

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
DEPARTAMENTO DE DEFESA FITOSSANITÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA FLORESTAL

Jessica Mengue Rolim

**CARACTERIZAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA E MOLECULAR DE
Fusarium spp., AGENTE CAUSAL DA MURCHA EM *Carya illinoensis*
K.**

Santa Maria, RS
2019

Jessica Mengue Rolim

**CARACTERIZAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA E MOLECULAR DE *Fusarium* spp.,
AGENTE CAUSAL DA MURCHA EM *Carya illinoensis* K.**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS) como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Engenharia Florestal**.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Marlove Fatima Brião Muniz

Santa Maria, RS, Brasil
2019

Rolim, Jessica
CARACTERIZAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA E MOLECULAR DE
Fusarium spp., AGENTE CAUSAL DA MURCHA EM *Carya*
illinoensis K. / Jessica Rolim.- 2019.
73 p.; 30 cm

Orientadora: Marlove Fatima Brião Muniz
Coorientadora: Lia Rejane Silveira Reiniger
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós
Graduação em Engenharia Florestal, RS, 2019

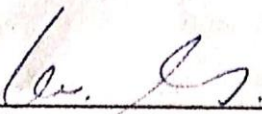
1. Murcha em noqueira-pecã 2. *Fusarium* spp. I. Brião
Muniz, Marlove Fatima II. Silveira Reiniger , Lia Rejane
III. Título.

Jessica Mengue Rolim

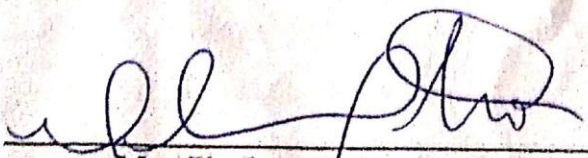
**CARACTERIZAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA E MOLECULAR DE
Fusarium spp., AGENTE CAUSAL DA MURCHA EM *Carya illinoensis*
K.**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS) como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Engenharia Florestal.

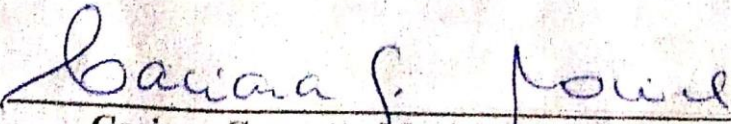
Aprovada em 19 de fevereiro de 2019:



Marlove Fatima Brião Muniz, Prof^a Dr^a (UFSM)
(ORIENTADORA)



Marília Lazarotto, Prof^a Dr^a (UFRGS)



Caciara Gonzatto Maciel, Prof^a Dr^a (UFMT)

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal que possibilitou a realização deste trabalho.

Ao órgão financiador CAPES, pelo apoio financeiro concedido através da disponibilização da bolsa mestrado.

À Prof^ª. Dr^ª. Marlove Fátima Brião Muniz pela confiança, disponibilidade e conhecimentos ofertados a mim, e por ter possibilitado que eu realizasse o estudo sob sua orientação.

À Prof^ª. Dr^ª. Lia Rejane Silveira Reiniger pela co-orientação deste trabalho.

Às professoras membros da banca por aceitarem o convite de avaliar e contribuir com o trabalho.

À funcionária Maria das Nevis Deconto Weber pelos conhecimentos e disponibilidade sempre presentes, e aos demais funcionários do Departamento de Defesa Fitossanitária que contribuem para a realização das pesquisas.

Ao laboratório de Biologia Molecular e Sequenciamento (LabDros) da UFSM coordenado pelo professor Dr. Élgion Loreto que disponibilizou e possibilitou a realização das análises moleculares e a laboratorista Mônica pelo auxílio em todas as etapas que envolveram a caracterização molecular neste trabalho.

Aos guias espirituais que rogam e intercedem por mim.

À toda minha família, principalmente a meus pais pelo incentivo, dedicação, força, auxílio, e carinho despendido. Em especial a meu pai por guiar meus passos e acreditar sempre no meu sucesso.

A meu namorado Danilo pela paciência, ajuda, apoio, e amor dedicados a mim em todos os momentos durante essa jornada e nos demais acontecimentos da minha vida.

À minha prima e amiga de todas horas Valéria, por dividir comigo todos os dias de glória, mas principalmente pelo apoio nos momentos de luta.

Aos meus amigos e colegas de laboratório por todo o auxílio essencial para o desenvolvimento da pesquisa, pelas horas de dedicação e amizade, além do incentivo e palavras de carinho. Em especial ao Lucas Savian pela ajuda durante a realização dos experimentos, por todo o apoio e amizade.

À todas as demais pessoas que contribuíram, direta ou indiretamente para a realização deste trabalho, o meu sincero reconhecimento e gratidão.

Muito obrigada!

“O começo de todas as ciências é o espanto de
as coisas serem o que são”.

(Aristóteles)

RESUMO

CARACTERIZAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA E MOLECULAR DE *Fusarium* spp., AGENTE CAUSAL DA MURCHA EM *Carya illinoensis* K.

AUTORA: Jessica Mengue Rolim

ORIENTADORA: Prof.^a. Dr.^a. Marlove Fatima Brião Muniz.

A produção de noqueira-pecã (*Carya illinoensis*) contribui com a cadeia econômica de diversas regiões do país, fornecendo amêndoas utilizadas pela indústria alimentícia, cascas utilizadas para fabricação de chás e fertilizantes, além da madeira, considerada de ótima qualidade para fabricação de móveis. No Rio Grande do Sul, o cultivo está estabelecido há bastante tempo, ganhando maior atenção nos últimos anos devido à rentabilidade proporcionada pela atividade. Porém, um dos fatores que prejudica a produção da espécie é a incidência de doenças, as quais são capazes de provocar danos severos e devastar pomares. Nesse contexto, a murcha ocasionada por fungos do gênero *Fusarium* surge como uma nova ameaça aos pomares da região sul do país, manifestando-se através de sintomas como murcha, encarquilhamento e necrose de folhas, além de escurecimento dos tecidos vasculares. Assim, o presente trabalho teve como objetivo analisar as características morfofisiológicas e moleculares, além de confirmar a patogenicidade de isolados de *Fusarium* spp. associados a murcha em noqueira-pecã em pomares da região Sul do Brasil. Para isso, amostras de material vegetal sintomáticos foram coletadas em diferentes municípios do Rio Grande do Sul e Paraná. Posteriormente, foram purificados e obtidos isolados potencialmente patogênicos. Após a obtenção dos isolados, esses foram avaliados quanto à variabilidade morfofisiológica através da mensuração do crescimento micelial, pigmentação das colônias e coloração do micélio aéreo além do dimensionamento de esporos e demais características das estruturas reprodutivas. A caracterização molecular foi realizada através da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para amplificação da região do fator de alongação 1-alfa e posterior sequenciamento. Já o teste de patogenicidade foi realizado através da imersão de raízes de plantas de noqueira em suspensão de esporos dos isolados de *Fusarium* spp. Além disso, foi avaliada a severidade da doença por meio de uma escala de notas de acordo com os sintomas expressos pelas plantas. Foram obtidos 19 isolados fúngicos de plantas distribuídas em diferentes localidades. As características morfofisiológicas analisadas foram suficientes para comprovar a existência de variabilidade entre os isolados, sendo a esporulação e o comprimento de macroconídios os caracteres que mais contribuíram para tal diferenciação. Através da análise de dissimilaridade dos caracteres morfofisiológicos foi possível separar os isolados em diferentes grupos. O sequenciamento da região do fator de alongação 1-alfa permitiu comprovar a diferença existente entre os isolados e identificar um complexo de espécies, sendo elas *Fusarium oxysporum*, *F. fujikuroi*, *F. graminearum*, *F. incarnatum* e *F. solani*. Todos os isolados foram considerados patogênicos a noqueira-pecã, porém, houve variabilidade quanto a agressividade dos mesmos. Com isso, pode-se concluir que diferentes espécies do gênero *Fusarium* são responsáveis pela ocorrência de murcha em noqueira-pecã no Rio Grande do Sul e Paraná.

Palavras-Chave: Noqueira-Pecã. Pecanicultura. Morfofisiologia de fungos. Variabilidade Genética. Fator de alongação 1-alfa.

ABSTRACT

MORPHOPHYSIOLOGICAL AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF *Fusarium* spp., CAUSAL AGENT OF WILT *Carya illinoensis* K.

AUTHOR: Jessica Mengue Rolim
ADVISER: DR^a. Marlove Fatima Brião Muniz.

The production of pecan (*Carya illinoensis*) contributes with the productive chain and economy of many regions from both the country and in Rio Grande do Sul state, cultivation has been established for quite some time, drawing greater attention in the last few years due to the profitability provided by the activity. However, one of the harmful factors in growing the species is the incidence of diseases, which are capable of severely damaging and devastating orchards. In this context, wilt occasioned by fungi of the *Fusarium* genus arises as a new threat to orchards from the southern region of the country, manifesting through symptoms such as wilt, shrouding and necrosis of leaves, as well as browning of vascular tissue. In this direction, the present work aimed to analyze the morphophysiological and molecular characteristics, as well as validate the pathogenicity from isolates of *Fusarium* spp. associated to pecan wilt in the southern region of Brasil. In order to do so, samples of symptomatic matter were collected in different towns from Rio Grande do Sul and Paraná. Subsequently, potentially pathogenic isolates were obtained and purified. After being obtained, the isolates were evaluated regarding the morphophysiological variability through measurement of mycelial growth, sporulation, colony pigmentation and coloring of the aerial mycelium as well as dimensioning of spores and further characteristics of reproductive structures. Molecular characterization was carried out through PCR (Polymerase Chain Reaction) to amplify the region of elongation factor 1-alpha and further sequencing. The pathogenicity test was carried out through immersion of pecan tree roots in suspension of spores from the *Fusarium* spp. isolates. Besides that, the severity of diseases has been evaluated through a scoring scale according to the symptoms indicated in the plants. Nineteen fungi isolates were obtained from plants distributed in different localities from Southern-region states. The analysed morphophysiological characteristics were enough to prove the existence of variability among isolates, with sporulation and macroconidium length being the highest contributing factors to such differentiation. Through dissimilarity analysis of morphophysiological traits, isolates could be separated in different groups. Sequencing of the region of elongation factor 1-alpha enabled proving difference among isolates as well as identifying five species, *Fusarium oxysporum*, *F. fujikuroi*, *F. graminearum*, *F. incarnatum* and *F. solani*. All isolates were considered pathogenic to the pecan tree, however, there was variability regarding their aggressiveness. Therefore, it can be concluded that different species of the *Fusarium* genus are responsible for pecan tree wilt in the southern region of Brazil.

Key-words: Pecan tree. Pecanculture. Fungus Morphophysiology. Genetic Variability. 1-alfa elongation factor.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Código, município de origem, coordenadas geográficas e data de coleta dos isolados de <i>Fusarium</i> spp. obtidos de árvores de noqueira-pecã com sintomas de murcha.....	26
Tabela 2 – Notas atribuídas a escala de severidade de murcha em noqueira-pecã.....	36
Tabela 3 – Crescimento micelial diário (mm) durante sete dias de incubação e taxa de crescimento micelial diário (mm/dia) (TCM) de isolados de <i>Fusarium</i> spp. em meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA).	40
Tabela 4 – Características morfológicas de <i>Fusarium</i> spp. obtidos de plantas sintomáticas de noqueira-pecã.	44
Tabela 5 – Grupos de isolados de <i>Fusarium</i> spp. com base na técnica de agrupamento UPGMA - (“Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean”).	50
Tabela 6 – Distâncias Euclidiana entre os isolados de <i>Fusarium</i> spp., após agrupamento pela técnica UPGMA - (“Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean”). ..	51
Tabela 7 – Contribuição relativa dos caracteres (esporulação, taxa de crescimento micelial, comprimento e largura de macroconídios e comprimento e largura de microconídios) para divergência.	52
Tabela 8 – Acesso Genbak, cobertura (%), similaridade (%) e referência das espécies utilizadas na construção do dendrograma filogenético da região do fator de alongação 1- α	53

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Plantas de noqueira-pecã com sintomas de murcha. A: amarelecimento e seca de folhas; B: fragmento de tronco com escurecimento dos tecidos vasculares. 25
- Figura 2 – Produção das plantas de noqueira-pecã. A: Sementes de noqueira-pecã preparadas para estratificação em areia esterilizada; B: Semeadura com substrato comercial em copos descartáveis. 27
- Figura 3 – Teste de patogenicidade em plantas de noqueira-pecã. A: plantas de 15 a 20 dias após emergência; B: planta selecionada para inoculação; C: imersão de raízes em suspensão de esporos e D: planta transplantada após a inoculação. 29
- Figura 4 – Plantas sintomáticas de noqueira-pecã após inoculação com isolados de *Fusarium* spp. A: amarelecimento e murcha de folhas; B: necrose marginal; C e D: seca; E: escurecimento do tecido vascular. 34
- Figura 5 – Plantas de noqueira-pecã 120 dias após inoculação com isolados de *Fusarium* spp. A: planta inoculada apresentando sintomas de murcha; B: tratamento testemunha, planta sem manifestação de sintomas. 35
- Figura 6 – Coloração do micélio aéreo de isolados de *Fusarium* spp. em meio BDA após 10 dias de incubação. 42
- Figura 7 - Coloração da colônias de isolados de *Fusarium* spp. em meio BDA após 10 dias de incubação. 42
- Figura 8 – Estruturas reprodutivas (macro e microconídios) dos isolados de *Fusarium* spp. e formação de esporodóquio em meio de cultura folha-de-cravo-ágar (CLA). 46
- Figura 9 – Dendrograma mostrando a porcentagem de dissimilaridade entre os 19 isolados de *Fusarium* spp. O Dendrograma foi obtido pela técnica UPGMA, a partir da análise da matriz de distância Euclidiana com seis caracteres morfológicos (esporulação, taxa de crescimento micelial, comprimento e largura de macroconídios e comprimento e largura de microconídios). 49
- Figura 10 – Dendrograma filogenético baseado no método Neighbour-joining a partir de sequências de DNA da região do fator de alongação 1- α , com base em 1000 réplicas de “bootstrap”. O número nas ramificações representa o número de “bootstrap”. 57

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1	<i>Carya illinoensis</i> (Wangenh.) K. Koch	14
2.2	DOENÇAS VASCULARES	15
2.2.1	Gênero <i>Fusarium</i>	19
2.3	CARACTERIZAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA E MOLECULAR DE FUNGOS	21
2.3.1	Caracterização molecular de <i>Fusarium</i> spp.	22
3	MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1	OBTENÇÃO E PURIFICAÇÃO DE ISOLADOS DE <i>Fusarium</i>	25
3.2	PATOGENICIDADE DOS ISOLADOS DE <i>Fusarium</i> spp.	27
3.2.1	Produção das plantas de noqueira-pecã	27
3.2.2	Preparo dos inóculos e suspensão de esporos	28
3.2.3	Inoculação das plantas	28
3.2.4	Avaliações	29
3.3	CARACTERIZAÇÃO DOS ISOLADOS DE <i>Fusarium</i> spp.	29
3.3.1	Caracterização morfofisiológica	29
3.3.1.1	<i>Taxa de crescimento micelial</i>	29
3.3.1.2	<i>Esporulação</i>	30
3.3.1.3	<i>Pigmentação das colônias</i>	30
3.3.1.4	<i>Caracterização de estruturas reprodutivas</i>	30
3.3.2	Caracterização molecular	31
3.3.2.1	<i>Extração de DNA dos isolados de <i>Fusarium</i> spp.</i>	31
3.3.2.2	<i>Reação de Polimerase em Cadeia (PCR) e sequenciamento</i>	32
3.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA	33
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
4.1	PATOGENICIDADE DOS ISOLADOS DE <i>Fusarium</i> spp. EM PLANTAS DE NOGUEIRA-PECÃ	34
4.2	CARACTERIZAÇÃO DOS ISOLADOS DE <i>Fusarium</i> spp.	39
4.2.1	Caracterização morfofisiológica	39
4.2.2	Caracterização molecular	53
5	CONCLUSÕES	60
	REFERÊNCIAS	61

1 INTRODUÇÃO

A noqueira-pecã (*Carya illinoensis* (Wangenh) C. Koch) é uma espécie pertencente à família Juglandaceae, oriunda da América do norte e México (WELLS, 2013). A produção da cultura está difundida em diversos países, contribuindo de forma significativa com a economia destas regiões. Atualmente, Estados Unidos e México são considerados os líderes de produção, porém, países como Argentina, Uruguai, Chile, Brasil e Austrália estão se destacando na atividade (LACERDA; LORENZI, 2006).

No Brasil, os primeiros pomares foram implantados por imigrantes norte-americanos no ano de 1915 em municípios do interior do estado de São Paulo (GOMES, 1976). No entanto, a expansão da cultura ocorreu nos anos 70, devido a incentivos fiscais para florestamento e reflorestamento, oferecidos pelo governo na época (RASEIRA, 1990).

Nos últimos vinte anos, houve um avanço significativo da pecanicultura em todo o país, aumentando assim as áreas de produção. Porém, foi durante a última década que o produtor rural passou a ter maior interesse pela atividade, visando o cultivo como uma nova fonte de renda, devido ao cenário econômico positivo que o país enfrentou aliado ao fato da fruticultura ser considerada uma prática que possui um retorno financeiro satisfatório (FRONZA; HAMANN, 2016).

Na região sul, a noqueira-pecã possui um papel importante no incremento da renda de muitos agricultores, especialmente no Rio Grande do Sul, o qual desponta na produção da cultura, com mais de 3.396 ha de área plantada e produção superior a 1.695 toneladas de nozes (EMATER/RS – ASCAR, 2014).

Atualmente, a pecanicultura é realizada por pequenos, médios e grandes produtores, seja em plantios menores através da agricultura familiar ou em grandes pomares comerciais de empresas já consolidadas no ramo. A prática ganhou espaço devido a fatores como o preço pago pelas nozes e a possibilidade de consorciar o plantio da espécie com outras culturas, bem como com a criação de animais, em sistemas agroflorestais e silvipastoris, que otimizam as áreas de produção e aumentam os rendimentos do produtor. Além disso, segundo Gatto et al. (2008) a madeira de noqueira-pecã possui maleabilidade elevada podendo ser utilizada na marcenaria de modo geral e na fabricação de móveis vergados, agregando assim mais valor comercial à espécie.

Apesar da atividade estar em constante crescimento ainda, há carência de informações relacionadas com a implementação dos pomares, desde o plantio das mudas, as necessidades nutricionais das plantas e o manejo de pragas e doenças que acometem a cultura.

As doenças são responsáveis por grande parte da perda de produção dos pomares e muitas já foram observadas e descritas para a espécie. Dentre elas está a sarna da nogueira-pecã, considerada a mais comum e de maior incidência em pomares do mundo todo. A doença é causada pelo fungo *Venturia effusa* o qual ataca tecidos jovens como folhas, pecíolo e epicarpo, comprometendo assim significativamente a produção de frutos (BOCK et al., 2017). Além disso, um complexo de espécies do gênero *Cladosporium* também é responsável pela mancha foliar, a qual já foi observada em diversos pomares no sul do Brasil (WALKER et al., 2016).

Recentemente, comprovou-se a ocorrência de novas enfermidades, como a mancha foliar causada por *Pestalotopsis clavispora* e *P. cocculi* as quais ocasionam lesões de bordas irregulares que com o avanço da doença coalescem e assemelham-se a queima foliar, provocando a perda por desfolha e diminuição da área fotossinteticamente ativa. A cultura também é atacada pelo cancro de tronco causado por *Lasiodiplodia subglobosa*, o qual provoca fendilhamentos ao longo do fuste e intumescimento da casca, podendo levar o hospedeiro à morte em um período relativamente curto (LAZAROTTO et al., 2014; POLETTTO et al., 2016).

Nesse sentido, a murcha causada por espécies do gênero *Fusarium* surge como uma nova ameaça aos pomares da região Sul, onde as árvores apresentam sintomas como amarelecimento, murcha e seca de folhas, além de escurecimento do sistema vascular, os quais comprometem a produção das plantas, podendo levar os indivíduos à morte. Esses sintomas característicos da doença foram relatados por diversos produtores de nogueira-pecã do Rio Grande do Sul e Paraná, posteriormente, através de visitas a campo, coleta e análise do material vegetal em laboratório constatou-se que os sintomas expressos pelas árvores estavam ligados a ocorrência da murcha. Dessa forma, a doença foi diagnosticada em nogueira-pecã pela primeira vez no Brasil, visto que não existem relatos na literatura da ocorrência de murcha na cultura.

O estudo de identificação de doenças requer a observação das interações entre a planta hospedeira, o agente patogênico e o ambiente, considerados os três elementos fundamentais no estabelecimento de patossistemas (BEDENDO; AMORIM, 2011). Estudos relacionados aos microrganismos causadores de doenças baseiam-se na avaliação de características morfofisiológicas aliadas a utilização de técnicas moleculares, as quais fornecem maior confiabilidade na caracterização e identificação de espécies patogênicas. Portanto, trabalhos com esse viés permitem que se conheça a variabilidade de isolados dentro de um determinado

gênero, gerando informações que servem como subsídios para implementação de estratégias de controle e tornam possível o manejo adequado da doença (TOZZE JÚNIOR et al., 2006).

Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivo determinar a estrutura morfofisiológica, molecular e a patogenicidade de isolados de *Fusarium* spp. associados a murcha em noqueira-pecã em pomares do Rio Grande do Sul e Paraná.

