população $N_e(m)$ (%)
Itapiranga	3	1:2	88
Presidente Figueiredo	6	3:3	100
Rio Preto da Eva	16	7:9	98
São Sebastião do Uatumã	16	7:9	98
Itacoatiara	18	9:9	100
Boa Vista do Ramos	34	20:14	96
Urucará	45	22:23	99
Maués	49	27:22	98
Manaus	98	69:29	83
Total população	285	165:120	97

5.4 Análise Filogenética de *Fusarium decemcellulare*

No presente também foram avaliadas as relações filogenéticas entre *F. decemcellulare* e outras espécies de *Fusarium*, comparando sequências completas dos genes de *MAT*.

Nas análises de *Máxima Verossimilhança* com base nas sequências dos genes *MAT*, os isolados heterotáticos de *F. decemcellulare* F307 (*MAT*-1) e F200 (*MAT*-2) obtidos de guaranazeiro com sintomas superbrotamento e o isolado homotático NRRL 13412 obtido de cafezeiro, formaram um clado distinto das demais espécies de *Fusarium* analisadas com suporte estatístico de 100% de *bootstrap* em ambos os idiomorfos *MAT*-1 e *MAT*-2 (Figura 2 e 3).

F. decemcellulare foi diferenciada das demais espécies de *Fusarium*, mas não houve diferença entre os isolados heterotáticos e o isolado homotático, os quais foram agrupados em um clado monofilético (Figura 2 e 3). Os genes *MAT* foram considerados com potencial para marcar limite entre espécies, pois são altamente divergentes entre espécies, embora sejam fortemente conservados dentro das espécies (Turgeon 1998; Yun *et al.* 2000). Os resultados confirmam a alta variabilidade do gene *MAT* entre as espécies de *Fusarium*, e a baixa variação entre isolados de *F. decemcellulare*. Provavelmente, ocorreu uma evolução única para os genes *MAT* entre os isolados homotáticos e heterotáticos nessa espécie. Em contraste, os genes *MAT* quando analisados em *Gibberella fujikuroi*, a espécie homotática (*G. zeae*) forma um clado monofilético distinto das espécies heterotáticas (O'Donnell *et al.* 2004; Martin *et al.* 2011).

Em um estudo sobre estrutura e evolução do loco *MAT* em *Fusarium* spp., um novo gene denominado de *MAT*-1-2-3 foi identificado no idiomorfo *MAT*1-2 e pode estar ausente em muitos outros gêneros de fungos (Martin *et al.* 2011). As sequências obtidas a partir do genoma completo de *F. decemcellulare* confirmam a presença dos três genes do idiomorfo *MAT* 1-1 (*MAT* 1-1-1, *MAT* 1-1-2 e *MAT* 1-1-3) e dos dois genes do idiomorfo *MAT* 1-2 (*MAT* 1-2-1 e o novo gene *MAT* 1-2-3) em homotáticos e heterotáticos.

O uso de genes *MAT* tem sido utilizado para verificar as relações filogenéticas em várias espécies de fungos (Barve *et al.* 2003; Martin *et al.* 2011; Steenkamp *et al.* 2000; Turgeon 1998). Em *Fusarium graminearum*, os genes *MAT* foram utilizados na reorganização de oito espécies filogeneticamente distintas. Esses genes estavam sob pressão seletiva purificadora, mesmo dentro de clados aparentemente assexuais, e forneceram uma indicação valiosa de parentesco filogenético em ambas as linhagens sexuada e assexuada (O'Donnell *et al.* 2004). Nas análises filogenéticas no complexo de espécies de *Colletotrichum*, os genes

MAT foram mais informativos do que a região ITS (*Internal Transcribed Spacers*) (Du *et al.* 2005).

A evolução dos sistemas *mating type* é altamente dinâmica, variando mesmo entre as espécies estreitamente relacionadas. A hipótese mais aceita da evolução de fungos baseada no modo de reprodução, é que o heterotalismo tenha sido o ancestral comum (Coppin *et al.* 1997), como foi sugerido em *Gibberella* (O'Donnell *et al.* 2004) e recentemente em *Neurospora* (Gioti *et al.* 2012). No entanto, em *Cochiliobulus* a proposta de ancestral comum é para o homotalismo (Yun *et al.* 1999). Diante das diferentes hipóteses existentes, tanto os mecanismos genéticos e a direção de transições evolucionárias em sistemas *mating types* ainda estão em debate.

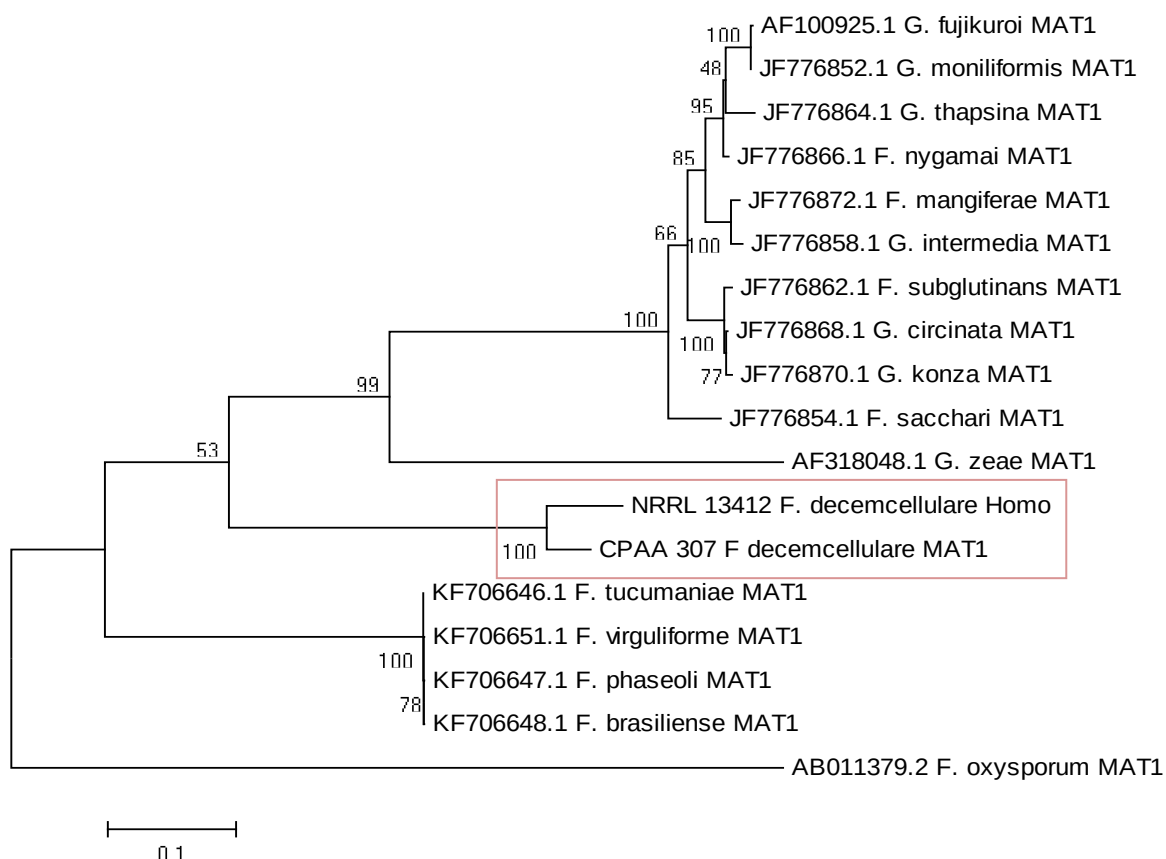


Figura 2 Análise de Máxima Verossimilhança de sequências do gene *MAT* 1-1 (*MAT* 1-1-1, *MAT* 1-1-2 e *MAT* 1-1-3) de isolados de *Fusarium*. Isolados de *F. decemcellulare*: heterotático (F307) e homotático (NRRL 13412). Números nos ramos indicam os valores de *bootstrap*.

