

Bento Gonçalves, RS / Janeiro, 2025

## Linhagens filogenéticas associadas à fusariose da videira no estado do Rio Grande do Sul

Fabio Rossi Cavalcanti<sup>(1)</sup> e Larissa Castro Ampese<sup>(2)</sup><sup>(1)</sup> Pesquisador, Embrapa Uva e Vinho, Bento Gonçalves, RS. <sup>(2)</sup> Bolsista da Embrapa Uva e Vinho, RS.

**Resumo** – *Fusarium oxysporum* f.sp. *herbemontis* é conhecido como o agente causador da fusariose da videira. Este estudo classificou filogeneticamente linhagens e espécies de *Fusarium* spp., isoladas de videiras sintomáticas e armazenadas na Coleção de Microrganismos de Interesse Agroindustrial da Embrapa Uva e Vinho. Os estudos filogenéticos em fungos são essenciais para entender suas relações evolutivas, classificação taxonômica e diversidade biológica. Através da análise de sequências de DNA, é possível reconstruir a história evolutiva desses organismos, revelando informações cruciais sobre a origem, evolução e ecologia dos fungos, auxiliando em conservação e aplicações biotecnológicas. Usaram-se produtos da amplificação de três *loci* (regiões genômicas) de onze isolados de *Fusarium* spp. para análises filogenéticas. Também foram investigados os padrões de restrição dos fragmentos amplificados (*amplicons*) empregando duas endonucleases. Os *amplicons* foram sequenciados e as sequências empregadas para construção de árvores filogenéticas, em conjunto com sequências de acesso público. Os resultados revelaram alta similaridade entre os isolados gaúchos de *Fusarium* spp. de videiras com linhagens de outros países.

**Termos para indexação:** *Vitis vinifera*, fusariose, filogenia.

### Phylogenetic lineages associated with grapevine fusarium wilt in the state of Rio Grande do Sul

**Abstract** – *Fusarium oxysporum* f.sp. *herbemontis* is recognized as the causal agent of grapevine *Fusarium* vascular wilt. This study phylogenetically categorized various lineages and species of *Fusarium* spp. isolated from symptomatic grapevines preserved in the Embrapa Grape and Wine Agroindustrial Interest Microorganism Collection. Phylogenetic studies in fungi are essential for comprehending their evolutionary relationships, taxonomic classifications, and biological diversity. DNA sequence analysis allows for the reconstruction of these organisms' evolutionary history, providing vital information regarding the origin, evolution, and ecology of fungi, thus aiding conservation and biotechnological applications. Amplification products from three *loci* of eleven *Fusarium* spp. isolates were used for phylogenetic analysis. The study also investigated restriction fragment patterns using two endonucleases. The amplicons were sequenced, and these sequences, along with publicly available ones, were used to construct phylogenetic trees. The

#### Embrapa Uva e Vinho

Rua Livramento, nº 515  
 Caixa Postal 130  
 95701-008 Bento Gonçalves, RS  
 www.embrapa.br/uva-e-vinho  
 www.embrapa.br/fale-conosco/sac

#### Comitê Local de Publicações

Presidente  
 Henrique Pessoa dos Santos

Secretária-executiva  
 Renata Gava

#### Membros

Fernando José Hawerth,  
 Mauro Celso Zanus, Joelsio  
 José Lazzarotto, Jorge Tonietto,  
 Thor Vinicius Martins Fajardo,  
 Alessandra Russi, Edgardo  
 Aquiles Prado Perez, Fábio  
 Ribeiro dos Santos, Luciana  
 Elena Mendonça Prado, Michele  
 Belas Coutinho Pereira  
 e Rochelle Martins Alvorcem

#### Revisão de texto

Renata Gava

#### Normalização bibliográfica

Rochelle Martins Alvorcem  
 (CRB-10/1810)

#### Projeto gráfico

Leandro Sousa Fazio

Publicação digital: PDF

Todos os direitos reservados à Embrapa.

results showed high similarity between *Fusarium* spp. isolates from grapevines with Fusarium wilt and isolates from other hosts/countries.

**Index terms:** *Vitis vinifera*, *Fusarium* wilt, phylogeny.

## Introdução

As videiras pertencem à família *Vitaceae* (Keller, 2020). O gênero *Vitis* contém mais de 60 espécies distribuídas pela Ásia, América do Norte e Europa, em clima subtropical, mediterrâneo e temperado-continental, sendo que *Vitis vinifera* é a mais difundida dentre as espécies de uva (Eibach; Topfer, 2015). A uva é uma das frutas mais consumidas no mundo, tanto fresca como processada, nas formas de vinho, suco e passas. Nos vinhedos, os cachos são delicados e as perdas na colheita e durante a sua distribuição são muito elevadas, quando não há manejo adequado (Mencarelli et al., 2005).

A cultura da videira sofre pressões fitossanitárias desde o plantio das mudas. A cada safra que se segue, quando não há um manejo adequado das áreas de produção, problemas relacionados a doenças podem causar perdas e prejuízos econômicos (Cavalcanti, 2021). Sob a denominação de “fusariose”, a infecção causada por *Fusarium oxysporum* f.sp. *herbemontis* é uma doença vascular, classificada como doença-de-hospedeiro-dominante, caracterizada por uma relação prolongada entre hospedeiro e patógeno. A doença causa danos econômicos severos devido, principalmente, à perda de produtividade nos vinhedos. Em casos agudos causa declínio e morte de plantas (Grigoletti Júnior, 1993).

Os fungos do gênero *Fusarium* causam sérias doenças em plantas de várias espécies ao redor do mundo. São microrganismos necrotróficos que produzem relações agressivas de parasitismo, mas são capazes de sobreviver no solo. Já foram relatadas espécies deste gênero capazes de causar doenças em humanos com sistema imune debilitado, o que indica a sua diversidade e versatilidade com relação aos diferentes hospedeiros suscetíveis ao mesmo (Agrios, 2005). O *F. oxysporum* causa o escurecimento vascular e decaimento de raízes, comprometendo o desenvolvimento da copa e a qualidade da nova brotação na planta de videira (Agrios, 2005). A espécie *F. oxysporum* ultrapassa facilmente mais de 100 subtipos, de acordo com o hospedeiro que infecta. Estes podem ser divididos em *formae speciales*, termo utilizado para classificar isolados morfológicamente semelhantes, mas que se diferenciam na sua habilidade em parasitar hospedeiros

específicos, cada um com determinado padrão de virulência (Oliveira; Costa, 2002; Agrios, 2005). Por apresentar tantas espécies e *formae speciales*, o gênero *Fusarium* está sob constantes pressões para modificações em sua taxonomia (Leslie, 2006) e há alguns anos considera-se que esse agrupamento de fungos se caracteriza por ser geneticamente heterogêneo, devido à origem evolucionária polifilética (Inami et al., 2014). A fusariose da videira foi inicialmente constatada no ano de 1940 e o seu causador é relatado como sendo o *F. oxysporum* f.sp. *herbemontis*, observado primeiramente em planta da cultivar Herbemont (Grigoletti Júnior, 1993).

Na videira, considerando podridões do tronco, o patógeno costuma estar acompanhado de outros microrganismos oportunistas, dificultando a compreensão dos sintomas da planta (Cavalcanti et al., 2013). Apesar disso, podridões do tronco podem ocorrer sem produzir sintomas aparentes, o que dificulta enormemente a definição de sua etiologia em muitos casos (Lobato; Cavalcanti, 2021). Considerando o problema das podridões de tronco da videira como um complexo, a correta identificação do patógeno é crucial e, geralmente, é realizada por isolamento do microrganismo e identificação morfológica de estruturas discriminantes do fungo, como células conidiogênicas e conídios. A identificação morfológica em tecidos muito contaminados é uma tarefa complicada e demorada, pois demanda obtenção de cultivo axênico do isolado, sendo sujeita a erros e inconsistências. Como alternativa a tais dificuldades, métodos moleculares podem produzir celeridade na identificação e checagem do patógeno presente no tecido do hospedeiro, e isso representa uma possibilidade de incremento no apoio à obtenção de material de propagação livre de doenças e mudas de qualidade superior (Lobato; Cavalcanti, 2021).

Para levantamento de informações sobre a diversidade genética do patógeno e desenvolvimento de ferramentas moleculares para sua detecção, o presente trabalho objetivou sequenciar as regiões amplificadas e utilizar essas informações para classificação filogenética de linhagens isoladas de plantas de videira, e armazenadas em coleção, com sintomas de fusariose em parreirais do Rio Grande do Sul. Paralelamente, foi iniciado desenvolvimento de método para identificação molecular de espécies de *Fusarium* spp., a partir de perfis de fragmentação de seu DNA genômico. Para o estudo, foram selecionados produtos da reação em cadeia da polimerase (PCR) (em inglês, *polymerase chain reaction*), das regiões do espaçador interno transcrito, (ITS, do inglês *Internal Transcribed Spacer*), da  $\beta$ -tubulina e do fator de alongação EF-1 $\alpha$  e posterior digestão com

enzimas de restrição (*HaeIII* e *CfoI*), técnica conhecida como marcador PCR-RFLP (ensaio CAPS, do inglês *Cleaved Amplified Polymorphic Sequences*) (Stein et al., 2019; Lobato; Cavalcanti, 2021). Por fim, a caracterização filogenética inicial de *Fusarium* spp. associada à fusariose da videira no Estado do Rio Grande do Sul objetivou entender o padrão filogenético da espécie relacionando-o com linhagens provenientes de outros países e de diferentes hospedeiros.

## Material e métodos

Este trabalho foi desenvolvido na Embrapa Uva e Vinho, em Bento Gonçalves, RS. O material biológico utilizado foi constituído de linhagens de fungos do gênero *Fusarium* isolados de videiras sintomáticas localizadas em diferentes vinhedos do Rio Grande do Sul, obtidos da Coleção de Microrganismos de Interesse Agroindustrial (CMIA) da Embrapa Uva e Vinho.

A lista completa das linhagens encontra-se na Tabela 1. O sintoma da infecção da fusariose da videira se evidencia em corte longitudinal como um escurecimento dos vasos do xilema (Cavalcanti; Garrido, 2015).

## Subcultivo e obtenção de material genético

A partir de culturas puras preservadas em meio batata-dextrose-ágar (BDA), discos com micélio de isolados de *Fusarium* spp. foram transferidos e cultivados em meio líquido batata-dextrose (BD). Para a transferência, os discos com diâmetro de 0,5 cm de ágar contendo micélio foram retirados das placas, sendo transferidos para frascos de Erlenmeyer contendo 20 mL de caldo BD. O subcultivo foi feito em duplicatas. Os frascos foram incubados em agitador orbital onde permaneceram por período de 6 a 8 dias, em temperatura média de 25 °C, sob agitação de aproximadamente 100 rpm. Após o intervalo de crescimento, a biomassa obtida foi separada por filtração à vácuo, com posterior armazenamento em microtubos de 2 mL e estocagem a -20 °C.