Os seguintes objetivos específicos foram propostos: a) caracterizar o patossistema murcha ocasionada por *Fusarium* spp. em noqueira-pecã; b) confirmar a patogenicidade de isolados de *Fusarium* spp. em plantas de noqueira-pecã; c) caracterizar morfofisiologicamente os isolados coletados em plantas de noqueira-pecã com sintomas de murcha; d) caracterizar molecularmente os isolados a fim de identificar a variabilidade dos mesmos. e) avaliar a eficiência do sequenciamento da região do fator de alongação 1-alfa na identificação de espécies de *Fusarium*. Para tanto, foram desenvolvidos estudos abordando as características morfofisiológicas dos isolados obtidos como pigmentação das colônias, esporulação e tamanho e forma de conídios, além de análises moleculares como a Reação de Polimerase em Cadeia (PCR) e o sequenciamento de DNA e a confirmação da patogenicidade através da inoculação do patógeno em plantas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch

A noqueira-pecã (*Carya illinoensis* (Wangenh) C. Koch) pertence à família Juglandaceae e é considerada uma das mais importantes espécies do gênero *Carya* (LÜDDERS, 2004). O gênero surgiu a mais de 30 milhões de anos na Ásia, Europa e América do Norte, porém devido a era glacial, cerca de 2 milhões de anos atrás, as diferentes espécies desapareceram da Europa, permanecendo apenas na América do Norte, onde a noqueira-pecã é considerada nativa. A espécie costuma estabelecer-se nas margens de rios, desde o Nebraska e Iowa nos Estados Unidos até Oaxaca, no Sul do México (ORTIZ; CAMARGO, 2005; SMITH, 2012).

As árvores são caducifólias, monoicas e de grande porte, podendo atingir até 50 m de altura, com tronco retilíneo e copa elíptica. As folhas são alternadas, compostas e imparipinadas, com 9 a 17 folíolos sésseis ou quase sésseis, oblongo-lanceolados, tendo ápice agudo ou acuminado, de coloração verde amarelada-escura na face superior, e coloração mais clara na face inferior. Os frutos são drupas que se agrupam em cachos com até sete unidades. A porção aproveitável representa cerca de 40 a 60% do fruto e o tamanho das nozes varia de acordo com a cultivar e com as técnicas de manejo empregadas (DUARTE; ORTIZ, 2001; MARCHIORI, 1997).

Para que os pomares sejam altamente produtivos é recomendado que os mesmos sejam compostos por plantas de cultivares protândricas, ou seja, aquelas em que os órgãos masculinos amadurecem primeiro, como: Desirable, Cape Fear, Success e Barton; e com cultivares protogínicas, em que os órgãos femininos são os que alcançam a maturidade primeiro, como por exemplo: Choctaw, Shawnee, Apache, Shoshoni, Stuart e Schley (RASEIRA, 1990). A propagação é comumente realizada por sementes, e as cultivares enxertadas. A produção de frutos inicia-se aproximadamente aos 6 anos de idade (BACKES; IRGANG, 2004;).

A noz-pecã compõe a dieta alimentar de diversas populações, servindo como fonte de nutrientes e energia. O consumo da amêndoa aumentou nos últimos anos, aliado a crescente preocupação em relação a uma alimentação mais saudável. Características como a presença de macro e micronutrientes que ofertam uma alta capacidade antioxidante, trazendo benefícios como a redução da incidência de doenças como o mal de Alzheimer, Parkinson, e alguns tipos de câncer, aumentou o interesse pelo consumo da noz (VILLARREAL-LOZOYA et al., 2007). Além disso, os frutos também são ricos em proteínas, vitaminas, lipídeos e carboidratos, o que

lhes conferem propriedades medicinais, auxiliando no controle de doenças como a gripe, malária, hepatite e problemas gastrointestinais (REIGER, 2004).

Além das amêndoas com alto valor nutricional e medicinal, as quais são utilizadas pelas indústrias alimentícias e farmacêuticas, a produção de noqueira também disponibiliza outros insumos, como a casca, utilizada na fabricação de chás e fertilizantes, a madeira classificada como de boa qualidade para fabricação de pisos, móveis e produção de energia e a possibilidade de consorciar o plantio com outras culturas e criação de animais (MOKOCHINSKI, 2015).

O cultivo da noqueira para fins comerciais iniciou há mais de cem anos, sendo os Estados Unidos o maior produtor mundial da amêndoa (VENKATACHALAM, 2004). No Brasil, a espécie foi introduzida por pioneiros da imigração norte-americana, os quais estabeleceram os primeiros plantios em Santa Barbara do Oeste e Americana, no estado de São Paulo (GOMES, 1976). Por ser uma cultura de clima temperado, a noqueira-pecã apresentou um ótimo desenvolvimento quando implantada nos estados da região sul do Brasil, e nas regiões mais altas e frias do Rio de Janeiro e Minas Gerais.

No Rio Grande do Sul, o cultivo da noqueira-pecã já está estabelecido há muitas décadas. Pomares “domésticos” encontram-se localizados nas mais diversas regiões do estado, já os plantios em grande escala, considerados comerciais, estão implantados nas regiões Central, do Vale do Taquari e de Rio Pardo. Muitos desses pomares, no entanto, foram abandonados ao longo dos anos, o que favoreceu o aparecimento de pragas e doenças na cultura. Porém, nos últimos anos, motivados pelo preço pago pelas nozes, produtores rurais e empresários retomaram o interesse pelo cultivo da noqueira-pecã, tornando o estado o maior produtor do Brasil (SILVA et al., 2013).

No entanto, apesar da retomada dos plantios e da crescente área cultivada no país ainda são escassas as informações quanto às condições adequadas de implantação e cultivo, bem como quanto ao manejo correto dos pomares. Assim, pesquisas voltadas a esse âmbito contribuem não só com a evolução científica, mas também com produtores da cultura.

2.2 DOENÇAS VASCULARES

As doenças vasculares são de extrema importância, pois estão amplamente distribuídas e acometem diversas espécies agrícolas e florestais, as quais podem ser atacadas desde seu estágio inicial de desenvolvimento até quando adultas, resultando no comprometimento da produção e longevidade das plantas (BEDENDO, 2011).

Diversos fatores bióticos ou abióticos podem ocasionar o sintoma de murcha, dentre as causas abióticas destacam-se o déficit hídrico, a salinização do solo e a deficiência de potássio. As murchas decorrentes da deficiência hídrica geralmente apresentam sintomas intermitentes, como a flacidez de folhas ao longo do dia e retomada da turgidez das mesmas durante a noite. Já a murcha ocasionada pela escassez de potássio, como ocorre especificamente na bananeira e (*Musa* spp.) em plátanos (*Musa acuminata*), é caracterizada pela presença de sintomas progressivos e permanentes (PEREIRA; GASPAROTTO, 2005).

As murchas ocasionadas por fatores bióticos podem ser induzidas por fungos, como algumas espécies dos gêneros *Fusarium* e *Verticilium*, por bactérias como *Ralstonia solanacearum*; ou nematoides como *Bursaphelenchus xylophilus*. Quando ocasionada por patógenos fúngicos, as murchas iniciam com a germinação dos propágulos que posteriormente colonizam e infectam as raízes das plantas. Logo após a penetração no sistema radicular, os fungos permanecem limitados à base da planta disseminando-se para o sistema vascular com o passar do tempo provocando sintomas como o amarelecimento seguido de murcha, necrose marginal e queda das folhas, brotos e frutos. Sendo os sintomas internos caracterizados pelo escurecimento dos vasos do xilema (BEDENDO, 2011; WHEELER; RUSH, 2001).

O escurecimento dos tecidos é um dos sintomas mais característicos das murchas. Através da observação desse sintoma é possível realizar um diagnóstico correto, distinguindo a doença de algumas outras que provocam sintomas externos muito similares, como é caso da podridão de raízes, a qual também provoca sintomas reflexos como o amarelecimento e murcha de folhas.

Esse escurecimento vascular é resultante de metabólitos secundários produzidos pelos patógenos. Nesse sentido, *Fusarium oxysporum* Schlecht, por exemplo, produz toxinas e algumas enzimas que degradam a parede celular e facilitam sua penetração no hospedeiro. As toxinas são conduzidas pelos vasos do xilema chegando até as folhas, as quais perdem a capacidade de controlar a perda de água, tornando-se sintomáticas. Já a necrose vascular é oriunda das células do parênquima do xilema que perdem a coesão e excretam pigmentos devido à ação de enzimas pectolíticas, glicosidases e fenol oxidases, produzidas pelo fungo (AGRIOS, 2005).

Além disso, o sucesso da infecção por *Fusarium oxysporum* envolve uma série de etapas e processos altamente regulados. Iniciando pelo reconhecimento das raízes pelo patógeno, fixação superficial e diferenciação de hifas de penetração, penetração do córtex e desobstrução das barreiras físicas das plantas, como a endoderme, com o objetivo de alcançar os tecidos vasculares, adaptação ao ambiente dentro do hospedeiro, o que inclui

a tolerância a substâncias antifúngicas, produção de estruturas reprodutivas nos vasos do xilema e por último, secreção de peptídeos ou fitotoxinas responsáveis pela virulência (DI PIETRO et al., 2003). Assim, são elucidados alguns dos complexos processos que envolvem a infecção por fungos e a reação das plantas a esses microrganismos.

No entanto, quando colonizada por bactérias, as plantas apresentam como sintomas iniciais a murcha das folhas mais velhas, seguida da flacidez dos tecidos do caule e ponteiro. Com o progresso da doença, ocorre a seca das folhas, ramos e caule. Além disso, quando realizado o corte transversal na planta pode-se observar a descoloração vascular e exsudação do pus bacteriano (BEDENDO, 2011).

Diversas são as culturas atacadas por fitopatógenos causadores de murchas. Conhecida como murcha bacteriana, a doença vascular causada por *Ralstonia solanacearum* é considerada uma das principais enfermidades das solanáceas em países de clima tropical e subtropical (LOPES, 2009). Além das culturas agrônômicas, a bactéria também é um patógeno de suma importância para espécies como eucalipto, na qual a murcha bacteriana é considerada uma doença que possui grande relevância econômica e epidemiológica (MAFIA et al., 2012).

Patógenos fúngicos de diversos gêneros também são responsáveis pela ocorrência das murchas em uma ampla gama de hospedeiros. Segundo Miranda et al. (2010) a murcha-de-*Verticillium*, causada por *Verticillium dahliae* Kleb é uma das doenças que representam uma forte ameaça a produção das mais variadas cultivares de tomate, principalmente em regiões com temperaturas mais amenas. Dentre os patógenos de solo, o fungo também é considerado o responsável por ocasionar os maiores danos em morangueiro. Neste caso, a doença costuma ocorrer em áreas com solos mais alcalinos e quando há um curto intervalo na rotação de culturas (UENO; COSTA, 2016). Em um estudo realizado por Poletto et al. (2014) fungos do gênero *Verticillium* foram observados associados a sementes de noqueira-pecã, tanto interna quanto externamente, o que indica que esses microrganismos não estão ocorrendo superficialmente, demonstrando assim ter um potencial patogênico.

Fungos do gênero *Ceratocystis* são importantes patógenos causadores de doenças vasculares. A cacauicultura sofre perdas severas ocasionadas pela murcha de *Ceratocystis*, cujo agente etiológico é o fungo *Ceratocystis cacaofunesta* Engelbrecht & Harrington (OLIVEIRA; LUZ, 2012). Já espécies como *Ceratocystis fimbriata* Ellis & Halsted são atribuídas a ocorrência de doenças em diversas plantas lenhosas de interesse econômico como acácia negra (SANTOS; FERREIRA, 2003), cafeeiro (MARIN et al, 2003), mangueira (BAKER et al. 2003) teca (FIRMINO et al., 2012) e eucalipto (FERREIRA et al., 1999). A murcha-de-*Ceratocystis* em eucalipto foi constatada pela primeira vez em 1997 no sudeste da Bahia, havendo relatos da

ocorrência da doença em plantios no Espírito Santo, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, São Paulo, Maranhão e Pará (ALFENAS et al., 2009; FERREIRA, 2009; FERREIRA et al., 1999). No Rio Grande do Sul, a murcha ocasionada por *Ceratocystis fimbriata* dizimou plantios de kiwi (*Actinidia deliciosa*) e impactou diretamente na economia do estado (PIVETA et al., 2013).

O gênero *Fusarium* também inclui espécies capazes de ocasionar a murcha em plantas das mais diversas famílias botânicas. Dentre as doenças que acometem o maracujazeiro, a murcha de *Fusarium* causada por *F. oxysporum* f. sp. *passiflorae* é considerada a principal doença da cultura, inviabilizando o cultivo do maracujazeiro em diversas áreas (PINHEIRO et al., 2016). A fusariose ocorre em várias regiões produtoras de maracujá acarretando danos devido à morte de plantas e afetando diretamente a produtividade e vida útil dos pomares (LIBERATO; COSTA, 2001).

Nesse sentido, a produção de bananas também é fortemente ameaçada pela doença vascular conhecida como mal-do-panamá, ocasionada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* E.F. Smith Sn. & Hansen. A enfermidade é endêmica em todas as regiões bananiculoras, sendo a banana “Maçã” considerada a mais suscetível (SILVA et al., 2011). Além disso, a murcha causada por variantes do fungo *Fusarium oxysporum* é também relatada e considerada de suma importância em culturas como batata, tomate, feijão, ervilha, grão-de-bico e melão (GOZALEZ-CENDALES et al., 2016)

Em nogueira-pecã algumas espécies do gênero *Fusarium* foram identificadas causando podridão do colo e sintomas associados a podridão de raízes em mudas em viveiro (LAZAROTTO et al., 2014). No entanto, sintomas relacionados a murcha foram observados recentemente em árvores adultas já estabelecidas no campo e por isso a investigação da doença é o objetivo principal deste trabalho.

A murcha ocasionada por *Fusarium* spp. quando em culturas anuais é classificada como uma doença monocíclica, quando um único ciclo de infecção ocorre em um ciclo do hospedeiro (VAN DER PLANK, 1963). Já em espécies perenes a doença pode ser considerada policíclica, onde múltiplos ciclos de infecção ocorrem em um único ciclo do hospedeiro (PLOETZ, 2015). O fungo ataca, a partir das raízes, os vasos lenhosos das plantas, causando a murcha repentina das folhas e morte do hospedeiro em qualquer estágio de desenvolvimento. Os sintomas também incluem amarelecimento e necrose de folhas, podendo ocorrer em apenas um dos lados das plantas, além do escurecimento dos tecidos vasculares.

2.2.1 Gênero *Fusarium*

Fusarium foi descrito pela primeira vez em 1809 pelo micólogo alemão Link. Em 1935 Wollenweber e Reinking dividiram o gênero o qual era composto por mais de 1000 indivíduos em 16 seções que incluíam 65 espécies, 55 variedades e 22 formas, utilizando como critérios para separação características morfológicas como tamanho e forma de macroconídios, presença ou ausência de clamidósporos e crescimento das colônias em diferentes meios de cultura (NELSON, 1991). Atualmente, o gênero *Fusarium* pertence à família Nectriaceae, ordem Hypocreales, classe Sordariomycetes, filo Ascomycota e apresenta aproximadamente 863 espécies e subespécies as quais podem estar presentes no solo, no ar, nos alimentos e nas plantas (INDEX FUGORUM, 2018).

Fungos deste gênero possuem diversas características ecológicas, podendo ser saprofíticos, produtores de micotoxinas, patógenos de plantas, animais e humanos e até agentes de biocontrole. Além disso, são habitantes naturais do solo e estão amplamente distribuídos em diversas regiões do mundo, sendo comumente encontrados em associações subterrâneas e aéreas com plantas (SUMMERELL et al., 2010).

Diversas espécies de *Fusarium* são conhecidas por produzirem micotoxinas nocivas a humanos e animais além de fabricarem metabólitos secundários que alteram a produção de hormônios nas plantas (O'DONNELL, 1996; ALEXANDER et al., 2011). Nesse sentido, *Fusarium graminearum* e *Fusarium oxysporum* foram listados entre os dez patógenos econômica e cientificamente mais importantes (DEAN et al., 2012).

Apesar de serem mais comuns em locais de clima tropical e temperado, espécies de *Fusarium* também podem ser encontradas em regiões desérticas, no Ártico e até nos Alpes. Esta ampla distribuição geográfica pode ser atribuída a habilidade do fungo de sobreviver em diversos substratos orgânicos e a facilidade de disseminação de seus esporos (NELSON et al., 1994). Além disso, altas temperaturas e umidade relativa do ar, solos ácidos e argilosos com deficiência de drenagem, aliados a contaminação prévia com nematoides são considerados fatores favoráveis à sobrevivência dos fungos (SILVA, s.d.).

A sobrevivência desses fungos no solo ocorre através dos clamidósporos, estruturas formadas pelo espessamento e desenvolvimento de uma parede secundária nas células da hifa (MASSOLA JÚNIOR; KRUGNER, 2011). Além disso, espécies de *Fusarium* possuem como características típicas do gênero a formação de macroconídios e microconídios, esporos assexuados, geralmente hialinos e septados os quais apresentam células basal e apical distintas

que são bastante utilizadas na taxonomia desses microrganismos (TEIXEIRA, 2015). Segundo Nelson (1983) características como tamanho de macroconídios, presença de microconídios, tipos de células microconidiogênicas e presença ou ausência de clamidósporos são critérios importantes que também auxiliam na identificação de espécies do fungo.

A dispersão de *Fusarium* spp. pode ocorrer de várias maneiras, dentre elas destacam-se os materiais propagativos infectados, como rizomas e mudas (STOVER, 1962). Além de materiais, máquinas e ferramentas contaminadas, utilizadas no manejo das plantas, as quais podem ser transportadas pelo homem dentro da área de cultivo ou até em novas áreas (PLOETZ, 2015). Restos culturais com propágulos do patógeno e presença de esporos na água utilizada na irrigação dos plantios, promovendo um risco de infecção em áreas não contaminadas. Além disso, espécies de *Fusarium* podem sobreviver por longos períodos sem a necessidade do hospedeiro presente, através dos clamidósporos, em restos de cultura, vivendo de forma saprofítica ou ainda de forma endofítica nas raízes e tecidos vasculares de plantas não-hospedeiras.

No entanto, a alta plasticidade genética em nível de espécies é uma característica relevante em isolados do gênero *Fusarium*, os quais exigem a utilização de técnicas e ferramentas que auxiliem na distinção dessas populações. Dentro do gênero são encontradas variações entre características morfológicas, de patogenicidade e virulência, o que resulta na classificação dos patógenos em “forma specialis” (f. sp.) e raças, de acordo com a habilidade do fungo de atacar um determinado hospedeiro ou cultivares específicas de plantas, respectivamente (OLIVEIRA; COSTA, 2002). *Fusarium oxysporum*, por exemplo, é considerado um organismo muito amplo, possuindo mais de 120 “formae speciales” (SILVA et al., 2014). Essas “formae speciales” se subdividem em raças as quais são classificadas de acordo com um conjunto de cultivares diferenciadoras que possuem genes específicos de resistência (HENRIQUE et al., 2015).

Durante muitos anos, a identificação de *Fusarium* era realizada com base apenas em critérios morfológicos, o que muitas vezes repercutia em resultados conflitantes devido principalmente ao pequeno número de caracteres morfológicos comparado ao vasto número de espécies dentro do gênero. Por isso, a utilização de técnicas moleculares surgiu como uma ferramenta para identificação das espécies de forma mais precisa (BRUNS et al., 1990; O'DONNELL, 1997; SUMMERELL et al., 2010).

Por relacionar evolutivamente sequências parciais de DNA de um ou mais genes, as análises moleculares auxiliam significativamente na identificação de novas espécies, como no caso do complexo de espécies *F. graminearum*, *G. fujikuroi* e *F. solani* as quais foram

identificadas sobretudo através de estudos filogenéticos. No entanto, devido às limitações encontradas tanto em estudos morfológicos como em moleculares tem-se empregado uma abordagem polifásica para caracterização e identificação de novas espécies de *Fusarium*, a qual engloba informações biológicas, morfológicas, bioquímicas e moleculares (BROWN; PROCTOR; 2013)

Sendo assim, devido as diversas complexidades envolvendo fitopatógenos do gênero *Fusarium* pesquisas voltadas a caracterização, identificação e controle desses fungos são de extrema relevância e impactam social e cientificamente.

2.3 CARACTERIZAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA E MOLECULAR DE FUNGOS

As caracterizações morfofisiológica e molecular são largamente utilizadas para identificação de fungos fitopatogênicos. Características morfofisiológicas envolvem análises de regime de luz e temperatura que mais se adequam ao desenvolvimento do fungo, além da verificação do meio de cultura mais propício ao desenvolvimento do mesmo e observações quanto a pigmentação das colônias, textura, forma marginal e velocidade de crescimento micelial, esporulação, além de formação e dimensionamento de estruturas reprodutivas.

Em diversos estudos, a variabilidade de isolados fúngicos pode ser observada por meio de análises experimentais que possibilitam o estabelecimento das variações morfológicas. Esta é uma abordagem bem conhecida e respaldada por diversos estudos científicos além de ser utilizada há mais de 200 anos por profissionais que trabalham na área da taxonomia de fungos (SUMMERELL et al., 2010).

Nesse contexto, alguns estudos basearam-se apenas através da observação de características morfológicas e fisiológicas para a identificação de espécies fúngicas, como o desenvolvido por Poletto et al. (2006) o qual identificou espécies de *Fusarium* responsáveis pela podridão de raízes em erva-mate; ou o desenvolvido por Rodrigues et al. (2004) que identificou *Lasiodiplodia theobromae* como agente causal da podridão de tronco em raízes em videira.