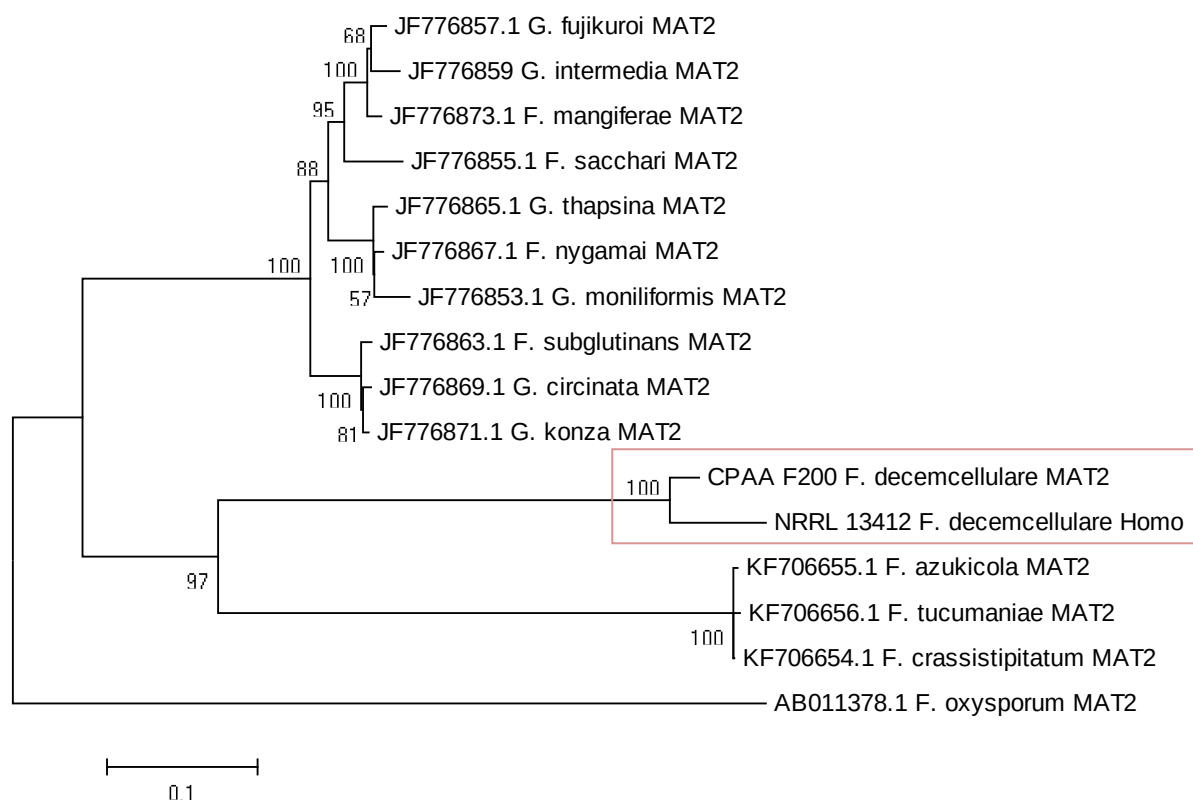


Figura 3 Análise de Máxima Verossimilhança de sequências do gene *MAT* 1-2 (*MAT* 1-2-1 e *MAT* 1-2-3) de isolados de *Fusarium*. Isolados de *F. decemcellulare*: heterotático (F200) e homotático (NRRL 13412). Números nos ramos indicam os valores de *bootstrap*.

6. CONCLUSÃO

Os *primers* desenvolvidos neste trabalho para *Fusarium decemcellulare*, possibilitou a determinação de *mating-type* na população de 285 isolados, indicando que podem ser aplicados com sucesso para amplificação dos idiomorfos *MAT-1* e *MAT-2*.

Os municípios produtores de guaranazeiro apresentaram elevado tamanho efetivo nas populações de *F. decemcellulare*, indicando capacidade de reprodução sexual no campo.

Os genes *MAT* podem ser utilizados para avaliar as relações filogenéticas e diferenciar *F. decemcellulare* das demais espécies de *Fusarium*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ângelo, P.C.S.; Nunes-Silva, C.G.; Brígido, M.M.; *et al.* 2008. Guaraná (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*), an anciently consumed stimulant from the Amazon rain forest: the seeded-fruit transcriptome. *Plant Cell Reports*, 27: 117–124.

Ângulo, S.M.; Villapudua, J.R. 1982. Buba of mango (*Mangifera indica* L.) in the state of Sinaloa, México: abstract the american phytopathological society. *Phytopathology*, 72 (1): 171.

Araújo, J.C.A.; Pereira, J.C.R.; Gasparotto, L.; Arruda, M.R. 2006. O complexo superbrotamento do guaranazeiro e seu controle. *Comunicado técnico*, nº 45, Manaus, Amazonas, 45p.

Atroch, A.L. 2007. Situação atual da cultura do guaraná no Estado do Amazonas. In: *Reunião Técnica da cultura do Guaraná*, 1. 2001, Manaus, AM. Resumos. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2001. 16-23p. (Embrapa Amazônia Ocidental. Documentos, 16).

Barve, M.P.; Arie, T.; Salimath, S.S.; Muehlbauer, F.J.; Peever, T.L. 2003. Cloning and characterization of the *mating type* (MAT) locus from *Ascochyta rabiei* (teleomorph: *Didymella rabiei*) and a MAT phylogeny of legume-associated *Ascochyta* spp. *Fungal Genetic Biology*. 39:151–167.

Bastos, C.N.; Santos, A. 2001. Superbrotamento de inflorescências do limão-de-caiena causados por *Fusarium decemcellulare*. *Fitopatologia Brasileira*, 26 (2): 222–226.

Bistis, G.N. 1998. Physiological heterothallism and sexuality in Ascomycetes: a partial history. *Fungal Genetics and Biology*, 23: 213–222.

Britz, H.; Wingfield, M.J.; Coutinho, T.A.; Marasas, W.F.O.; Leslie, J.F. 1998. Female fertility and *mating type* distribution in a South African population of *Fusarium subglutinans* f. sp. *pini*. *Applied and Environmental Microbiology*, 64: 2094–2095.

BOTANY, 2007. University of Hawaii at Manoa (http://www.botany.hawaii.edu/faculty/carr/phylo_sapind.htm). Acessado em: 31/08/2007.

Caballero, A. 1994. Developments in the prediction of effective population size. *Heredity*, 73: 657–679.

Castellani, A. 1939. Viability of some pathogenic in fungi distilled water. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 42: 225–226.

Covert, S.F.; Briley, A.; Wallace, M.M.; McKinney, V.T. 1999. Partial *MAT-2* gene structure and the influence of temperature on mating success in *Gibberella circinata*. *Fungal Genetics and Biology*. 28 (2): 43–54.

Coppin, E.; Debuchy, R.; Arnaise, S.; Picard, M. 1997. *Mating types* and sexual development in filamentous ascomycetes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 61:411–28

Dalla, P.M.; Camargo, L.E.A. 1997. Doenças Do Cacaueiro (*Theobroma Cacao*) In: Kimati, H.; Amorim, L.; Bergamin Filho, A. *Manual de Fitopatologia. Doenças das plantas cultivadas*. São Paulo, Editora Agronômica Ceres, 3: 176–183.

Debuchy, R. 1999. Internuclear recognition: a possible connection between ascomycetes and homobasidiomycetes. *Fungal Genetics and Biology*, 27: 218–223.

Debuchy, R.; Berteaux-Lecellier, V.; Silar, P. 2010. Mating systems and sexual morphogenesis in Ascomycetes. In: Borkovich, K.A., Ebbole, D.J. (Eds.), *Cellular and Molecular Biology of Filamentous Fungi*. ASM Press, Washington, p. 501–535.

Doyle, J.J.; Doyle, J.L.; Hortorium, L.H.B. 1987. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12 (1): 13–15.

Du, M.; Schardl, C.L.; Nuckles, E.M.; Vaillancourt, L.J. 2005 Using *mating-type* gene sequences for improved phylogenetic resolution of *Colletotrichum* species complexes. *Mycologia* 97: 641–658.

Duarte, M.L.R.; Albuquerque, F.C. 1999. Doença do guaranazeiro. In: Duarte, M.L.R. Doenças de plantas no Trópico Úmido Brasileiro. *I-Plantas industriais*. Belém: EMBRAPA Amazônia Oriental, p. 89–121.

EMBRAPA, 2013. Mais agricultores familiares do AM querem produzir guaraná. (<http://www.embrapa.br/imprensa/noticias/2013/julho/3a-semana/mais-agricultores-familiares-do-am-querem-produzir-guarana/>). Acessado em 25/09/2013.

Farr, D.F.; Rossman, A.Y. 2016. Fungal Databases, Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS, USDA (<http://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/>). Acessado em 22/01/2016.

Ford, E.J.; Bourret, J.S.; Snyder, W.C. 1967. Biologic specialization in *Calonectria Fusarium rigidiuscula* in relation to green point gall of cacao. *Phytopathology*. 57:710-712.