A extração de DNA total fúngico foi realizada através da metodologia clorofórmio:fenol:álcool isoamílico (CIA) adaptada de Sambrook e Russel (2001).

## Reação em cadeia de polimerase (PCR)

Ensaio de PCR foram realizados a partir do DNA total extraído dos isolados. Os oligonucleotídeos empregados na amplificação (White et al., 1990;

**Tabela 1.** Relação de isolados cedidos pela Coleção de Microrganismos de Interesse Agroindustrial (CMIA) da Embrapa Uva e Vinho.

Data do lote	Código CMIA <sup>(1)</sup>	Código do isolado	GenBank/ITS	Variedade	Localidade	Ano
3/4/2017	BRM004927	F304	MG461598.1	Cabernet Sauvignon	Vale dos Vinhedos, RS	1989
3/4/2017	BRM004928	F306	MG461599.1	Gewurztraminer	Vale dos Vinhedos, RS	1989
3/4/2017	BRM004940	F371	MG461600.1	Pinot Noir/Kober 5BB	Vacaria, RS	2007
3/4/2017	BRM004941	F373	MG461601.1	Seibel	Monte Belo do Sul, RS	2007
3/4/2017	BRM004944	F627	MG461602.1	Niagara	Flores da Cunha, RS	2004
18/4/2017	BRM004920	F287	MG461593.1	Seibel	Monte Belo do Sul, RS	–
18/4/2017	BRM004922	F292	MG461594.1	Merlot	Vale dos Vinhedos, RS	–
18/4/2017	BRM004923	F293	MG461595.1	Cabernet Franc	Desconhecido	–
18/4/2017	BRM004924	F295	MG461596.1	Cabernet Sauvignon	Desconhecido	–
18/4/2017	BRM004925	F296	MG461597.1	Cabernet Franc	Desconhecido	–
18/4/2017	BRM004946	F683	MG461603.1	Cultivar desconhecida	Vale Real, RS	–

<sup>(1)</sup> BRM004940 (F371): linhagem de *Fusarium solani*. As demais linhagens se referem a *Fusarium oxysporum* f.sp. *herbomontis*.

O'Donnell; Cigelnik, 1997) estão apresentados na Tabela 2.

Adicionaram-se aos microtubos de 200  $\mu\text{L}$ : 10,7  $\mu\text{L}$  de água ultrapura; 5  $\mu\text{L}$  de tampão 5X da enzima Taq Flexi DNA Polimerase; 1,5  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  (25 mM); 4,5  $\mu\text{L}$  de dNTPs (80 mM); 1  $\mu\text{L}$  de cada iniciador direto e reverso (20 mM); 0,3  $\mu\text{L}$  de Taq DNA polimerase "GoTaq Flexi DNA Polymerase" (5 U/ $\mu\text{L}$ ). Por último fez-se a transferência de 1  $\mu\text{L}$  de DNA (considerando-se 25  $\mu\text{L}$  de volume final do *mix*, cerca de 330 ng de DNA) para o microtubo. A concentração foi definida a partir de um valor médio mencionado em trabalhos envolvendo DNA fúngico e PCR. A relação dos iniciadores e suas sequências de nucleotídeos encontra-se na Tabela 2.

As reações de PCR foram realizadas em termociclador. Temperaturas de amplificação foram determinadas empiricamente. Para amplificação da região ITS, utilizaram-se os iniciadores ITS1 (direto) e ITS4 (reverso) (Tabela 2). As reações de amplificação seguiram as etapas: 95 °C por 5 minutos, seguida de 39 ciclos de repetição das temperaturas de 95 °C por 30 segundos, 60 °C por 1 minuto e 72 °C por 1 minuto. Em seguida, a temperatura foi mantida a 72 °C por 10 minutos.

Para a amplificação da região da  $\beta$ -Tubulina utilizaram-se os iniciadores BTubT1 e BTubT22 (Tabela 2). As reações de amplificação seguiram as etapas: 95 °C por 5 minutos; seguido por 30 ciclos de 94 °C por 35 segundos, 58,6 °C por 55 segundos, 72 °C por 2 minutos e, ao final, 72 °C por 10 minutos.

Para a amplificação da região do fator de elongação EF-1 $\alpha$  utilizaram-se os iniciadores EF1-728 e EF1-1567 (Tabela 2). As reações de amplificação para essa região seguiram as etapas: 95 °C por 5 minutos; seguido por 30 ciclos de 95 °C por 30 segundos, 57,4 °C por 1 minuto e 72 °C por 1 minuto e, ao final, 72 °C por 10 minutos.

Eletroforese foi empregada para verificar a ocorrência de amplificação da região do DNA flanqueada

pelos iniciadores utilizados em cada reação de PCR. Preparou-se o gel de agarose em concentração de 1,2% (p/V), com tampão TBE 1X (10,8 g Tris-base; 5,5 g ácido bórico; 4,0 mL 0,5 M EDTA pH 8,0 em 1 L água padrão). Foram aplicados 4,5  $\mu\text{L}$  de produto de PCR misturado com 1,3  $\mu\text{L}$  de corante azul de bromofenol (na proporção de 1:10 em diluição com glicerol 60%) ao lado de 2,2  $\mu\text{L}$  de marcador de peso molecular de 100 pares de bases (pb), com concentração de 0,1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ). As amostras foram submetidas a eletroforese por aproximadamente 70 minutos a 120V. Os géis foram corados por imersão em solução de brometo de etídio a 0,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  por aproximadamente 20 minutos. Em seguida, foram visualizados em fotodocumentador UV controlado por *software*, sob luz ultravioleta, com comprimento de onda 302 nm. A identificação do tamanho dos *amplicons* foi realizada por comparação com a migração de fragmentos do marcador de peso molecular.

### Sequenciamento dos produtos de PCR

Os produtos de PCR que apresentaram *amplicons* resolvidos nitidamente foram selecionados para sequenciamento. Os *amplicons* foram tratados com fosfatase alcalina e exonuclease I (EXO), que degradam o excesso de nucleotídeos e de iniciadores da mistura, respectivamente. Em tubos de 200  $\mu\text{L}$  foram adicionados: 5  $\mu\text{L}$  de produto de PCR, 1  $\mu\text{L}$  de SAP (1 U/ $\mu\text{L}$ ), 1  $\mu\text{L}$  de EXO (2,5 U/ $\mu\text{L}$ ), em seguida incubando-se a 37 °C por 15 minutos e 80 °C por 15 minutos. Em seguida, utilizando-se espectrofotômetro para quantificação de ácidos nucleicos e proteínas em baixo volume, os ácidos nucleicos foram quantificados e sua qualidade avaliada, encaminhando-os para o sequenciamento pelo Método de Sanger em equipamento sequenciador de DNA e analisador genético de capilar de bancada. Os eletroferogramas foram encaminhados ao laboratório em arquivos de formato .seq.

**Tabela 2.** Iniciadores utilizados nas reações de PCR.

Iniciador	Direção	Sequência de nucleotídeos (5'→3')	Temperatura melting ( $T_m$ ) <sup>(1)</sup> (°C)	Temperatura de anelamento (°C)
ITS1	Direto	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	68,5 e 64,5	60 por 1 minuto.
ITS4	Reverso	TCCTCCGCTTATTGA TATGC	61,5 e 57,8	60 por 1 minuto.
BTubT1	Direto	AACATGCGTGAGATTGTAAGT	70,2 e 66,8	58,6 por 55 segundos.
BTubT22	Reverso	TCTGGATGTTGTTGGGAATCC	70,3 e 66,8	58,6 por 55 segundos.
EF1-728	Direto	CATCGAGAAGTTCGAGAAGG	61,5 e 57,6	57,4 por 1 minuto.
EF1-1567	Reverso	ACHGTRCCRATACCACCRATCTT	53,7 e 56,0	57,4 por 1 minuto.

<sup>(1)</sup> Fornecida pelo fabricante (Untergasser et al., 2007).

### Digestão do DNA amplificado de *F. oxysporum* para procedimentos de PCR-RFLP (CAPS)

Para análise do perfil de restrição das regiões ITS,  $\beta$ -Tubulina e Fator de Elongação EF-1 $\alpha$ , utilizaram-se digestões simples com as endonucleases de restrição *HaeIII* (10 U/ $\mu$ L) e *CfoI* (10 U/ $\mu$ L) que reconhecem e clivam a fita de DNA nos sítios apresentados na Tabela 3. As condições de reação seguiram as orientações do fabricante.

A primeira fragmentação dos produtos de PCR foi feita com a enzima *HaeIII*. Adicionando-se, em microtubo de 200  $\mu$ L: 3,5  $\mu$ L de água ultrapura; 1,0  $\mu$ L de tampão C 10X; 0,5  $\mu$ L de *HaeIII*, 10 U/ $\mu$ L. Em seguida as amostras foram incubadas por 2h30 a

**Tabela 3.** Sequências onde ocorre o reconhecimento do DNA e sua clivagem pelas enzimas de restrição *HaeIII* e *CfoI*.

Enzima de restrição	Sítio de restrição
<i>HaeIII</i>	5' GG▼CC 3'
	3' CC▲GG 5'
<i>CfoI</i>	5' G CG▼C 3'
	3' C▲GC G 5'

37 °C. Na restrição dos produtos de PCR com a enzima *CfoI* foram misturadas em microtubo de 200  $\mu$ L: 3,65  $\mu$ L de água ultrapura; 1  $\mu$ L de tampão B 10X; 0,1  $\mu$ L de albumina de soro bovino acetilada (BSA, do inglês *Bovine Serum Albumin Acetylated*, 10 mg/mL, 100X) e 0,25  $\mu$ L de *CfoI*, 10 U/ $\mu$ L. Em seguida, as amostras foram incubadas por 2h30 a 37° C.

A análise dos perfis de restrição deu-se em eletroforese em gel de agarose (3%), adicionando-se 10  $\mu$ L da amostra e 2  $\mu$ L de corante azul de bromofenol. O tamanho dos fragmentos foi estimado pela aplicação de 4,5  $\mu$ L de marcador de peso molecular 100 pb. As amostras foram submetidas à eletroforese por aproximadamente 2 horas a 120 V em tampão TBE 1X e os géis seguiram revelação padrão em brometo de etídio.

### Análise filogenética das sequências de DNA de *F. oxysporum*

Após a obtenção das sequências de nucleotídeos das regiões amplificadas, verificou-se a sua qualidade por meio de análises no *software* visualizador. Foram avaliados os picos gerados para cada nucleotídeo da sequência, aceitando-se valores de qualidade da sequência (*Phred score*) maiores que 20. Foi verificado o comprimento das sequências obtidas, comparando-se com os perfis de restrição.