No entanto, Lombardi (2002) afirma que os resultados obtidos através da análise de critérios fenotípicos necessitam de confirmação com o uso de técnicas mais específicas e apuradas. Nesse contexto, o uso de ferramentas moleculares para caracterização e identificação de agentes patogênicos se mostra de extrema importância, pois fornece informações imprescindíveis nesse âmbito. Por acessarem diretamente o DNA é que as técnicas moleculares

adquiriram confiabilidade e grande utilização na identificação de espécies fúngicas (ZACCARO et al., 2007).

Além disso, métodos que envolvem a análise do ácido desoxirribonucleico (DNA) estão sendo muito úteis em pesquisas voltadas à filogenia de fungos, diferenciação de espécies, “formae speciales”, raças e isolados (KURAMAE; SOUZA, 2002). Nesse sentido, trabalhos científicos realizados em diversos países comprovam a eficiência da utilização de características morfofisiológicas aliadas a técnicas moleculares para identificação de espécies de *Fusarium*. Assim, Matos et al. (2016) identificaram *Fusarium decemicellulare* causando superbrotamento de inflorescências e necrose vascular das ráquis em cajueiro (*Anacardium occidentale*) no Brasil. Borrero et al. (2018) através da compilação de técnicas de análises morfológicas, fisiológicas e moleculares, identificaram *Fusarium proliferatum* como agente causal da murcha em morangueiro (*Fragaria* spp.) na Espanha. Já Halpern et al. (2018) identificaram *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* raça 4 causando murcha em algodoeiro (*Gossypium* spp.), no Texas (EUA).

Uma das técnicas amplamente utilizada para identificação de fungos é a amplificação da região do rDNA por reação em cadeia da polimerase (PCR), que possibilita a amplificação de regiões específicas do genoma (ANTONIOLLI et al., 2000). Após a realização da PCR, o DNA pode então ser sequenciado utilizando uma técnica que associa a PCR com métodos de terminação de cadeias de dideoxynucleotídeos (moléculas que não possuem o grupo hidroxila no carbono 3'. São eles: ddATP, ddGTP, ddCTP e ddTTP, marcados com material fluorescente). Após o resultado do sequenciamento, com o auxílio de sequências existentes no GenBank e utilizando softwares específicos pode ser possível chegar-se a identificação dos microrganismos a nível de espécie (MENEZES, 2007).

Assim, a combinação de análises morfofisiológicas e moleculares são essenciais para a obtenção de resultados satisfatórios em estudos que visem a caracterização e identificação de agentes patogênicos.

2.3.1 Caracterização molecular de *Fusarium* spp.

O aumento contínuo de relatos de doenças ocasionadas por espécies de *Fusarium* e a necessidade de caracterizá-las corretamente é uma das preocupações por parte dos profissionais que estudam o gênero. A definição de espécies morfológicas é baseada na ideia de que um indivíduo morfológico pode representar uma enorme variação dentro da espécie, o que é de suma importância para identificação inicial dos fungos. As características morfofisiológicas são

bastante úteis e utilizadas para diferenciar espécies de *Fusarium*, entretanto, o número de caracteres utilizados para tal análise é relativamente pequeno quando comparado com a infinidade de espécies existentes dentro do gênero. Além disso, a expressão dessas características pode ser altamente influenciada pelo ambiente o que, conseqüentemente, pode refletir em erros de identificação (LESLIE; SUMMERELL, 2006).

Sendo assim, a utilização de técnicas moleculares ganhou espaço em pesquisas voltadas à identificação de fungos, fornecendo resultados mais precisos nesse âmbito. Nesse contexto, a ampliação do DNA através da reação em cadeia da polimerase (PCR) é uma das técnicas mais utilizadas para identificação de espécies de *Fusarium*, pois possibilita a amplificação de fragmentos de DNA específicos e detecta a presença desse DNA em células vivas ou mortas, ou até mesmo quando misturadas com outros DNA's (PINHEIRO, 2004).

Diversas regiões do DNA podem ser amplificadas para identificação de espécies de *Fusarium* tais como: ITS (Internal Transcribed Spacer), beta – tubulina, fator de elongação 1 – alfa, entre outras (MACIEL, 2012). No entanto, todas essas regiões apresentam vantagens e desvantagens quanto ao uso, seja pela facilidade de amplificação, tamanho dos fragmentos amplificados ou pela variação ao nível das sequências, intra e inter – espécies (OLIVEIRA et al., 2011).

O gene que codifica o fator de elongação 1 – alfa é considerado um dos marcadores mais usuais para diferenciação de *Fusarium* spp. TEF-1 α possui alto valor filogenético, além de ser responsável por codificar um fragmento essencial do mecanismo de tradução de proteínas. Este gene é considerado de cópia única em *Fusarium* e demonstra um alto nível de polimorfismo de sequências entre espécies, mesmo quando comparadas com as porções ricas em íntrons de genes que codificam proteínas como β tubulina e histona (CHANDRA et al., 2011).

A realização de estudos voltados à amplificação de regiões genômicas de espécies de *Fusarium* comprovaram que o do fator de elongação 1 – alfa pode ser utilizado para distinguir as espécies do gênero, possuindo correlação com 16 taxa de *Fusarium* com potencial micotoxigênico (O'DONNELL et al., 1998; SEIFERT; LEVESQUE, 2004). Kristensen et al., (2005) em seu trabalho, concluíram que a região do fator de elongação 1 – alfa é capaz de identificar espécies monofiléticas de *Fusarium*, o que ressalta a importância da utilização dessa região em análises filogenéticas desses fungos.

No entanto, para que se obtenham resultados satisfatórios as análises filogenéticas devem ser realizadas em isolados caracterizados morfológicamente e se possível com o

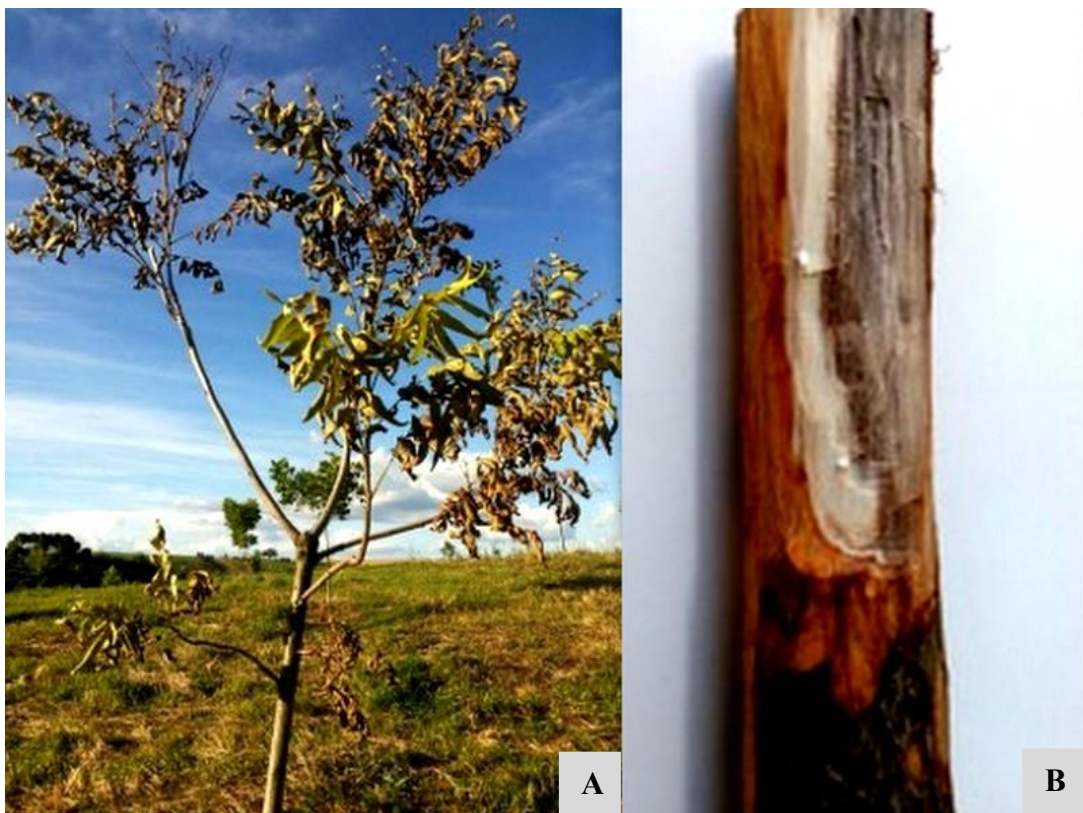
conhecimento acerca de características específicas como procedência geográfica, hospedeiros, patogenicidade e produção de metabólitos secundários (KRISTENSEN et al., 2005). Com isso, diminuem-se as chances de identificar incorretamente os isolados aumentando a confiabilidade dos resultados obtidos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 OBTENÇÃO E PURIFICAÇÃO DE ISOLADOS DE *Fusarium* spp.

As amostras vegetais foram coletadas de pomares de noqueira-pecã de municípios do Rio Grande do Sul e de um município no estado do Paraná. Todos os pontos de coleta foram georreferenciados com auxílio de um equipamento Global Positioning System (GPS). Os isolados obtidos foram provenientes de fragmentos de plantas de noqueira-pecã, as quais apresentavam sintomas como amarelecimento seguido de murcha e necrose de folhas além do escurecimento dos tecidos vasculares (Figura 1). Todos os isolados referentes ao mesmo município de coleta são oriundos de plantas localizadas em um único pomar. Na tabela 1, estão apresentados os códigos dos isolados obtidos, a procedência dos mesmos, as coordenadas geográficas dos locais de origem e as datas de coletas ou recebimento dos materiais.

Figura 1 – Plantas de noqueira-pecã com sintomas de murcha. A: amarelecimento e seca de folhas; B: fragmento de tronco com escurecimento dos tecidos vasculares.



Fonte: Rolim, 2017.

Tabela 1 – Código, município de origem, coordenadas geográficas e data de coleta dos isolados de *Fusarium* spp. obtidos de árvores de nogueira-pecã com sintomas de murcha.

Código	Procedência	Coordenadas (GMS)	Data de Coleta
GUA	Guarapuava – PR	25°23'23" – 51°27'51"	Jan/2017
PAN1	Pantano Grande – RS	30°09'41,1" – 52°32'17,3"	Jan/2017
PAN2	Pantano Grande – RS	30°09'39" – 52°32'18"	Jan/2017
PAN3	Pantano Grande – RS	30°09'36" – 52°32'28"	Jan/2017
S1	Segredo – RS	29°20'07" – 52°58'52"	Fev/2017
S2	Segredo – RS	29°20'07" – 52°58'53"	Fev/2017
S3	Segredo – RS	29°20'06" – 52°58'52"	Fev/2017
S4	Segredo – RS	29°20'07" – 52°58'54"	Fev/2017
S5	Segredo – RS	29°20'08" – 52°58'52"	Fev/2017
SL	Santana do Livramento – RS	31°00'11" – 56°06'08"	Mar/2017
SSP1	São Sepé – RS	30°09'49" – 53°34'17"	Mar/2017
SSP2	São Sepé – RS	30°09'50" – 53°33'52"	Mar/2017
VN1	Vila Nova do Sul – RS	30°20'28" – 53°53'05"	Jan/2017
VN2	Vila Nova do Sul – RS	30°20'26" – 53°53'15"	Jan/2017
VN3	Vila Nova do Sul – RS	30°20'23" – 53°53'08"	Jan/2017
VN4	Vila Nova do Sul – RS	30°20'26" – 53°53'10"	Jan/2017
VN5	Vila Nova do Sul – RS	30°20'26" – 53°53'11"	Jan/2017
VN6	Vila Nova do Sul – RS	30°20'26" – 53°53'07"	Jan/2017
VN7	Vila Nova do Sul – RS	30°20'27" – 53°53'10"	Jan/2017

Fonte: Rolim, 2018.

Os fragmentos vegetais sintomáticos coletados foram devidamente identificados e encaminhados para o laboratório de Fitopatologia Elocy Minussi do Departamento de Defesa Fitossanitária do Centro de Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Maria - RS. No primeiro momento, foi realizada a assepsia do material, onde pequenas porções de tecidos vegetais sintomáticos foram imersas em hipoclorito de sódio na proporção 4:1 durante 2 minutos, seguida de dupla lavagem em água destilada esterilizada. Após secagem em papel filtro, o material foi transferido para placas de Petri contendo meio de cultura batata-dextrose-água (BDA) e incubado a 25 °C com fotoperíodo de 12 horas durante cinco dias. Transcorrido

o período de incubação, pequenas porções do micélio que cresceu a partir dos fragmentos de material vegetal foram observadas em microscópio óptico para verificação da presença de estruturas do patógeno. Em caso positivo, estruturas do fungo foram transferidas para placas de Petri contendo meio de cultura BDA sob as mesmas condições de incubação descritas acima (ALFENAS; MAFIA 2007). Após sete dias de crescimento, os isolados foram purificados conforme a técnica de cultura monospórica, descrita por Fernandes (1993).

3.2 PATOGENICIDADE DOS ISOLADOS DE *Fusarium* spp.

3.2.1 Produção das mudas de noqueira-pecã

O teste de patogenicidade foi realizado utilizando mudas de noqueira-pecã produzidas de sementes da cultivar Barton. As sementes foram adquiridas de um viveiro comercial localizado no município de Anta Gorda – RS. Primeiramente, as sementes foram submetidas ao processo de estratificação, as quais foram acomodadas em camadas alternadas de areia esterilizada com 5 cm de espessura, dispostas em bandejas plásticas providas de orifícios na parte inferior, para drenagem do excesso de água (Figura 2 – A). As bandejas foram mantidas em câmara fria na temperatura de $4 \pm 0,5$ °C durante noventa dias, conforme recomendado por Poletto et al. (2015). Posteriormente, foi realizada a semeadura em substrato comercial esterilizado em copos descartáveis transparente com capacidade para 750 ml providos de orifício na parte inferior para drenagem da água (Figura 2 – B).

Figura 2 – Produção das plantas de noqueira-pecã. A: Sementes de noqueira-pecã preparadas para estratificação em areia esterilizada; B: Semeadura com substrato comercial em copos descartáveis.



3.2.2 Preparo dos inóculos e suspensão de esporos

Fragmentos das culturas puras dos isolados (Item 3.1) foram cultivados em meio de cultura BDA durante 14 dias a 25 ± 2 °C com fotoperíodo de 12 horas, para posterior utilização. Para o preparo da suspensão de esporos foi adicionada água destilada esterilizada em cada placa e, com o auxílio da alça de Drigalski, realizada a raspagem da colônia. Posteriormente, a suspensão foi filtrada em uma dupla camada de gaze para um béquer. A contagem da concentração de esporos foi efetuada com o auxílio da câmara de Neubauer e ajustada para 1×10^6 esporos mL^{-1} . O ajuste da concentração de esporos foi calculado através da seguinte equação: $V_f = V_i \times C_i/C_f$, onde V_f = volume final da suspensão; V_i = volume inicial da suspensão; C_i = concentração inicial de esporos/ mL^{-1} contada na câmara de Neubauer; e C_f = concentração de esporos/ mL^{-1} desejada.

O isolado S2 não produziu esporos em meio de cultura BDA aos 14 dias de incubação, então, após o cultivo fez-se a raspagem da colônia acrescida de 30 ml de água destilada esterilizada. Posteriormente, a suspensão foi transportada para um béquer, sem passar pelo peneiramento em cama de gaze afim de permitir que as hifas do fungo permanecessem na suspensão e servissem nesse caso, como fonte de inóculo.

3.2.3 Inoculação das plantas

A inoculação foi realizada por meio da imersão das raízes das plantas em suspensão de esporos, conforme adaptação de Pastrana (2017). A fim de padronizar o teste de patogenicidade, foram selecionadas para inoculação plantas com 15 a 20 dias após a emergência, altura variando de 20 a 25 cm e com o primeiro par de folhas verdadeiras presente (Figura 3 – A e B). As plantas selecionadas foram removidas dos copos descartáveis e tiveram suas raízes lavadas em água corrente para retirada do excesso de substrato. Com auxílio de um bisturi, realizou-se microferimentos nas raízes com o objetivo de facilitar a entrada do patógeno. Posteriormente, as raízes das plantas foram imersas durante 30 minutos em recipientes contendo a suspensão de esporos (Figura 3 – C). Para a testemunha, foi utilizada apenas água destilada esterilizada. Transcorrido o período de imersão, as plantas foram transplantadas para sacos plásticos (17 x 25 cm) contendo substrato comercial quimicamente esterilizado composto por casca de Pinus, vermiculita e macro nutrientes (Figura 3 – D). Foram realizadas quatro repetições, cada repetição composta por uma planta, as quais foram arranjadas em posições aleatoriamente distribuídas em casa de vegetação climatizada a 25 °C e irrigadas diariamente.

Figura 3 – Teste de patogenicidade em plantas de noqueira-pecã. A: plantas de 15 a 20 dias após emergência; B: planta selecionada para inoculação; C: imersão de raízes em suspensão de esporos e D: planta transplantada após a inoculação.



Fonte: Rolim, 2018.

3.2.4 Avaliações

As plantas foram observadas diariamente até 120 dias, para verificação da manifestação de sintomas. Para confirmação da patogenicidade, foi efetuado o reisolamento do patógeno em meio de cultura BDA a fim de completar o Postulado de Koch. Também, foi avaliada a severidade da doença de acordo com a escala proposta por Pastrana (2017). A escala é composta por notas de 1 a 5, onde 1 = sem sintomas; 2 = seca e morte de folhas mais velhas; 3 = folhas mais velhas sintomáticas acompanhadas de murcha das folhas mais jovens e/ou nanismo, 4 = sintomas foliares graves e escurecimento do caule, e 5 = plantas mortas.

3.3 CARACTERIZAÇÃO DOS ISOLADOS DE *Fusarium* spp.

3.3.1 Caracterização morfofisiológica

3.3.1.1 Taxa de crescimento micelial

Para determinação da taxa de crescimento micelial, discos de micélio com 6 mm de diâmetro provenientes da cultura pura dos isolados, com sete dias de incubação, foram transferidos para o centro de placas de Petri, contendo meio de cultura BDA. As placas foram incubadas a 25 ° C e em regime de luz alternada com fotoperíodo de 12 horas. Foram realizadas quatro repetições, sendo cada uma constituída por uma placa. O crescimento micelial de cada

isolado foi avaliado diariamente até os sete dias de incubação através da mensuração das colônias em sentidos diametralmente opostos, com auxílio de um paquímetro digital (MACIEL et al., 2017).

3.3.1.2 Esporulação

A esporulação foi avaliada aos dez dias de incubação. Para isso, foram adicionadas 20 mL de água destilada esterilizada em quatro placas de Petri, após fez-se a raspagem das colônias utilizando uma alça de Drigalski e peneiramento em camada dupla de gaze, para a posterior estimativa da concentração de conídios (conídios.mL⁻¹), com o auxílio da câmara de Neubauer (MACIEL et al., 2017).

3.3.1.3 Pigmentação das colônias

A avaliação da coloração das colônias foi realizada após sete dias de incubação das culturas puras em meio BDA a 25 ° C e fotoperíodo de 12 horas. Foram observadas a face superior e reversa das placas. A determinação da pigmentação das colônias e coloração do micélio aéreo foi realizada com o auxílio da cartilha de cores de Munsell (MUNSELL COLOR, 2009).

3.3.1.4 Caracterização de estruturas reprodutivas

A partir da cultura monospórica os isolados foram transferidos para o meio de cultura folha-de-cravo-ágar (FCA), o qual favorece a máxima expressão das características de *Fusarium* spp. Após 10 dias de crescimento, foram observadas as seguintes características: presença ou ausência de esporodóquio, coloração de esporodóquio quando presente, dimensão de macro e microconídios, forma de microconídios, número de septos de macroconídios e presença ou ausência de clamidósporos (LESLIE; SUMMEREL, 2006; NELSON et al., 1983). Para o dimensionamento das estruturas, foram medidos o comprimento e largura de 30 macroconídios e 30 microconídios, com auxílio de uma ocular OMS, acoplada ao microscópio óptico na magnitude de 40 X.

3.3.2 Caracterização molecular

As análises moleculares foram empregadas em isolados representativos dos grupos que foram gerados pelo UPGMA. A extração de DNA e a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) dos isolados de *Fusarium* spp. foram realizadas no Laboratório de Biologia Molecular e Sequenciamento (LabDros) do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Santa Maria - RS.

3.3.2.1 Extração de DNA dos isolados de *Fusarium* spp.

Para realizar a extração do DNA, os isolados foram cultivados em meio líquido batata-dextrose. Para isso, discos de micélio de 5 mm de diâmetro de colônias com 7 dias de crescimento foram dispostos em Erlenmeyers, contendo aproximadamente 20 mL de meio de cultura batata-dextrose, os quais foram incubados a 25 ° C com fotoperíodo de 12 horas durante 5 dias. Posteriormente, utilizou-se o Protocolo de extração de DNA “Mini-prep” (baseado no protocolo adaptado por Amgad Saleh e Kurt Zeller (LESLIE; SUMMERELL, 2006).

