

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

Tales Poletto

***Sirosporium diffusum* ASSOCIADO À NOGUEIRA-PECÃ:
PATOGENICIDADE, MORFOFISIOLOGIA, FILOGENIA E ESCALA
DIAGRAMÁTICA**

Santa Maria, RS
2018

Tales Poletto

***Sirosporium diffusum* ASSOCIADO À NOGUEIRA-PECÃ: PATOGENICIDADE,
MORFOFISIOLOGIA, FILOGENIA E ESCALA DIAGRAMÁTICA**

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**

Orientador: Prof^a Dr^a. Marlove Fátima Brião Muniz

Santa Maria, RS

2018

Poletto, Tales

Sirosporium diffusum ASSOCIADO À NOGUEIRA-PECÃ:
PATOGENICIDADE, MORFOFISIOLOGIA, FILOGENIA E ESCALA
DIAGRAMÁTICA / Tales Poletto.- 2018.

96 p.; 30 cm

Orientadora: Marlove Fátima Brião Muniz
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós
Graduação em Engenharia Florestal, RS, 2018

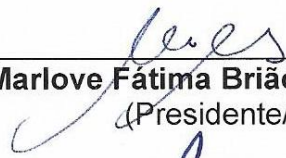
1. *Carya illinoensis* 2. Mancha foliar marrom 3.
Sequenciamento I. Brião Muniz, Marlove Fátima II. Título.

Tales Poletto

***Sirosporium diffusum* ASSOCIADO À NOGUEIRA-PECÃ:
PATOGENICIDADE, MORFOFISIOLOGIA, FILOGENIA E ESCALA
DIAGRAMÁTICA**

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**

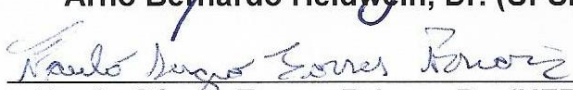
Aprovado em 27 de fevereiro de 2018:



Marlove Fátima Brião Muniz, Dr^a. (UFSM)
(Presidente/Orientador)



Arno Bernardo Heldwein, Dr. (UFSM)



Paulo Sérgio Torres Brioso, Dr. (UFRRJ)

Santa Maria, RS

2018

DEDICATÓRIA

*À minha família, pelo estímulo e
apoio e, aos amigos, que
colaboraram na
realização deste trabalho.*

Dedico...

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Santa Maria, pelos 8 anos de muito aprendizado, de forma gratuita e qualificada que, através do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal da UFSM, possibilitou a realização desse trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo auxílio financeiro através da concessão da bolsa de mestrado.

À Professora Dr^a. Marlove Fátima Brião Muniz, pela orientação, disponibilidade, ensinamentos, compreensão, amizade, apoio prestado e por todas as oportunidades que me viabilizou. Professora Marlove, muito obrigado!

À Professora Lia Rejane Reiniger, pela co-orientação, ensinamentos, amizade e disponibilidade sempre que solicitada.

À banca examinadora, constituída pelo Prof. Arno Bernardo Heldwein e Prof. Paulo Sergio Torres Briosso pelas considerações e contribuições prestadas a este trabalho.

À Prof. Elena Blume, pela ajuda prestada, ensinamentos, atenção e amizade nesta trajetória acadêmica.

*Aos professores Ricardo Harakava e Uwe Braun, ao pesquisador Ewald Groenewald e a doutoranda Sandra Isabel Rodrigues Videira pela ajuda na identificação morfológica e molecular do *Sirosporium*.*

Meu agradecimento especial a meus pais Ivonir e Maria e meu irmão Igor, que sempre me apoiaram e estão sempre ao meu lado.

Aos amigos do Laboratório de Fitopatologia, Adriana Falcão Dutra, Vinícius Spolaor Fantinel, Lucas Savian, Jéssica Emília Rabuske, Jéssica Mengue Rolim, Clair Walker, Hélen Cristine Setim, Janaina Sarzi, Caciara Gonzatto Maciel, Ricardo Mezzomo, Pâmela Oruoski, Márcia Gabriel, Renata Fontana Favaretto, Vanessa Alba, Laís da Silva Martello e, em especial, a Técnica Administrativa Maria Neves Deconto Weber pela amizade, apoio, compreensão e ajuda prestada.

Agradeço a todas aquelas pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho. Muito obrigado!

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal
Universidade Federal de Santa Maria

***Sirosporium diffusum* ASSOCIADO À NOGUEIRA-PECÃ: PATOGENICIDADE, MORFOFISIOLOGIA, FILOGENIA E ESCALA DIAGRAMÁTICA**

AUTOR: TALES POLETTTO

ORIENTADORA: MARLOVE FÁTIMA BRIÃO MUNIZ

LOCAL DA DEFESA E DATA: Santa Maria, 27 de fevereiro de 2018.