Por meio do *software* visualizador as sequências obtidas foram depuradas e salvas em formato .FASTA e em arquivo texto (.txt). Em seguida, foram submetidas a alinhamento na plataforma on-line *Basic Local Alignment Search Tool for Nucleotides*, uma ferramenta do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI).

Sequências das regiões de interesse foram alinhadas com aquelas disponíveis na base de dados de sequências genéticas (GenBank) (Tabelas 4, 5 e 6). Confirmadas as identidades, foi realizada a análise filogenética dos isolados de *F. oxysporum* a partir das sequências das regiões ITS,  $\beta$ -Tubulina e EF-1 $\alpha$ . As sequências foram submetidas a análise de alinhamento empregando-se *software* utilizado para alinhamento múltiplo de sequências de DNA ou proteínas e ferramenta de bioinformática que fornece um conjunto abrangente de funcionalidades para visualização e análise de sequências de ácidos nucleicos (parâmetros *default*). Os alinhamentos gerados foram salvos em formato .aln (alinhamento) e .FASTA para, posteriormente, serem empregados na construção de árvores filogenéticas.

Árvores filogenéticas foram reconstruídas no *software* utilizado para análise de dados de genética evolutiva e construção de árvores filogenéticas. (Kumar et al., 2016). Empregaram-se as sequências na construção de duas árvores filogenéticas: a) contendo as três regiões dos isolados utilizados no presente trabalho e de um isolado do gênero *Phaeoacremonium* sp. como *outgroup*; e b) com as três regiões dos isolados utilizados neste trabalho, bem como de isolados disponíveis no banco de dados do NCBI. Para todas as árvores foi utilizado o Método de Máxima Verossimilhança, utilizando-se o modelo evolutivo Kimura 2-parâmetros.

## Resultados e discussão

### Deteção do DNA de *F. oxysporum* por PCR

De acordo com vários autores, a região ITS é considerada como uma espécie de “código de barras” em fungos verdadeiros, devido à sua grande conservação (White et al., 1990; Korabecna, 2007; Wade, 2009; Karlsson et al., 2016). O estudo foi estendido para incluir outras regiões conservadas do genoma fúngico, como a da  $\beta$ -tubulina e do EF-1 $\alpha$  (Hu et al., 2007; Karlsson et al., 2016).

Estudos objetivando a detecção molecular do fungo fitopatogênico *F. oxysporum* foram iniciados pela amplificação do DNA da região ITS, por reações de PCR com os iniciadores ITS1 e ITS4 descritos na literatura (White et al., 1990; Brasileiro et al., 2004;

Silva et al., 2014; Fernandes et al., 2021). Na caracterização molecular de espécies fitopatogênicas de *Fusarium*, isolados de plantas cucurbitáceas em Kermanshah, Irã, foram realizadas amplificações da região ITS, e obtidos produtos de PCR de aproximadamente 550 pb para *F. oxysporum* (Chehri et al., 2011). O mesmo tamanho de produto de PCR foi relatado em estudo com *F. oxysporum* isolado do solo, no Irã (Zarrin et al., 2016).

No presente estudo, os 11 isolados de *Fusarium* spp. analisados tiveram seu DNA detectado com os iniciadores ITS1 e ITS4 (Figura 1) por dois motivos: amplificar uma região conservada e marcadora no Reino Fungi e prover quantidade de DNA suficiente para preparo de amostras para sequenciamento por Sanger, bem como estudos de restrição.

Trabalhos envolvendo a amplificação do DNA da região da  $\beta$ -tubulina em *Fusarium* spp., com o par de iniciadores BTubT1 e BTubT22, estão disponíveis. Por exemplo, Taylor et al. (2016) utilizaram estes iniciadores na caracterização molecular de *Fusarium oxysporum* encontrado em plantações de cebola, causando podridão da raiz, no Reino Unido, obtendo produtos de PCR de aproximadamente 1500 pb.

Os produtos de PCR na região de  $\beta$ -tubulina das linhagens de *Fusarium* spp. isoladas de parreirais do RS, quando submetidos à eletroforese, apresentaram fragmentos de 1426 pb (gel A) e 1441 pb (gel B), valores próximos aos descritos por Taylor et al. (2016) (Figura 2).

Uma terceira região conservada do genoma de *Fusarium* também foi abordada no presente trabalho: a região do fator de alongação (EF-1 $\alpha$ ). A região do EF-1 $\alpha$  possibilita a distinção intraespecífica em *Fusarium*, não havendo relatos de cópias não-ortólogas do gene no gênero (Geiser et al., 2004). No presente estudo, foi utilizado, para a amplificação da região EF-1 $\alpha$ , o par de iniciadores EF1-728 e EF1-1567 (Figura 3). Até o presente momento, esta seria a primeira abordagem para amplificação da região do EF-1 $\alpha$  de *Fusarium* spp isolado de videira, com o par de iniciadores supracitado. Logo, não há informações disponíveis sobre o tamanho de fragmento de DNA gerado a partir do uso desse par de iniciadores.

Devido à grande diversidade do gênero *Fusarium*, seja em aspectos morfológicos, fisiológicos ou ecológicos, a identificação dos fungos e suas respectivas espécies é difícil e trabalhosa (Burgess et al., 1996). Tradicionalmente a identificação de espécies de *Fusarium* baseia-se em características morfológicas do fungo, como a forma e coloração das colônias em meios de cultura específicos, a taxa

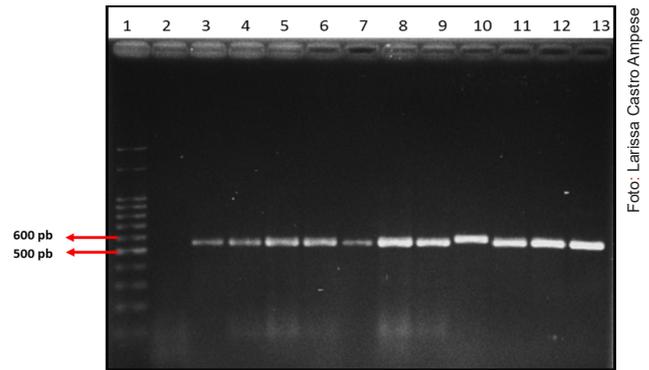


Foto: Larissa Castro Ampese

**Figura 1.** Detecção do DNA amplificado de isolados de *Fusarium* sp. com os iniciadores ITS1 e ITS4, via PCR. As setas da esquerda indicam o tamanho dos fragmentos do marcador de peso molecular. Os produtos de PCR de *Fusarium* sp. com iniciadores ITS1 e ITS4 encontram-se nas colunas de 3 a 13. Todos isolados apresentaram região do ITS amplificada com tamanho de aproximadamente 500 a 600 pb. 1: Marcador de peso molecular; 2: Controle negativo da reação de PCR; 3: F287; 4: F292; 5: F293; 6: F295; 7: F296; 8: F304; 9: F306; 10: F371; 11: F373; 12: F627; 13: F683.

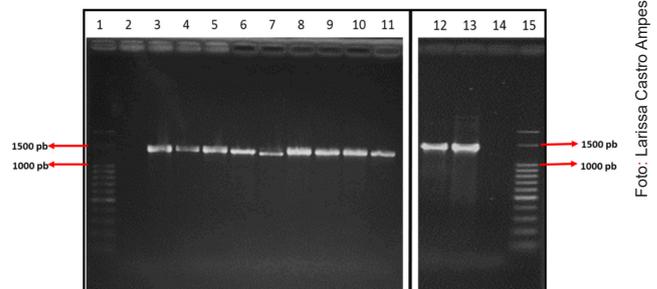


Foto: Larissa Castro Ampese

**Figura 2.** Detecção da amplificação do DNA de isolados de *Fusarium* sp. com os iniciadores BTubT1 e BTubT22, utilizados para amplificar a região da  $\beta$ -tubulina, via PCR. As setas indicam o tamanho dos fragmentos do marcador de peso molecular, nas colunas 1 e 15. Os produtos de PCR de *Fusarium* sp. com iniciadores BTubT1 e BTubT22 encontram-se nas colunas de 3 a 13. 1: Marcador de peso molecular; 2: Controle negativo da reação de PCR; 3: F287; 4: F292; 5: F293; 6: F296; 7: F371; 8: F373; 9: F304; 10: F306; 11: F683; 12: F627; 13: F295; 14: Controle negativo da reação de PCR; 15: Marcador de peso molecular.

de crescimento e especificidade de hospedeiros (Oliveira; Costa, 2002; Faleiro et al., 2003). Tais métodos de identificação são altamente influenciados pelo meio de cultura escolhidos para o crescimento do microrganismo, pela idade das colônias e condições de incubação, sendo subjetivos e sujeitos a erros (Teixeira et al., 2004; Lobato; Cavalcanti, 2021).

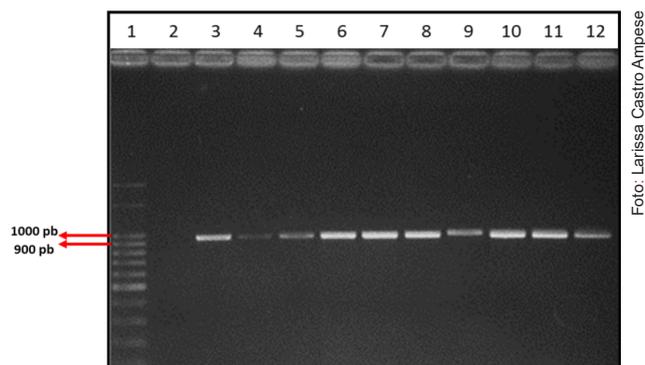


Foto: Larissa Castro Ampese

**Figura 3.** Detecção da amplificação do DNA de isolados de *Fusarium* com os iniciadores EF1 728 e EF1 1567, utilizados para amplificar a região da EF-1 $\alpha$ , via PCR. As setas da esquerda indicam o tamanho dos fragmentos do marcador de peso molecular. Os produtos de PCR de *Fusarium* sp. com iniciadores EF1 728 e EF1 1567 encontram-se nas colunas 3 a 12. 1: marcador de peso molecular; 2: controle negativo da reação de PCR; 3: F287; 4: F292; 5: F293; 6: F296; 7: F304; 8: F306; 9: F371; 10: F373; 11: F627; 12: F683.

#### Análise das sequências de DNA de *Fusarium* spp.

O sequenciamento do DNA das regiões ITS,  $\beta$ -tubulina e EF-1 $\alpha$  dos isolados de *Fusarium*, provenientes de isolados de videiras infectadas e armazenados na CMIA, foi realizado pelo método de Sanger. Durante a depuração das sequências constatou-se que todas obtiveram qualidade satisfatória, portanto nenhuma foi excluída. As sequências obtidas com respectivas faixas de comprimentos foram: 480–570 pb para a região ITS, 680–720 pb para a

região  $\beta$ -tubulina e 720–800 pb para a região do EF-1 $\alpha$ . Considerando que a qualidade dos *amplicons* enviados para sequenciamento foi dentro dos padrões, discrepâncias entre tamanhos de *amplicon* e sequências podem acontecer por vários motivos, como por exemplo: a) qualidade da leitura de sequenciamento; b) terminações prematuras (por dd-NTP); c) eliminação dos iniciadores na análise; ou d) erros gerais no eletroferograma.