Primeiramente, as amostras foram retiradas dos Erlenmeyers com auxílio de um bastão de vidro esterilizado e maceradas em almofariz com nitrogênio líquido. Depois de maceradas, aproximadamente 500 µL de cada amostra foi transferida para microtubos com capacidade para 1,5 mL, onde foram acrescentados 700 µL de tampão CTAB a 2% com 2-mercaptoetanol. Depois disso, agitou-se em vórtex por cerca de 3 segundos, para homogeneizar a mistura. Após a agitação, realizou-se o banho maria a 65 ° C por 30 minutos. Transcorrido esse período, foram adicionados em cada amostra, 300 µL de clorofórmio: álcool isoamílico (24: 1, v: v) e agitado em vórtex durante três segundos, a fim de misturar as fases aquosa e orgânica. Em seguida, a mistura foi centrifugada a 130 rpm durante cinco minutos. Com auxílio de uma pipeta, foram transferidos 600 µL da fase aquosa (superior) de cada amostra para um microtubo novo e estéril e adicionados 600 µL de isopropanol. As amostras foram misturadas cuidadosamente. Logo após, permaneceram em repouso durante cinco minutos em temperatura ambiente, para que houvesse a precipitação dos ácidos nucleicos. Em seguida, realizou-se a centrifugação a 130 rpm por cinco minutos, para sedimentar os ácidos nucleicos. Depois da centrifugação, a fase líquida foi descartada e os microtubos permaneceram abertos e invertidos em uma toalha de papel, por cinco minutos. Posteriormente, foram adicionados 600 µL de tampão 1 × TE a cada amostra e então procedeu-se a resuspensão dos pellets. Em seguida, adicionou-se 300 µL de

fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25: 24: 1 v: v: v) e agitou-se em vórtex, durante alguns segundos, depois foi realizada a centrifugação a 130 rpm por mais cinco minutos. Com auxílio de uma pipeta, foram transferidos 500 µL da fase aquosa (superior) de cada amostra para um microtubo novo e estéril e acrescido 1 µL de RNase. Agitou-se rapidamente em vórtex e incubou-se a 37 °C por 30 minutos. Em seguida, foram transferidos 500 µL de isopropanol (2-propanol) a cada microtubo, os quais foram brevemente invertidos e permaneceram em repouso durante cinco minutos em temperatura ambiente, para promover a precipitação dos ácidos nucleicos. Novamente, as amostras foram centrifugadas a 130 rpm durante cinco minutos, para proporcionar a sedimentação do DNA. Na sequência, descartou-se a mistura aquosa e os microtubos foram invertidos em uma toalha de papel, por cerca de cinco minutos. Logo após, lavou-se os pellets de DNA com 1 mL de etanol 70 (v / v) gelado, por duas vezes e repetiu-se o processo de secagem em toalha de papel. Por fim, resuspendeu-se os pellets em 50 µL de tampão TE e armazenou-se a 4 ° C para posterior utilização.

3.3.2.2 Reação de Polimerase em Cadeia (PCR) e sequenciamento

A concentração de DNA total foi estimada através da leitura em espectrofotômetro (NanoDrop 2000, Thermo Scientific) pela absorbância a 260 nm (A₂₆₀). As amostras de DNA genômico extraídas foram submetidas a Reação de Polimerase em Cadeia (PCR) para amplificação da região do fator de alongação 1-alfa, com o par de primers EF1 (5'-ATGGGTAAGGA (A / G) GACAAGAC-3') e EF2 (5'-GGA (G / A) GTACCAGT (G / C) ATCATGTT-3') (O'DONNELL et al., 1998). A reação de PCR foi constituída de 20 mM de Tris-HCl (pH 8,4), 50 mM de KCl, 1,5 mM de MgCl₂, 0,1 mM de cada dNTP, 0,2 uM de cada primer, 1 unidade de Taq DNA Polimerase (Invitrogen) e 100 ng de DNA. As reações foram realizadas em termociclador sob as seguintes condições térmicas: 94 °C por 3 min, seguido de 40 ciclos a 94 °C por 20 s, 60 °C por 30 s e 72 °C por 30 s, e incubação final a 72 ° C por 10 min. Também foi incluído nas amplificações, um controle negativo sem DNA. Os fragmentos amplificados e o controle foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% em tampão TAE 1X (40 mM Tris Base, 40 mM ácido acético e 1 mM EDTA) contendo gel-red e visualizado sob luz ultravioleta.

Os produtos da PCR foram purificados por precipitação com polietilenoglicol (PEG) 13 %. Em sequência, as amostras foram novamente separadas por eletroforese em gel de agarose a 1,5% em tampão TAE 1X (40 mM Tris Base, 40 mM ácido acético e 1 mM EDTA) contendo gel-red e visualizado sob luz ultravioleta, a fim de confirmar a purificação.

Para o sequenciamento, foram utilizados 2 μ L da amostra purificada e 4,5 pmol de primer. O procedimento foi realizado utilizando o equipamento ABI-Prism 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Os fragmentos sequenciados foram analisados com auxílio do *software* BioEdit (HALL, 1999). As sequências de nucleotídeos obtidas foram comparadas com as existentes no *GenBank* para os isolados. As sequências do *GenBank* que demonstraram os maiores “escores” foram selecionadas e alinhadas juntamente com as sequências adquiridas no sequenciamento pelo algoritmo ClustalW. A análise filogenética foi realizada através do método “*Neighbour-joining*” com 1000 replicatas pelo programa MEGA versão 4 (TAMURA et al., 2007). A similaridade das sequências de nucleotídeos entre os isolados foi calculada por meio do Basic Local Alignment Search Tool - BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para o teste de patogenicidade, as notas atribuídas a escala de severidade de murcha em plantas de noqueira-pecã foram comparadas pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade de erro.

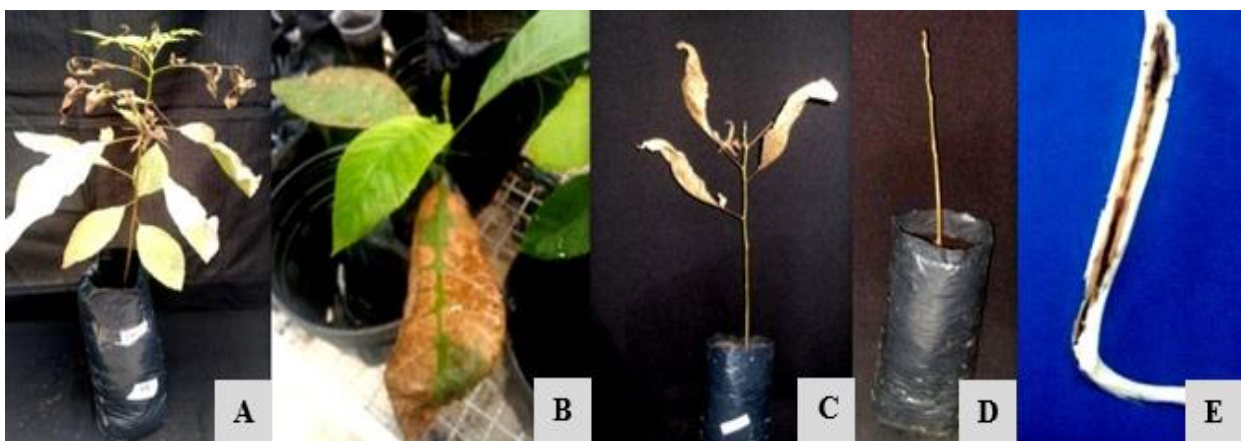
Os dados quantitativos de caracterização morfofisiológica dos isolados de *Fusarium* spp. foram submetidos à técnica de análise multivariada para agrupamento dos isolados pelo programa GENES 2015 5.0. A matriz de distância euclidiana foi calculada como medida de dissimilaridade e utilizada para agrupamento dos isolados pelo método “Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean” – UPGMA, pelo programa GENES 2015 5.0 (CRUZ, 2008).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 PATOGENICIDADE DOS ISOLADOS DE *Fusarium* spp. EM MUDAS DE NOGUEIRA-PECÃ

Todos os isolados de *Fusarium* spp. se mostraram patogênicos quando inoculados em nogueira-pecã. Os primeiros sintomas foram observados 75 dias após a inoculação do patógeno, iniciando pelo amarelecimento e murcha de algumas folhas (Figura 4 – A). Transcorrido aproximadamente 10 dias, os sintomas avançaram para necrose marginal, seca e queda de folhas, além da morte de algumas plantas, sinalizando o progresso da doença (Figura 4 – B, C e D). O isolado VN2 proveniente do município de Vila Nova do Sul foi o primeiro a ocasionar sintomas, provocando a seca de folhas e posterior morte de todas as plantas. Após cinco dias, os isolados PAN2, S4 e VN3 também foram observados ocasionando sintomas foliares, já o isolado PAN3, além de sintomas foliares graves, também provocou a morte de todas as plantas. Aos 120 dias fez-se a avaliação final dos sintomas através da realização de um corte longitudinal nas plantas onde observou-se o escurecimento dos tecidos em pelo menos uma das repetições inoculadas com cada isolado (Figura 4 – E). Em seguida, os isolados inoculados foram reisolados a partir dos tecidos sintomáticos, confirmando o postulado de Koch.

Figura 4 – Plantas sintomáticas de nogueira-pecã após inoculação com isolados de *Fusarium* spp. A: amarelecimento e murcha de folhas; B: necrose marginal; C e D: seca; E: escurecimento do tecido vascular.



Fonte: Rolim, 2018.

Quanto à severidade da doença, o isolado oriundo do município de Santana do Livramento (SL) mostrou-se o menos agressivo, pois ocasionou apenas sintomas foliares em

três das quatro repetições inoculadas e sintomas foliares graves acompanhados do escurecimento dos tecidos vasculares em apenas uma das plantas, alcançando assim nota 2,5 na escala de severidade da doença e não diferindo estatisticamente do tratamento testemunha, para o qual foi atribuída nota 1 que corresponde a não ocorrência de sintomas (Tabela 2).

Todos os demais isolados diferiram significativamente da testemunha, sendo que os isolados PAN1, PAN2, S1 e VN3 apresentaram uma média de notas que variou de 3,25 a 3,75, enquanto o restante dos isolados alcançaram valores entre 4 e 5 na escala de severidade, correspondendo a sintomas foliares graves e escurecimento dos tecidos vasculares até a morte de plantas (Figura 5) (Tabela 2). Os isolados PAN3 e VN2, apesar de não diferirem estatisticamente daqueles que causaram sintomas correspondentes as notas entre 3 e 4, merecem destaque, pois foram alguns dos primeiros a expressar sintomas nas plantas e os únicos a causarem a morte de todos os indivíduos inoculados, demonstrando-se bastante agressivos.

Figura 5 – Plantas de noqueira-pecã 120 dias após inoculação com isolados de *Fusarium* spp. A: planta inoculada apresentando sintomas de murcha; B: tratamento testemunha, planta sem manifestação de sintomas.



Fonte: Rolim, 2018.

Tabela 2 – Notas atribuídas a escala de severidade de murcha em nogueira-pecã.

Isolados	Nota
GUA	4,50 a*
PAN1	3,75 a
PAN2	3,50 a
PAN3	5,00 a
S1	3,75 a
S2	4,50 a
S3	4,75 a
S4	4,00 a
S5	4,50 a
SL	2,50 b
SSP1	4,00 a
SSP2	4,25 a
VN1	4,75 a
VN2	5,00 a
VN3	3,25 a
VN4	4,50 a
VN5	4,00 a
VN6	4,25 a
VN7	4,75 a
TESTEMUNHA	1,00 b
CV (%)	26,06

Fonte: Rolim, 2018.

*Médias seguidas de mesma letra não diferem na coluna pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade de erro.

No presente estudo, as mudas adquiridas pelos produtores foram produzidas através de enxertos e as árvores apresentaram sintomas após 4 a 5 anos de idade, quando já encontravam-se estabelecidas no campo. No entanto, fungos do gênero *Fusarium* possuem uma alta plasticidade quanto a sobrevivência, podendo estar latente na planta e ser desencadeado após um determinado tempo devido a estresses sofrido pelo hospedeiro, bem como no solo dessas áreas contaminadas, servindo de fonte de inóculo ou ainda podendo ter sido introduzido através de ferramentas infectadas, as quais quando utilizadas no manejo de plantas saudáveis pode servir como fonte de disseminação da doença. Inicialmente, os produtores observaram os primeiros sintomas da doença em árvores isolados, os quais correspondiam ao amarelecimento e murcha de folhas. Posteriormente, os sintomas avançaram no número de indivíduos e progrediram, ocasionando a morte de algumas plantas, indicando o avanço da doença no campo. No entanto, várias são as formas na qual o patógeno pode ter adentrado aos pomares, sendo o controle da doença de difícil manejo após a infecção.

Elliott (2018) ressalta a importância dos testes de patogenicidade afirmando que o fato de apenas isolar e identificar fungos não comprova a patogenicidade dos mesmos nem indica o nível de virulência desses patógenos, sendo necessários para isso, testes que comprovem a ocorrência da doença e que são determinantes para estudos nesse âmbito. Logo, testes com essa finalidade confirmaram a ocorrência de espécies de *Fusarium* causando murcha em culturas agrônomicas e florestais de interesse econômico, sendo um problema considerado grave e de difícil manejo quando instalado em determinadas áreas.

O processo infeccioso por patógenos de solo normalmente inicia pelo contato com as raízes das plantas. Segundo Bais et al. (2004) a atração química entre microrganismos e as raízes ocorre através de mecanismos que envolvem a sinalização cruzada entre ambos. Os exsudatos liberados pelas plantas incluem a excreção de água, oxigênio livre, enzimas, íons, além de uma vasta gama de metabolitos primários e secundários que possuem carbono em sua composição e conseqüentemente atraem os microrganismos habitantes do solo (BERTIN et al., 2003). Além disso, uma diversidade de fitopatógenos permanecem no solo em um período de latência e são despertados ao seu estado normal após o contato do propágulo dormente com moléculas provenientes dos exsudatos liberados pelas sementes e raízes (NELSON, 1990).

Algumas espécies de *Fusarium*, após a atração e penetração nas raízes do hospedeiro, obstruem o xilema por meio do crescimento micelial, resultando na produção de metabólitos nos tecidos vasculares que quando acumulados provocam o escurecimento da região, promovendo indícios da infecção pelo patógeno e caracterizando a doença. Além

disso, o processo bioquímico envolvido durante a fase de infecção e responsável pela descoloração dos tecidos envolve a oxidação de fenóis e provavelmente sua desidrogenação por peroxidases (PEGG, 1981). Já os sintomas reflexos como a murcha foliar, ocorrem devido à combinação entre os metabólitos produzidos pelo patógeno e aqueles produzidos pela planta em resposta à doença (DIMOND, 1970). O processo infeccioso envolvendo a produção de metabólitos e oxidação de fenóis, possivelmente ocorreu nas plantas inoculadas, no presente estudo, as quais expressaram sintomas reflexos na parte aérea, bem como escurecimento dos tecidos vasculares.

A todo momento são descritos novos relatos da ocorrência de murcha causada por *Fusarium* spp. nas mais variadas espécies de plantas localizadas em diferentes regiões do planeta, evidenciando a importância da doença e de estudos relacionados a caracterização, identificação e manejo do patógeno. A murcha de *Fusarium* ocasionada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* é uma das grandes ameaças à produção de algodão (*Gossypium hirsutum* L.) no Brasil e em regiões produtoras de países como Austrália, China, Egito e Israel, demonstrando a ampla distribuição geográfica do patógeno e a disseminação da doença pelo mundo (SANOGO ZHANG; 2015). Em teca (*Tectona grandis*), espécie economicamente importante na região centro oeste e amazônica, isolados de *Fusarium oxysporum* foram identificados causando a murcha em plantios localizados no oeste do estado do Mato Grosso, comprometendo a produção e qualidade da madeira oriunda da cultura (BORGES et al., 2018).

Nesse contexto, isolados de *Fusarium oxysporum* foram identificados como responsáveis pela murcha em plantas de pimenta (*Capsicum annum* L.) da cultivar Lorca, no Vale de Culiacán, uma das principais regiões produtoras da cultura no México (VELARDE-FÉLIX et al., 2018). *F. oxysporum* também foi relatado ocasionando a doença em árvores de *Cladrastis kentukea* nos Estados Unidos (GRANEY; ELMER; LOYD; 2017). Na Índia, Pandey et al., (2017) observaram a ocorrência de murcha ocasionada por *Fusarium solani* em mudas de *Melia dubia*, importante espécie madeireira no país. Já no Brasil, plantas de café (*Coffea canephora*) foram infectadas por *F. decemcellulare*, *F. lateritium* e *F. solani* os quais ocasionaram a perda de turgescência e amarelecimento de folhas além de descoloração vascular, sendo comprovada a ocorrência da murcha (BELAN et al., 2018).

Em noqueira-pecã, *Fusarium solani* e *F. oxysporum* foram observados causando “dieback” além da morte de plantas quando associados com *Euplatypus segnis*, importante praga na cultura (ALVIDREZ-VILLARREAL et al., 2012). *Fusarium equiseti* identificado associado a sementes de noqueira-pecã, causou necrose foliar e podridão radicular de plantas (LAZAROTTO et al, 2014). Além disso, *Fusarium boottii* foi relatado associado a árvores de

nogueira-pecã na África do Sul (GRYZENHOUT; KOOA; LANDMAN; 2016). Lazarotto et al. (2014) estudando doenças em noqueira-pecã, identificaram espécies de *Fusarium* spp. ocasionando a podridão de raízes na cultura. Porém, ainda são poucos os relatos abordando doenças ocasionadas pelo gênero *Fusarium* em noqueira, o que evidencia a importância de trabalhos com esse viés.

Quanto a severidade da doença, diversos trabalhos comprovam a existência de variabilidade quanto a agressividade de isolados de *Fusarium* spp. Costa Junior et al. (2016) avaliando a agressividade de isolados de *Fusarium* spp. em plantas de pupunheira (*Bactris gasipaes* Kunth var. *gasipaes* Henderson), observaram que *Fusarium proliferatum* foi consideravelmente mais agressivo a cultura que *F. oxysporum*.

Silva et al. (2017) também comprovaram a existência de diferentes níveis de severidade entre isolados de *Fusarium* spp. quanto inoculados em *Pinus taeda*. Já Castro et al. (2008) avaliando a agressividade de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* em *Heliconia* spp. também observaram a variabilidade entre os isolados, mesmo sendo esses da mesma espécie, os quais foram agrupados de acordo com a agressividade, como de maior agressividade, agressividade intermediária e menor agressividade. Esses resultados, corroboram com os obtidos no presente estudo em que os isolados também apresentaram diferenças quanto a agressividade, o que evidencia a variabilidade existente entre fungos do gênero *Fusarium*.

4.2 CARACTERIZAÇÃO DOS ISOLADOS DE *Fusarium* spp.

4.2.1 Caracterização morfofisiológica

A caracterização morfofisiológica dos isolados de *Fusarium* spp. teve início com a análise do crescimento micelial das colônias e da taxa de crescimento micelial diário (TCM). Nesse caso, foram observadas diferenças entre os isolados, sendo o isolado S2 o que obteve o crescimento micelial mais rápido, atingindo completamente o dimensionamento da placa ao sétimo dia de incubação. Esse mesmo isolado apresentou a maior taxa de crescimento micelial diário, alcançando 11,43 mm/dia. Em contrapartida, o isolado S5 foi o que apresentou menor crescimento micelial aos sete dias de incubação e menor TCM, atingindo 40,03 mm e 5,72 mm/dia, respectivamente (Tabela 3).

Kuhnem Júnior e colaboradores (2013) observaram diferença no crescimento micelial de *Fusarium meridionales* e *Fusarium verticillioides*, sendo que os isolados de *F. meridionales* apresentaram uma taxa de crescimento micelial de 4,34 mm/dia enquanto *F. verticillioides* exibiu 2,73 mm/dia. Spolti et al. (2012) em seus estudos, observaram uma taxa de crescimento

micelial de 5,90 mm/dia para *F. meridionales*, enquanto Walker et al. (2016) encontraram TCM de 11,20 mm/dia para isolados de *F. verticillioides*.

Embora considerada secundária, essa é uma característica importante para comparação de *Fusarium* spp., pois apesar de ocorrer variação entre isolados da mesma espécie algumas espécies crescem consideravelmente mais rápido que outras o que permite esta separação (LESLIE; SUMMERELL, 2006).

Tabela 3 – Crescimento micelial diário (mm) durante sete dias de incubação e taxa de crescimento micelial diário (mm/dia) (TCM) de isolados de *Fusarium* spp. em meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA).

(continua)

Isolados	Dias							TCM
	Crescimento micelial diário							
	1	2	3	4	5	6	7	
GUA	6,59	17,20	32,05	41,80	52,70	61,39	71,38	10,20
PAN1	6,56	13,41	23,82	30,73	38,27	45,64	54,49	7,78
PAN2	7,48	16,78	28,86	38,25	47,53	53,40	65,01	9,29
PAN3	7,75	18,80	32,49	41,02	50,75	56,58	68,37	9,77
S1	7,37	19,21	31,02	40,61	47,08	54,33	66,00	9,43
S2	16,42	35,69	58,97	69,62	73,53	78,96	80,00	11,43
S3	10,80	19,16	27,63	37,88	44,92	53,93	58,98	8,43
S4	6,51	15,71	23,49	30,73	36,05	47,99	55,89	7,98
S5	6,25	12,80	18,38	23,96	27,32	33,81	40,03	5,72
SL	6,68	15,80	25,43	37,92	46,64	53,32	65,05	9,29
SSP1	8,59	19,70	29,95	42,05	51,64	58,70	67,24	9,61
SSP2	9,77	25,04	35,76	46,98	54,41	69,65	73,60	10,51
VN1	8,22	16,65	26,30	37,31	44,61	52,74	58,79	8,40
VN2	7,60	16,34	27,04	35,86	44,42	49,63	60,29	8,61

(conclusão)

Isolados	Dias							TCM
	Crescimento micelial diário							
	1	2	3	4	5	6	7	
VN3	8,83	15,18	23,86	33,71	41,82	48,74	52,53	7,50
VN4	7,99	25,67	37,60	52,08	59,40	69,22	70,51	10,07
VN5	6,78	21,53	31,55	43,68	49,97	63,74	70,92	10,13
VN6	7,56	16,41	26,44	37,04	45,56	53,28	59,73	8,53
VN7	7,48	19,32	30,37	44,73	56,42	67,14	73,09	10,44

Fonte: Rolim, 2018.