Gasparotto, L.; Pereira, J.C.R.; Araújo, J.C.A. 2006. Doenças de expressão econômica de culturas exploradas na Amazônia Ocidental. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, 31: 37–38.

Geiser, D.M.; Gasco, M.M.J.; Kang, S.; Makalowska, I.; Veeraraghavan, N.; Ward, T.J.; Zhang, N.; Kuldau, G.A.; O'Donnell, K. 2004. FUSARIUM-ID: A DNA sequence database for identifying *Fusarium*. *European Journal of Plant Pathology*, 110: 473–479.

Gioti, A.; Mushegian, A.A.; Strandberg, R.; Stajich, J.E.; Johannesson, H. 2012. Unidirectional evolutionary transitions in fungal mating systems and the role of transposable elements. *Molecular Biology and Evolution*. 29: 3215–3226.

Gomes, A.A.M. 2013. *Frequência de hermafroditas e distribuição de tipos de acasalamento em populações de Fusarium verticillioides associadas ao milho em diferentes zonas climáticas do Brasil*. Dissertação de mestrado, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Pernambuco. 29p.

Guaraná: Aspectos Agroeconômicos. 1985. Região Norte. Belém: SUDAM, p.1–22.

Guimarães, E.A. 2013. *Biologia reprodutiva, filogenia e patogenicidade de Fusarium decemcellulare*. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Lavras – UFLA, Lavras, Minas Gerais. 58p.

Guu, J.R.; Ju, Y.M.; Hsieh, H.J. 2007. Nectriaceous fungi collected from forests in Taiwan. *Botanical Studies*, 48: 187–203.

Hughes, T.J.; O'Donnell, K.; Sink, S.; Rooney, A.P.; Scandiani, M.M.; Luque, A.; Bhattacharyya, M.K.; Huang, X. 2014. Genetic architecture and evolution of the mating type locus in fusaria that cause soybean sudden death syndrome and bean root rot. *Mycologia*, 106 (4): 686–697.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE. 2010. Censo agrícola de 2010. (<http://www.sidra.ibge.gov.br>). Acessado em 06/03/2011.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE. 2013. Levantamento de Avaliação da Safra 2013 de Guaraná em Grãos. *Conjuntura Mensal*, Conab.

Lee, S.H.; Kim, Y.K.; Yun, S.H.; Lee, Y.W. 2008. Identification of differentially expressed proteins in a MAT-1-2-deleted strain of *Gibberella zeae*, using a comparative proteomics analysis. *Current Genetics*, 53: 175–84.

LSPA, 2013. Levantamento Sistemático Produção Agrícola. (http://www1.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa_201308.pdf). Acessado em 13/01/2014.

Junqueira, N.T.V.; Santiago, D.V.R.; Pinto, A.C.Q.; Chaves, R. C. 2001. Principais doenças da fruteira-do-conde no cerrado. *Circular técnica* nº 16, 33p.

Kerényi, Z.; Moretti, A.; Waalwijk, C.; Ola'h, B.; Hornok, L. 2004. Mating type sequences in asexually reproducing *Fusarium* species. *Applied and Environmental Microbiology*, 70: 4419–4423.

Kim, H.K.; Lee, T.; Yun, S.H. 2008. A putative pheromone signaling pathway is dispensable for self-fertility in the homothallic ascomycete *Gibberella zeae*. *Fungal Genetics and Biology*, 45: 1188–96.

Kim, H.J.; Min, B.R. 2004. Nucleotide divergence analysis of IGS region in *Fusarium oxysporum* and its *formae speciales* based on the sequence. *Mycobiology*, 32: 119–122.

Leslie, J.F.; Klein, K.K. 1996. Female fertility and *mating type* effects on effective population size and evolution in filamentous fungi. *Genetics*, 144: 557–567.

Leslie, J.F.; Summerell, B.A. 2006. *The Fusarium laboratory manual*. Malden, Blackwell, 387p.

Lombarad, L.; Bogale, M.; Montenegro, F.; Wingfield, B.D.E.; Wingfield, M. J. 2008. A new bark canker disease of the tropical harswood tree *Cedrelinga cateniformis* in Ecuador. *Fungal Diversity*, 31: 73–81.

Mansuetus, A.S.B.; Odvody G.N.; Frederiksen, R.A.; Leslie, J.F. 1997. Biological species in the *Gibberella fujikuroi* species complex (*Fusarium* section Liseola) recovered from sorghum in Tanzania. *Mycological Research*, 101: 815–820.

- Martin, S.H.; Wingfield, B.D.; Wingfield, M.J.; Steenkamp, E.T. 2011. Structure and evolution of the *Fusarium* mating type locus: new insights from the *Gibberella fujikuroi* complex. *Fungal Genetics and Biology*, 48: 731–740.
- McDonald, B.A.; Linde, C. 2002. Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. *Institute of Plant Sciences, Plant Pathology Group, Federal Institute of Technology, ETH-Zentrum, LFW, CH-8092 Zürich, Switzerland*. 40: 349–379.
- Metzenberg, R.L.; Glass, N.L. 2005. *Mating type* and mating strategies in *Neurospora*. *Bioessays*, 12: 53–59.
- Milgroom, M.G.; Peever, T.L. 2003. Population biology of plant pathogens: the synthesis of plant disease epidemiology and population genetics. *Plant Disease*, 87: 608–617.
- Nascimento Filho, F.J. 2000. Novos clones de guaranazeiro para o estado do Amazonas. In: *Recomendações técnicas*. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, nº8, nov., p. 1–3.
- Nascimento Filho, F.J.; Atroch, A.L. 2002. Guaranazeiro. In: Brukner, C.H. (Ed.). *Melhoramento de fruteiras tropicais*. Viçosa: UFV, p.291–307.
- Nauta, M.J.; Hoekstra, R. F. 1992. Evolution of reproductive systems in filamentous ascomycetes. II. Evolution of hermaphroditism and other reproductive strategies. *Heredity*, 68: 537–546.
- O'Dea, J.A. 2003. Consumption of nutritional supplements among adolescents: usage and perceived benefits. *Health Education Research*. 18:98–107.
- O'Donnell, K.; Cigelnik, E.; Nirenberg, H.I. 1998. Molecular systematics and phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia*, 90: 465–93.

O'Donnell, K. 2000. Molecular phylogeny of the *Nectria haematococca-Fusarium solani* species complex. *Mycologia*, 92 (5): 919–938.

O'Donnell, K.; Ward, T.J.; Geiser, D.M.; Kistler, H.C.; Aoki, T. 2004. Genealogical concordance between the *mating-type* locus and seven other nuclear genes supports formal recognition of nine phylogenetically distinct species within the *Fusarium graminearum* clade. *Fungal Genetics and Biology*, 41: 600–623.

O'Donnell, K.; Rooney, A.P.; Proctor H.R.; Brown, W.D.; McCormick, S.P.; Ward, T.J.; Rasmus, J.N.; Frandsen, R.J.N.; Lysoe, E.; Rehner, S.A.; Aoki, T.; Robert, V.A.R.G.; Crous, P.W.; Groenewald, J.Z.; Kang, S.; Geiser, D.M. 2013. Phylogenetic analyses of RPB1 and RPB2 support a middle Cretaceous origin for a clade comprising all agriculturally and medically important fusaria. *Fungal Genetics and Biology*, 52: 20–31.

Oliveira, C.H.; Moraes, M.E.; Moraes, M.O.; Bezerra, F.A.; Abib, E.; De Nucci, G. 2005. Clinical toxicology study of an herbal medicinal extract of *Paullinia cupana*, *Trichilia catigua*, *Ptychopetalum olacoides* and *Zingiber officinale* (Catuama) in healthy volunteers. *Phytotherapy Research*. 19:54–57.

Pereira, J.C.R. 2005. Cultura do guaranazeiro no Amazonas. 4. Ed. Manaus: *Embrapa Amazônia Ocidental*, 40 p. (Embrapa Amazônia Ocidental. Sistemas de Produção; 2).

Pereira, J.C.R.; Araújo, J.C.A.; Nascimento Filho, F.J.; Atroch, A.L.; Gasparotto, L.; Arruda, M.R.; L.P. Santos. 2007. Avaliação da resistência à antracnose em clones de Guaranazeiro. *Pesquisa com guaranazeiro na Embrapa Amazônia Ocidental: Status atual e perspectivas*. Embrapa Amazônia Ocidental, 39p.