No caso do presente trabalho, o sequenciamento a partir de um único iniciador pode gerar uma sequência resultante geralmente menor do que o fragmento total amplificado. Também, no presente trabalho, para pesquisas no *Basic Local Alignment Search Tool for Nucleotides* (BLASTN), ferramenta do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), usada para buscar na base de dados do NCBI e comparar sequências de nucleotídeos, as sequências usadas foram as que tiveram o fator “d”, acima, depurado ou eliminado, acarretando diferenças do tamanho do *amplicon* original.

As sequências obtidas foram alinhadas no algoritmo BLASTN *on-line*, para a comparação com sequências homólogas depositadas no banco de dados do NCBI.

Na Tabela 4, constam os comprimentos das sequências obtidas para cada isolado, em cada região do DNA, bem como a porcentagem de identidade de nucleotídeos das linhagens estudadas com as espécies: *F. oxysporum* e *F. solani* (Tabela 1). As sequências do trabalho estão apresentadas concatenadas e alinhadas na Figura 4.

**Tabela 4.** Resultados do alinhamento das sequências das três regiões (ITS,  $\beta$ -tubulina e EF-1 $\alpha$ ), contendo informação de comprimento da sequência em pares de bases (pb) e identidade para cada isolado estudado.

Espécie	Isolado	ITS		$\beta$ -tubulina		EF-1 $\alpha$	
		Comprimento (pb)	Identidade (%)	Comprimento (pb)	Identidade (%)	Comprimento (pb)	Identidade (%)
<i>Fusarium oxysporum</i>	F287	500	100	872	99	830	99
<i>F. oxysporum</i>	F292	488	99	765	100	808	99
<i>F. oxysporum</i>	F293	489	100	688	100	724	99
<i>F. oxysporum</i>	F295	486	100	860	99	831	99
<i>F. oxysporum</i>	F296	490	100	842	100	806	99
<i>F. oxysporum</i>	F304	489	100	843	100	838	99
<i>F. oxysporum</i>	F306	491	100	835	99	836	99
<i>F. oxysporum</i>	F371	522	100	838	99	841	99
<i>F. oxysporum</i>	F373	500	100	826	98	843	99
<i>F. oxysporum</i>	F627	499	100	820	100	777	99
<i>F. oxysporum</i>	F683	496	100	935	99	816	99







### Padrões de fragmentos de regiões do DNA de *Fusarium* spp. gerados por enzimas de restrição Cleaved Amplified Polymorphic Sequences (CAPS)

Isolados de *Fusarium* provenientes do solo tiveram a região ITS amplificada com os iniciadores ITS1 e ITS4, em estudo realizado no Irã (Zarrin et al., 2016). Também neste trabalho, os autores utilizaram as enzimas de restrição *HaeIII* e *SmaI* para realizar a análise de PCR-RFLP (CAPS), do inglês *Cleaved Amplified Polymorphic Sequences* da região ITS amplificada e obtiveram diferentes padrões de restrição para diferentes espécies de *Fusarium*, confirmando a possibilidade de diferenciar espécies deste gênero a partir da técnica de PCR-RFLP (CAPS). Chehri et al. (2011) dividiram isolados de *Fusarium* em dois grupos por análise de padrões de PCR-RFLP (CAPS) da região ITS, utilizando-se a enzima *HaeIII* (dentre outras), obtendo um fragmento de DNA inferior a 100 pb, outro pouco superior a este tamanho, e um terceiro fragmento entre 300–400 pb. No presente estudo, o mesmo método foi aplicado para a identificação de isolados de *Fusarium* obtidos de videiras com sintomas de fusariose em parreirais do Rio Grande do Sul. Por exemplo, trabalhando com a diferenciação de leveduras, Esteve-Zarzoso et al. (1999) utilizaram as enzimas *CfoI*, *HaeIII* e *HinfI* na realização de PCR-RFLP (CAPS) da região ITS. Foram obtidos diferentes perfis de restrição da região ITS para cada espécie, e para cada enzima testada.

Neste trabalho, não foi observada a presença de polimorfismos entre os isolados de *F. oxysporum* pela técnica de PCR-RFLP (CAPS) da região ITS em digestões com *HaeIII* e *CfoI*. Os produtos de restrição da região ITS de *F. oxysporum* obtidos pela digestão com a enzima *HaeIII* foram semelhantes aos resultados relatados por Chehri et al. (2011). Utilizando-se a mesma enzima com o isolado F371, identificado como *F. solani* pelo alinhamento da sequência do ITS no BLASTN, obtiveram-se fragmentos de cerca de 236, 121 e 90 pb (Figura 5).

Os fragmentos obtidos com a enzima *CfoI* foram semelhantes aos padrões previamente descritos na literatura (Appel; Gordon, 1995; 1996; Glass; Donaldson, 1995). Fragmentos de digestão do *amplicon* ITS por *HaeIII* em *F. solani* (F371) foram confirmados na literatura (Brasileiro et al., 2004) (Figura 5).

A digestão dos produtos de PCR das regiões  $\beta$ -tubulina e EF-1 $\alpha$  foi realizada através da utilização das mesmas enzimas de restrição (*HaeIII* e *CfoI*) ensaiadas com ITS. Os resultados obtidos para a região da  $\beta$ -tubulina estão mostrados na Figura 6. Os produtos de restrição desta região do DNA de

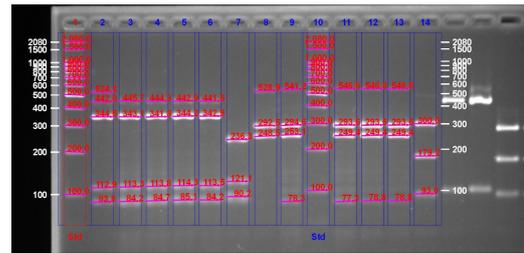


Foto: Larissa Castro Ampese

**Figura 5.** Digestão do produto de PCR da região ITS pelas enzimas de restrição *HaeIII* e *CfoI*, para isolados de *Fusarium* spp. O tamanho dos fragmentos do marcador de peso molecular está apresentado na coluna 1. Colunas 2 a 7, restrição com *HaeIII*. Colunas 8,9 e 11 a 14, restrição com *CfoI*. 1: Marcador de peso molecular; 2: F287; 3: F292; 4: F293; 5: F295; 6: F296; 7: F371 (*F. solani*); 8: F287; 9: F292; 10: Marcador de peso molecular; 11: F293; 12: F295; 13: F296; 14: F371.

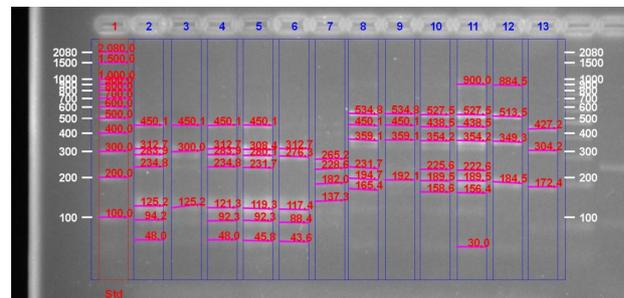


Foto: Larissa Castro Ampese

**Figura 6.** Digestão do produto de PCR da região  $\beta$ -tubulina pelas enzimas de restrição *HaeIII* e *CfoI*, para isolados de *F. oxysporum* e *F. solani*. A marcação e reconhecimento dos fragmentos produzidos foi realizada no programa do fotodocumentador. Legenda: Gel de agarose 3%. As demarcações da esquerda indicam o tamanho dos fragmentos do marcador de peso molecular de 100 pb, na coluna 1. Os fragmentos de restrição gerados com a enzima *HaeIII* encontram-se nas colunas 2 a 7. Os fragmentos de restrição obtidos com a enzima *CfoI* encontram-se nas colunas 8 a 13. Todos isolados de *F. oxysporum*, colunas 2 a 6 e 8 a 12, apresentaram perfis de restrição semelhantes, com ambas as enzimas, exceto pelo isolado F292 (colunas 3 e 9) que apresentou fragmentos levemente diferentes. O isolado de *F. solani* apresentou perfil de restrição diferente dos demais, para ambas as enzimas, como pode ser visualizado nas colunas 7 e 13. 1: Marcador de peso molecular (100 pb); 2: F287; 3: F292; 4: F293; 5: F295; 6: F296; 7: F371; 8: F287; 9: F292; 10: F293; 11: F295; 12: F296; 13: F371.

*F. oxysporum*, utilizando-se a enzima *HaeIII*, foram de aproximadamente 450, 310, 280, 230, 120, 100, 92 e 45 pb (Figura 6). Utilizando-se esta mesma enzima para o isolado F371, identificado como *F. solani* no BlastN, os fragmentos obtidos tiveram 265, 229, 182 e 137 pb. Digerindo-se o DNA da região da  $\beta$ -tubulina com a enzima *CfoI*, os fragmentos

obtidos foram de aproximadamente 530, 445, 355, 225, 190 e 155 pb. Utilizando-se a mesma enzima para a digestão do isolado F371, os fragmentos obtidos foram de 427, 304 e 172 pb. Pode-se observar um comportamento diferente nas digestões promovidas com o isolado F292 (colunas 3 e 9), o qual se desdobrou em menor número de fragmentos, se comparado à digestão dos outros isolados de *F. oxysporum*, indicando que em sua sequência de DNA, nesta região, existe um número menor de sítios de restrição para a ação das enzimas testadas.