A cultura da noqueira-pecã [*Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch], família Juglandaceae, tem importância econômica no sul do Brasil e o cultivo cresce expressivamente a cada ano. Por conseguinte, o aumento da área plantada tem desencadeado frequentes epidemias, principalmente de doenças fúngicas, as quais são favorecidas pelo clima úmido e acúmulo de hospedeiros suscetíveis. Recentemente, uma nova doença foi diagnosticada e relatada nos plantios brasileiros [(POLETTTO et al., 2017), <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-16-0820-PDN>], a qual é causada pelo fungo *Sirosporium diffusum*. A doença causa desfolha das plantas, prejudicando a produção de frutos. Diante dessa observação, o objetivo deste trabalho foi avaliar a patogenicidade de isolados de *Sirosporium* sp. associados a mancha foliar marrom da noqueira-pecã, caracterizá-los morfológica, fisiológica e molecularmente, bem como, desenvolver uma escala diagramática para avaliar esta doença em estudos epidemiológicos. Para tanto, foram realizadas coletas de folhas sintomáticas em 10 pomares de noqueira-pecã, no estado do Rio Grande do Sul. Após a obtenção de 10 isolados do patógeno, um teste de patogenicidade foi conduzido para a avaliação da incidência e virulência do patógeno. Os isolados também foram caracterizados morfolologicamente, sendo as variáveis utilizadas na análise UPGMA (Método de Agrupamento da Distância Média) em que os isolados foram agrupados em um dendrograma de acordo com a dissimilaridade morfológica e estabelecidos os caracteres que mais contribuíram para a divergência. A análise molecular foi realizada através da amplificação e sequenciamento das regiões ITS e *tef1- α* do DNA. Para a caracterização fisiológica, num primeiro ensaio, combinaram-se oito meios de cultura e cinco regimes de luz, enquanto que no segundo, os três melhores tratamentos do ensaio anterior, que conferiram maior esporulação, foram combinados com três temperaturas. Para a elaboração da escala diagramática foram coletados 240 folíolos sintomáticos, a partir dos quais obteve-se a severidade real da doença em termos percentuais. Para a construção da escala, utilizaram-se os limites observados de severidade mínima e máxima da doença, mais seis níveis intermediários. A validação foi realizada por oito avaliadores, primeiramente sem o uso da escala e, na sequência, utilizando-a. Os resultados mostraram através do teste de patogenicidade, que todos os isolados foram patogênicos e a incidência foi de 100% para maioria deles. No entanto, houve diferenças na capacidade de virulência. A análise filogenética confirmou *Sirosporium diffusum* como o agente causador da mancha foliar marrom em *C. illinoensis* no Brasil. O sequenciamento da região ITS e do gene *tef1- α* foram eficazes para a identificação do fungo como *S. diffusum*. As melhores condições artificiais de cultivo em que *S. diffusum* apresenta bom crescimento micelial e esporulação de forma conjunta foi obtida com fotoperíodo de 24 horas, temperatura de $20 \pm 1^\circ\text{C}$ e com os meios de cultura V8CaCO₃ ou CA. A escala diagramática proposta para avaliação de mancha foliar marrom em *C. illinoensis* proporciona boa acurácia, precisão e reprodutibilidade das estimativas aos avaliadores, além de ser de fácil utilização, sendo adequada para estudos epidemiológicos da doença.

Palavras-chave: *Carya illinoensis*; mancha foliar marrom; sequenciamento

ABSTRACT

Master's Thesis
Graduate Program in Forest Engineering
Federal University of Santa Maria

***Sirosporium diffusum* ASSOCIATED TO PECAN: PATHOGENICITY, MORPHOPHYSIOLOGY, PHYLOGENY AND DIAGRAMATIC SCALE**

AUTHOR: TALES POLETTTO

ADVISOR: MARLOVE FÁTIMA BRIÃO MUNIZ

DATE AND PLACE OF THE DEFENSE: February, 27th, 2018, Santa Maria.

The culture of the pecan [*Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch], family *Juglandaceae*, have economic importance in southern Brazil and cultivation grows rapidly. Consequently, the increase of planted area has triggered frequent epidemics, mainly of fungal diseases, which are favored by the climate and the accumulation of susceptible hosts. Recently, a new disease was diagnosed and reported in Brazilian plantations [(POLETTTO et al., 2017), <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-16-0820-PDN>], which is caused by fungi *Sirosporium diffusum*. The disease causes defoliation of the plants, reducing the production of fruits. In view of this observation, the objective of this work was to evaluate the pathogenicity of isolates of *Sirosporium* sp. associated with brown leaf spot of the pecan, characterize them morphological, physiological, and molecular, as well as to develop a disease diagrammatic scale for epidemiological studies. For that, samples of symptomatic leaves were collected in 10 pecan orchards, in the state of Rio Grande do Sul. After obtaining the 10 isolates of the pathogen, a pathogenicity test was conducted for the evaluation of the incidence and virulence of the pathogen, characterized morphologically and the variables used in the UPGMA (Method of grouping the mean distance) analysis in which the isolates were grouped in a dendrogram according to the morphological dissimilarity and the characters that contributed the most to the divergence were established. Molecular analysis was performed by amplifying and sequencing the ITS and *tef1- α* regions of the DNA. For physiological characterization, eight culture media and five light regimes were combined in the first assay, while in the second, the three best treatments from the first assay which conferred higher sporulation were combined with three temperatures. For the elaboration of the diagrammatic scale, 240 symptomatic leaflets were collected, from which the real severity of the disease was obtained in percentage terms. For the construction of the scale, the observed limits of minimum and maximum disease severity plus six intermediate levels were used. The validation was performed by eight evaluators, first without and, subsequently, with the use of the scale. The results showed through the pathogenicity test that all isolates were pathogenic and the incidence was 100% for most of them, with differences in the virulence capacity. The phylogenetic analysis confirmed the isolates as *Sirosporium diffusum*, the causative agent of the brown leaf spot in *C. illinoensis* in Brazil. Sequencing of the ITS region and the *tef1- α* gene were effective for identification of the fungus as *S. diffusum*. The best artificial conditions of culture in which *S. diffusum* shows good mycelial growth and sporulation together was obtained with photoperiod of 24 hour, temperature of 20 \pm 1°C and culture media V8CaCO₃ or CA. The diagrammatic scale proposed for evaluation of brown leaf spot in *C. illinoensis* provides good accuracy, precision and reproducibility of the estimates to the evaluators, besides being easy to use, and epidemiological studies of the disease are adequate.