Ploetz, R.C. 2006. *Fusarium* wilt of banana is caused by several pathogens referred to as *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. *Phytopathology*. 96: 653–6.

Pöggeler, S.; Kück, U. 2000. Comparative analysis of mating-type loci from *Neurospora crassa* and *Sordaria macrospora*: identification of novel transcribed ORFs. *Molecular and General Genetics*, 263: 292–301.

Poletto, I.; Muniz, M.F.B.; Ceconi, D.E.; Santin, D.; Deconto, M.N.; Blume, E.W. 2006. Zoneamento e identificação de *Fusarium* spp. Causadores de podridão de raízes em plantios de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.) na região do vale do Taquari. *Ciência Florestal*, 16 (1): 1–10.

Qi, Y.-X.; Pu, J.-J.; Zhang, X.; Zhang, H.; Lu, Y.; Yu, Q.-F.; Zhang, H.-Q.; Xie, Y.-X. 2013. First Report of Dieback of Mango Caused by *Fusarium decemcellulare* in China. *Journal of Phytopathology*, 161: 735–738.

Ray, S.; Phadke, S.; Patel, C.; Hackman, R.M.; Stohs, S. 2005. Short-term and long-term *in vivo* exposure to an ephedra- and caffeine containing metabolic nutrition system does not induce cardiotoxicity in B6C3F1 mice. *Archives of Toxicology*. 79:330–340.

Rossmann, A.Y.; Samuels, G.J.; Rogerson, C.T.; Lowen, R. 1999. Genera of *Bionectriaceae*, *Hypocreaceae* and *Nectriaceae* (*Hypocreales*, *Ascomycetes*). *Studies Mycology*, 42 (3): 134–137.

Rossmann, A.Y.; McKemy, J.M.; Pardo-Schultze, R.A.; Schroers, H.J. 2001. Molecular studies of the bionectriaceae using large subunit rDNA sequences. *Mycologia*, 93 (1): 100–110.

Santos, A.V.P.; Sacramento, C.K. 1983. Aplicação da Cultura de Tecidos na Propagação clonal do Guaranazeiro. *Simpósio Brasileiro do Guaraná*, EMBRAPA-UEPAE, Manaus, p.237–9.

Schulz, B.; Boyle, C. 2005. The endophyte continuum. *Mycological Research*. 109: 661-686.

Sfalsin, E. 2012. *Caracterização morfológica e molecular de Fusarium decemcellulare agente etiológico da galha-floral do cacaueiro*. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Lavras – UFLA, Lavras, Minas Gerais, 33p.

Steenkamp, E.T.; Wingfield, B.D.; Coutinho, T.A.; Zeller, K.A.; Wingfield, M.J.; Marasas, W.F.O.; Leslie, J.F. 2000. PCR-based identification of MAT-1 and MAT-2 in the *Giberella fujikuroi* species complex. *Applied and Environmental Microbiology*, 66 (10): 4378–4382.

Summerell, B.; Laurence, M.H.; Liew, E.C.Y.; Leslie, J.F. 2010. Biogeography and phylogeography of *Fusarium*: a review. *Fungal Diversity*, 44 (1): 3–13.

Tamura, K.; Peterson, D.; Peterson, N.; Stecher, G.; Nei, M.; Kumar, S. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28: 2731–2739.

Thompson, J.D.; Higgins, D.G.; Gibson, T.J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22: 4673–4680.

Turgeon, B.G. 1998. Application of *mating type* gene technology to problems in fungal biology. *Annual Review of Phytopathology*. 36:115–137.

Venturini, G.; Assante, G.; Toffolatti, S.L.; Vercesi, A. 2011. Mating behavior of a Northern Italian population of *Fusarium verticillioides* associated with maize. *Applied and Environmental Microbiology*, 52: 367–370.

Vidal, M.S.C. 2005. (Coord.). Diagnóstico socioeconômico da cultura do guaraná. Maués: Prefeitura Municipal: IDAM: AmBev, 83p.

Yun, S.H.; Berbee, M.L.; Yoder, O.C.; Turgeon, B.G. 1999. Evolution of the fungal selffertile reproductive life style from self-sterile ancestors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 96: 5592–5597.

Yun, S-H.; Arie, T.; Kaneko, I.; Yoder, O.C.; Turgeon, B.G. 2000. Molecular organization of mating type loci in heterothallic, homothallic and asexual *Gibberella/Fusarium* species. *Fungal Genetics and Biology*, 31: 7–20.

Wright, S. 1931. Evolution in Mendelian Populations. *Genetics*, 16: 97–159.

Zhan, J.; Torriani, S.F.F.; McDonald, B.A. 2007. Significant difference in pathogenicity between MAT1-1 and MAT1-2 isolates in the wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola*. *Fungal Genetics and Biology*, 44: 339–346.

8. ANEXOS

ANEXO A – Lista de isolados de *Fusarium decemcellulare* obtidos de superbrotaamento de guaranazeiro coletados nos municípios produtores no Estado do Amazonas para o proposto estudo.

ISOLADOS	LOCAL DE COLETA	SINTOMA NA PLANTA	MATING TYPE	COORDENADAS
F08	MAUÉS	HIPERTROFIA FLORAL	MAT-1	S 03° 23' 52,6'' / W 57° 40' 33,7''
F09	MAUÉS	HIPERTROFIA FLORAL	MAT-1	S 03° 23' 52,6'' / W 57° 40' 33,7''
F10	MAUÉS	HIPERTROFIA FLORAL	MAT-2	S 03° 23' 52,6'' / W 57° 40' 33,7''
F11	MAUÉS	HIPERPLASIA DA GEMA VEGETATIVA	MAT-1	S 03° 23' 52,6'' / W 57° 40' 33,7''
F12	MAUÉS	HIPERPLASIA DA GEMA VEGETATIVA	MAT-1	S 03° 23' 52,6'' / W 57° 40' 33,7''
F13	MAUÉS	HIPERPLASIA DA GEMA VEGETATIVA	MAT-1	S 03° 23' 52,6'' / W 57° 40' 33,7''
F14	MAUÉS	HIPERTROFIA FLORAL	MAT-1	S 03° 23' 52,6'' / W 57° 40' 33,7''
F16	MAUÉS	HIPERPLASIA DA GEMA VEGETATIVA	MAT-1	S 03° 23' 52,6'' / W 57° 40' 33,7''
F17	MAUÉS	HIPERPLASIA DA GEMA VEGETATIVA	MAT-2	S 03° 23' 52,6'' / W 57° 40' 33,7''
F18	MAUÉS	HIPERPLASIA DA GEMA VEGETATIVA	MAT-2	S 03° 23' 52,6'' / W 57° 40' 33,7''
F19	MAUÉS	HIPERTROFIA FLORAL	MAT-2	S 03° 23' 52,6'' / W 57° 40' 33,7''
F20	MAUÉS	HIPERPLASIA DA GEMA VEGETATIVA	MAT-2	S 03° 23' 52,6'' / W 57° 40' 33,7''
F21	MAUÉS	HIPERPLASIA DA GEMA VEGETATIVA	MAT-1	S 03° 23' 52,6'' / W 57° 40' 33,7''
F23	MAUÉS	HIPERTROFIA FLORAL	MAT-1	S 03° 23' 52,6'' / W 57° 40' 33,7''
F24	MAUÉS	HIPERTROFIA FLORAL	MAT-1	S 03° 23' 52,6'' / W 57° 40' 33,7''
F25	MAUÉS	HIPERPLASIA DA GEMA VEGETATIVA	MAT-2	S 03° 23' 52,6'' / W 57° 40' 33,7''
F27	MAUÉS	HIPERTROFIA FLORAL	MAT-2	S 03° 23' 52,6'' / W 57° 40' 33,7''
F48	MAUÉS	HIPERPLASIA DA GEMA VEGETATIVA	MAT-2	S 03° 23' 52,6'' / W 57° 40' 33,7''