Na fragmentação da região do EF-1 $\alpha$  de *F. oxysporum* com *HaeIII* foram obtidos fragmentos de aproximadamente 320, 190, 92 e 54 pb, exceto para o isolado F292 (coluna 3), que apresentou uma única banda, bastante fraca, de 325 pb (Figura 7). Utilizando-se a mesma enzima para digerir o DNA do isolado F371 (*F. solani*), os fragmentos obtidos foram de 351, 297, 140 e 6 pb. Digerindo-se o DNA de *F. oxysporum* com *CfoI*, foi obtida apenas uma banda, de aproximadamente 470 pb, na eletroforese em gel de agarose a 3%. Para o isolado F293 (coluna 10) foram obtidos fragmentos de 475 e 21 pb e para o F295 (coluna 11) obtiveram-se fragmentos de 628, 475 e 19 pb (Figura 7). Como demonstrado na Figura 3 os produtos de amplificação desta região apresentam-se entre os 900 e

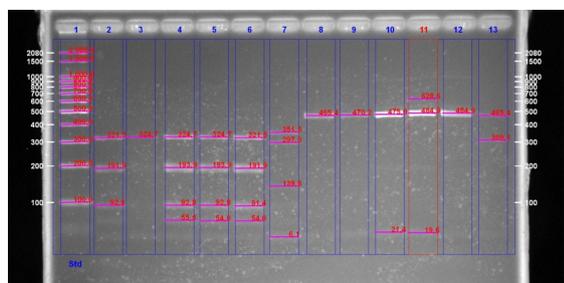


Foto: Larissa Castro Ampese

**Figura 7.** Digestão do produto de PCR da região EF-1 $\alpha$  pelas enzimas de restrição *HaeIII* e *CfoI*, para isolados de *Fusarium* spp. Tamanho dos fragmentos do marcador de peso molecular representado na coluna 1. Colunas 2 a 7, restrição com *HaeIII*. Colunas 8 a 13, restrição com *CfoI*. 1: marcador de peso molecular; 2: F287; 3: F292; 4: F293; 5: F295; 6: F296; 7: F371(*F. solani*); 8: F287; 9: F292; 10: F293; 11: F295; 12: F296; 13: F371

1.000 pb, portanto, pode ter ocorrido uma clivagem da sequência de DNA no sítio de restrição próximo aos 470 pb, o que formaria dois fragmentos de comprimento similar que possivelmente migrariam e se depositariam sobrepostos no gel, após a corrida eletroforética (Figura 7). Caso não fosse verificada nenhuma clivagem do DNA com a utilização desta enzima, a indicação no gel de agarose estaria entre

900 e 1.000 pb, como na Figura 3. Utilizando-se a mesma enzima para a restrição do DNA do isolado F371, obtiveram-se fragmentos de 465 e 309 pb.

### Estudos filogenéticos de *Fusarium* spp. isolados em vinhedos do Rio Grande do Sul

Árvores filogenéticas baseadas nas sequências de certas regiões do DNA de um organismo são ferramentas que auxiliam no estudo de relações evolutivas entre os organismos, antes baseadas apenas em morfologia (Griffiths et al., 2013). O fungo *F. oxysporum* tem sido relatado como causador de diversas doenças em plantas, animais e até mesmo em seres humanos, em diferentes países (Salah et al., 2015).

Neste trabalho, foram alinhadas sequências de 11 isolados, obtidos da CMI, com as sequências homólogas de isolados de outros países. Destaca-se que este método é apropriado para considerar substituições múltiplas, bem como as diferentes frequências na ocorrência de inserções, deleções ou rearranjos (Hall, 2013; Braun et al., 2014; Caldart et al., 2016). As plantas hospedeiras dos isolados considerados no estudo incluem os gêneros: *Vitis*, *Tanacetum*, *Caryocar*, *Paris*, *Hibiscus*, *Conifer*, *Chrysanthemum*, *Pulsatilla*, *Dendrobium*, *Daturae Aquilaria*. O gênero *Fusarium* é polifilético e possui enorme gama de hospedeiros, nas quais pode sobreviver ou parasitar (Silva et al., 2014).

Inicialmente, foram alinhadas as 11 sequências dos isolados de *Fusarium* estudadas (10 da espécie *F. oxysporum* e 1 *F. solani*) em conjunto com 14 sequências da região ITS de isolados de *F. oxysporum* (incluindo 2 *F. oxysporum* f. sp. *herbemontis*) e 1 sequência de *F. solani* obtidas em regiões do mundo. Estas sequências complementares foram obtidas no banco de dados do NCBI, e são oriundas dos países: Austrália (1), Brasil (1), Chongren (República da China) (2), Estados Unidos (2), Coréia do Sul (2), China (2), México (1), Vietnã (1), Índia (1) e Japão (2), alinhadas com um isolado de *Phaeoacremonium angustius* (BRM006263), adicionado como grupo externo (*outgroup*). As plantas hospedeiras dos isolados incluem os gêneros: *Vitis*, *Tanacetum*, *Caryocar*, *Paris*, *Hibiscus*, *Conifer*, *Chrysanthemum*, *Pulsatilla*, *Dendrobium*, *Daturae Aquilaria*. Importante lembrar que o gênero *Fusarium* possui enorme gama de hospedeiros, nas quais pode sobreviver ou parasitar. Maiores informações a respeito das sequências da região ITS obtidas do banco de dados do NCBI encontram-se na Tabela 5.

A árvore filogenética construída a partir da análise da região ITS de 27 isolados está apresentada na Figura 8. Percebe-se a baixa variabilidade genética da região investigada entre os isolados gaúchos e

**Tabela 5.** Informações dos isolados obtidos no GenBank, utilizados na construção da árvore filogenética baseada na região ITS.

Espécie	Código de Acesso (GenBank/NCBI)	País de origem	Hospedeiro	Espécie hospedeira	Comprimento da sequência (pb)
<i>Fusarium oxysporum</i>	KX058543.1	Austrália	Tanaceto	<i>Tanacetum cinerariifolium</i>	482
<i>F. oxysporum</i>	KR080532.1	Brasil	Pequi	<i>Caryocar brasilienseium</i>	554
<i>F. oxysporum</i>	KU931547.1	Chongren/ República da China	Paris	<i>Paris polyphylla</i> var. <i>chinensis</i>	553
<i>F. oxysporum</i>	KU931542.1	Chongren/ República da China	Paris	<i>Paris polyphylla</i> var. <i>chinensis</i>	552
<i>F. oxysporum</i>	KT828536.1	Estados Unidos	Hibisco	<i>Hibiscus sabdariffa</i>	538
<i>F. oxysporum</i>	DQ016228.1	Estados Unidos	Conífera	<i>Conifer nursery</i>	518
<i>F. oxysporum</i>	KC491873.1	Coreia do Sul	Crisantemo	<i>Chrysanthemum morifolium</i>	544
<i>F. oxysporum</i>	JX669526.1	China	Pulsatila	<i>Pulsatilla koreana</i>	519
<i>F. oxysporum</i>	JQ809654.1	China	Orquídea	<i>Dendrobium candidum</i>	519
<i>F. oxysporum</i>	FJ654692.1	México	Feijão	<i>Phaseolus</i>	486
<i>F. oxysporum</i>	HM236000.1	Vietnã	-	<i>Aquilaria crassna</i>	509
<i>F. oxysporum</i>	KF963540.1	Índia	Feijão de Corda	<i>Vigna unguiculata</i>	505
<i>F. oxysporum</i>	LC200399.1	Japão	Videira	<i>Vitis vinifera</i> cv. Fujiminori	468
<i>Phaeoacremonium</i> sp.	MG041381.1	Brasil	Videira	<i>Vitis vinifera</i>	533

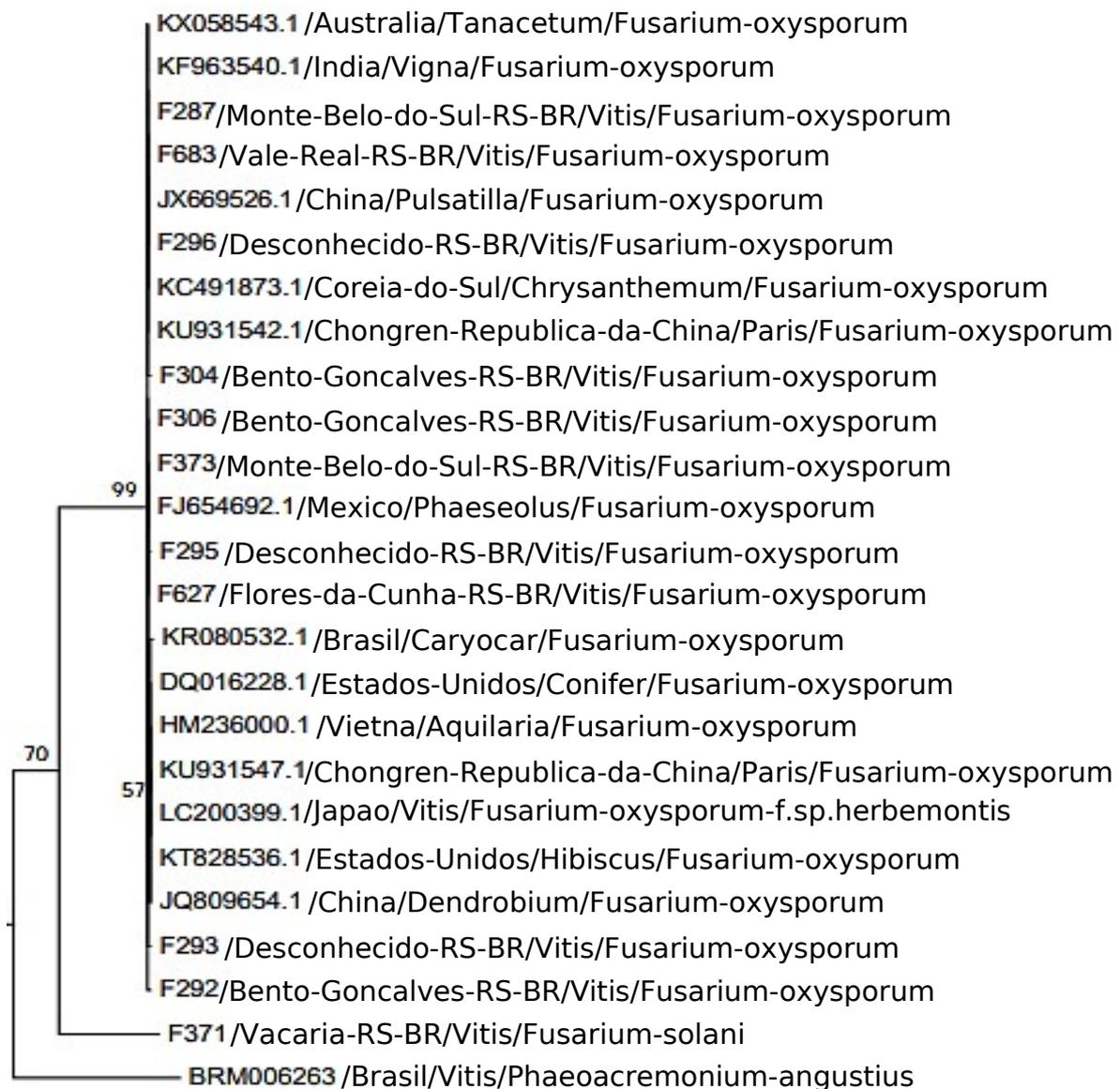
isolados do resto do mundo. Os desdobramentos gerados na árvore que representam menor similaridade entre os organismos foram obtidos: para o isolado de *F. solani* (F371) oriundo do Rio Grande do Sul, com um valor de *bootstrap*, igual a 99; e o isolado de *Phaeoacremonium angustius* (BRM006263; acesso GenBank MG041381.1) utilizado como grupo externo (*outgroup*), que obteve valor de *bootstrap* igual a 70.