Key words: *Carya illinoensis*; brown leaf spot; sequencing

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO I

FIRST REPORT OF *Sirosporium diffusum* CAUSING BROWN LEAF SPOT ON *Carya illinoensis* IN BRAZIL

Figure 1. A, Symptoms of *S. diffusum* on a naturally infected leaf of Barton cultivar. B, Reddish brown lesions on a naturally infected leaflet of 'Barton'. C, Colony of *S. diffusum* on carrot-agar medium. D, Mycelium of *S. diffusum* on carrot-agar (stereomicroscope, 30x). E, Leaflet after pathogenicity test (six black lesions indicating the sites of inoculation). F, Lesions of brown leaf spot nine days after inoculation. G, Conidiophores (arrow) and conidia formed in vitro. H, Conidia formed *in vitro*.....23

CAPÍTULO II

CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, FILOGENÉTICA E PATOGÊNICA DE *Sirosporium diffusum* EM *Carya illinoensis* NO BRASIL

Figura 1. A, sintomas de mancha foliar marrom causada por *Sirosporium* sp. em folíolos de *Carya illinoensis* observados em campo. B, folíolo após teste de patogenicidade (seis lesões escuras indicam os locais de inoculação). C, detalhe das lesões iniciais formadas no decorrer do teste de patogenicidade. D, colônia em meio de cultura cenoura-ágar-água (CA) com halo vermelho difuso no meio de cultura. E, conidióforo (seta) e conídio. F, conidióforo. G, conídio adulto. H, conídio jovem.....34

Figura 2. Estruturas do fungo *Sirosporium* sp. visualizadas em Microscopia Eletrônica de Varredura, cultivadas em meio cenoura - ágar - água (CA). A e C, conidióforo e conídios; B, cicatriz do conídio no conidióforo e constrição nos septos dos conídios; D, (seta) conídio jovem e (seta pontilhada) adulto; E, conídios adultos; F, detalhe da inserção do conídio no conidióforo.....36

Figura 3. Dissimilaridade morfológica (%) entre os 10 isolados de *Sirosporium* sp. obtidos de folhas de *Carya illinoensis*. O dendrograma foi gerado através do método UPGMA, baseado na matriz de distância de Mahalanobis usando as características de crescimento micelial, IVCM, CMD, esporulação, comprimento e largura de conídio e número de septos. O valor do coeficiente de correlação cofenética (r) foi de 0,76. ...38

- Figura 4.** Árvore filogenética obtida a partir das sequências de DNA da região ITS, dos 10 isolados de *Sirosporium diffusum*, patogênicos a noqueira-pecã (*Carya illinoensis*), de acordo com o método estatístico Neighbor-joining. Os números sobre os ramos indicam a porcentagem de repetições da análise de *bootstrap* na qual as repetições foram observadas (1000 repetições).40
- Figura 5.** Árvore filogenética obtida a partir das sequências de DNA do gene *tef1- α* , dos 10 isolados de *Sirosporium diffusum*, patogênicos a noqueira-pecã (*Carya illinoensis*), de acordo com o método estatístico Neighbor-joining. Os números sobre os ramos indicam a porcentagem de repetições da análise de *bootstrap*, na qual as repetições foram observadas (1000 repetições).41

CAPÍTULO III

EFEITO DO MEIO DE CULTURA, REGIME DE LUZ E TEMPERATURA SOBRE O DESENVOLVIMENTO DE *Sirosporium diffusum*

- Figura 1.** Colônias de *Sirosporium diffusum* após 56 dias de crescimento cultivadas em diferentes meios de cultura e regimes de luz59

CAPÍTULO IV

ESCALA DIAGRAMÁTICA PARA QUANTIFICAR A SEVERIDADE DA MANCHA FOLIAR MARROM EM NOGUEIRA-PECÃ.

- Figura 1.** Proporção de folhas de noqueira-pecã (total de 240 folíolos) com diferentes severidades (% de área sintomática) de mancha foliar marrom mensuradas usando análise de imagens.72
- Figura 2.** Escala diagramática elaborada para avaliação da severidade da mancha foliar marrom em folíolos de *Carya illinoensis*. Valores em porcentagem da área foliar sintomática.72
- Figura 3.** Severidade estimada (linhas cheias) e severidade real (linha pontilhada) para mancha foliar marrom em folíolos de *Carya illinoensis*. A-H: avaliadores com escala. I-Q: sem a utilização da escala.76

Figura 4. Erros absolutos (severidade estimada menos severidade real) para oito avaliadores de mancha foliar marrom em folíolos de *Carya illinoensis*.....78

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, FILOGENÉTICA E PATOGÊNICA DE *Sirosporium diffusum* EM *Carya illinoensis* NO BRASIL

Tabela 1. Código de acesso no laboratório, no herbário SMDB e no *Genbank*, municípios e coordenadas geográficas dos isolados de *Sirosporium* sp. oriundos de folhas sintomáticas de *Carya illinoensis*.....28

Tabela 2. Escala de notas para avaliação da virulência de isolados de *Sirosporium* sp. em folíolos de *Carya illinoensis*.....29

Tabela 3. Virulência de isolados de *Sirosporium* sp. e incidência da mancha foliar marrom em folíolos de *Carya illinoensis*, cultivar Barton, após teste de patogenicidade... ..33