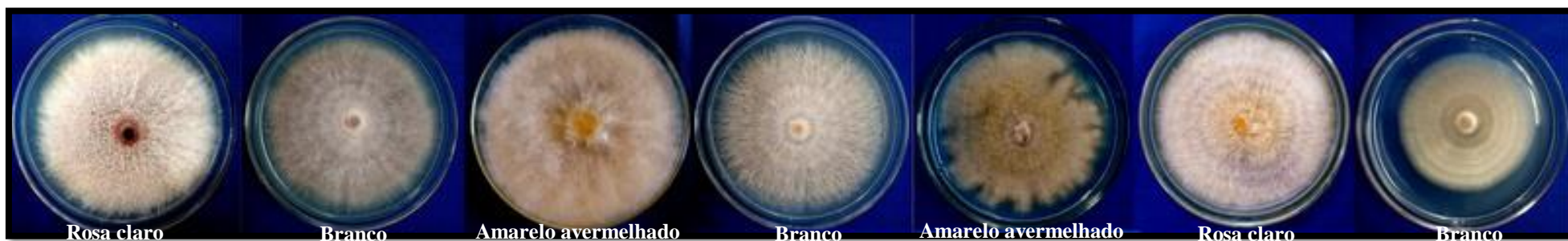
TCM: Taxa de crescimento micelial diário.

Outras características como esporulação, tamanho e forma de macro e microconídios, presença ou ausência de clamidósporos e pigmentação das colônias são consideradas essenciais na caracterização morfofisiológica de *Fusarium* spp. e estão apresentadas na Tabela 4.

A coloração do micélio aéreo variou entre Branco, Amarelo avermelhado e Rosa claro (Figura 6). Já a coloração das colônias dos isolados variou entre tons de Amarelo, Rosa, e Vermelho (Figura 7).

Diversos estudos de caracterização incluem a pigmentação das colônias como um atributo relevante. Walker et al. (2016) observaram *Fusarium acuminatum* em meio de cultura BDA apresentando coloração vermelho-carmim, variando entre tons de amarelo bronzeado e marrom; já *Fusarium verticillioides* exibiu coloração violeta. Ramdial et al. (2016) observaram *Fusarium incarnatum* com micélio aéreo bastante denso e de coloração branca e no reverso da placa coloração variando de creme a salmão. *Fusarium solani* também apresentou micélio aéreo denso, porém com colônias de coloração branca (FU; LIU; LI, 2017). Já *Fusarium oxysporum*, quando cultivado em BDA, exibiu colônias que variaram de salmão a rosa (TAYLOR et al., 2017). Assim, através da análise de estudos que descreveram a coloração de diversas espécies de *Fusarium* nota-se que, apesar de ser uma característica bastante colaborativa para caracterização e até identificação desses fitopatógenos, deve ser apoiada por demais caracteres devido a ocorrência de sobreposição de cores em diferentes espécies ou então a episódios em que isolados da mesma espécie expressam colorações distintas mesmo quando cultivados sob as mesmas condições de luminosidade e temperatura.

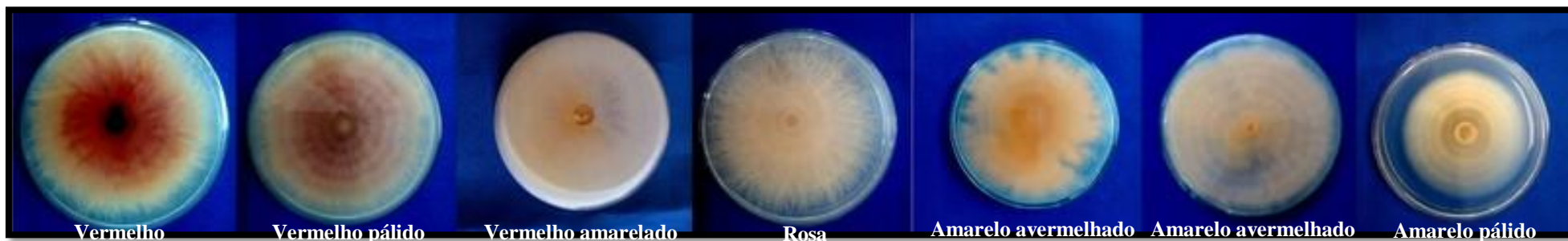
Figura 6 – Coloração do micélio aéreo de isolados de *Fusarium* spp. em meio BDA após 10 dias de incubação.



Fonte: Rolim, 2018.

As cores foram classificadas de acordo com a cartilha de cores de Munsell (2009).

Figura 7 - Coloração da colônias de isolados de *Fusarium* spp. em meio BDA após 10 dias de incubação.



Fonte: Rolim, 2018.

As cores foram classificadas de acordo com a cartilha de cores de Munsell (2009).

Na avaliação da esporulação aos 10 dias de incubação, o destaque foi para o isolado GUA o qual obteve uma média de $27,00 \times 10^6$ esporos/mL, enquanto o isolado S2 não produziu esporos em meio BDA (Tabela 4). O processo de esporulação é considerado bastante específico, no qual as células reprodutivas podem ser afetadas por alterações morfológicas, fisiológicas e bioquímicas (CASTRO; COELHO, 2000). Segundo Nozaki et al. (2004) as condições que contribuem para o crescimento da colônia nem sempre são as mesmas que favorecem a esporulação. Além disso, fatores como a composição do meio de cultura, luminosidade e temperatura muitas vezes são responsáveis pelas alterações na expressão dessas características.

A dimensão e forma de conídios também é relevante em estudos de caracterização de espécies de *Fusarium* (Tabela 4). Neste caso, os isolados analisados apresentaram bastante variação quanto ao tamanho de macro e microconídios (Figura 7). O comprimento de macroconídios variou 5,85 a 17,13 μm para os isolados VN2 e S5, respectivamente. A largura variou de 1,02 a 2,73 μm , expressa respectivamente nos isolados GUA e VN3, enquanto o número de septos variou de 1 até 3, na grande maioria dos isolados. Quanto aos microconídios, o comprimento variou de 2,29 μm para o isolado VN2 a 5,26 μm para PAN1. Já a largura permaneceu entre 0,85 e 1,76 μm dos isolados SSP1 e VN3, respectivamente. Além disso, cabe ressaltar que o isolado S4, quando cultivado em CLA não apresentou macroconídios, enquanto os isolados SSP2 e VN4 não expressaram a presença de microconídios, já o isolado S2 que não produziu esporos no meio de cultura. Os microconídios de todos os isolados apresentaram formato reniforme.

A formação de esporodóquio em meio de cultura CLA é importante na diferenciação de espécies de *Fusarium*, além disso, essa estrutura pode apresentar diferentes colorações que variam de acordo com a espécie do fungo (Figura 8). No presente estudo, observou-se uma variação na presença dessa estrutura, além disso, quando presentes, os esporodóquios exibiram coloração creme, amarelo ou laranja.

Outra estrutura bastante importante nas espécies de *Fusarium* são os clamidósporos, responsáveis pela sobrevivência do fungo em condições adversas e no presente trabalho em alguns isolados observou-se a presença da estrutura enquanto outros não expressaram a presença de clamidósporos. No entanto, os clamidósporos são comumente encontrados em culturas mais antigas, dando origem a hifas ou conidióforos (SUMMERELL et al., 2003) logo, a produção da estrutura está fortemente relacionada com o tempo de incubação do isolado.

Tabela 4 – Características morfológicas de *Fusarium* spp. obtidos de plantas sintomáticas de noqueira-pecã.

(continua)

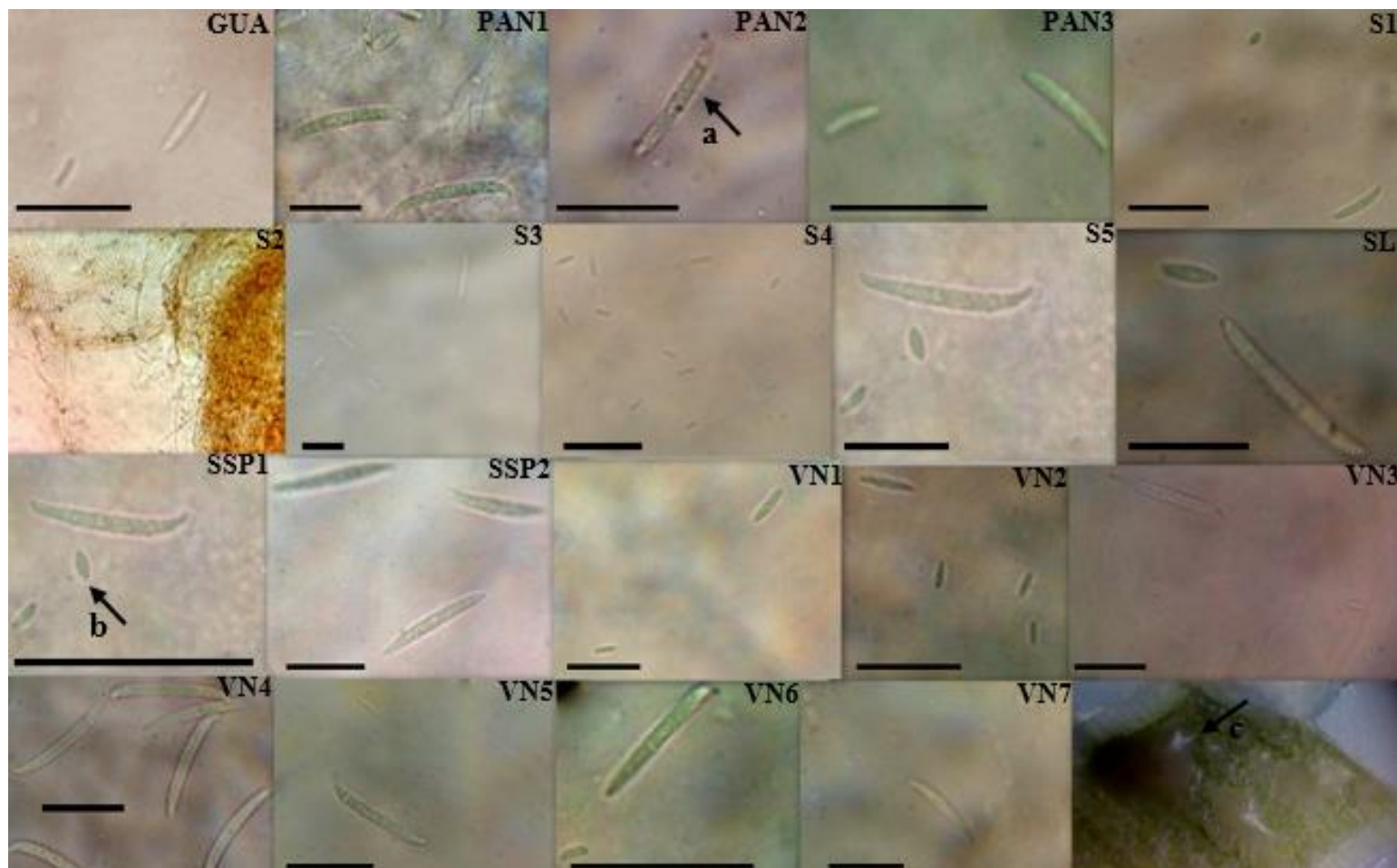
Isolados	Esp. (x10 ⁶) ¹	Macroconídios ²		n°. de septos ²	Microconídios ²		Esporod óquio ²	Cor Esporod. ²	Clamid. ²
		Comp.(µm)	Larg. (µm)		Comp.(µm)	Larg. (µm)			
GUA	27,00	6,66	1,02	1-2	2,94	0,92	-	-	+
PAN1	3,29	17,06	1,98	2-3	5,26	1,53	+	Creme	+
PAN2	1,37	11,53	1,59	2-3	3,33	1,16	-	-	+
PAN3	3,27	7,23	1,25	1-2	3,4	1,11	-	-	+
S1	10,72	7,68	1,34	2-3	2,86	0,87	+	Amarelo	+
S2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S3	4,07	10,8	1,24	0-1	3,54	0,86	-	-	+
S4	6,46	-	-	-	2,86	1,06	-	-	-
55	4,49	17,13	1,49	2-3	3,30	1,07	+	Creme	-
SL	2,48	15,56	1,55	2-4	5,06	1,30	+	Creme	+

Isolados	Esp. (x10 ⁶) ¹	Macroconídios ²		n°. de septos ²	Microconídios ²		Esporod óquio ²	Cor Esporod. ²	(conclusão)
		Comp.(µm)	Larg. (µm)		Comp.(µm)	Larg. (µm)			Clamid. ²
SSP1	2,52	7,40	1,14	1-2	2,62	0,85	-	-	+
SSP2	9,32	15,73	1,70	3-4	-	-	+	Laranja	-
VN1	11,71	6,01	1,22	1-2	2,44	0,96	-	-	+
VN2	7,61	5,85	1,27	1-3	2,29	0,95	-	-	+
VN3	4,08	16,03	2,73	1-3	4,22	1,76	+	Creme	+
VN4	5,03	15,17	1,95	3-4	-	-	+	Laranja	-
VN5	2,56	12,75	1,90	1-2	3,31	1,03	-	-	+
VN6	19,68	8,13	1,37	2-3	3,33	1,00	-	-	+
VN7	2,37	11,13	1,42	0-1	3,41	0,91	+	Amarelo	+

Fonte: Rolim, 2018.

Esp. corresponde esporulação, esporod. corresponde a esporodóqui e clamid. corresponde a clamidósporo. ¹ Meio de cultura batata-dextrose-ágar, ²Meio de cultura folhaa-de-cravo-ágar.

Figura 8 – Estruturas reprodutivas (macro e microconídios) dos isolados de *Fusarium* spp. e formação de esporodóquio em meio de cultura folha-de-cravo-ágar (CLA).



Fonte: Rolim, 2018. Macroconídio (a); microconídio (b); Esporodóquio (c). A barra presente em cada imagem corresponde à medida de 10 μm.

Moreira et al. (2015) caracterizando *Fusarium verticillioides* observaram a produção de microconídios ovais com até dois septos, esporodóquio de coloração alaranjada, ausência de clamidósporos e macroconídios falcados medindo 12 a 15 x 3 a 4 μm com 3 a 5 septos; Mehmood et al. (2017) estudando *Fusarium solani* verificaram que os isolados apresentaram microconídios ovais ou reniformes com 7 a 16 μm de comprimento a 1,5 a 5 μm de largura, enquanto os macroconídios eram fusiformes, levemente curvos com dimensões de 25 a 41 x 3 a 7 μm , possuindo 3 a 6 septos, também houve a presença abundante de clamidósporos. Já no trabalho realizado por Ibrahim et al. (2015) *Fusarium solani* produziu esporodóquios de coloração creme, clamidósporos isolados ou em pares, microconídios ovais ou reniformes com 11,03 a 12,19 μm de comprimento e 2,76 a 3,99 μm de largura. Os autores também caracterizaram isolados de *Fusarium oxysporum*, os quais apresentaram esporodóquios alaranjados, clamidósporos isolados ou em pares, microconídios ovais ou reniformes medindo 6,72 a 12,94 x 2,39 a 2,85 μm e macroconídios retos ou levemente curvados medindo 27,07 a 42,54 x 2,76 a 4,23 μm . Nelson et al. (1983) descrevem *F. oxysporum* como uma espécie que, quando cultivada em meio CLA normalmente apresenta esporodóquios de cor creme ou laranja, macroconídios falciformes, retos ou ligeiramente curvos com paredes finas, microconídios ovais ou reniformes e clamidósporos abundantes. *F. solani* é descrito apresentando esporodóquios de coloração creme, macroconídios possuindo paredes mais espessas e paralelas, microconídios ovais, globosos ou reniformes e presença de clamidósporos. Os autores também descrevem *F. incarnatum* como uma espécie com esporodóquio de cor laranja, macroconídios fusóides e clamidósporos presentes, porém sem a presença de microconídios, características expressas pelos isolados SSP2 e VN4 e que os aproximam dessa espécie.

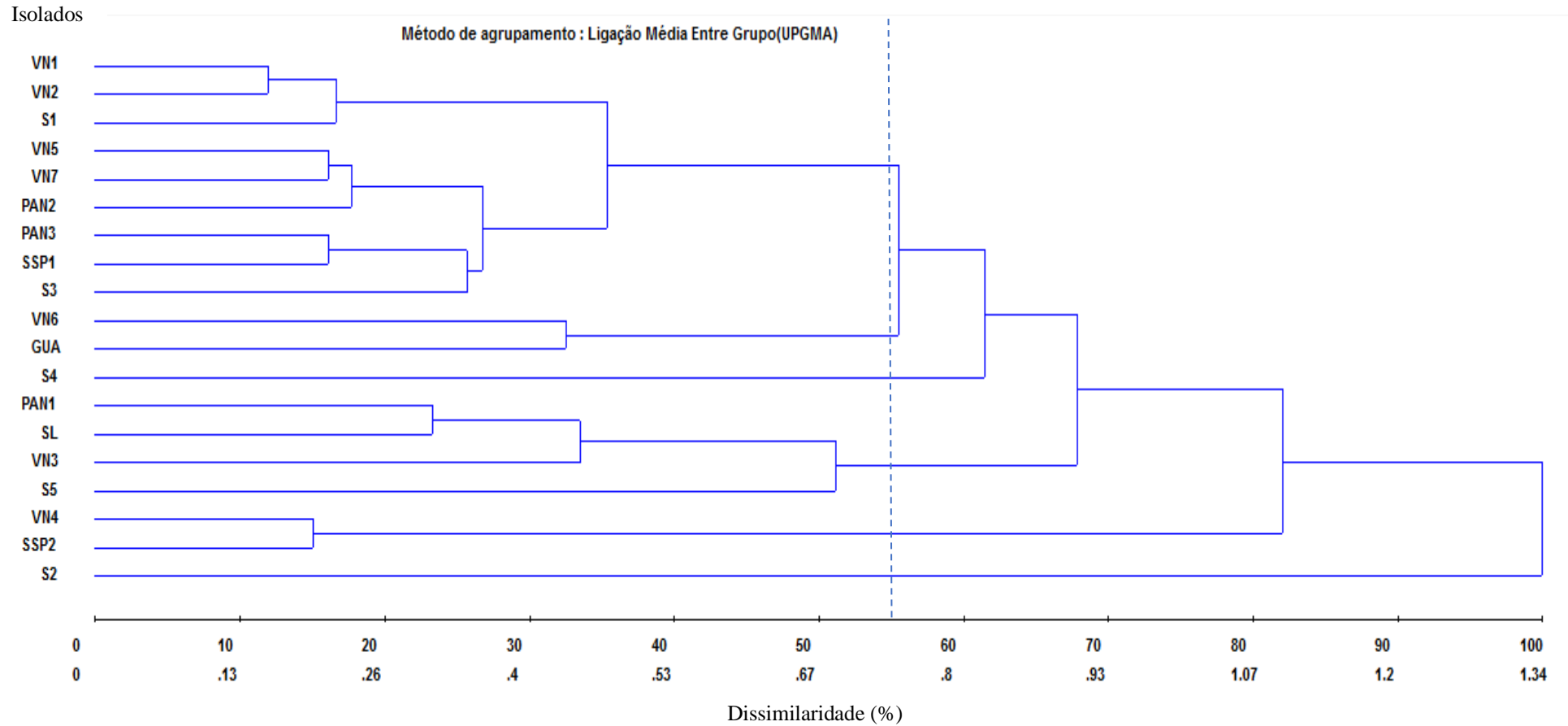
Atualmente, graças as recorrentes mudanças apresentadas por fungos do gênero *Fusarium*, a identificação de espécies baseadas em caracteres morfológicos não é rotineiramente encontrada na literatura (BARRETO, 2018). Entretanto, manuais de identificação morfológica como os produzidos por Nelson et al. (1983) e Leslie e Summerell (2006) ainda são utilizados para fins de caracterização e comparação entre isolados.

Subsequentemente à caracterização morfofisiológica dos 19 isolados do presente trabalho, os dados referentes à esporulação, crescimento micelial (TCM), comprimento e largura de macro e microconídios foram submetidos ao método de agrupamento UPGMA (“*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*”) e por meio do dendrograma gerado, os isolados foram agrupados pela similaridade entre as médias dos caracteres. Analisando o dendrograma (Figura 9), observa-se aos 55% de dissimilaridade, a formação de seis grandes

grupos (Tabela 5). O grupo um apresenta dissimilaridade inferior a 40 %, sendo que os isolados VN1, VN2 e S1; VN5, VN7 e PAN2, assim como PAN3 e SSP1 demonstraram bastante semelhança, com dissimilaridade inferior a 20 %. O grupo dois também apresenta isolados com dissimilaridade entre si inferior a 40 %. Já o grupo três é composto apenas pelo isolado S4, o qual possivelmente apresentou características que o distinguiu dos demais. O quarto grupo alocou isolados com dissimilaridade superior a 50%, nesse caso, o isolado S5 parece possuir características que o diferencia dos outros isolados do grupo, no entanto, o isolado ainda permanece no mesmo clado visto que a finalidade da análise é definir grupos de isolados. Os isolados do grupo cinco também demonstraram bastante proximidade entre si, com percentual de dissimilaridade inferior a 20 %, porém com dissimilaridade superior a 80 % quando comparado com os outros grupos. Já o isolado S2, pertencente ao sexto grupo demonstrou ser completamente diferente dos demais isolados, com 100 % de dissimilaridade.