F50	MAUÉS	HIPERPLASIA DA GEMA VEGETATIVA	MAT-1	S 03° 23' 52,6'' / W 57° 40' 33,7''
F51	MAUÉS	HIPERPLASIA DA GEMA VEGETATIVA	MAT-1	S 03° 23' 52,6'' / W 57° 40' 33,7''
F52	MAUÉS	HIPERPLASIA DA GEMA VEGETATIVA	MAT-2	S 03° 23' 52,6'' / W 57° 40' 33,7''
F173	MAUÉS	HIPERTROFIA FLORAL	MAT-2	S 03° 23' 52,6'' / W 57° 40' 33,7''
F174	MAUÉS	HIPERPLASIA DA GEMA VEGETATIVA	MAT-1	S 03° 23' 52,6'' / W 57° 40' 33,7''
F175	MAUÉS	HIPERTROFIA FLORAL	MAT-1	S 03° 23' 52,6'' / W 57° 40' 33,7''
F176	MAUÉS	HIPERTROFIA FLORAL	MAT-2	S 03° 23' 52,6'' / W 57° 40' 33,7''
F177	MAUÉS	HIPERPLASIA DA GEMA VEGETATIVA	MAT-1	S 03° 23' 52,6'' / W 57° 40' 33,7''
F178	MAUÉS	FOLHA	MAT-2	S 03° 23' 52,6'' / W 57° 40' 33,7''
F179	MAUÉS	HIPERTROFIA FLORAL	MAT-1	S 03° 23' 52,6'' / W 57° 40' 33,7''
F180	MAUÉS	HIPERPLASIA DA GEMA VEGETATIVA	MAT-1	S 03° 23' 52,6'' / W 57° 40' 33,7''
F181	MAUÉS	HIPERTROFIA FLORAL	MAT-1	S 03° 23' 52,6'' / W 57° 40' 33,7''
F182	MAUÉS	HIPERPLASIA DA GEMA VEGETATIVA	MAT-1	S 03° 23' 52,6'' / W 57° 40' 33,7''
F183	MAUÉS	FOLHA	MAT-1	S 03° 23' 52,6'' / W 57° 40' 33,7''
F184	MAUÉS	HIPERTROFIA FLORAL	MAT-2	S 03° 23' 52,6'' / W 57° 40' 33,7''
F185	MAUÉS	HIPERPLASIA DA GEMA VEGETATIVA	MAT-1	S 03° 23' 52,6'' / W 57° 40' 33,7''
F187	MAUÉS	HIPERTROFIA FLORAL	MAT-1	S 03° 23' 16,8'' / W 57° 41' 02,3''
F189	MAUÉS	HIPERPLASIA DA GEMA VEGETATIVA	MAT-1	S 03° 23' 16,8'' / W 57° 41' 02,3''
F190	MAUÉS	HIPERTROFIA FLORAL	MAT-2	S 03° 23' 16,8'' / W 57° 41' 02,3''
F191	MAUÉS	HIPERPLASIA DA GEMA VEGETATIVA	MAT-1	S 03° 23' 16,8'' / W 57° 41' 02,3''
F192	MAUÉS	HIPERTROFIA FLORAL	MAT-1	S 03° 23' 16,8'' / W 57° 41' 02,3''
F193	MAUÉS	HIPERPLASIA DA GEMA VEGETATIVA	MAT-1	S 03° 23' 16,8'' / W 57° 41' 02,3''
F194	MAUÉS	HIPERPLASIA DA GEMA VEGETATIVA	MAT-1	S 03° 23' 16,8'' / W 57° 41' 02,3''
F195	MAUÉS	HIPERPLASIA DA GEMA VEGETATIVA	MAT-2	S 03° 23' 16,8'' / W 57° 41' 02,3''
F197	MAUÉS	HIPERPLASIA DA GEMA VEGETATIVA	MAT-1	S 03° 22' 03,9'' / W 57° 42' 18,6''
F198	MAUÉS	HIPERPLASIA DA GEMA VEGETATIVA	MAT-1	S 03° 22' 03,9'' / W 57° 42' 18,6''
F199	MAUÉS	GALHA	MAT-1	S 03° 22' 03,9'' / W 57° 42' 18,6''

F200	MAUÉS	HIPERTROFIA FLORAL	MAT-2	S 03° 24' 0,6'' / W 57° 40' 35''
F201	MAUÉS	HIPERPLASIA DA GEMA VEGETATIVA	MAT-2	S 03° 24' 0,6'' / W 57° 40' 35''
F202	MAUÉS	HIPERPLASIA DA GEMA VEGETATIVA	MAT-2	S 03° 24' 0,6'' / W 57° 40' 35''
F203	MAUÉS	HIPERPLASIA DA GEMA VEGETATIVA	MAT-2	S 03°23' 53,1'' / W 57° 40' 34,2''
F204	MAUÉS	HIPERTROFIA FLORAL	MAT-2	S 03°23' 53,1'' / W 57° 40' 34,2''
F205	MAUÉS	HIPERTROFIA FLORAL	MAT-2	S 03° 21' 05,6'' / W 57° 42' 21,4''
F206	MAUÉS	GALHA	MAT-2	S 03° 21' 05,6'' / W 57° 42' 21,4''
F207	MAUÉS	GALHA	MAT-2	S 03° 22' 21,7'' / W 57° 42' 03,0''
F208	BOA VISTA DO RAMOS	GALHA	MAT-1	S - 3º 03' 44,0" / W - 57º 33,0' 19,5"
F209	BOA VISTA DO RAMOS	HIPERTROFIA FLORAL	MAT-1	S - 3º 03' 44,0" / W - 57º 33,0' 19,5"
F210	BOA VISTA DO RAMOS	HIPERTROFIA FLORAL	MAT-1	S - 3º 03' 44,0" / W - 57º 33,0' 19,5"
F211	BOA VISTA DO RAMOS	HIPERTROFIA FLORAL	MAT-1	S - 3º 03' 44,0" / W - 57º 33,0' 19,5"
F212	BOA VISTA DO RAMOS	HIPERTROFIA FLORAL	MAT-1	S - 3º 03' 44,0" / W - 57º 33,0' 19,5"
F213	BOA VISTA DO RAMOS	HIPERPLASIA DA GEMA VEGETATIVA	MAT-1	S - 3º 03' 44,0" / W - 57º 33,0' 19,5"
F214	BOA VISTA DO RAMOS	HIPERPLASIA DA GEMA VEGETATIVA	MAT-1	S - 3º 03' 44,0" / W - 57º 33,0' 19,5"
F215	BOA VISTA DO RAMOS	HIPERPLASIA DA GEMA VEGETATIVA	MAT-1	S - 3º 03' 44,0" / W - 57º 33,0' 19,5"
F216	BOA VISTA DO RAMOS	HIPERPLASIA DA GEMA VEGETATIVA	MAT-1	S - 3º 03' 44,0" / W - 57º 33,0' 19,5"
F217	BOA VISTA DO RAMOS	HIPERTROFIA FLORAL	MAT-1	S - 3º 03' 53,7" / W - 57º 33,0' 15,3"
F218	BOA VISTA DO RAMOS	HIPERPLASIA DA GEMA VEGETATIVA	MAT-1	S - 3º 03' 53,7" / W - 57º 33,0' 15,3"
F219	BOA VISTA DO RAMOS	HIPERTROFIA FLORAL	MAT-2	S - 3º 03' 53,7" / W - 57º 33,0' 15,3"
F220	BOA VISTA DO RAMOS	HIPERPLASIA DA GEMA VEGETATIVA	MAT-1	S - 3º 03' 53,7" / W - 57º 33,0' 15,3"
F221	BOA VISTA DO RAMOS	HIPERTROFIA FLORAL	MAT-1	S - 3º 03' 55,2" / W - 57º 33,0' 12,2"
F222	BOA VISTA DO RAMOS	HIPERTROFIA DA GALHA	MAT-1	S - 3º 03' 55,2" / W - 57º 33,0' 12,2"
F223	BOA VISTA DO RAMOS	HIPERTROFIA FLORAL	MAT-1	S - 3º 03' 55,2" / W - 57º 33,0' 12,2"
F224	BOA VISTA DO RAMOS	HIPERPLASIA DA GEMA VEGETATIVA	MAT-1	S - 3º 03' 55,2" / W - 57º 33,0' 12,2"
F225	BOA VISTA DO RAMOS	GALHA	MAT-1	S - 3º 03' 55,2" / W - 57º 33,0' 12,2"
F226	BOA VISTA DO RAMOS	HIPERTROFIA FLORAL	MAT-1	S - 3º 03' 55,2" / W - 57º 33,0' 12,2"
F227	BOA VISTA DO RAMOS	HIPERTROFIA FLORAL	MAT-2	S - 3º 04' 17,8" / W - 57º 33,0' 09,1"