Tabela 4. Características morfológicas de *Sirosporium* sp. isolados de folhas de *Carya illinoensis* após 56 dias de incubação em meio CA (cenoura - ágar - água), com fotoperíodo de 24 horas, à $20 \pm 1^\circ\text{C}$37

CAPÍTULO III

EFEITO DO MEIO DE CULTURA, REGIME DE LUZ E TEMPERATURA SOBRE O DESENVOLVIMENTO DE *Sirosporium diffusum*

Tabela 1. Resumo da análise de variância para as variáveis crescimento micelial, índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) e esporulação de *Sirosporium diffusum* cultivado em diferentes meios de cultura e regimes de luz, e sua interação.....55

Tabela 2. Médias de esporulação de *Sirosporium diffusum* em função da interação entre diferentes meios de cultura e regimes de luz.. ..56

Tabela 3. Médias de crescimento micelial (mm) de *Sirosporium diffusum* em função da interação entre meios de cultura e regimes de luz.. ..57

Tabela 4. Médias de Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) de *Sirosporium diffusum* em função da interação entre meios de cultura e regimes de luz... ..58

Tabela 5. Resumo da análise de variância para as variáveis crescimento micelial, índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) e esporulação de *Sirosporium diffusum* em função de diferentes meios de cultura e temperaturas, e sua interação.....60

Tabela 6. Crescimento micelial (mm), índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) e esporulação de *Sirosporium diffusum* submetido a quatro meio de cultura e três temperaturas sob fotoperíodo contínuo.... .61

CAPÍTULO IV

ESCALA DIAGRAMÁTICA PARA QUANTIFICAR A SEVERIDADE DA MANCHA FOLIAR MARROM EM NOGUEIRA-PECÃ

Tabela 1. Coeficientes linear (*a*), angular (*b*), de determinação R^2 e erro absoluto em modulo (EA), obtidos nas regressões entre severidade real e estimada da doença, a partir de folíolos de *Carya illinoensis* apresentando sintomas de mancha foliar marrom com e sem o uso da escala diagramática.....75

Tabela 2. Coeficiente de determinação (R^2) como medida de reprodutibilidade das estimativas da mancha foliar marrom causada por *Sirosporium diffisum* em folíolos de *Carya illinoensis* entre avaliadores com e sem escala diagramática.....79

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL.....	16
2 CAPÍTULO I: FIRST REPORT OF <i>Sirosporium diffusum</i> CAUSING BROWN LEAF SPOT ON <i>Carya illinoensis</i> IN BRAZIL.....	21
2.1 REFERENCES.....	23
3 CAPÍTULO II: CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA FILOGENÉTICA E PATOGÊNICA DE <i>Sirosporium diffusum</i> EM <i>Carya illinoensis</i> NO BRASIL....	24
3.1 INTRODUÇÃO	25
3.2 MATERIAL E MÉTODOS	27
3.2.1 Obtenção dos isolados.....	27
3.2.2 Teste de patogenicidade	28
3.2.3 Análise morfológica	29
3.2.4 Microscopia Eletrônica de Varredura	30
3.2.5 Extração de DNA, reação da PCR e sequenciamento.....	31
3.3 RESULTADOS	32
3.4 DISCUSSÃO.....	42
3.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45
4. CAPÍTULO III: EFEITO DO MEIO DE CULTURA, REGIME DE LUZ E TEMPERATURA SOBRE O DESENVOLVIMENTO DE <i>Sirosporium diffusum</i>	49
4.1 INTRODUÇÃO	50
4.2 MATERIAL E MÉTODOS	52
4.2.1 Local dos experimentos	52
4.2.2 Ensaio 1: efeito do meio de cultura e regime de luz	52
4.2.3 Ensaio 2: efeito do meio de cultura e temperatura	54
4.2.4 Procedimento estatístico.....	54
4.3 RESULTADOS	55
4.3.1 Ensaio 1: efeito do meio de cultura e regime de luz	55
4.3.2 Ensaio 2: efeito do meio de cultura e temperatura	59
4.4 DISCUSSÃO	62
4.5 CONCLUSÃO.....	65
4.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
5 CAPÍTULO IV: ESCALA DIAGRAMÁTICA PARA QUANTIFICAR A SEVERIDADE DA MANCHA FOLIAR MARROM EM NOGUEIRA-PECÃ	68

5.1 INTRODUÇÃO	69
5.2 MATERIAL E MÉTODOS	71
5.3 RESULTADOS	74
5.4 DISCUSSÃO.....	79
5.5 CONCLUSÃO.....	81
5.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82
6 DISCUSSÃO GERAL	85
7 CONCLUSÕES	92
8 REFERÊNCIAS GERAIS	93

1 INTRODUÇÃO GERAL

A noqueira-pecã [*Carya Illinoensis* (Wangenheim) K. Koch], pertencente à família *Juglandaceae*, é cultivada em diversos locais do mundo, principalmente em regiões com clima temperado a subtropical. Seu cultivo é bastante expressivo em países como Estados Unidos, México, África do Sul, Uruguai, Argentina, Perú e Austrália. Os Estados Unidos e o México, de onde a espécie é nativa, são os maiores produtores mundiais de noz-pecã.