Além disso, observa-se que os isolados agrupados pelo UGMA obtiveram características morfofisiológicas semelhantes. Todos os isolados pertencentes ao primeiro grupo, apresentaram formação de clamidósporos em meio de cultura CLA, o que define-se como uma característica marcante e que pode aproximar isolados da mesma espécie ou de complexos de espécies. Os isolados VN6 e GUA, apresentaram coloração das colônias e dos micélios aéreos idênticas, além de possuírem macro e microconídios com dimensões próximas e ausência de esporodóquio, o que os aproximou e justificou a alocação dos isolados no mesmo grupo. O isolado S4 não apresentou macroconídios quando cultivado em meio de cultura CLA, o que o distinguiu dos demais isolados e o alocou em um grupo único pela técnica UPGMA. Os isolados pertencentes ao grupo quatro também apresentaram colônias com aspecto bastante semelhante, além da dimensão dos conídios e produção de esporodóquio de coloração creme, o que os aproximou morfofisiologicamente. Assim como os demais, os isolados VN4 e SSP2 apresentaram características semelhantes. Nesse caso, ambos os isolados não produziram microconídios quando cultivados em meio CLA. Já o isolado S2, apresentou características morfofisiológicas bastante distintas dos demais, não produzindo nenhuma das estruturas avaliadas, o que corrobora com a alocação em um grupo único. Assim, percebe-se que a técnica de agrupamento UPGMA foi eficiente na separação de isolados.

Figura 9 – Dendrograma mostrando a porcentagem de dissimilaridade entre os 19 isolados de *Fusarium* spp. O Dendrograma foi obtido pela técnica UPGMA, a partir da análise da matriz de distância Euclidiana com seis caracteres morfológicos (esporulação, taxa de crescimento micelial, comprimento e largura de macroconídios e comprimento e largura de microconídios).



Fonte: Rolim, 2018.

Tabela 5 – Grupos de isolados de *Fusarium* spp. com até 55 % de dissimilaridade, com base na técnica de agrupamento UPGMA - (“Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean”).

Grupos	Isolados
1	VN1; VN2; S1; VN5; VN7; PAN2; PAN3; SSP1; S3
2	VN6; GUA
3	S4
4	PAN1; SL; VN3; S5
5	VN4; SSP2
6	S2

Fonte: Rolim, 2018.

O método de agrupamento UPGMA também fornece as distâncias Euclidianas entre os isolados, sendo que as menores distâncias indicam uma maior proximidade entre os parâmetros analisados, enquanto as maiores distâncias apontam maior diferença entre os caracteres. As distâncias entre os isolados os agrupam em clados, assim, isolados com menores distâncias são agrupados em um mesmo clado, enquanto isolados com uma discrepância maior entre distâncias são agrupados em clados distintos, permitindo dessa forma a união de isolados similares em um mesmo grupo.

Na tabela 6 estão apresentadas as distâncias Euclidianas entre os 19 isolados de *Fusarium* spp. Quando analisada a maior distância entre os isolados observa-se que S2 foi o que apareceu com maior frequência, exibindo uma distância que variou de 1,0668 do isolado S1 a 2,0041 do isolado VN3. Essa distância de S2 aos demais isolados pode estar atrelada ao fato de o mesmo não ter apresentado esporulação em meio BDA nem formação de macro e microconídios em meio de cultura CLA, o que o difere completamente dos demais. Já a menor distância foi de 0,1627 entre os isolados VN1 e VN2.

Tabela 6 – Distâncias Euclidiana entre os isolados de *Fusarium* spp., após agrupamento pela técnica UPGMA - (“Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean”).

Isolado	Maior Distância		Menor Distância	
	Valor	Isolado	Valor	Isolado
GUA	1,1406	S2	0,2155	SSP1
PAN1	1,9230	S2	0,3119	SL
PAN2	1,3302	S2	0,2168	VN5
PAN3	1,1406	S2	0,2155	SSP1
S1	1,0668	S2	0,2203	VN2
S2	2,0041	VN3	0,9765	SSP1
S3	1,2619	S2	0,2856	PAN2
S4	1,4528	VN3	0,6059	VN2
S5	1,7582	S2	0,6091	PAN1
SL	1,7183	S2	0,3119	PAN1
SSP1	1,0451	VN3	0,2155	PAN3
SSP2	1,4507	S4	0,2015	VN4
VN1	1,1437	S2	0,1627	VN2
VN2	1,0677	S2	0,1627	VN1
VN3	2,0041	S2	0,3720	PAN1
VN4	1,4482	S4	0,2015	SSP2
VN5	1,3559	S2	0,2156	VN5
VN6	1,4109	S2	0,3676	VN1
VN7	1,1917	S2	0,2156	VN5

Fonte: Rolim, 2018.

A análise multivariada (UPGMA) também fornece a contribuição relativa dos caracteres para divergência entre os isolados, ou seja, quanto cada parâmetro analisado contribui para distinção e agrupamento dos isolados. Observa-se na tabela 7 que a esporulação foi a característica que mais influenciou na diferenciação dos isolados, com 58,12 % de contribuição, seguida do comprimento de macroconídios, responsável por 35,98 %, enquanto os demais caracteres praticamente não influenciaram no agrupamento.

Tabela 7 – Contribuição relativa dos caracteres (esporulação, taxa de crescimento micelial, comprimento e largura de macroconídios e comprimento e largura de microconídios) para divergência.

Caracteres	Valor (%)
Esporulação	58,12
Taxa de crescimento micelial	2,25
Comprimento macroconídios	35,98
Largura macroconídios	0,52
Comprimento microconídios	2,84
Largura microconídios	0,29

Fonte: Rolim, 2018.

Krahm (2017) analisou características morfológicas como esporulação, taxa de crescimento micelial, diâmetro final da colônia, crescimento micelial diário, comprimento, largura e número de septos dos macroconídios para realizar o agrupamento UPGMA com o objetivo de distinguir e separar em grupos 24 isolados de *Fusarium* spp. Em seu estudo, a autora obteve o dendrograma a partir da matriz de distância de Mahalanobis e observou níveis de dissimilaridade entre os isolados de 40 e 90%. Além disso, comprovou que o comprimento de macroconídios foi o que mais contribuiu para o agrupamento dos isolados. Mezzomo et al. (2018) também utilizaram caracteres morfológicos para realizar o agrupamento de isolados de *Fusarium* spp., através do dendrograma obtido pelo UPGMA a partir da distância Euclidiana, os autores observaram a formação de sete grandes grupos de isolados, com dissimilaridade entre si que atingiu valores menores que 10 % e superiores a 70 %. Quanto a influência de cada caractere para o agrupamento, verificou-se que a esporulação foi a variável que mais contribuiu, com 72,22 %, seguido do comprimento de macroconídios, com 26,77 %, semelhante ao que foi observado no presente estudo. Lazarotto et al. (2014) consideraram a esporulação, crescimento micelial e dimensão (comprimento e largura) de macroconídios para realizar o agrupamento UPGMA e diferenciar isolados de *Fusarium* spp. patogênicos à noqueira-pecã. Nesse caso, a largura dos macroconídios foi a variável que praticamente sozinha distinguiu os isolados pois foi responsável por 99,98 % da contribuição para o agrupamento.

A variabilidade das espécies presentes no gênero *Fusarium* é refletida através dos resultados obtidos nos últimos trabalhos, os quais demonstram que características diferentes são responsáveis pelo agrupamento dos isolados. No presente estudo, a esporulação e o

comprimento de macroconídios contribuíram com 94,1 % para discriminação dos isolados. No entanto, apesar de ser comprovada como uma ferramenta útil para distinção dos fungos esta técnica deve ser amparada por outras, como as análises moleculares, que possibilitam confirmar a veracidade dos resultados obtidos.

4.2.2 Caracterização molecular

Após a caracterização morfofisiológica, foram selecionados aleatoriamente um isolado de cada grupo gerado pelo UPGMA para realização da identificação molecular. Para tanto, os isolados S1, S2, S4, SL, VN4 e VN6 foram submetidos a extração do DNA e posterior sequenciamento da região do fator de alongação 1-alfa. Estão apresentados na tabela 8 os 3 dos 6 a 8 acessos que foram utilizados para comparação filogenética, obtidos a partir do GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Para a construção do dendrograma filogenético foram selecionados e alinhados os acessos que apresentaram os maiores percentuais de cobertura e similaridade (Figura 9).

Tabela 8 – Isolado, número de acesso no Genbank, cobertura (%), similaridade (%) e referência das espécies utilizadas na construção do dendrograma filogenético da região do fator de alongação 1- α .

(continua)				
Isolado	Acesso Genbank	Cobertura (%)	Similaridade (%)	Referência
<i>Fusarium oxysporum</i>	KF575346	98	99	O'Donnell et al. (2017)
<i>Fusarium oxysporum</i>	JF740726	98	99	O'Donnell et al. (2017)
<i>Fusarium oxysporum</i>	KR708645	96	99	Hu, H.Q. (2015)
<i>Fusarium oxysporum</i>	EU246564	96	99	Wang, B. (2016)
<i>Fusarium fujikuroi</i>	MH582339	94	100	O'Donnell et al. (2018)
<i>Fusarium fujikuroi</i>	LS423234	94	100	Susca, A. (2018)
<i>Fusarium graminearum</i>	MG670538	94	99	Yaman, T. (2018)

(conclusão)

Isolado	Acesso Genbank	Cobertura (%)	Similaridade (%)	Referência
<i>Fusarium graminearum</i>	MH572267	94	99	Bilska, et al. (2018)
<i>Fusarium graminearum</i>	KY283892	94	99	Tang, H. (2017)
<i>Fusarium incarnatum</i>	MG882013	95	95	Heng, W. (2018)
<i>Fusarium incarnatum</i>	MF502424	95	95	Huang et al. (2018)
<i>Fusarium incarnatum</i>	KF267263	95	95	Choi et al. (2013)
<i>Fusarium solani</i>	KX901847	95	99	Choi et al. (2017)
<i>Fusarium solani</i>	KY078212	95	99	Wu et al. (2017)
<i>Fusarium solani</i>	MH628130	95	99	Li, Y. (2018)

Fonte: Rolim, 2018.

Analisando o dendrograma (Figura 10), observa-se que os isolados S1 e VN6 associaram-se a *Fusarium oxysporum*, ainda que alocando-se em clados distintos o que demonstra uma certa distância genética entre eles. Essa distinção também foi verificada durante a análise das características morfofisiológicas que separou os isolados em diferentes grupos. O isolado VN6 alocou-se em um clado com 74 % de *bootstrap*, enquanto o isolado S1 agrupou-se em um clado com 68 % de suporte *bootstrap*. Apesar de estes não serem considerados valores demasiadamente altos, quando comparadas com as demais sequências de *F. oxysporum* o valor de *bootstrap* aumentou para 89 % para o isolado VN6 e 85 % para S1.

Fusarium oxysporum é considerada uma espécie com grande importância econômica pois é responsável pela murcha em diversas culturas, além de ter sido relatada como uma ameaça a humanos e animais (NELSON et al., 1981; VARTIVIRIAN et al., 1993). Hafizi et al. (2014) analisando características morfológicas, separaram isolados de *Fusarium* spp. em dois grupos. Posteriormente, através da identificação molecular os isolados de ambos os grupos foram identificados como *F. oxysporum*, além disso, os isolados pertencentes a morfotipos distintos também foram agrupados em clados separados. Esse resultado corrobora com o obtido

no presente estudo, em que os dois isolados permaneceram em diferentes grupos de características morfológicas e em clados distintos na análise filogenética.

O isolado S4 foi identificado como *Fusarium fujikuroi*, pois agrupou-se em um clado com 98 % de *bootstrap* com isolados dessa espécie. Além disso, foi observada uma proximidade entre os clados que agruparam *F. oxysporum* e *F. fujikuroi*, porém, associando as características morfofisiológicas de cada isolados é possível confirmar a veracidade da identificação molecular. Uma das características morfológicas que permite distinguir as espécies é a presença de clamidósporos. Segundo Leslie e Summerell (2006) isolados de *Fusarium oxysporum* apresentam clamidósporos em abundância quando cultivados em meio de cultura CLA, enquanto *F. fujikuroi* não produz a estrutura em meio de cultura. No presente estudo, observou-se a formação de clamidósporos nos isolados VN6 e S1, bem como nos demais isolados pertencentes aos mesmos grupos formados pelo UPGMA. Em contrapartida, o isolado S4 não apresentou a estrutura quando cultivado em meio de cultura, o que o diferencia dos demais e corrobora com a identificação das espécies.

Carmo (2017) amplificou a região do fator de alongação 1- alfa e realizou o sequenciamento de 29 isolados de *Fusarium* spp. patogênicos a *Pinus* spp. Através da análise filogenética, a autora identificou espécies pertencentes a quatro complexos distintos, sendo que 13 desses isolados corresponderam ao complexo *F. fujikuroi*, além disso, assim como no presente estudo, as características morfofisiológicas foram relacionadas com os resultados obtidos na identificação molecular, atribuindo mais confiabilidade ao trabalho.

O isolado S2 foi o mais distinto morfofisiologicamente dos demais e no dendrograma filogenético foi alocado em um clado com sequencias de *Fusarium graminearum*, apresentando 87 % de *bootstrap*. Leslie e Summerell (2006) descrevem a espécie com características como rápido crescimento micelial, produção de micélio denso de coloração inicialmente branca, progredindo para amarelo queimado com o passar do tempo e formação do estágio telemórfico (*Gibberella zae*) quando cultivado em meio CLA. Em comparação, S2 apresentou crescimento micelial bastante veloz, sendo o mais rápido dentre todos os isolados, houve grande produção de micélio denso e com coloração semelhante a citada pelos autores. Além disso, o fungo não produziu esporos em BDA nem em CLA, o que pode ser explicado pela dificuldade de esporulação apresentada pela espécie e formação de *Gibberella zae* em folha-de-cravo-ágar.

Fusarium graminearum é conhecido por ocasionar a fusariose ou giberela do trigo, considerada uma das doenças mais perigosas do mundo. O patógeno produz micotoxinas extremamente tóxicas, que se acumulam nos grãos e oferecem grande risco a saúde de humanos

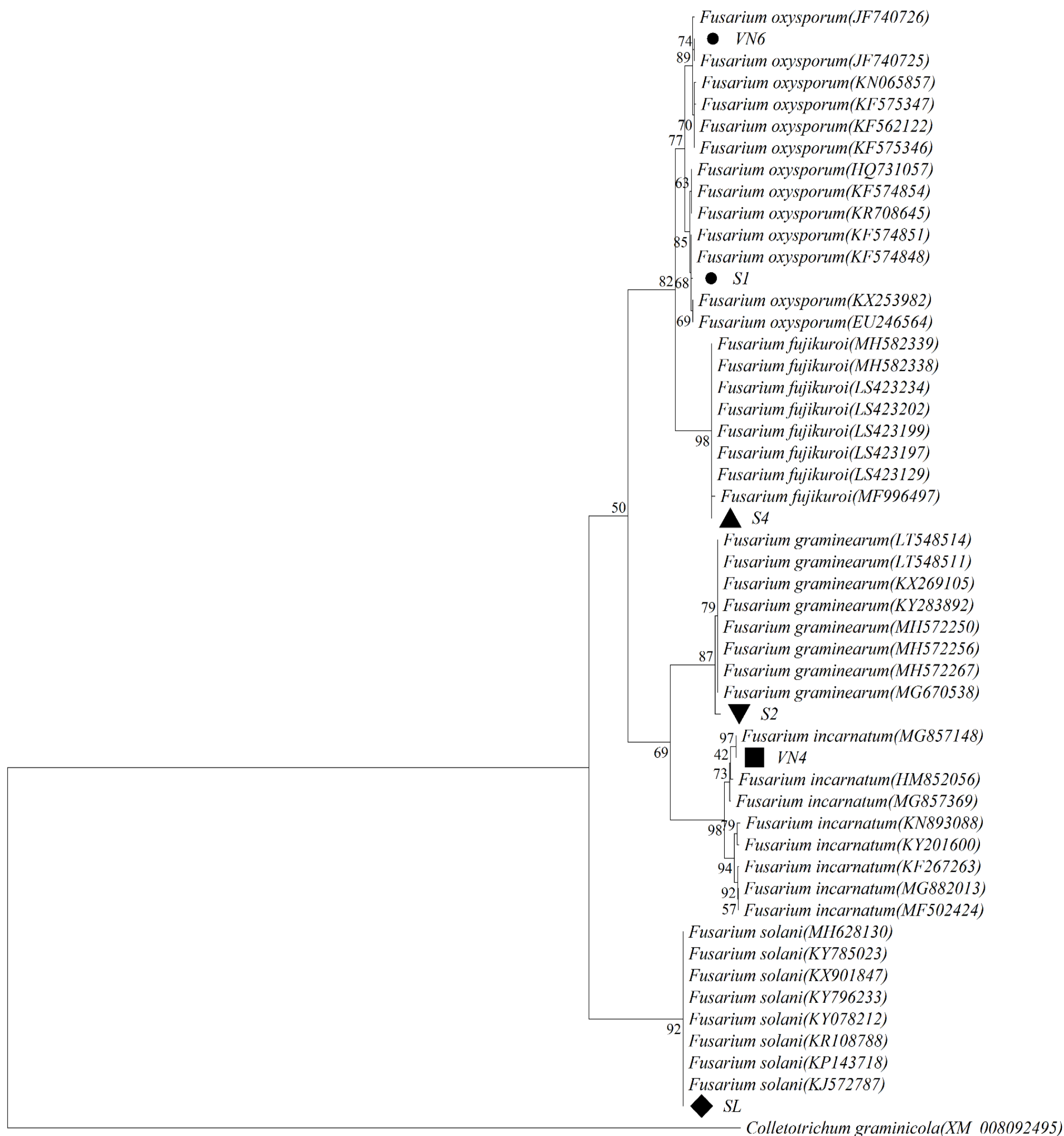
e animais (GOSWAMI; KISTLER, 2004). Logo, se alojado nos frutos, esse patógeno pode se tornar uma ameaça à produção de nogueira-pecã.

O isolado VN4 foi identificado como *Fusarium incarnatum*, alcançando 97 % de *bootstrap*. Além disso, em meio CLA o isolado apresentou características que confirmam a identificação da espécie, como formação de esporodóquio de coloração laranja, ausência de microconídios e de clamidósporos. Lesllie e Summerel (2006) confirmam as características descritas por Nelson et al. (1983) para a espécie, que indicam a ausência de microconídios, clamidósporos raros de encontrar e formação de esporodóquio alaranjado. Os autores ainda relatam que a espécie costuma apresentar formação de mesoconídios retos ou em formato de fuso, porém, essa estrutura não foi observada nos isolados analisados. A amplificação e sequenciamento da região do fator de alongação 1-alfa permitiu a identificação de *Fusarium incarnatum* como patógeno de *Morus alba* (CHEN et al., 2017).

Por último, o isolado SL foi identificado como *Fusarium solani*, o qual foi alocado em um clado 92 % de suporte *bootstrap* com sequencias da espécie. Assim como os demais, o isolado também apresentou características semelhantes aquelas apresentadas por fungos dessa espécie, como colônia de coloração clara e presença de esporodóquio de coloração creme. Yang et al. (2017) utilizaram as regiões ITS, β -tubulina e fator de alongação 1-alfa para identificar *Fusarium solani* responsável pela murcha em *Plukenetia volubilis*.

Regiões como ITS, β -tubulina, e o fator de alongação 1-alfa são comumente amplificadas e sequenciadas para identificação de espécies de fungos. Nesse sentido o fator de alongação 1-alfa tem sido a região mais empregada para identificação de *Fusarium* spp. principalmente por ser considerado um gene altamente informativo, o que possibilita a separação de espécies relacionadas (GEISER et al., 2004). Além disso, a caracterização morfofisiológica deve ser utilizada como uma ferramenta de auxílio, visando a correta separação e identificação das espécies. Assim, a correlação entre as duas análises fornece veracidade aos resultados e confiabilidade ao estudo.

Figura 10 – Dendrograma filogenético baseado no método Neighbour-joining a partir de sequências de DNA da região do fator de alongação 1- α , com base em 1000 réplicas de “bootstrap”. O número nas ramificações representa o número de “bootstrap”.



Através da avaliação da patogenicidade, observação das características morfofisiológicas e identificação molecular foi possível caracterizar um novo patossistema. Assim, *Fusarium* spp. surge em noqueira-pecã como agente causal de uma doença ainda não descrita para a espécie, o que evidencia a importância da realização deste trabalho.

Ao longo do estudo, pode-se observar que a caracterização morfofisiológica dos isolados foi ao encontro do resultado obtido através do agrupamento UPGMA, e que ambos contribuíram com a identificação molecular das espécies. Além disso, o sequenciamento da região do fator de alongação 1 alfa foi suficiente para identificação das diferentes espécies de *Fusarium*, sendo esta uma informação de grande valia para trabalhos com esse viés. Logo, pode-se perceber que as técnicas empregadas na realização deste estudo se complementam e fornecem confiabilidade aos resultados obtidos.