F228	BOA VISTA DO RAMOS	GALHA	MAT-1	S - 3º 04' 17,8" / W - 57º 33,0' 09,1"
F229	BOA VISTA DO RAMOS	HIPERTROFIA FLORAL	MAT-1	S - 3º 04' 17,8" / W - 57º 33,0' 09,1"
F231	BOA VISTA DO RAMOS	HIPERTROFIA FLORAL	MAT-2	S - 3º 04' 17,8" / W - 57º 33,0' 09,1"
F232	BOA VISTA DO RAMOS	HIPERTROFIA FLORAL	MAT-2	S - 3º 04' 17,8" / W - 57º 33,0' 09,1"
F233	BOA VISTA DO RAMOS	GALHA	MAT-1	S - 3º 04' 17,8" / W - 57º 33,0' 09,1"
F234	BOA VISTA DO RAMOS	HIPERTROFIA FLORAL	MAT-2	S - 2º 55' 50,8" / W - 57º 32,0' 33,7"
F235	BOA VISTA DO RAMOS	HIPERPLASIA DA GEMA VEGETATIVA	MAT-2	S - 2º 55' 50,8" / W - 57º 32,0' 33,7"
F236	BOA VISTA DO RAMOS	HIPERPLASIA DA GEMA VEGETATIVA	MAT-2	S - 2º 55' 50,8" / W - 57º 32,0' 33,7"
F237	BOA VISTA DO RAMOS	HIPERPLASIA DA GEMA VEGETATIVA	MAT-2	S - 2º 55' 51,0" / W - 57º 32,0' 30,5"
F238	BOA VISTA DO RAMOS	HIPERPLASIA DA GEMA VEGETATIVA	MAT-1	S - 2º 55' 51,0" / W - 57º 32,0' 30,5"
F239	BOA VISTA DO RAMOS	HIPERPLASIA DA GEMA VEGETATIVA	MAT-2	S - 2º 55' 51,0" / W - 57º 32,0' 30,5"
F240	BOA VISTA DO RAMOS	HIPERPLASIA DA GEMA VEGETATIVA	MAT-1	S - 2º 55' 51,0" / W - 57º 32,0' 30,5"
F241	BOA VISTA DO RAMOS	HIPERPLASIA DA GEMA VEGETATIVA	MAT-2	S - 2º 55' 51,0" / W - 57º 32,0' 30,5"
F242	BOA VISTA DO RAMOS	HIPERPLASIA DA GEMA VEGETATIVA	MAT-2	S - 2º 55' 52,6" / W - 57º 30,0' 06,9"
F243	BOA VISTA DO RAMOS	GALHA	MAT-2	S - 2º 55' 52,6" / W - 57º 30,0' 06,9"
F244	BOA VISTA DO RAMOS	HIPERPLASIA DA GEMA VEGETATIVA	MAT-2	S - 2º 55' 52,6" / W - 57º 30,0' 06,9"
F245	ITACOATIARA	HIPERPLASIA DA GEMA VEGETATIVA	MAT-1	S - 3º 07' 25,0" / W - 58º 43,0' 20,9"
F246	ITACOATIARA	HIPERTROFIA FLORAL	MAT-1	S - 3º 07' 25,0" / W - 58º 43,0' 20,9"
F249	ITACOATIARA	HIPERTROFIA FLORAL	MAT-2	S - 3º 07' 25,0" / W - 58º 43,0' 20,9"
F250	ITACOATIARA	HIPERTROFIA FLORAL	MAT-1	S - 3º 07' 25,0" / W - 58º 43,0' 20,9"
F251	ITACOATIARA	GALHA	MAT-1	S - 3º 07' 13,8" / W - 58º 49,0' 18,6"
F252	ITACOATIARA	HIPERTROFIA DA GALHA	MAT-1	S - 3º 07' 13,8" / W - 58º 49,0' 18,6"
F253	ITACOATIARA	HIPERPLASIA DA GEMA VEGETATIVA	MAT-1	S - 3º 07' 13,8" / W - 58º 49,0' 18,6"
F254	ITACOATIARA	GALHA	MAT-1	S - 3º 07' 13,8" / W - 58º 49,0' 18,6"
F255	ITACOATIARA	HIPERPLASIA DA GEMA VEGETATIVA	MAT-2	S - 3º 07' 13,8" / W - 58º 49,0' 18,6"
F257	ITACOATIARA	HIPERPLASIA DA GEMA VEGETATIVA	MAT-2	S - 3º 07' 13,8" / W - 58º 49,0' 18,6"
F258	ITACOATIARA	HIPERTROFIA FLORAL	MAT-1	S - 3º 07' 13,8" / W - 58º 49,0' 18,6"
F259	ITACOATIARA	HIPERTROFIA FLORAL	MAT-2	S - 3º 06' 43,3" / W - 58º 32,0' 22,7"

F260	ITACOATIARA	HIPERTROFIA FLORAL	MAT-2	S - 3º 06' 43,3" / W - 58º 32,0' 22,7"
F261	ITACOATIARA	HIPERTROFIA FLORAL	MAT-2	S - 3º 06' 43,3" / W - 58º 32,0' 22,7"
F262	ITACOATIARA	HIPERPLASIA DA GEMA VEGETATIVA	MAT-2	S - 3º 06' 43,3" / W - 58º 32,0' 22,7"
F263	ITACOATIARA	HIPERTROFIA FLORAL	MAT-2	S - 3º 06' 43,3" / W - 58º 32,0' 22,7"
F265	ITACOATIARA	HIPERTROFIA FLORAL	MAT-1	S - 3º 06' 43,3" / W - 58º 32,0' 22,7"
F266	ITACOATIARA	HIPERTROFIA FLORAL	MAT-2	S - 3º 06' 43,3" / W - 58º 32,0' 22,7"
F267	ITACOATIARA	GALHA	MAT-2	S - 3º 06' 43,3" / W - 58º 32,0' 22,7"
F269	BOA VISTA DO RAMOS	HIPERTROFIA FLORAL	MAT-1	S - 3º 03' 44,0" / W - 57º 33,0' 19,5"
F270	ITAPIRANGA	HIPERTROFIA FLORAL	MAT-1	S - 2º 43' 35,4" / W - 58º 06' 02,2"
F271	ITAPIRANGA	HIPERTROFIA FLORAL	MAT-2	S - 2º 43' 35,4" / W - 58º 06' 02,2"
F272	ITAPIRANGA	HIPERTROFIA FLORAL	MAT-1	S - 2º 43' 35,4" / W - 58º 06' 02,2"
F273	ITAPIRANGA	HIPERTROFIA FLORAL	MAT-2	S - 2º 43' 35,4" / W - 58º 06' 02,2"
F274	URUCARÁ	HIPERTROFIA FLORAL	MAT-1	S - 2º 26' 05,9" / W - 57º 45' 32,1"
F275	URUCARÁ	HIPERTROFIA FLORAL	MAT-2	S - 2º 26' 05,9" / W - 57º 45' 32,1"
F277	URUCARÁ	HIPERTROFIA FLORAL	MAT-1	S - 2º 26' 05,9" / W - 57º 45' 32,1"
F278	URUCARÁ	HIPERTROFIA FLORAL	MAT-1	S - 2º 25' 54" / W - 57º 44' 34,6"
F279	URUCARÁ	HIPERTROFIA FLORAL	MAT-1	S - 2º 26' 11,9" / W - 57º 45' 28,5"
F280	URUCARÁ	HIPERTROFIA FLORAL	MAT-2	S - 2º 26' 11,9" / W - 57º 45' 28,5"
F282	URUCARÁ	HIPERPLASIA DA GEMA VEGETATIVA	MAT-2	S - 2º 26' 11,9" / W - 57º 45' 28,5"
F284	URUCARÁ	HIPERPLASIA DA GEMA VEGETATIVA	MAT-1	S - 2º 26' 9,0" / W - 57º 45' 3,0"
F285	URUCARÁ	HIPERPLASIA DA GEMA VEGETATIVA	MAT-1	S - 2º 27' 19,2" / W - 57º 44' 29,1"
F286	URUCARÁ	HIPERTROFIA FLORAL	MAT-1	S - 2º 27' 19,2" / W - 57º 44' 29,1"
F287	URUCARÁ	HIPERPLASIA DA GEMA VEGETATIVA	MAT-1	S - 2º 27' 19,2" / W - 57º 44' 29,1"
F288	URUCARÁ	HIPERTROFIA FLORAL	MAT-2	S - 2º 27' 33,9" / W - 57º 44' 11,8"
F290	URUCARÁ	HIPERPLASIA DA GEMA VEGETATIVA	MAT-2	S - 2º 27' 33,9" / W - 57º 44' 11,8"
F291	URUCARÁ	HIPERTROFIA FLORAL	MAT-2	S - 2º 31' 11,1" / W - 57º 43' 06,8"
F292	URUCARÁ	HIPERTROFIA FLORAL	MAT-2	S - 2º 31' 11,1" / W - 57º 43' 06,8"
F293	URUCARÁ	HIPERPLASIA DA GEMA VEGETATIVA	MAT-2	S - 2º 30' 45,1" / W - 57º 42' 46,1"