No Brasil, os plantios com maiores extensões de área plantada, encontram-se nas regiões do Vale do Taquari, Rio Pardo e Central do Estado do Rio Grande do Sul (POLETTTO et al., 2015). No ano de 2017, o Estado do Rio Grande do Sul criou o Programa Estadual de Desenvolvimento da Pecanicultura (Pró-Pecã), objetivando aumentar a área cultivada e a produção de frutos de noz-pecã, gerando emprego e renda no meio rural e incentivando as agroindústrias de beneficiamento e fornecedores de equipamentos para essa cadeia produtiva no Estado do Rio Grande do Sul (SEAPI, 2017). A cultura da noqueira-pecã está presente em pequenas propriedades rurais no Estado onde, além de diversificar a produção, é utilizada em sistemas agrossilvipastoris, sombreamentos de aviários, para fins madeireiros e ornamentais. O cultivo dessa espécie cresce a cada ano, e novos pomares estão sendo implantados, não somente no Rio Grande do Sul, mas também nos Estados de Santa Catarina e Paraná. A produção brasileira, na safra 2015 foi de 4.138,0 toneladas de noz (fruto seco) colhidas, num total de 2.319,0 hectares (IBGE, 2016).

O interesse pela produção dessa fruta se dá, principalmente, pela rentabilidade que proporciona e por suas propriedades nutricionais e medicinais (POLETTTO et al., 2015), pois é fonte de proteínas, fibras, ácidos graxos essenciais e vitaminas (TEMELLI et al., 2007). Também, é um dos alimentos com maior quantidade de compostos fenólicos entre as diferentes nozes e possui uma das maiores atividades antioxidantes (VILLARREAL-LOZOYA; LOMBARDINI; CISNEROS-ZEVALLOS, 2007). Além disso, é rica em fitoesteróis que são compostos análogos ao colesterol, os quais reduzem o colesterol sanguíneo, diminuem o risco para certos tipos de câncer e aumentam as funções imunológicas do organismo (YANG, 2009).

No entanto, da mesma forma que o cultivo cresce, aumenta a importância de estudos que contribuam para o aprimoramento das técnicas de manejo da cultura.

Os primeiros estudos científicos envolvendo a cultura da noqueira no Rio Grande do Sul e no Brasil iniciaram no Centro de Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Maria - UFSM e na Universidade Federal do Pampa - UNIPAMPA no ano de 2009. A partir de então, os estudos com a cultura envolveram produção de mudas, entomologia, genética e melhoramento, fenologia, tecnologia de alimentos e principalmente fitopatologia, envolvendo estudos com diagnose de doenças, caracterização morfológica e molecular de fitopatógenos, epidemiologia, sanidade de semente, resistência genética e metabólitos secundários de importância.

As doenças da noqueira-pecã no Brasil, até então diagnosticadas, danificam as folhas, provocam queda de frutos, cancro no tronco e podridão de raízes. Dentre elas destacam-se a mancha foliar de *Cladosporium*, causada por fungos pertencentes ao complexo *Cladosporium cladosporioides* (Fresen.) de Vries (WALKER et al., 2016). Esta doença danifica as folhas e, em casos graves, causa severa desfolha, além de atacar frutos causando mumificação e abortamento. Em outros países produtores de noz-pecã, como os Estados Unidos, esta doença é conhecida como Sarna, causada pelo fungo *Fusicladium effusum* G. Winter (fase teleomórfica), *Cladosporium caryigenum* (Ellis & Langl.) Gottwald (fase anamórfica) e é considerada a principal doença da cultura (TURECHEK; STEVENSON, 1998; JOHNSON; BLACK, 2012; BOCK et al., 2017).

A mancha foliar de *pestalotiopsis* caudada pelo fungo *Pestalotiopsis clavispora* (G. F. Atk.) Steyaert, ocorrente no Brasil, está associada a climas úmidos. Em casos graves causa desfolha intensa e, em consequência da diminuição da área fotossintética, causa perdas na produção de frutos (LAZAROTTO et al., 2012). Na China, uma doença similar, mancha preta dos frutos, causada pelo fungo *Pestalotiopsis microspora* (Speg.) Bat. & Peres foi relatada atacando a cultura, afetando negativamente o rendimento e a qualidade dos frutos (SHI et al., 2015). O cancro do tronco é uma doença de importância na cultura e foi relatada em pomares brasileiros em 2016. O fungo causador, *Lasiodiplodia subglobosa* A.R. Machado & O.L. Pereira, afeta os troncos e ramos. Os sintomas são expressos inicialmente como lesões protuberantes que aumentam de tamanho até formarem rachaduras, ocasionando a morte da planta (POLETTTO et al., 2016). Também, a podridão-de-raízes em mudas, causada por *Fusarium equiseti* (Corda) Sacc., é uma doença ocorrente em viveiros, causando prejuízos pela mortalidade de mudas (LAZAROTTO et al., 2014). Um compêndio com mais doenças que acometem a cultura da

nogueira-pecã, pode ser consultado no site da Texas AgriLife Extension Service (RHODES, 2014).

As doenças foliares são as que causam maiores perdas na produção e, neste contexto, uma nova doença, caracterizada por causar manchas foliares foi constatada em pomares do Rio Grande do Sul, tendo como agente causal o fungo *Sirosporium diffusum* (POLETTI et al., 2017), (<https://doi.org/10.1094/PDIS-06-16-0820-PDN>), Apesar deste patossistema ter sido relatado recentemente no Brasil, Crous e Braun (2003) evidenciam que o fungo *Sirosporium diffusum* ocorre associado à *Carya illinoensis* e a *Juglans regia* L. (*Juglandaceae*) nos Estados Unidos, África do Sul, Cuba, Malawi, México, Moçambique e Venezuela. Esse fungo sofreu várias mudanças taxonômicas, foi registrado pela primeira vez, em 1911, como *Clasterosporium diffusum* Heald & Wolf, depois como *Cercospora fusca* Rand, atualmente, o nome aceito é *Sirosporium diffusum* (Heald e Wolf) Deighton (ELLIS, 1976). No entanto, Videira et al. (2017), sugeriram uma nova reclassificação como *Ragnhildiana diffusa* (Heald & F.A. Wolf) Videira & Crous.