Sendo assim, comprovou-se a ocorrência da murcha ocasionada por *Fusarium* spp. podendo este trabalho servir de base para estudos que visem a implantação de estratégias de controle para a doença, bem como para fornecer informação à produtores e pesquisadores da cultura.

5 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente estudo permitiram concluir que:

- Os 19 isolados obtidos de *Fusarium* spp. são patogênicos a noqueira-pecã, porém, existe variabilidade quanto à agressividade.

- *Fusarium oxysporum* (S1 e VN6), *F. fujikuroi* (S4), *F. incarnatum* (VN4), *F. graminearum* (S2) e *F. solani* (SL) são agentes causais da murcha em noqueira-pecã.

- A esporulação e o comprimento de macroconídios são os caracteres que mais influenciam na caracterização morfofisiológica dos isolados de *Fusarium* spp.

- O sequenciamento da região do fator de alongação 1-alfa é eficiente na identificação das espécies de *Fusarium* patogênicas a noqueira-pecã.

REFERÊNCIAS

- AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**. 5. ed. San Diego: Elsevier Academic Press, 2005. 922p.
- ALEXANDER, N.J. et al. The genetic basis for 3-ADON and 15-ADON trichothecene chemotypes in *Fusarium*. **Fungal Genetics and Biology**, [S. L.], v. 48, p. 485–495, 2011. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21216300>>. Acesso em: 14 set. 2018. DOI: 10.1016/j.fgb.2011.01.003.
- ALFENAS, A. C. et al. **Clonagem e doenças do eucalipto**. 2. ed. Viçosa: UFV, 2009 500p.
- ALFENAS, A.C. et al. Isolamento de fungos fitopatogênicos. In: ALFENAS, A.C.; MAFIA, R.G. (Eds.). **Métodos em fitopatologia**. 1. ed. Viçosa: UFV, 2007. p. 53-91.
- ALVIDREZ-VILLARREAL, R. et al. Isolation and pathogenicity of fungi associated to ambrosia borer (*Euplatypus segnis*) found injuring pecan (*Carya illinoensis*) wood. **Agricultural Sciences**, Delaware, v. 3, n. 03, p. 405, 2012. Disponível em: <https://file.scirp.org/pdf/as20120300011_79240789.pdf>. Acesso em: 03 out. 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.4236/as.2012.33048>.
- ANTONIOLLI, Z. I. et al. Variation in rDNA ITS sequences in *Glomus mosseae* and *Gigaspora margarita* spores from a permanent pasture. **Mycological Research**, Amsterdam, v. 104, n. 6, p. 708-715. 2000. Disponível em: < <https://www.cambridge.org/core/journals/mycological-research/article/variation-in-rdna-its-sequences-in-glomus-mosseae-and-gigaspora-margarita-spores-from-a-permanent-pasture/OCC1305965FBED6979858EE60FEF0B6C>>. Acesso em: 16 set. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0953756299001860>.
- BAIS, H. P. et al. How plants communicate using the underground information superhighway. **Trends Plant Science**, Cambridge, v. 9, p. 26-32, 2004. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14729216>>. Acesso em: 01 out. 2018. DOI: 10.1016/j.tplants.2003.11.008.
- BACKES, P.; IRGANG, B. **Árvores cultivadas no sul do Brasil: guia de identificação e interesse paisagístico das principais espécies exóticas**. Porto Alegre: Paisagem do Sul. 2004. 204 p.
- BAKER, G. J. et al. Genetic variability and host specialization in the Latin American clade *Ceratocystis fimbriata*. **Phytopathology**, East Lansing, v. 93, n. 10, p. 1274-1284, 2003. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18944327>>. Acesso em: 15 set. 2018. DOI: 10.1094/PHYTO.2003.93.10.1274.
- BARRETO, G. G. **Caracterização morfológica de *Fusarium* spp. do feijão fava e controle biológico via sementes-plântulas**. 2018. 55 p. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em ciências biológicas) – Universidade Federal da Paraíba, Areia, PB, 2018.
- BEDENDO, I. P. Murcha Vascular. In: BERGAMIN FILHO A.; KIMATI, H.; AMORIM L. (Eds.) **Manual de Fitopatologia**. v. 1, 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2011. 451-457 p.

- BEDENDO, I.; AMORIM L. Ambiente e Doença. In: BERGAMIN FILHO A.; KIMATI H.; AMORIM L. (Eds.) **Manual de Fitopatologia**. v. 1, 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2011. 133-147 p.
- BELAN, L. L. et al. First report of *Fusarium* species associated with *Fusarium* wilt in *Coffea canephora* plants in Brazil. **Plant Disease**, St. Paul, v. 102, n.9, 2018. Disponível em: <<https://sci-hub.tw/https://doi.org/10.1094/PDIS-01-18-0186-PDN>>. Acesso em: 03 out. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1094/PDIS-01-18-0186-PDN>.
- BERTIN, C.; YANG, X. H.; WESTON, L. A. The role of root exudates and allelochemicals in the rhizosphere. **Plant and Soil**, [S. L.], v. 256, p. 67-83, 2003. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1023/A:1026290508166>>. Acesso em: 01 out. 2018. DOI: 10.1023/A:1026290508166.
- BOCK, C. H. et al. Population genetic structure of *Venturia effusa*, cause of pecan scab, in the southeastern United States. **Phytopathology**, v. 107, n. 5, p. 607-619, 2017.
- BORGES, R. C. F. et al. Vascular wilt of teak (*Tectona grandis*) caused by *Fusarium oxysporum* in Brazil. **Phytopathologia Mediterranea**, Florença, v. 57, n. 1, p. 115-121, 2018. Disponível em: <<http://www.fupress.net/index.php/pm/article/view/20896>>. Acesso em: 03 out. 2018. DOI: http://dx.doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-20896.
- BORRERO, C. et al. First Report of Vascular Wilt Caused by *Fusarium proliferatum* on Strawberry in Spain. **Plant Disease**, St. Paul, 2018. Disponível em: <<https://apsjournals.apsnet.org/doi/abs/10.1094/PDIS-09-18-1544-PDN?mobileUi=0>>. Acesso em: 18 set. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-18-1544-PDN>.
- BROWN, D. W.; PROCTOR R. A. **Fusarium: genomics, molecular and cellular biology**. 1. ed. USA: Caister Academic Press, 2013, 194 p.
- BRUNS, T. D.; FOGEL, R.; TAYLOR, J.W. Amplification and sequencing of DNA from fungal herbarium specimens. **Mycologia**, n. 2 v. 82, p. 175-184, 1990. Disponível em: <https://www.jstor.org/stable/3759846?seq=1#page_scan_tab_contents>. Acesso em: 17 set. 2018. DOI: 10.2307/3759846.
- CARMO, A. L. I. M do. **Fusarium em sementes de Pinus no Brasil: distribuição, patogenicidade, identificação de espécies e controle biológico**. 2017. 81 f. Tese (Doutorado em agronomia). Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2017.
- CASTRO, N. R.; COELHO, R. S. B. Caracterização fisiológica de isolados de *Cercospora cruenta* em diferentes meios de cultura. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 26, n. 4, p. 466-471, 2000.
- CASTRO, N. R. et al. Ocorrência, métodos de inoculação e agressividade de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* em *Heliconia* spp. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 34, n. 2, p. 127-130, 2008. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/240771709_Ocorrencia_metodos_de_inoculacao_e_agressividade_de_Fusarium_oxysporum_f_sp_cubense_em_Heliconia_spp>. Acesso em: 04 out. 2018. DOI:10.1590/S0100-54052008000200003.

CHANDRA, N. S et al. Prospects of molecular markers in *Fusarium* species diversity. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Münster, v. 90, n. 5, p. 1625–1639, 2011. Disponível em: <<https://sci-hub.tw/10.1007/s00253-011-3209-3>>. Acesso em: 17 set. 2018. DOI: 10.1007/s00253-011-3209-3.

CHEN, S. C. et al. First Report of Root Rot Caused by *Fusarium incarnatum* on *Morus alba* in China. **Plant Disease**, St. Paul, v. 101, n. 7, p. 1320-1320, 2017. Disponível em: <<https://apsjournals.apsnet.org/doi/full/10.1094/PDIS-02-17-0161-PDN?prevSearch=%24%7BresultBean.text%7D&searchHistoryKey=%24%7BsearchHistoryKey%7D>>. Acesso em: 20 nov. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1094/PDIS-02-17-0161-PDN>.

COSTA JUNIOR, J. C. da et al. Qualidade sanitária e fisiológica, métodos de detecção de *Fusarium* spp. e tratamento de sementes de pupunheira. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 26, n. 4, 2016. Disponível em: <<https://www.redalyc.org/html/534/53449110008/>>. Acesso em: 04 out. 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.5902/1980509825029>.

CRUZ, C.D. **Programa Genes: Diversidade Genética**. 1. ed. Viçosa: UFV. 2008. 278p

DEAN, R. et al., The top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. **Molecular Plant Pathology**, Londres, p. 414-430, 2012. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1364-3703.2011.00783.x>>. Acesso em: 14 set. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00783.x>.

DI PIETRO, A. et al. *Fusarium oxysporum*: exploring the molecular arsenal of a vascular wilt fungus. **Molecular Plant Pathology**, Londres, v. 4, n. 5, p. 315-325, 2003. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20569392>>. Acesso em: 01 out. 2018. DOI: 10.1046/j.1364-3703.2003.00180.x.

DIMOND, A. E. Biophysics and Biochemistry of the vascular wilt syndrome. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 4, n. 5, p. 315-325, 1970. Disponível em <<https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.py.08.090170.001505>>. Acesso em: 01 out. 2018. DOI: <<https://doi.org/10.1146/annurev.py.08.090170.001505>>.

DUARTE, V.; ORTIZ, E. R. N. Podridão de *Phytophthora* da amêndoa e da casca da noqueira pecan. In: LUZ, E. D. M. N. et al. (Ed.). **Doenças causadas por *Phytophthora* no Brasil**. 1. ed. Campinas: Rural, 2001. p. 493-508

ELLIOTT, M. L. Standardizing Pathogenicity Assays for *Fusarium* Wilt Pathogens of Ornamental Palms. **Plant Disease**, St. Paul, v. 102, n. 8, p. 1541-1548, 2018. Disponível em: <<https://apsjournals.apsnet.org/doi/abs/10.1094/PDIS-10-17-1525-RE>>. Acesso em: 01 out. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-17-1525-RE>.

EMATER/RS-ASCAR. Cultura da noz pecã em 2014 no Rio Grande do Sul: área total, produção e número de produtores. Tabela. Porto Alegre: EMATER/RS-ASCAR, 2014.

EMBRAPA. Doenças. Brasília, 2018. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/territorio_mata_sul_pernambucana/arvore/CO NT000gztrwiy02wx7ha0aadhmpgm5qvcb.html>.

FERNANDES, M.R. **Manual para laboratório de fitopatologia**. 1. ed. Passo Fundo – RS: EMATER – CNPT, 1993. 128p

FERREIRA, E. M. et al., Influência das murchas-de-*Ceratocystis* sobre o crescimento de um clone híbrido de *Eucalyptus* spp. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, p. 216, 2007.

FERREIRA, F. A. et al. Murcha de *Ceratocystis* em eucalipto no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**. Brasília, v. 24, p. 284, 1999. Suplemento.

FERREIRA, M. A. **Estrutura Genética de populações de *Ceratocystis fimbriatae* padrão espaço-temporal da murcha-de-ceratocystis**. 2009. 107 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia). Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 2009.

FRONZA, D.; HAMANN, J. J. **O cultivo da noqueira-pecã**. 1. ed. Santa Maria: UFSM, 2016. 424 p.

FIRMINO, A. C. et al. *Ceratocystis fimbriata* causando seca em atemóia na região de Botucatu-SP. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 38, n. 2, p. 171-171, 2012. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-54052012000200016>. Acesso em: 15 set. 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-54052012000200016>.

FU, Y. P.; LIU, Z. H.; LI, Y. *Fusarium solani*: A New Pathogen Causing Postharvest Lemon Rot in Changchun, China. **Plant Disease**, St. Paul, v. 101, n. 8, p. 1548, 2017. Disponível em: <<https://apsjournals.apsnet.org/doi/full/10.1094/PDIS-08-16-1194-PDN?prevSearch=%24%7BresultBean.text%7D&searchHistoryKey=%24%7BsearchHistoryKey%7D>>. Acesso em: 06 out. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1094/PDIS-08-16-1194-PDN>.

GATTO, D. A. et al. Características tecnológicas das madeiras de *Lueheadivaricata*, *Carya illinoensis* e *Platanus x acerifolia* quando submetidas ao vergamento. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 18, n. 1, p. 121- 131, 2008. Disponível em: <<https://periodicos.ufsm.br/cienciaflorestal/article/view/516>>. Acesso em 10 set. 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.5902/19805098516>.

GEISER, D. M. et al. *FUSARIUM-ID* v.1.0: A DNA sequence database for identifying *Fusarium*. **European Journal of Plant Pathology**, [S.I.], v. 110, n. 5-6, p. 473-479, 2004. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1023/B:EJPP.0000032386.75915.a0>>. Acesso em: 17 set. 2018. DOI: 10.1007/978-1-4020-2285-2_2.

GOMES, R. P. **Fruticultura Brasileira**. São Paulo: Nobel, 1976. 443 p.

GONZALEZ-CENDALES Y., et al. Identification of I-7 expands the repertoire of genes for resistance to *Fusarium* wilt in tomato to three resistance gene classes. **Molecular Plant Pathology**, Londres, v. 17, n. 3, p. 448–463. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26177154>>. Acesso em: 16 set. 2018. DOI: 10.1111/mpp.12294.

GOSWAMI, R. S.; KISTLER, H. C. Heading for disaster: *Fusarium graminearum* on cereal crops. **Molecular plant pathology**, Londres, v. 5, n. 6, p. 515-525, 2004. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20565626>>. Acesso em: 20 nov. 2018. DOI: 10.1111/j.1364-3703.2004.00252. x.

GRANEY, L.; ELMER, W. H.; LOYD, A. L. First Report of *Fusarium* Wilt of Yellowwood (*Cladrastis kentukea*) Caused by *Fusarium oxysporum* in the United States. **Plant Disease**, St. Paul, v. 101, n. 1, p. 258-258, 2017. Disponível em: <<https://apsjournals.apsnet.org/doi/full/10.1094/PDIS-05-16-0644-PDN>>. Acesso em: 03 out. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-16-0644-PDN>.

GRYZENHOUT, M.; KHOOA, B.; LANDMAN, L. First report of *Fusarium boothii* from pecan (*Carya illinoensis*) and camel thorn (*Vachellia erioloba*) trees in South Africa. **South African Journal of Botany**, [S. L.], v. 105, p. 158-162, 2016. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0254629916002465>>. Acesso em: 03 out. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2016.03.003>.

HAFIZI, R.; SALLEH, B.; LATIFFAH, Z. Morphological and molecular characterization of *Fusarium solani* and *F. oxysporum* associated with crown disease of oil palm. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 44, n. 3, p. 959-968, 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3910218/>>. Acesso em: 19 nov. 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822013000300047>.

HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium**, Oxford, v. 41, p. 95 – 98, 1999. Disponível em: <<http://brownlab.mbio.ncsu.edu/jwb/papers/1999hall1.pdf>>. Acesso em: 27 set. 2018.

HALPERN, H. C. et al. First report of *Fusarium wilt* of cotton caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* race 4 in Texas, USA. **Plant Disease**, St. Paul, v. 102, n. 2, p. 446-446, 2018. Disponível em: <<https://apsjournals.apsnet.org/doi/abs/10.1094/PDIS-07-17-1084-PDN>>. Acesso em: 18 set. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1094/PDIS-07-17-1084-PDN>.

HENRIQUE, F. H.; et al. Classification of physiological races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* in common bean. **Bragantia**, Campinas, v. 74, n. 1, p. 84-92, 2015. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0006-87052015000100084>. Acesso em: 17 set. 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/1678-4499.0265>.

IBGE. **Lavoura Agrícola Municipal 2014 – Rio Grande do Sul**. Rio de Janeiro: IBGE, 2014. Disponível em: <https://ww2.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/pam/2014/default_xls.shtm> . Acesso em: 10 set. 2018.

IBRAHIM, N. F. et al. First report of *Fusarium oxysporum* and *F. solani* associated with pineapple rot in Peninsular Malaysia. **Plant Disease**, St. Paul, v. 99, n. 11, p. 1650-1650, 2015. Disponível em: <<https://apsjournals.apsnet.org/doi/full/10.1094/PDIS-02-15-0227-PDN?prevSearch=%24%7BresultBean.text%7D&searchHistoryKey=%24%7BsearchHistoryKey%7D>>. Acesso em: 06 out. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1094/PDIS-02-15-0227-PDN>.

INDEX FUNGARUM. Disponível em: <http://www.speciesfungorum.org/Names/Names.asp?strGenus=Fusarium>. Acesso em: 16 set. 2018.

KRAHN, J. R. T. **Microbiota do solo em três sistemas de cultivo de citros e patogenicidade de *Fusarium* spp.** 2017. 82 p. Dissertação (Mestrado em agronomia) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2017.

KRISTENSEN, R. et al. Phylogeny and toxigenic potential is correlated in *Fusarium* species as revealed by partial translation elongation factor 1 alpha gene sequences. **Mycology**. London, v. 109, n. 2, p. 173–186, 2005. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0953756208613945>>. Acesso em: 18 set. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0953756204002114>.

KURAMAE, E. E.; SOUZA, N. L. Variabilidade genética entre formaes speciales de *Fusarium oxysporum* e raças 1 e 2 de *F. oxysporum* f. sp. lycopersici através de RAPD e sequências de regiões ITS e rDNA. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 24, p. 1481-1485. 2002. Disponível em: <<http://periodicos.uem.br/ojs/index.php/ActaSciAgron/article/view/2409>>. Acesso em: 15 set. 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.4025/actasciagron.v24i0.2409>.

KUHNEM JÚNIOR, P. R. et al. Características patogênicas de isolados do complexo *Fusarium graminearum* e de *Fusarium verticillioides* em sementes e plântulas de milho. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 43, n. 4, p. 583-588, 2013. Disponível em: <<https://www.redalyc.org/pdf/331/33125776009.pdf>>. Acesso em: 05 out. 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782013000400004>.

LACERDA, M.; LORENZI, H. **Frutas brasileiras e exóticas cultivadas: de consumo in natura**. 1. ed. São Paulo: Nova Cultura, 2006. 640 p.

LAZAROTTO, M. et al. First report of *Fusarium equiseti* associated on pecan (*Carya illinoensis*) seeds in Brazil. **Plant Disease**, St. Paul, v. 98, n. 6, p. 847-847, 2014. Disponível em: <<https://apsjournals.apsnet.org/doi/abs/10.1094/PDIS-09-13-0976-PDN>>. Acesso em: 03 out. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-13-0976-PDN>.

LAZAROTTO, M et al. Identification and characterization of pathogenic *Pestalotiopsis* species to pecan tree in Brazil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 49, n. 6, p. 440-448, 2014. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-204X2014000600440&script=sci_arttext&lng=pt>. Acesso em: 10 set. 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2014000600005>

LAZAROTTO, M. et al. Morphological and molecular characterization of *Fusarium* spp. pathogenic to pecan tree in Brazil. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 13, n. 4, p. 9390-9402, 2014. Disponível em: <<https://sci-hub.tw/10me.4238/2014.November.11.5>>. Acesso em: 13 set. 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.4238/2014>.

LESLIE, J. F.; SUMMERELL, B. A. **The *Fusarium* laboratory manual**. 1. ed. Iowa: Blackwell Pub, 2006. p. 388.

LIBERATO, J. R.; COSTA, H. Doenças fúngicas, bacterianas e fitonematóides. In: BRUCKNER, C. H.; PICANÇO, M. C. (Eds.). **Maracujá: tecnologia de produção, pós-colheita, agroindústria, mercado**. 1. ed. Porto Alegre: Cinco continentes, 2001. p.243-245.

LOMBARDI, A. P. Z. **Caracterização patogênica, morfológica, fisiológica, molecular e sensibilidade a fungicida de *Cercospora coffeicola***. 2002. 125 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia)-Faculdade de Ciências Agrônomicas da UNESP, Botucatu, 2002.

Murcha Bacteriana ou Murchadeira – Uma inimiga do Tomateiro em climas quentes., Brasília: Embrapa, 2009.

LÜDDERS, P. Pekannuss (*Carya illinoensis*)—Botanik, Anbau und Verwendung einer subtropischen Obstart mit Zukunft. **Erwerbs-Obstbau**, [S. L.], v. 46, p. 52–58, 2004. Disponível em: < <http://link.springer.com/article/10.1007/s10341-004-0022-5>>. Acesso em: 09 set. 2018. DOI: 10.1007/s10341-004-0022-5.

MACIEL, C. G. et al. *Fusarium oxysporum* and *F. verticillioides* associated with damping-off in *Pinus* spp. **Revista Ciência Agrônômica**, Fortaleza, v. 48, n. 1, p. 134-141, 2017. Disponível em: < <http://www.scielo.br/pdf/rca/v48n1/1806-6690-rca-48-01-0134.pdf>>. Acesso em: 19 set. 2018. DOI: 10.5935/1806-6690.20170015.

MACIEL, C. G. ***Fusarium sambucinum* associado a sementes de *Pinus elliottii*: patogenicidade, morfologia, filogenia molecular e controle**. 2012. 93f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria – RS, 2012.