Para a construção da árvore filogenética baseada na região da  $\beta$ -tubulina, foram alinhadas as 11 sequências dos isolados gaúchos, em conjunto com 14 sequências da mesma região de isolados de *F. oxysporum* e uma sequência de *F. solani*, obtidas no GenBank.

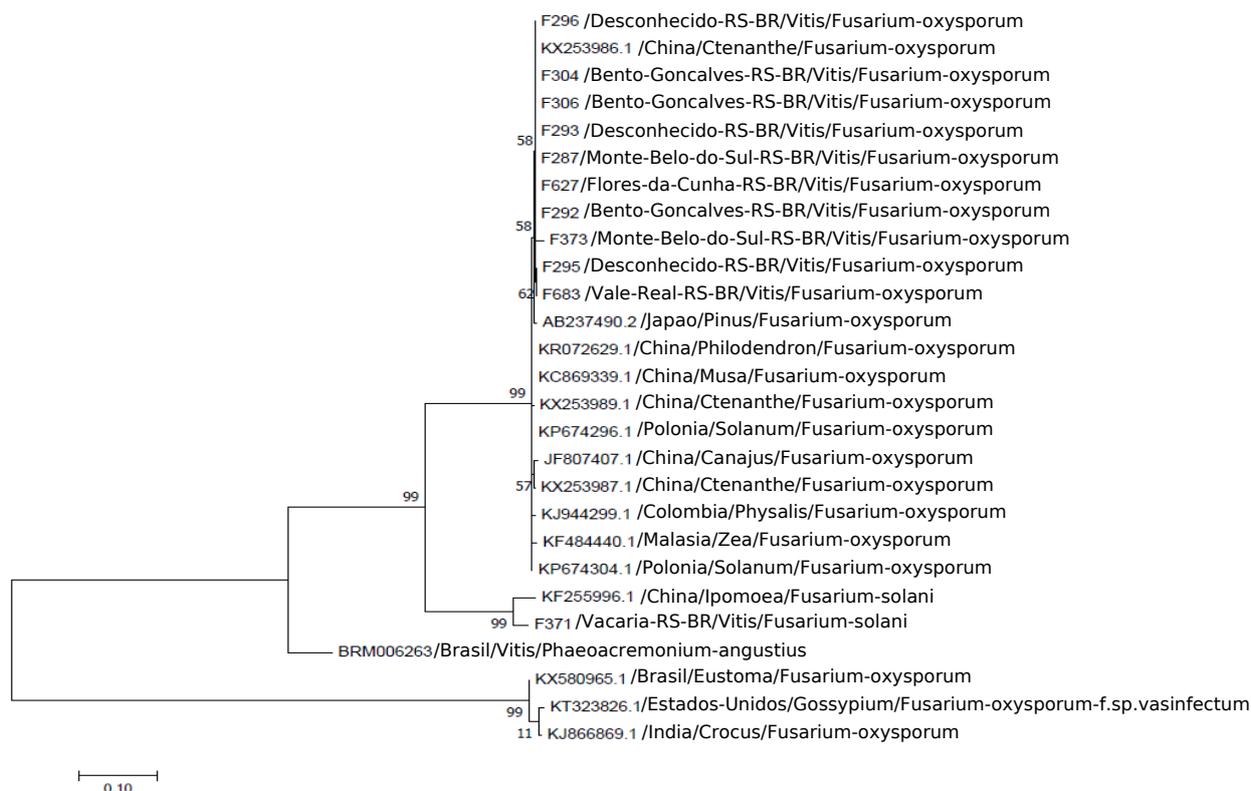
A árvore filogenética construída a partir da análise da região da  $\beta$ -tubulina com 27 isolados está apresentada na Figura 9. Pela filogenia dessa região, pode-se verificar, novamente, elevada similaridade entre os isolados de *F. oxysporum* oriundos do Rio Grande do Sul e também com a maioria dos

isolados provenientes de outros países. Na análise do isolado JF807407.1 (Tabela 6), foi utilizada uma sequência similar à da  $\beta$ -tubulina, sendo que esse isolado se agrupou com os demais isolados de *F. oxysporum*. Foi verificada a ocorrência de agrupamento de dois isolados de *F. solani* (F371, originário do Rio Grande do Sul, e KF255996.1, proveniente da China), conforme esperado, havendo o desdobramento da árvore com *bootstrap* igual a 99 (Figura 9). O isolado de *P. angustius*, adicionado à árvore como grupo externo, ficou separado dos demais, como *outgroup*. Os isolados KX580965.1 (*F. oxysporum*, Brasil), KT323826.1 (*F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, Estados Unidos) e KJ866869.1 (*F. oxysporum*, Índia) foram agrupados entre si, sendo separados dos demais isolados de *F. oxysporum*, o que indica menor similaridade entre estes (Figura 9).

Da mesma forma que para as outras regiões estudadas, para a construção da árvore filogenética baseada na região do EF-1 $\alpha$ , foram alinhadas as 11



**Figura 8.** Árvore filogenética baseada na sequência da região ITS de 25 isolados: 10 *Fusarium oxysporum* e um *F. solani* deste estudo; 14 *F. oxysporum* do GenBank e *P. angustius* como grupo externo. A escala é equivalente à substituição de 100 nucleotídeos a cada 1.000 pb. Os valores de *bootstrap* indicados nos desdobramentos estão em porcentagem.



**Figura 9.** Árvore filogenética baseada nas sequências da região da β-tubulina de 27 isolados: 10 *Fusarium oxysporum* e um *F. solani* deste estudo; 1 *Phaeoacremonium angustius*; 14 *F. oxysporum* e 1 *F. solani* do Genbank. A escala é equivalente à substituição de 100 nucleotídeos a cada 1.000 pb. Os valores de *bootstrap* indicados nos desdobramentos estão em porcentagem.

sequências dos isolados gaúchos estudados (10 da espécie *F. oxysporum* e um *F. solani*), em conjunto com 14 sequências da mesma região do DNA de isolados de *F. oxysporum* e um sequência de *F. solani*. Estas sequências foram obtidas no banco de dados do NCBI, e são oriundas dos países: China (8), Itália (1), Tunísia (1), Estados Unidos (3), Austrália (1) e Sérvia (1), alinhadas com um isolado de *P. angustius* (BRM006263), adicionado novamente como grupo externo (*outgroup*). As plantas hospedeiras dos isolados incluem os gêneros: *Tanacetum*, *Philodendron*, *Fragaria* e *Sesamum*. Maiores informações a respeito das sequências da região do EF-1α obtidas do banco de dados do NCBI encontram-se na Tabela 7.

Com relação à árvore filogenética da região EF-1α (Figura 10), nota-se o agrupamento de 9 isolados de *F. oxysporum* originários do Rio Grande do Sul (F373, F627, F287, F296, F304, F306, F293, F295 e F292) com os isolados KJ194169.1 e KT224095.1

(China) e KT323867.1 (Estados Unidos), sendo desconsideradas as separações apresentadas dentro deste agrupamento maior, devido aos baixos valores de *bootstrap* (valores iguais a 4, 29 e 53). O isolado de *F. oxysporum* F683 (Rio Grande do Sul) separou-se dos demais isolados gaúchos (*bootstrap* igual a 75), sendo agrupado com o *F. oxysporum* KT213420.1 (China) e *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* AF363399.1 (Tunísia). Os isolados KF690635.1 (China) e KX058552.1 (Austrália) foram agrupados entre si, com *bootstrap* igual a 89. O isolado AF363396.1 de *F. oxysporum* f. sp. *vasinfecum* (Estados Unidos) e o AF363406.1 de *F. oxysporum* f. sp. *dianthi* (Itália) foram agrupados com *bootstrap* igual a 93. Todos os isolados citados apresentam-se em um grande grupo, separados de um grupo menor com *bootstrap* igual a 99. Neste grupo, estão quatro isolados chineses (KT224076.1, KR072627.1, KT224341.1 e KT213402.1) e um isolado sérvio (KJ647280.1), todos pertencentes

**Tabela 6.** Informações dos isolados obtidos no GenBank e utilizados na construção da árvore filogenética baseada na região da  $\beta$ -tubulina.

Espécie	Código de Acesso (GenBank/NCBI)	País de origem	Hospedeiro	Espécie hospedeira	Comprimento da sequência (pb)
<i>Fusarium oxysporum</i>	KF484440.1	Malásia	Milho	<i>Zea mays</i>	500
<i>F. oxysporum</i>	KR072629.1	China	Imbé	<i>Philodendron oxycardium</i>	1275
<i>F. oxysporum</i>	KJ944299.1	Colômbia	Fisalis	<i>Physalis peruviana</i>	542
<i>F. oxysporum</i>	KP674296.1	Polônia	Batata	<i>Solanum tuberosum</i>	864
<i>F. oxysporum</i>	KX580965.1	Brasil	Lisianthus	<i>Eustoma grandiflorum</i>	459
<i>F. oxysporum</i>	KJ866869.1	Índia	Açafrão	<i>Crocus sativus</i>	351
<i>F. oxysporum</i>	KT323826.1	Estados Unidos	Algodão	<i>Gossypium spp.</i>	1885
<i>F. oxysporum</i>	KP674304.1	Polônia	Batata	<i>Solanum tuberosum</i>	724
<i>F. oxysporum</i>	KX253989.1	China	Maranta	<i>Ctenanthe oppenheimiana</i>	1298
<i>F. oxysporum</i>	JF807407.1	China	Guandu	<i>Canajus cajan</i>	534
<i>F. oxysporum</i>	AB237490.2	Japão	Pinus	<i>Pinus luchuensis</i>	638
<i>F. oxysporum</i>	KX253987.1	China	Maranta	<i>Ctenanthe oppenheimiana</i>	1289
<i>F. oxysporum</i>	KX253986.1	China	Maranta	<i>Ctenanthe oppenheimiana</i>	1286
<i>F. oxysporum</i>	KC869339.1	China	Banana	<i>Musa acuminata</i>	945
<i>F. oxysporum</i>	KF255996.1	China	Batata-doce	<i>Ipomoea batatas</i>	1332
<i>Phaeoacremonium angustius</i>	BRM006263/ não publicado	Brasil	Videira	<i>Vitis vinifera</i>	590