Esta doença é importante para a cultura da noqueira-pecã no sul do Brasil, pois prejudica o desenvolvimento da planta na fase de viveiro causando desfolha intensa e atraso no crescimento das mudas. Já em pomares adultos, pode provocar intensa desfolha, com redução da produtividade e qualidade dos frutos. Esses danos se intensificam, principalmente, se a cultura for conduzida em condições ambientais com temperaturas amenas, alta umidade, e em solos com deficiências nutricionais.

A escassez de informações a nível morfológico e molecular deste patógeno, bem como, os respectivos sintomas associados à cultura, tem gerado insegurança e dificuldades no manejo fitossanitário dos pomares. Dhingra e Sinclair (1995) salientam que o estudo de um fitopatógeno requer o seu cultivo em condições que proporcionem bom desenvolvimento, para assim proceder estudos subsequentes de taxonomia e/ou genéticos.

A análise dos caracteres morfológicos é uma ferramenta importante em estudos envolvendo caracterização de espécies fúngicas, no entanto, podem apresentar instabilidade dependendo das condições de cultivo a que são submetidos, induzindo a erros na identificação, como ocorre para as espécies *Acremonium strictum* W. Gams e *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg (TEIXEIRA; VIEIRA; MACHADO, 2004). Lanfranco et al. (2001) destacam que é

importante realizar análise de caracteres morfológicos conjuntamente com dados moleculares para identificação de espécies fúngicas.

A biologia molecular é uma ferramenta importante na identificação das espécies fúngicas, principalmente àquelas consideradas patogênicas. As informações genótípicas contidas no DNA possibilitam detectar indivíduos e suas diferenças que, muitas vezes, são causadas por alterações de um único par de bases, tendo aplicações imediatas na identificação e caracterização de linhagens e genótipos (SOUTO; TESSMAN; NUNES, 2000). Além disso, a análise do DNA facilita a caracterização e a diagnose rápida de patógenos, com uma sensibilidade e especificidade maior que a identificação por taxonomia clássica (MAGNANI et al., 2005).

Não somente identificar corretamente o patógeno é essencial em patossistemas importantes, também conhecer as condições ótimas de crescimento e esporulação *in vitro* é fundamental para o desenvolvimento de estudos posteriores, sejam eles relacionados à resistência genética de hospedeiros, inoculações artificiais e classificação taxonômica, pois esses estudos demandam material biológico inoculante puro e em quantidade suficiente. Apesar da importância desse patógeno, não foram encontrados na literatura, estudos sobre as condições físicas adequadas para o seu crescimento e desenvolvimento *in vitro*, sendo que essas informações são essenciais para a viabilização de pesquisas subsequentes.

No que se refere a estudos de resistência genética, quando são realizados testes de patogenicidade artificiais com intuito de avaliar a resistência do hospedeiro frente a patógenos, ou em estudos epidemiológicos, os quais requerem quantificar a severidade doença, é necessária a adoção de métodos precisos, acurados e reproduzíveis para que os erros sejam minimizados e os resultados sejam os mais confiáveis possíveis. Nesse sentido, as escalas diagramáticas são utilizadas para a orientação da estimativa visual, de tal modo que a avaliação torne-se mais precisa e acurada após a comparação da amostra com a representação no diagrama (SUSSEL; POZZA; CASTRO, 2009).

O patossistema *Sirosporium* sp. - *Carya illinoensis* tem grande importância para os Estados do Sul do Brasil, visto que tem influência direta na qualidade e quantidade de produção de frutos. A identificação do patógeno e suas características, o conhecimento da forma de cultivo em ambiente artificial, assim como o estabelecimento de formas confiáveis para quantificação em estudos

epidemiológicos é de fundamental importância, pois subsidia estudos posteriores com resistência genética e para que alternativas de controle e prevenção de doenças sejam elaboradas.

A partir da descrição desta nova doença nos pomares de noqueira-pecã no Brasil, foram elaborados estudos com o intuito de elucidar esse patossistema, contribuindo assim com o fornecimento de informações no âmbito etiológico, fornecendo descrição de características morfofisiológicas e genéticas. Além disso, serve para fornecer características sintomatológicas, as quais são importantes para estudos epidemiológicos. A disponibilização das informações e dos patógenos isolados neste estudo fornece subsídios para que novas pesquisas sejam geradas, seja em empresas, centro de pesquisas, produtores de noqueira-pecã ou interessados em sua utilização. Dessa forma, contribuem também para que o controle da doença da noqueira-pecã seja eficiente, além de contribuir na viabilização do aumento do crescimento dos plantios comerciais e da cadeia produtiva da noz-pecã no sul do Brasil.

Diante do exposto, este trabalho tem como objetivo, avaliar a patogenicidade de isolados de *Sirosporium* sp. associados a mancha foliar da noqueira-pecã, caracterizá-los morfológica, fisiológica e molecularmente, bem como, desenvolver uma escala diagramática para a avaliação da severidade da doença.