F297	URUCARÁ	HIPERPLASIA DA GEMA VEGETATIVA	MAT-2	S - 2º 30' 45,2" / W - 57º 42' 46,3"
F298	URUCARÁ	HIPERPLASIA DA GEMA VEGETATIVA	MAT-2	S - 2º 30' 45,2" / W - 57º 42' 46,3"
F299	URUCARÁ	HIPERPLASIA DA GEMA VEGETATIVA	MAT-2	S - 2º 30' 45,5" / W - 57º 42' 46,6"
F300	URUCARÁ	HIPERTROFIA FLORAL	MAT-2	S - 2º 30' 45,5" / W - 57º 42' 46,6"
F301	URUCARÁ	HIPERPLASIA DA GEMA VEGETATIVA	MAT-2	S - 2º 30' 45,5" / W - 57º 42' 46,6"
F302	URUCARÁ	HIPERPLASIA DA GEMA VEGETATIVA	MAT-2	S - 2º 30' 45,5" / W - 57º 42' 46,6"
F303	URUCARÁ	HIPERPLASIA DA GEMA VEGETATIVA	MAT-2	S - 2º 30' 45,5" / W - 57º 42' 46,6"
F304	URUCARÁ	HIPERTROFIA FLORAL	MAT-1	S - 2º 29' 02,1" / W - 57º 43' 42,4"
F305	URUCARÁ	HIPERPLASIA DA GEMA VEGETATIVA	MAT-1	S - 2º 29' 02,1" / W - 57º 43' 42,4"
F306	URUCARÁ	HIPERTROFIA FLORAL	MAT-1	S - 2º 29' 02,1" / W - 57º 43' 42,4"
F307	URUCARÁ	HIPERPLASIA DA GEMA VEGETATIVA	MAT-1	S - 2º 29' 02,1" / W - 57º 43' 42,4"
F308	URUCARÁ	GALHA	MAT-2	S - 2º 29' 02,1" / W - 57º 43' 42,4"
F311	S. SEB. DO UATUMÃ	HIPERTROFIA FLORAL	MAT-2	S - 2º 35' 35,7" / W - 58º 01' 39,6"
F312	S. SEB. DO UATUMÃ	HIPERPLASIA DA GEMA VEGETATIVA	MAT-2o	S - 2º 35' 35,7" / W - 58º 01' 39,6"
F313	S. SEB. DO UATUMÃ	HIPERPLASIA DA GEMA VEGETATIVA	MAT-1	S - 2º 35' 35,7" / W - 58º 01' 39,6"
F314	S. SEB. DO UATUMÃ	HIPERPLASIA DA GEMA VEGETATIVA	MAT-2	S - 2º 33' 40,1" / W - 58º 00' 31,2"
F315	S. SEB. DO UATUMÃ	HIPERPLASIA DA GEMA VEGETATIVA	MAT-2	S - 2º 33' 40,1" / W - 58º 00' 31,2"
F316	S. SEB. DO UATUMÃ	HIPERPLASIA DA GEMA VEGETATIVA	MAT-1	S - 2º 33' 40,1" / W - 58º 00' 31,2"
F317	S. SEB. DO UATUMÃ	HIPERPLASIA DA GEMA VEGETATIVA	MAT-1	S - 2º 33' 40,1" / W - 58º 00' 31,2"
F318	S. SEB. DO UATUMÃ	HIPERTROFIA FLORAL	MAT-1	S - 2º 33' 40,1" / W - 58º 00' 31,2"
F319	S. SEB. DO UATUMÃ	HIPERPLASIA DA GEMA VEGETATIVA	MAT-2	S - 2º 34' 14,2" / W - 58º 59' 35,3"
F320	S. SEB. DO UATUMÃ	HIPERPLASIA DA GEMA VEGETATIVA	MAT-2	S - 2º 34' 14,2" / W - 58º 59' 35,3"
F321	S. SEB. DO UATUMÃ	HIPERPLASIA DA GEMA VEGETATIVA	MAT-1	S - 2º 34' 14,2" / W - 58º 59' 35,3"
F322	URUCARÁ	HIPERPLASIA DA GEMA VEGETATIVA	MAT-2	S - 2º 26' 05,9" / W - 57º 45' 32,1"
F323	URUCARÁ	HIPERPLASIA DA GEMA VEGETATIVA	MAT-2	S - 2º 27' 33,9" / W - 57º 44' 11,8"
F324	URUCARÁ	HIPERPLASIA DA GEMA VEGETATIVA	MAT-1	S - 2º 30' 45,1" / W - 57º 42' 46,1"
F327	URUCARÁ	HIPERPLASIA DA GEMA VEGETATIVA	MAT-2	S - 2º 27' 19,2" / W - 57º 44' 29,1"
F330	URUCARÁ	HIPERTROFIA FLORAL	MAT-1	S - 2º 26' 05,9" / W - 57º 45' 32,1"

F331	URUCARÁ	HIPERTROFIA FLORAL	MAT-1	S - 2º 31' 11,1" / W - 57º 43' 06,8"
F332	S. SEB. DO UATUMÃ	HIPERTROFIA FLORAL	MAT-1	S - 2º 33' 40,1" / W - 58º 00' 31,2"
F333	S. SEB. DO UATUMÃ	HIPERPLASIA DA GEMA VEGETATIVA	MAT-2	S - 2º 33' 40,1" / W - 58º 00' 31,2"
F334	S. SEB. DO UATUMÃ	HIPERTROFIA FLORAL	MAT-1	S - 2º 34' 14,2" / W - 58º 59' 35,3"
F335	RIO PRETO DA EVA	HIPERPLASIA DA GEMA VEGETATIVA	MAT-1	S - 2º 54' 51,9" / W - 59º 28' 55,6"
F336	RIO PRETO DA EVA	HIPERPLASIA DA GEMA VEGETATIVA	MAT-2	S - 2º 54' 51,9" / W - 59º 28' 55,6"
F337	RIO PRETO DA EVA	HIPERTROFIA FLORAL	MAT-1	S - 2º 54' 16,9" / W - 59º 26' 35,0"
F338	RIO PRETO DA EVA	HIPERPLASIA DA GEMA VEGETATIVA	MAT-2	S - 2º 54' 16,9" / W - 59º 26' 35,0"
F339	RIO PRETO DA EVA	HIPERPLASIA DA GEMA VEGETATIVA	MAT-1	S - 2º 54' 16,9" / W - 59º 26' 35,0"
F340	RIO PRETO DA EVA	HIPERTROFIA FLORAL	MAT-1	S - 2º 54' 16,9" / W - 59º 26' 35,0"
F341	URUCARÁ	HIPERTROFIA FLORAL	MAT-2	S - 2º 26' 9,0" / W - 57º 45' 3,0"
F343	URUCARÁ	HIPERPLASIA DA GEMA VEGETATIVA	MAT-2	S - 2º 27' 33,9" / W - 57º 44' 11,8"
F344	S. SEB. DO UATUMÃ	HIPERTROFIA FLORAL	MAT-1	S - 2º 33' 40,1" / W - 58º 00' 31,2"
F345	S. SEB. DO UATUMÃ	HIPERPLASIA DA GEMA VEGETATIVA	MAT-2	S - 2º 34' 14,2" / W - 58º 59' 35,3"
F350	RIO PRETO DA EVA	HIPERTROFIA FLORAL	MAT-1	S - 2º 54' 51,9" / W - 59º 28' 55,6"
F352	RIO PRETO DA EVA	HIPERTROFIA FLORAL	MAT-1	S - 2º 54' 51,9" / W - 59º 28' 55,6"
F356	RIO PRETO DA EVA	HIPERTROFIA FLORAL	MAT-2	S - 2º 54' 09,1" / W - 59º 26' 39,0"
F358	RIO PRETO DA EVA	GALHA	MAT-1	S - 2º 54' 09,1" / W - 59º 26' 39,0"
F363	RIO PRETO DA EVA	HIPERTROFIA FLORAL	MAT-1	S - 2º 54' 09,1" / W - 59º 26' 39,0"
F366	RIO PRETO DA EVA	HIPERPLASIA DA GEMA VEGETATIVA	MAT-1	S - 2º 54' 16,9" / W - 59º 26' 35,0"
F371	RIO PRETO DA EVA	HIPERPLASIA DA GEMA VEGETATIVA	MAT-1	S - 2º 54' 16,9" / W - 59º 26' 35,0"
F372	RIO PRETO DA EVA	HIPERTROFIA FLORAL	MAT-2	S - 2º 54' 16,9" / W - 59º 26' 35,0"

ANEXO B - Isolados da Coleção do Laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Amazônia Ocidental, coletados na área experimental da Embrapa (Manaus) e município de Presidente Figueiredo (Fazenda Jayoro).