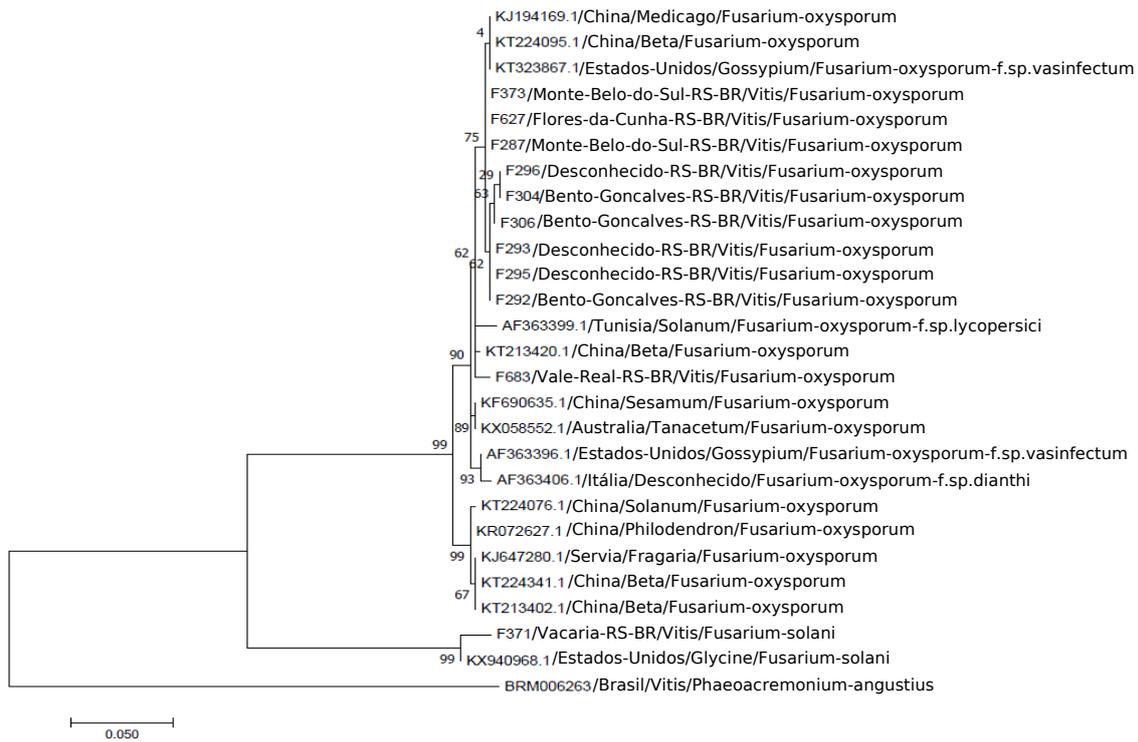
à espécie *F. oxysporum*. Os isolados de *F. solani* (F371 e KX940968.1) foram agrupados entre si (*bootstrap* igual a 99). Por último, pode-se observar a formação de um desdobramento na árvore correspondente ao isolado de *P. angustius* (BRM006263), utilizado como grupo externo. Mais uma vez foi verificada alta similaridade entre as sequências dos isolados.

Finalmente, construiu-se uma árvore filogenética baseada nas três regiões do DNA (ITS,  $\beta$ -tubulina e EF-1 $\alpha$ ) concatenadas dos 11 isolados de *Fusarium*

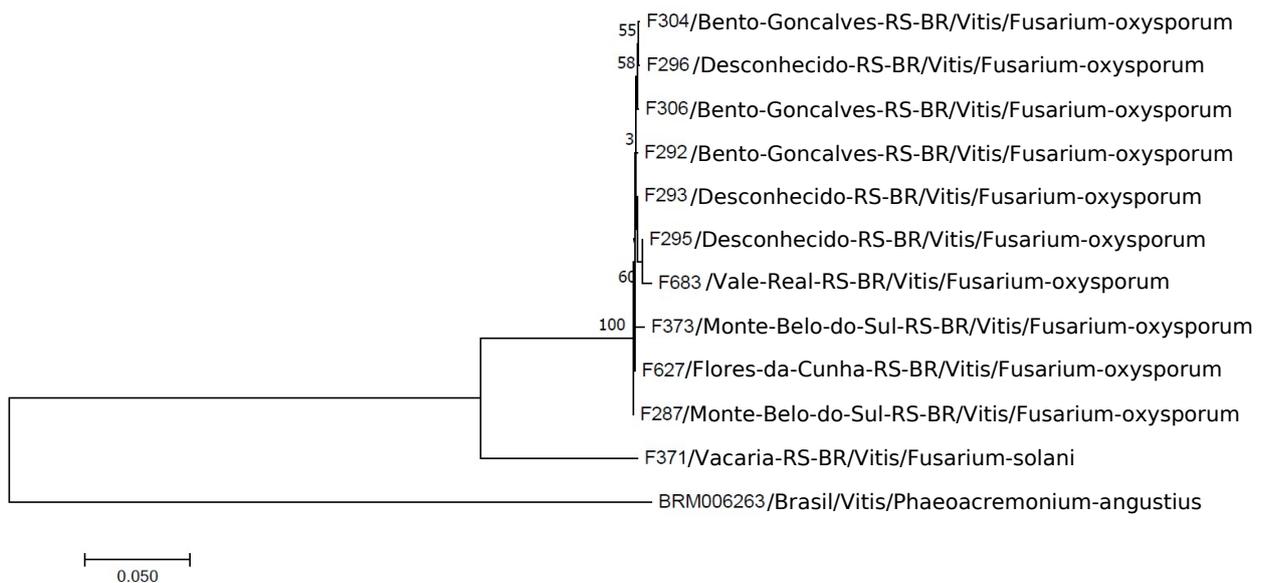
spp. abordados neste trabalho (Figura 11). A árvore gerada evidencia a alta similaridade dos isolados gaúchos de *F. oxysporum*. Houve pequenos desdobramentos, separando alguns dos isolados, porém os valores de *bootstrap* foram baixos (menores que 70). O isolado de *F. solani* foi localizado em grupo diferente dos *F. oxysporum*, com alto valor de *bootstrap* (100), indicando elevada confiabilidade na separação. O isolado BRM006263, de *P. angustius*, utilizado como grupo externo foi separado dos demais.

**Tabela 7.** Informações dos isolados obtidos no GenBank, utilizados na construção da árvore filogenética baseada na região da EF-1 $\alpha$ .

Espécie	Código de acesso (GenBank/NCBI)	País de origem	Hospedeiro	Espécie hospedeira	Comprimento da sequência (pb)
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>dianthi</i>	AF363406.1	Itália	Cravo	<i>Dianthus</i> spp.	606
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	AF363399.1	Tunísia	Tomate	<i>Solanum lycopersicum</i>	609
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>vasinfectum</i>	AF363396.1	Estados Unidos	Algodão	<i>Gossypium</i> spp.	604
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>vasinfectum</i>	KT323867.1	Estados Unidos	Algodão	<i>Gossypium</i> spp.	1823
<i>F. oxysporum</i>	KT213420.1	China	Beterraba	<i>Beta vulgaris</i>	673
<i>F. oxysporum</i>	KT224095.1	China	Beterraba	<i>Beta vulgaris</i>	671
<i>F. oxysporum</i>	KT224076.1	China	Batata	<i>Solanum tuberosum</i>	669
<i>F. oxysporum</i>	KJ194169.1	China	Alfafa	<i>Medicago</i> spp.	685
<i>F. oxysporum</i>	KX058552.1	Austrália	Tanaceto	<i>Tanacetum cinerariifolium</i>	403
<i>F. oxysporum</i>	KR072627.1	China	–	<i>Philodendron oxycardium</i>	687
<i>F. oxysporum</i>	KJ647280.1	Sérvia	Morango	<i>Fragaria ananassa</i> Duch.	675
<i>F. oxysporum</i>	KT213402.1	China	Beterraba	<i>Beta vulgaris</i>	669
<i>F. oxysporum</i>	KF690635.1	China	Gergelim	<i>Sesamum indicum</i>	665
<i>F. oxysporum</i>	KT224341.1	China	Beterraba	<i>Beta vulgaris</i>	669
<i>Fusarium solani</i>	KX940968.1	Estados Unidos	Soja	<i>Glycine max</i>	712
<i>Phaeoacremonium angustius</i>	BRM006263 /Não publicado	Brasil	Videira	<i>Vitis vinifera</i>	703



**Figura 10.** Árvore filogenética baseada nas sequências da região do EF-1α de 27 isolados: 10 *Fusarium oxysporum* e 1 *F. solani* deste estudo; 1 *Phaeoacremonium angustius*; 14 *F. oxysporum* e 1 *F. solani* do GenBank. A escala é equivalente à substituição de 50 nucleotídeos a cada 1.000 pb. Os valores de *bootstrap* indicados nos desdobramentos são dados em porcentagem.



**Figura 11.** Árvore filogenética baseada nas três regiões do DNA (ITS, β-tubulina e EF-1α) dos 11 isolados de *Fusarium* spp. deste estudo. O isolado de *Phaeoacremonium angustius* foi inserido como grupo externo. A escala é equivalente à substituição de 50 nucleotídeos a cada 1.000 pb. Os valores de *bootstrap* indicados nos desdobramentos estão em porcentagem.

## Conclusões

- 1) A abordagem de PCR com os iniciadores ITS1 e ITS4, BTubT1 e BTubT2 e EF1 728 e EF1 1567 permite a amplificação do DNA dos 11 isolados gaúchos de *Fusarium* spp. Os produtos de PCR obtidos são de, aproximadamente, 500 pb (ITS) e 800 pb ( $\beta$ -tubulina e EF-1 $\alpha$ ).
- 2) A abordagem de PCR-RFLP (CAPS) empregada no presente estudo oferece padrões de restrição da região ITS com as enzimas *HaeIII* e *CfoI*, bem como das regiões da  $\beta$ -tubulina e EF-1 $\alpha$ , para ambas as enzimas. A técnica permite, ainda, a diferenciação de isolados de *F. oxysporum* e *F. solani* através dos distintos padrões de restrição apresentados.
- 3) As sequências de *Fusarium* spp. obtidas de amostras de videira com fusariose em parreirais no Rio Grande do Sul mostraram-se similares às depositadas no GenBank, em isolados de outras partes do mundo. Tais sequências possuem elevados percentuais de identidade com as sequências disponíveis no banco de dados.
- 4) Os estudos filogenéticos realizados com as sequências de *Fusarium* spp. isolados de podridões de videira evidenciam alta similaridade entre os mesmos e também com isolados provenientes de outros hospedeiros/países, impossibilitando a elucidação da origem de disseminação da fusariose da videira, em vinhedos do sul do Brasil. Nos isolados trabalhados, a região ITS é menos informativa que a da  $\beta$ -tubulina e a do EF-1 $\alpha$ .
- 5) Os alinhamentos das regiões ITS,  $\beta$ -tubulina e EF-1 $\alpha$  concatenadas revelam alta similaridade intraespecífica em *F. oxysporum*. As sequências do ITS dos isolados de *Fusarium* trabalhados estão depositadas no GenBank.