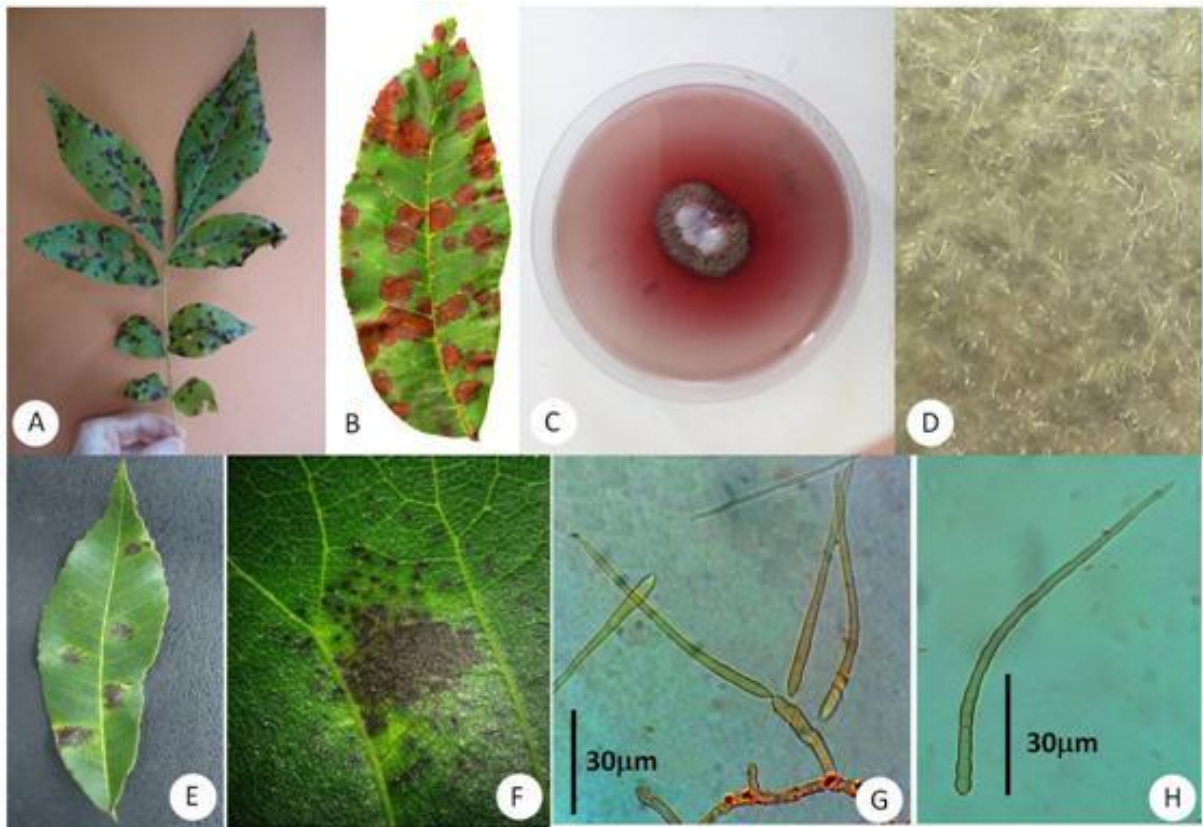
2 CAPÍTULO I: FIRST REPORT OF *Sirosporium diffusum* CAUSING BROWN LEAF SPOT ON *Carya illinoensis* IN BRAZIL. Plant Disease, v. 101, n. 2, p. 381, 2017.

T. Poletto, M. F. B. Muniz, E. Blume, and R. Mezzomo, Department of Plant Pathology, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, Brazil; **U. Braun**, Martin-Luther-Universität, Institut für Biologie Bereich, Geobotanik und Botanischer Garten, Herbarium, Neuwerk 21, 06099 Halle (Saale), Germany; **S. I. R. Videira**, CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, Uppsalalaan 8, 3584 CT, Utrecht, The Netherlands; **R. Harakava**, Biological Institute of São Paulo, Brazil; and **I. Poletto**, Biochemistry and Biology Laboratory, UNIPAMPA, São Gabriel, Brazil.

Pecan [*Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch] is economically important in the State of Rio Grande do Sul (RS), Brazil. During December 2013, brown leaf spot symptoms were observed in orchards and nurseries on up to 85% of the trees, being more severe on cultivars Barton, Desirable, Wichita, and Mahan. By early 2016, the disease was distributed throughout the state. Symptoms began in late spring on mature leaves as round, reddish-brown spots with a dark halo, measuring 0.5 to 1.5 cm in diameter, and progressed to cause severe defoliation by late summer. Pure cultures were obtained through single-spore isolation from young, reddish-brown leaf spots on 'Barton' from an orchard in Anta Gorda (RS). The spores were plated on carrot agar medium (200 ml carrot juice, 20 g agar, 800 ml distilled water) and incubated under continuous light at $20 \pm 1^\circ\text{C}$ for 56 days. Colonies formed brown creeping aerial mycelium with light brown conidiophores, usually singly but sometimes in fascicles, measuring $95 \times 4 \mu\text{m}$ with prominent, thickened, and darkened conidiogenous loci. Conidia were light brown, often curved, smooth, tapered toward the distal end, with 0 to 21 septa, and measuring 20 to 157×2.75 to $5 \mu\text{m}$, with a thickened and darkened hilum at the base. Morphological characteristics fit the description of *Sirosporium diffusum* (Heald & F. A. Wolf) Deighton (Ellis, 1976). A partial region of *tef1- α* gene and the ITS region were amplified using the primers EF1 and EF2 (O'Donnell and Cigelnik, 1997) and ITS1 and ITS4 (White et al., 1990), respectively. Although there were no previous sequences of this fungus deposited in *GenBank*, both ITS and *tef1- α* sequences were 100% identical to the respective