ISOLADOS	LOCAL DE COLETA	SINTOMA NA PLANTA	MATING TYPE
F01	MANAUS	HIPERPLASIA DA GEMA VEGETATIVA	MAT-1
F02	MANAUS	HIPERPLASIA DA GEMA VEGETATIVA	MAT-1
F04	MANAUS	HIPERPLASIA DA GEMA VEGETATIVA	MAT-1
F05	MANAUS	HIPERPLASIA DA GEMA VEGETATIVA	MAT-1
F06	MANAUS	HIPERPLASIA DA GEMA VEGETATIVA	MAT-1
F15	MANAUS	HIPERPLASIA DA GEMA VEGETATIVA	MAT-1
F29	MANAUS	GALHA	MAT-1
F30	MANAUS	GALHA	MAT-1
F54	FAZENDA JAYORO	HIPERTROFIA FLORAL	MAT-2
F55	FAZENDA JAYORO	HIPERTROFIA FLORAL	MAT-2
F57	FAZENDA JAYORO	HIPERPLASIA DA GEMA VEGETATIVA	MAT-1
F60	FAZENDA JAYORO	HIPERPLASIA DA GEMA VEGETATIVA	MAT-1
F61	FAZENDA JAYORO	HIPERPLASIA DA GEMA VEGETATIVA	MAT-2
F62	FAZENDA JAYORO	HIPERPLASIA DA GEMA VEGETATIVA	MAT-1
F63	MANAUS	HIPERPLASIA DA GEMA VEGETATIVA	MAT-2
F64	MANAUS	HIPERPLASIA DA GEMA VEGETATIVA	MAT-2
F67	MANAUS	HIPERPLASIA DA GEMA VEGETATIVA	MAT-1
F68	MANAUS	HIPERPLASIA DA GEMA VEGETATIVA	MAT-1
F69	MANAUS	HIPERPLASIA DA GEMA VEGETATIVA	MAT-2
F72	MANAUS	HIPERPLASIA DA GEMA VEGETATIVA	MAT-1
F76	MANAUS	HIPERTROFIA FLORAL	MAT-2
F77	MANAUS	HIPERTROFIA FLORAL	MAT-1
F78	MANAUS	HIPERTROFIA FLORAL	MAT-2

F80	MANAUS	HIPERTROFIA FLORAL	MAT-1
F82	MANAUS	HIPERTROFIA FLORAL	MAT-2
F83	MANAUS	HIPERTROFIA FLORAL	MAT-2
F84	MANAUS	HIPERTROFIA FLORAL	MAT-1
F85	MANAUS	HIPERTROFIA FLORAL	MAT-1
F87	MANAUS	HIPERTROFIA FLORAL	MAT-1
F90	MANAUS	HIPERPLASIA DA GEMA VEGETATIVA	MAT-2
F91	MANAUS	HIPERPLASIA DA GEMA VEGETATIVA	MAT-2
F92	MANAUS	HIPERPLASIA DA GEMA VEGETATIVA	MAT-1
F94	MANAUS	HIPERPLASIA DA GEMA VEGETATIVA	MAT-2
F95	MANAUS	GALHA	MAT-2
F97	MANAUS	GALHA	MAT-1
F98	MANAUS	GALHA	MAT-1
F99	MANAUS	GALHA	MAT-1
F101	MANAUS	GALHA	MAT-1
F102	MANAUS	GALHA	MAT-1
F103	MANAUS	GALHA	MAT-1
F104	MANAUS	GALHA	MAT-1
F105	MANAUS	GALHA	MAT-1
F106	MANAUS	GALHA	MAT-1
F107	MANAUS	GALHA	MAT-1
F108	MANAUS	GALHA	MAT-1
F109	MANAUS	GALHA	MAT-1
F111	MANAUS	GALHA	MAT-1
F112	MANAUS	GALHA	MAT-1
F113	MANAUS	GALHA	MAT-1
F114	MANAUS	GALHA	MAT-1
F115	MANAUS	GALHA	MAT-1

F116	MANAUS	GALHA	MAT-1
F117	MANAUS	GALHA	MAT-1
F118	MANAUS	GALHA	MAT-1
F119	MANAUS	GALHA	MAT-1
F120	MANAUS	GALHA	MAT-1
F121	MANAUS	GALHA	MAT-1
F125	MANAUS	GALHA	MAT-1
F126	MANAUS	GALHA	MAT-1
F127	MANAUS	GALHA	MAT-1
F128	MANAUS	GALHA	MAT-1
F129	MANAUS	GALHA	MAT-1
F130	MANAUS	GALHA	MAT-1
F131	MANAUS	GALHA	MAT-1
F132	MANAUS	HIPERPLASIA DA GEMA VEGETATIVA	MAT-2
F133	MANAUS	HIPERPLASIA DA GEMA VEGETATIVA	MAT-1
F134	MANAUS	HIPERPLASIA DA GEMA VEGETATIVA	MAT-1
F135	MANAUS	HIPERPLASIA DA GEMA VEGETATIVA	MAT-1
F136	MANAUS	GALHA	MAT-1
F137	MANAUS	GALHA	MAT-1
F138	MANAUS	GALHA	MAT-1
F139	MANAUS	GALHA	MAT-1
F140	MANAUS	HIPERTROFIA FLORAL	MAT-2
F141	MANAUS	HIPERTROFIA FLORAL	MAT-2
F142	MANAUS	HIPERTROFIA FLORAL	MAT-1
F143	MANAUS	HIPERTROFIA FLORAL	MAT-1
F145	MANAUS	HIPERTROFIA FLORAL	MAT-1
F146	MANAUS	HIPERTROFIA FLORAL	MAT-1
F147	MANAUS	HIPERTROFIA FLORAL	MAT-1

F148	MANAUS	HIPERTROFIA FLORAL	MAT-1
F150	MANAUS	HIPERTROFIA FLORAL	MAT-1
F151	MANAUS	HIPERPLASIA DA GEMA VEGETATIVA	MAT-1
F152	MANAUS	HIPERPLASIA DA GEMA VEGETATIVA	MAT-1
F153	MANAUS	HIPERPLASIA DA GEMA VEGETATIVA	MAT-1
F154	MANAUS	HIPERPLASIA DA GEMA VEGETATIVA	MAT-1
F155	MANAUS	HIPERPLASIA DA GEMA VEGETATIVA	MAT-1
F156	MANAUS	HIPERPLASIA DA GEMA VEGETATIVA	MAT-1
F157	MANAUS	HIPERPLASIA DA GEMA VEGETATIVA	MAT-1
F158	MANAUS	GALHA	MAT-1
F159	MANAUS	GALHA	MAT-1
F160	MANAUS	GALHA	MAT-1
F163	MANAUS	GALHA	MAT-1
F164	MANAUS	GALHA	MAT-1
F165	MANAUS	GALHA	MAT-1
F166	MANAUS	GALHA	MAT-1
F167	MANAUS	GALHA	MAT-1
F168	MANAUS	GALHA	MAT-1
F170	MANAUS	GALHA	MAT-1
F172	MANAUS	GALHA	MAT-1
F398	MANAUS	HIPERPLASIA DA GEMA VEGETATIVA	MAT-1
F399	MANAUS	FOLHA	MAT-2
F400	MANAUS	HIPERPLASIA DA GEMA VEGETATIVA	MAT-1
F401	MANAUS	CAULE	MAT-1
F402	MANAUS	CAULE	MAT-2
F403	MANAUS	CAULE	MAT-2
F404	MANAUS	CAULE	MAT-2
F405	MANAUS	FOLHA	MAT-2

F406	MANAUS	HIPERPLASIA DA GEMA VEGETATIVA	MAT-2
F407	MANAUS	CAULE	MAT-2
F408	MANAUS	CAULE	MAT-2
F409	MANAUS	HIPERPLASIA DA GEMA VEGETATIVA	MAT-2