MAFIA, R. G. et al. Murcha-bacteriana: disseminação do patógeno e efeitos da doença sobre a clonagem do eucalipto. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 36, n. 4, 2012. Disponível em: < <http://www.redalyc.org/html/488/48824769002/>>. Acesso em: 12 set. 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-67622012000400002>.

MARCHIORI, J. N. C. **Dendrologia das angiospermas: das magnoliáceas às flacurtiáceas**. 1. ed. Santa Maria: Editora da UFSM, 1997. 271 p.

MARIN, M. et al. Relationships of *Ceratocystis fimbriata* isolates from Colombian Coffee-Growing regions based on molecular data and pathogenicity. **Journal of Phytopathology**, Bari, v. 151, n. 7-8, p. 395-405, 2003. Disponível em: < <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1046/j.1439-0434.2003.00738.x>>. Acesso em: 15 de set. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1439-0434.2003.00738.x>.

MASSOLA JÚNIOR, N. S.; KRUGNER, T. L. Fungos Fitopatogênicos. In: Amorim, L.; Rezende, J. A. M.; Bergamin Filho, A. **Manual de Fitopatologia volume I - Princípios e Conceitos**., 4. ed. São Paulo: Ceres, 2011. p. 149-206.

MATOS, K. S. et al. Inflorescence oversprouting and vascular and rachis necrosis caused by *fusarium decemcellulare* in *anacardium occidentale* in Brazil. **Plant disease**, St. Paul, v. 100, n. 8, p. 1781-1781, 2016. Disponível em: < <https://apsjournals.apsnet.org/doi/full/10.1094/PDIS-01-16-0015-PDN?prevSearch=%24%7BresultBean.text%7D&searchHistoryKey=%24%7BsearchHistoryKey%7D>>. Acesso em: 16 set. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1094/PDIS-01-16-0015-PDN>.

MEHMOOD, N. et al. First report of *Fusarium solani* causing fruit rot of strawberry in Pakistan. **Plant Disease**, St. Paul, v. 101, n. 9, p. 1681-1681, 2017. Disponível em: <

<https://apsjournals.apsnet.org/doi/full/10.1094/PDIS-12-16-1825-PDN?prevSearch=%24%7BresultBean.text%7D&searchHistoryKey=%24%7BsearchHistoryKey%7D>>. Acesso em: 06 out. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1094/PDIS-12-16-1825-PDN>.

MENEZES, J. P. **Caracterização populacional e molecular, e seleção de *Trichoderma* spp. para biocontrole de *Fusarium* sp. em crisântemo.** 2007. 111 f. Tese (Doutorado em agronomia)-Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2007.

MEZZOMO, R. et al. The morphological and molecular characterization of *Fusarium* spp. Pathogenic to *ilex paraguariensis*. **Cerne**, Lavras, v. 24, n. 3, p. 209-218, 2018. Disponível em: < <http://cerne.ufla.br/site/index.php/CERNE/article/view/1851/1082>>. Acesso em: 18 set. 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/01047760201824032535>.

MIRANDA, B. E. C. et al. Fontes de resistência em acessos de *Solanum* (secção Lycopersicon) a *Verticillium dahliae* raças 1 e 2. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 4, p. 458-465, 2010. Disponível em: < <http://www.scielo.br/pdf/hb/v28n4/14.pdf>>. Acesso em: 13 set. 2018.

MOKOCHINSKI, F.M. **Estimativa de produção, caracterização física e perfil químico de amêndoas de nogueira-pecã.** 2015. 67 f. Dissertação (Mestrado em agronomia) – Universidade Estadual do Centro Oeste, UNICENTRO, Guarapuava – PR, 2015.

MOREIRA, S. I. et al. Postharvest Ginger Rhizome Rot Caused by *Fusarium verticillioides* in Brazil. **Plant Disease**, St. Paul, v. 99, n. 8, p. 1177-1177, 2015. Disponível em: < <https://apsjournals.apsnet.org/doi/full/10.1094/PDIS-10-14-1095-PDN?prevSearch=%24%7BresultBean.text%7D&searchHistoryKey=%24%7BsearchHistoryKey%7D>>. Acesso em: 06 out. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-14-1095-PDN>.

Munsell Soil Color Charts (2009). Macbeth Division of Kollinorgen Instruments Corporation. NELSON, P. E. History of *Fusarium* systematics. **Phytopathology**, East Lansing, v.81, p. 1045-1048, 1991.

NELSON P. E.; TOUSSOUN T. A.; COOK R. J. ***Fusarium*: Diseases, Biology, and Taxonomy.** 1. ed. Pennsylvania: Pennsylvania State University Press, 1981. 474 p.

NELSON, E. B. Exudate molecules initiating fungal responses to seeds and roots. **Plant and Soil**, [S. L.], v. 129, n. 1, p. 61-73, 1990. Disponível em: < <https://link.springer.com/article/10.1007/BF00011692>>. Acesso em: 01 out. 2018. DOI: 10.1007/BF00011692.

NELSON, P. E.; DIGNANI, M. C.; ANAISSIE, E. J. Taxonomy, biology and clinical aspects of *Fusarium* species. **Clinical Microbiology Reviews**, [S. L.], v.7, n.4, p.479-504, 1994. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC358338/>>. Acesso em: 12 set. 2018. DOI: 10.1128/CMR.7.4.479.

NELSON, P. E. et al. ***Fusarium* species, an illustrated manual for identification.** 1. ed. University Park: Pennsylvania State University Press, 1983. 193p.

NOZAKI, M. H.; CAMARGO, M. E.; BARRETO, M. Caracterização de *Diaporthe citri* em diferentes meios de cultura, condições de temperatura e luminosidade. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 1, p. 429-432, 2004. Disponível em: <

http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-41582004000400012&script=sci_abstract. Acesso em: 06 out. 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-41582004000400012>.

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**, [S. L.], v.7, n. 1, p. 103-116, 1997. Disponível em: <<https://sci-hub.tw/https://doi.org/10.1006/mpev.1996.0376>>. Acesso em: 17 set. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1006/mpev.1996.0376>.

O'DONNELL, K. et al. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: Concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. **Proceedings of the National Academy Science**, Washington, v. 95, p. 2044-2049, 1998. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC19243/>>. Acesso em: 17 set. 2018.

O'DONNELL, K. Progress towards a phylogenetic classification of *Fusarium*. **Sydowia**, Horn, v.48, p. 57-70, 1996. Disponível em: <https://www.zobodat.at/pdf/Sydowia_48_0057-0070.pdf>. Acesso em: 14 set. 2018.

OLIVEIRA, I. et al. Aplicação de métodos moleculares na avaliação da diversidade de fungos entomopatogênicos da traça da oliveira. Curso Análise Genética e Molecular - Escola Superior Agrária do Instituto Politécnica de Bragança: Aplicação nas áreas medicinal, forense, ambiental, agronômica, animal e alimentar – **Resumo das comunicações**: Bragança, 2011, 27 p.

OLIVEIRA, M. L.; LUZ, E.D.M.N. Principais doenças do cacaueteiro e seu manejo. In: Valle, R.R.M. **Ciência, tecnologia e manejo do cacaueteiro**. 2. ed. Brasília, DF: Ceplac/Cepec, 2012. p.187-275.

OLIVEIRA, V. C; COSTA, J. L. S. Análise de restrição de DNA ribossomal amplificado (ARDRA) pode diferenciar *Fusarium solani* f.sp. *phaseoli* de *F. solani* f.sp. *glycines*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, p. 631-634, 2002. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S010041582002000600013&script=sci_abstract&tlng=t>. Acesso em: 13 set. 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-41582002000600013>.

ORTIZ, E. R. N.; CAMARGO, L. E. A. Doenças da Nogueira Pecan. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A.; REZENDE, J. A. M. (Eds.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. cap. 57, p. 501-505.

PANDEY, A. et al. First report of *Fusarium solani* causing wilt of *Melia dubia*. **Forest Pathology**, [S. L.], v. 48, n. 1, p. 12398, 2017. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/efp.12398>>. Acesso em: 03 out. 2018. DOI: 10.1111/efp.12398. DOI: <https://doi.org/10.1111/efp.12398>.

PASTRANA, A. M. et al. *Fusarium oxysporum* f. sp. *mori*, a new *forma specialis* causing Fusarium wilt of blackberry. **Plant Disease**, St. Paul. v. 101, n. 12, 2017. Disponível em: <https://apsjournals.apsnet.org/doi/abs/10.1094/PDIS-03-17-0428-RE>. Acesso em: 18 set. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-17-0428-RE>.

PEREIRA, J. C R.; GASPAROTTO, L. **Contribuição para o reconhecimento das sigatokas negra e amarela e doenças vasculares da bananeira (*Musa spp*)**. 1. ed. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2005. 37 p.

PEGG, G.F. Biochemistry and physiology of pathogenesis. In: MACE M.E; BELL, A. A.; BECKMAN, C. H. **Fungal Wilt Diseases of Plants**. 1 ed. New York: Academic Press, 1981, p.193- 253.

PINHEIRO, G. S. et al. Identificação e modelagem do risco de fatores químicos e físicos à incidência da fusariose do maracujazeiro na Bahia. **Revista Brasileira de Geografia Física**, Recife, v. 9, n. 4, p. 1168-1182, 2016. Disponível em: <<https://periodicos.ufpe.br/revistas/rbgfe/article/view/233780/27323>>. Acesso em: 15 set. 2018.

PINHEIRO, M.R.R. **Estudo de variabilidade genética de *Aspergillus flavus* com base para o desenvolvimento de PCR multiplex para detecção de fungos produtores de aflatoxinas em castanha-do-brasil e castanha-de-caju**. 2004. 149 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Genômicas e Biotecnologia) – Universidade Católica de Brasília, Brasília, 2004.

PIVETA, G. et al. *Ceratocystis fimbriata* kiwi (*Actinidia deliciosa*) in southern Brazil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 35, n. 2, p. 665-669, 2013. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbf/v35n2/40.pdf>>. Acesso em: 08 set. 2018.

PLOETZ, R. et al. Tropical race 4 of Panama disease in the Middle East. **Phytoparasitica**, v. 43, p. 283-293, 2015. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s12600-015-0470-5>>. Acesso em: 15 set. 2018.

POLETTI, T. et al. First report of stem canker caused by *Lasiodyplodia subglobosa* on *Carya illinoensis*. **Plant Disease**, St. Paul, v. 100, p. 1016-1016, 2016. Disponível em: <<http://apsjournals.apsnet.org/doi/abs/10.1094/PDIS-08-15-0948-PDN>>. Acesso em: 08 set. 2018. DOI: 10.1094/PDIS-08-15-0948-PDN.

POLETTI, I. et al. 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 Taquarí, RS. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 16, n. 1, p. 1-10, 2006. Disponível em: <<https://periodicos.ufsm.br/cienciaflorestal/article/view/1882>>. Acesso em: 18 set. 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.5902/198050981882>

POLETTI, T. et al. Fungos associados às flores e frutos da noqueira-pecã (*Carya illinoensis*). **Revista de Ciências Ambientais**, Canoas, v. 8, n. 1, p. 05-13, 2014. Disponível em: <<https://www.revistas.unilasalle.edu.br/index.php/Rbca/article/view/1384/1129>>. Acesso em: 15 set. 2018. DOI: 10.18316/1384.

POLETTI, T. et al. Métodos de superação de dormência da semente de noqueira pecã *Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 39, n. 6, 2015. Disponível em: <<http://www.redalyc.org/html/488/48843584014/>>. Acesso em: 18 set. 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/0100-67622015000600014>.

RAMDIAL, H.; HOSEIN, F.; RAMPERSAD, S. N. First report of *Fusarium incarnatum* associated with fruit disease of bell peppers in Trinidad. **Plant Disease**, St. Paul, v. 100, n. 2, p. 526, 2016. Disponível em: <<https://apsjournals.apsnet.org/doi/full/10.1094/PDIS-05-15-0550-PDN>>. Acesso em: 05 out. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-15-0550-PDN>.

RASEIRA, A. A cultura da Nogueira pecã (*Carya illinoensis*). **EMBRAPA**, Pelotas, n. 63, p. 3, abr. 1990. Comunicado técnico. Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/743219/1/Digitalizar0023.pdf>>. Acesso em: 09 set. 2018.

REIGER, M. **Pecan - *Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch.** Georgia: University of Georgia, 2004. Disponível em: <<http://www.uga.edu/fruit%20pecan.htm>>. Acesso em: 10 set. 2018.

RODRIGUES, R.; PARADELA FILHO, O.; RIBEIRO, I. J. A. Caracterização morfológica e patológica da *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.). Griffon & Maubl., agente causal das podridões do tronco e raízes da videira. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 01, p. 300-302, 2004.

SANOGO, S.; ZHANG, J. Resistance sources, resistance screening techniques and disease management for *Fusarium* wilt in cotton. **Euphytica**, Wageningen, v. 207, n. 2, p. 255-271, 2015. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s10681-015-1532-y>>. Acesso em: 03 out. 2018. DOI: 10.1007/s10681-015-1532-y.

SANTOS, A. F.; FERREIRA, F. A. Murcha de *Ceratocystis* em acácia-negra no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 325, 2003. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/0D/fb/v28n3/a20v28n3.pdf>>. Acesso em: 15 set. 2018.

SEIFERT, K. A.; LEVESQUE, C. A. Phylogeny and molecular diagnosis of mycotoxigenic fungi. **European Journal of Plant Pathology**, [S. L.], v.110, p. 449-471, 2004. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1023/B:EJPP.0000032385.41877.7a>>. Acesso em: 17 set. 2018. DOI: 10.1023/B:EJPP.0000032385.41877.7a.

SILVA, F. B. da et al. Isolamento e seleção de *Trichoderma* spp. antagonistas à *Pestalotiopsis clavispora*, patógeno da nogueira-pecã. **Revista Brasileira de Agroecologia**, Porto Alegre, v. 8, n. 3, 2013. Disponível em: <<http://www.aba-agroecologia.org.br/revistas/index.php/rbagroecologia/article/view/13249/9904>>. Acesso em: 11 set. 2018.

SILVA, F P. da; VECHIATO, M; HARAKAVA, R. EF-1 α gene and IGS rDNA sequencing of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectrum* and *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* reveals polyphyletic origin n of strains. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 39, n. 1, p. 64-73, 2014. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1982-56762014000100008>. Acesso em: 17 set. 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S1982-56762014000100008>.

SILVA, S. O. et al. Avaliação de genótipos tetraploides de bananeira cultivados em área infestada pelo agente causal do mal-do-panamá. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 33, n.1, p. 137-143, 2011. Disponível em: <

<http://www.scielo.br/pdf/rbf/2011nahead/aop01511.pdf>>. Acesso em: 16 set. 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-29452011005000029>.

SILVA, T. W. R. da et al. Detection methods, transmission and pathogenicity of *Fusarium* spp. in *Pinus taeda* seeds. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 27, n. 1, p. 73-84, 2017. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1980-50982017000100073&script=sci_arttext&tlng=pt>. Acesso em: 04 out. 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.5902/1980509826448>.

SMITH, A. F. **The Pecan: A Culinary History**. Prepared for the National Pecan Shellers Association Meeting Charleston. 2012. Disponível em: <http://andrewsmith.com/wp-content/themes/wooden-mannequin/pdf/PecanHistory.pdf>. Acesso em: 09 set. 2018.

SPOLTI, P. et al. Phenotypic and pathogenic traits of two species of the *Fusarium graminearum* complex possessing either 15-ADON or NIV genotype. **European Journal of Plant Pathology**, [S.I.], v. 133, p. 621-629, 2012. Disponível em: < <https://sci-hub.tw/10.1007/s10658-012-9940-5>>. Acesso em: 5 out. 2018. DOI: 10.1007/s10658-012-9940-5.

STOVER, R. **Fusarial wilt (Panama Disease) of bananas and other Musa species**. Kew: Commonwealth Mycological Institute, 1962. 122 p

SUMMERELL, B. A.; SALLEH, B.; LESLIE, J.F. A utilitarian approach to *Fusarium* identification. **Plant Disease**, St. Paul, v. 87, n. 2, p. 117-128, 2003. Disponível em: <<https://apsjournals.apsnet.org/doi/pdf/10.1094/PDIS.2003.87.2.117>>. Acesso em: 14 set. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1094/PDIS.2003.87.2.117>.

SUMMERELL B. A. Biogeography and phylogeography of *Fusarium*: a review. **Fungal Diversity**, Chiang Mai, v. 44, n. 1, p. 3–13, 2010. Disponível em: < <https://link.springer.com/article/10.1007/s13225-010-0060-2>>. Acesso em: 16 set. 2018. DOI:10.1007/s13225-010-0060-2.

TAMURA, K. et. al. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v. 24, p.1596-1599, 2007. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17488738>>. Acesso em 27 set. 2018. DOI: 10.1093/molbev/msm092.

TAYLOR, A. et al. First report of *Fusarium oxysporum* causing a vascular wilt of statice (*Limonium sinuatum*) in the UK. **Plant Disease**, St. Paul, v. 101, n. 6, p. 1040-1040, 2017. Disponível em: < <https://apsjournals.apsnet.org/doi/full/10.1094/PDIS-09-16-1380-PDN?prevSearch=%24%7BresultBean.text%7D&searchHistoryKey=%24%7BsearchHistoryKey%7D>>. Acesso em: 06 out. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-16-1380-PDN>

TEIXEIRA, L. M. **Caracterização de isolados de *Fusarium oxysporum* e resistência de genótipos de Passiflora à fusariose**. 2015. 43 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2015.

- TOZZE JÚNIOR, H. J.; MELLO, M. B. A; MASSOLA JÚNIOR, N S. Caracterização morfológica e fisiológica de isolados de *Colletotrichum* sp. causadores de antracnose em solanáceas. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 32, n. 1, p. 71-79, 2006. Disponível em: < <http://www.scielo.br/pdf/sp/v32n1/v32n1a11>>. Acesso em: 08 set. 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-54052006000100011>.
- UENO, B.; COSTA, H. Doenças causadas por fungos e bactérias. In: ANTUNES, L. E. C.; REISSER JUNIOR, C.; SCHWENGBER, J. E. (Org.) **Cultivo do morangueiro**. Brasília: Embrapa, 2016. Cap. 17.
- VARTIVARIAN, S. E.; ANAISSIE, E. J.; BODEY, G. P. Emerging fungal pathogens in immunocompromised patients: classification, diagnosis, and management. **Clinical infectious diseases**, [S. L.], v. 17, n. Supplement_2, p. S487-S491, 1993. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8274615>>. Acesso em: 19 nov. 2018. DOI: https://doi.org/10.1093/clinids/17.Supplement_2.S487.
- VAN DER PLANK, J. E. **Plant disease: epidemic and control**. Academic Press, New York, London. 1963. 249 p.
- VELARDE-FÉLIX, S. et al. Occurrence of *Fusarium oxysporum* causing wilt on pepper in Mexico. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ottawa, v. 40, n. 2, p. 238-247, 2018. Disponível em: < <http://sci-hub.tw/https://doi.org/10.1080/07060661.2017.1420693>>. Acesso em: 03 out. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1080/07060661.2017.1420693>.
- VENKATACHALAM, M. **Chemical Composition of Select Pecan [*Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch.] Varieties and Antigenic Stability of Pecan Proteins**. 2004. 90 f. Tese (Doutorado em Fisiologia) - Universidade do Estado da Florida, Florida, 2004.
- VILLARREAL-LOZOYA, J. E.; LOMBARDINI, L.; ZEVALLOS, L.C. Phytochemical constituents and antioxidant capacity of different pecan [*Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch] cultivars. **Food Chemistry**, Texas, v. 102, n. 4, July 2007. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814606005796%20L>>. Acesso em: 10 set. 2018. DOI: 10.1016/j.foodchem.2006.07.024.
- WALKER, C. et al. Caracterização morfológica, molecular e patogenicidade de *Fusarium acuminatum* e *Fusarium verticillioides* a *Cordia americana*. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 26, n. 2, p. 463-473, 2016. Disponível em: < <https://periodicos.ufsm.br/cienciaflorestal/article/view/22747>>. Acesso em: 05 out. 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.5902/1980509822747>.
- WALKER, C. et al. First report of species in the *Cladosporium cladosporioides* complex causing pecan leaf spot in Brazil. **Journal of Plant Pathology**, Bari, v. 98, n. 12, 2016. Disponível em: < <http://www.sipav.org/main/jpp/index.php/jpp/article/view/3514>>. Acesso em: 08 set. 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.4454/JPP.V98I2.012>.
- WELLS, L. **Southeastern pecan growers' handbook**. Georgia: University of Georgia, 2013. 236 p.
- WHEELER, T.; RUSH, C.M. Soilborne diseases. In: Maloy, O.C.; Murray, T.D. **Encyclopedia of Plant Pathology**. 1. Ed. New York: JohnWiley & Sons. 2001. p.935-947.

YANG, L. Y. et al. First Report of Vine Wilt Disease Caused by *Fusarium solani* on Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis*) in China. **Plant Disease**, St. Paul, v. 101, n. 9, p. 1675-1675, 2017. Disponível em: < <https://apsjournals.apsnet.org/doi/full/10.1094/PDIS-04-17-0473-PDN?prevSearch=%24%7BresultBean.text%7D&searchHistoryKey=%24%7BsearchHistoryKey%7D>>. Acesso em: 20 nov. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1094/PDIS-04-17-0473-PDN>.

ZACCARO, R. P. et al. Utilização de marcador molecular SCAR na identificação de *Fusarium subglutinans*, agente causal da malformação da mangueira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 29, n. 3, p. 563-570, 2007. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-29452007000300029>. Acesso em: 15 set. 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-29452007000300029>.