## Referências

- AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**. 5th ed. [S.l.]: Elsevier, 2005. 948 p.
- APPEL, D. J.; GORDON, T. R. Intraspecific variation within populations of *Fusarium oxysporum* based on RFLP analysis of the intergenic spacer region of the rDNA. **Experimental Mycology**, v. 19, n. 2, p. 120-128, June 1995. DOI: <https://doi.org/10.1006/emyc.1995.1014>.
- APPEL, D. J.; GORDON, T. R. Relationships among pathogenic and nonpathogenic isolates of *Fusarium oxysporum* based on the partial sequence of the intergenic spacer region of the ribosomal DNA. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 9, n. 2, p. 125-138, Mar. 1996. DOI: <https://doi.org/10.1094/mpmi-9-0125>.
- BRASILEIRO, B. T. R. V.; COIMBRA, M. R. M.; MORAIS JR, M. A. de; OLIVEIRA, N. T. de. Genetic Variability within *Fusarium solani* species as revealed by PCR-fingerprinting based on PCR markers. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, n. 3, p. 205-210, Sept. 2004. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1517-83822004000200006>.
- BRAUN, R. L.; JUNQUEIRA, D. M.; VERDI, H. Filogenia Molecular. In: VERLI, H. (org). **Bioinformática da biologia à flexibilidade molecular**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2014.
- BURGESS, L. W.; SUMMERELL, B. A.; BACKHOUSE, D.; BENYON, F.; LEVIC, J. Biodiversity and population studies in *Fusarium*. **Sydowia**, v. 48, n. 1, p. 1-11, 1996.
- CALDART, E. T.; MATA, H.; CANAL, C. W.; RAVAZOLLO, A. P. Análise filogenética: conceitos básicos e suas utilizações como ferramenta para virologia e epidemiologia molecular. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 44, p. 1-20, 17 set. 2016.
- CAVALCANTI, F. R.; BUENO, C. J.; ALMANÇA, M. A. K. **Declínio e morte de plantas de videira**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2013, 44p. (Embrapa Uva e Vinho. Documentos, 82). Disponível em: <https://www.cnpuv.embrapa.br/publica/documentos/doc082.pdf>. Acesso em: 16 out. 2023.
- CAVALCANTI, F. R.; GARRIDO, L. da R. Controle de doenças. In: GARRIDO, L. da R.; HOFFMANN, A.; SILVEIRA, S. V. da. (ed.). **Produção integrada de uva para processamento: manejo de pragas e doenças**. Brasília, DF: Embrapa, 2015. v. 4, cap. 2, p. 33-48. Disponível em: <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/132389/1/manual-4-manejo-cap2.pdf>. Acesso em: 24 jul. 2023.
- CAVALCANTI, F. R. Manejo fitossanitário: manejo de doenças da videira na Campanha Gaúcha. In: SILVEIRA, S. V. da; PROTAS, J. F. da S. **Vinhos finos da região da Campanha Gaúcha: tecnologias para a vitivinicultura e para estruturação de Indicação Geográfica**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2021. Cap. 3, p. 81-116. (Embrapa Uva e Vinho. Documentos, 130). Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/231091/1/DOc-130-online.pdf>. Acesso em: 16 out. 2023.
- CHEHRI, K. ; SALLEH, B.; YLI-MATTILA, T.; REDDY, K. R. N.; ABBASI, S. Molecular characterization of pathogenic *Fusarium* species in cucurbit plants from Kermanshah province, Iran. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 18, n. 4, p. 341-351, Oct. 2011. DOI: 0.1016/j.sjbs.2011.01.007.

- EIBACH, R.; TOPFER, R. Traditional grapevine breeding techniques. In: REYNOLDS, A. **Grapevine breeding programs for the wine industry**. Elsevier, 2015. 444 p.
- FALEIRO, F. G.; LUZ, E. D. M. N.; CERQUEIRA, A. O.; ROCHA, C. S. S. Uso de marcadores RAPD na Classificação de Isolados de *Phytophthora* spp. causadores da podridão parda do cacauzeiro no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, n. 3, p. 312-315, jun. 2003. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-41582003000300015>.
- FERNANDES, S.; GODOY-LUTZ, G.; JOCHUA, C.; URREA, C.; ESKRIDGE, K.; STEADMAN J. R.; HERR, J. R. Root and crown rot pathogens found on dry beans grown in Mozambique. **Tropical Plant Pathology**, v. 46, p. 294-310, Mar. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1007/s40858-021-00422-8>.
- GEISER, D. M.; JIMÉNEZ-GASCO, M. del M.; KANG, S.; MAKALOWSKA, I.; VEERAGHAVAN, N.; WARD, T. J.; ZHANG, N.; KULDAU, G. A.; O'DONNELL, K. FUSARIUM-ID v. 1.0: A DNA sequence database for identifying *Fusarium*. **European Journal of Plant Pathology**, v. 110, p. 473-479, June 2004. DOI: <https://doi.org/10.1023/B:EJPP.0000032386.75915.a0>.
- GLASS, N. L.; DONALDSON, G. C. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 4, p. 1323-1330, Apr. 1995. DOI: <https://doi.org/10.1128/aem.61.4.1323-1330>. Apr. 1995.
- GRIFFITHS, K. E.; BALDING, S. T.; DICKIE, J. B.; LEWIS, G. P.; PEARCE, T. R.; GRENYER, R. Maximizing the phylogenetic diversity of seed banks. **Conservation Biology**, v. 29, n. 2, p. 370-381, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1111/cobi.12390>.
- GRIGOLETTI JÚNIOR, A. **Fusariose da videira: resistência de cultivares, sintomas e controle**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, dez. 1993. (Embrapa Uva e Vinho. Circular técnica, 18). Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/87070/1/fusariose.pdf>. Acesso em: 16 out. 2023.
- HALL, B. G. Building phylogenetic trees from molecular data with MEGA. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, n. 5, p. 1229-1235, 30 May 2013. DOI: <https://doi.org/10.1093/molbev/mst012>.
- HU, H. L.; JEEWON, R.; ZHOU, T.; HYDE, K. D. Phylogenetic diversity of endophytic Pestalotiopsis species in *Pinus armandii* and *Ribes* spp.: evidence from rDNA and  $\beta$ -tubulin gene phylogenies. **Fungal Diversity**, v. 24, p. 1-22, 2007.
- INAMI, K.; KASHIWA, T.; KAWABE, M. The tomato wilt fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* shares common ancestors with nonpathogenic *Fusarium oxysporum* isolated from wild tomatoes in the Peruvian Andes. **Microbes and Environments**, v. 29, n. 2, p. 200-210, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1264/jsme2.me13184>.
- KARLSSON, I.; EDEL-HERMANN, V.; GAUTHERON, N.; DURLING, M. B.; KOLSETH, A.-K.; STEINBERG, C.; PERSSON, P.; FRIBERG, H. Genus-specific primers for study of *Fusarium* communities in field samples. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 82, n. 2, p. 491-501, Jan. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1128/AEM.02748-15>.
- KELLER, M. **The science of grapevines**. 3rd ed. Academic Press, 2020. 554 p.
- KORABECNA, M. The variability in the fungal ribosomal DNA (ITS1, ITS2, and 5.8 S rRNA gene): its biological meaning and application in medical mycology. **Formatex**, v. 108, n. 43, p. 783-787, 2007.
- LOBATO, A. C. B.; CAVALCANTI, F. R. **Padrões de restrição de DNA para detecção molecular de *Lasiodiplodia theobromae* em videira e estudos filogenéticos em sequências concatenadas**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2021. (Embrapa Uva e Vinho. Boletim de pesquisa e desenvolvimento, 19). Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/221585/1/BolPesqDes-19-2021.pdf>. Acesso em: 16 out. 2023.
- MENCARELLI, F.; BELLINCONTRO, A.; DIRENZO, G. **Grape: post-harvest operations**. Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2005. Disponível em: <http://www.fao.org/3/a-av004e.pdf>. Acesso em: 23 set. 2022.
- O'DONNELL, K.; CIGELNIK, E. Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 7, n. 1, p. 103-116, fev. 1997. DOI: <https://doi.org/10.1006/mpev.1996.0376>.
- OLIVEIRA, V. C. de; COSTA, J. L. S. da. Análise de restrição de DNA ribossomal amplificado (ARDRA) pode diferenciar *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* de *F. solani* f. sp. *glycines*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 27, n. 79, p. 631-634, nov. 2002. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-41582002000600013>.
- SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001, v. 2.
- TAYLOR, A.; VÁGÁNY, V.; JACKSON, A. C.; HARRISON, R. J.; RAINONI, A.; CLARKSON, J. P. Identification of pathogenicity-related genes in *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae*. **Molecular Plant Pathology**, v. 7, n. 17, p. 1032-1047, 23 Sept. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1111/mpp.12346>.
- SALAH, H.; AL-HATMI, A. M. S.; THEELEN, B.; ABUKAMAR, M.; HASHIM, S.; DIEPENINGEN, A. D. V.; LASS-FLORL, C.; BOEKHOUT, T.; ALMASLAMANI, M.; TAJ-AL-

DEEN, S. J. Phylogenetic diversity of human pathogenic *Fusarium* and emergence of uncommon virulent species. **Journal of Infection**, v. 71, n. 6, p. 658-666, Dec. 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2015.08.011>.

SILVA, F. P. da; VECHIATO, M. H.; HARAKAVA, R. EF-1 $\alpha$  gene and IGS rDNA sequencing of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* reveals polyphyletic origin of strains. **Tropical Plant Pathogen**, v. 39, n. 1, p. 64-73, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1982-56762014000100008>.

STEIN, D. L.; AGUSTINI, B. C.; TORMENTE, F. V.; ALVES, S. A. M.; CAVALCANTI, F. R. Estudos de caracterização molecular de *Neovectria ditissima* no Rio Grande do Sul. In: ALVES, S. A. M.; CZERMANSKI, A. B. (ed.). **O Cancro Europeu no Brasil**. Brasília, DF: Embrapa, 2019. cap. 4, p. 60-75. Disponível em: <http://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/handle/doc/1116315>. Acesso em: 16 out. 2023.

TEIXEIRA, H.; VIEIRA, M. das G. G. C.; MACHADO, J. C. Marcadores RAPD na análise da diversidade genética de isolados de *Acremonium strictum*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, n. 31, p. 413-418, Dez. 2004. DOI:

<https://doi.org/10.1590/S0100-41582004000600009>.

UNTERGASSER, A.; NIJVEEN, H.; RAO, X.; BISSELING, T.; GEURTS, R.; LEUNISSEN, J. A. M. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. **Nucleic Acids Research**, v. 35, n. 2, W71-74, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkm306>.

WADE, R. H. On and around microtubules: An overview. **Molecular Biotechnology**, v. 43, n. 2, p. 177-191, Oct. 2009. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12033-009-9193-5>.

WHITE, T. J.; BRUNS, T. D.; LEE, S. B.; TAYLOR, J. W. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M. A. (ed.). **PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications**. [S.l.]: Academic Press, 1990, p. 315-322.

ZARRIN, M.; GANJ, F.; FARAMARZI, S. Analysis of the rDNA internal transcribed spacer region of the *Fusarium* species by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. **Biomedical Reports**, v. 4, n. 4, p. 471-474, Feb. 2016. DOI: <https://doi.org/10.3892/br.2016.615>.