unpublished sequences of a culture of *S. diffusum* currently deposited at the CBS-KNAW collection (CBS 106.14). The sequences of our isolate were deposited in *GenBank* (accession numbers KX344494 and KU534938, respectively). A pathogenicity test was performed to fulfill Koch's postulates. Twenty detached mature leaflets of 'Barton' were inoculated each with 100 μl of spore suspension (2×10^5 spores ml^{-1}), divided into six drops, and distributed separately on the adaxial leaf surface. Twenty detached mature leaflets were used as controls and were treated with distilled water. The leaflets were maintained in sterile plastic boxes with two moistened sheets of filter paper at $23 \pm 1^\circ\text{C}$ and a 12-h photoperiod. The test was repeated three times. The original disease symptoms were observed on the inoculated leaves after 9 days, but not on the control leaves. Subsequently, the pathogen was reisolated from the lesions and identified as *S. diffusum*. This is the first report of *S. diffusum* causing brown leaf spot on *C. illinoensis* in Brazil. The identification of this pathogen will allow the study of strategies for managing the disease in Brazil.

Figure 1 - **A**, Symptoms of *S. diffusum* on a naturally infected leaf of Barton cultivar. **B**, Reddish brown lesions on a naturally infected leaflet of 'Barton'. **C**, Colony of *S. diffusum* on carrot-agar medium. **D**, Mycelium of *S. diffusum* on carrot-agar (stereomicroscope, 30x). **E**, Leaflet after pathogenicity test (six black lesions indicating the sites of inoculation). **F**, Lesions of brown leaf spot nine days after inoculation. **G**, Conidiophores (arrow) and conidia formed in vitro. **H**, Conidia formed in vitro.



2.1 REFERENCES

- Ellis, M. B. 1976. More Dematiaceous Hyphomycetes. CMI, Kew, Surrey, U.K.
- O'Donnell, K., and Cigelnik, E. 1997. Mol. Phylogenet. Evol. 7:103.
- White, T., et al. 1990. Page 315 in: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Academic Press, San Diego.

3 CAPÍTULO II: CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, FILOGENÉTICA E PATOGÊNICA DE *Sirosporium diffusum* EM *Carya illinoensis* NO BRASIL

Resumo

A mancha foliar marrom causada por *Sirosporium diffusum* é uma doença importante para *Carya illinoensis*, haja vista que a desfolha causada, prejudica a quantidade e a qualidade final dos frutos em pomares e, em viveiro, as mudas sofrem atraso em seu desenvolvimento. O objetivo deste estudo foi caracterizar os isolados de *Sirosporium* sp. utilizando abordagens morfológicas e moleculares, além de comprovação de patogenicidade em folhas. Foram obtidos isolados de *Sirosporium* sp. em folhas sintomáticas coletadas em pomares do Rio Grande do Sul, Brasil, em 2016. No total foram obtidos 10 isolados de *Sirosporium* sp., os quais, foram patogênicos, com incidência de 100% para a maioria deles. No entanto, houve variação na virulência. Diferenças nas características morfológicas na fase anamórfica mostraram variabilidade entre os isolados estudados. As variáveis que mais contribuem para a separação inicial de isolados foram o índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) (40,2%), seguido pelo crescimento médio diário (CMD) e crescimento micelial. A análise filogenética dos isolados confirmou *S. diffusum* como o agente causador da mancha foliar marrom em *C. illinoensis* no Brasil. O sequenciamento da região ITS e do gene *tef1- α* do DNA do fungo foram suficientes para a identificação em nível de espécie.

Palavras chave: noqueira-pecã; mancha foliar marrom; patossistema

PHYLOGENETIC, MORPHOLOGICAL, AND PATHOGENIC CHARACTERIZATION OF *Sirosporium diffusum* ON *Carya illinoensis* IN BRAZIL

Abstract

The brown leaf spot caused by *Sirosporium diffusum* is an important disease for *Carya illinoensis*. As the consequent defoliation damages the final quantity and quality of the fruits in orchards, and in nurseries, seedlings are delayed in their development. The aim of this study is to characterize isolates of *Sirosporium* sp.

using morphological and molecular approaches, and pathogenicity tests on *Carya illinoensis* leaves. *Sirosporium* sp. isolates from symptomatic leaves of *Carya illinoensis* were collected in orchards of Rio Grande do Sul, Brazil, in 2016. A total of 10 isolates of *Sirosporium* sp. were obtained, of which, were pathogenic, with 100% incidence in most of them. However, there was variation in virulence capacity. Differences in morphological traits showed variability among the studied isolates despite the non-observation of the teleomorphic phase. The variables that contributed the most to the initial separation of isolates were the mycelial growth rate index (MGRI) 40.2%, followed by daily mycelial growth (CMD) and mycelial growth. The phylogenetic analysis of isolates confirmed *S. diffusum* as the causal agent of the brown leaf spot in *C. illinoensis* in Brazil. Sequencing of the ITS region and the *tef1- α* gene of the fungus DNA was sufficient for species-level identification.

Key words: pecan; brown leaf spot; pathosystem

3.1 INTRODUÇÃO

O cultivo da noqueira-pecã [*Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch], família Juglandaceae, tem ganhado cada vez mais importância econômica nos Estados do Sul do Brasil (POLETTTO et al., 2015). Isso decorre da grande demanda por suas nozes, ocasionada principalmente pela rica composição nutricional, a qual proporciona grandes benefícios à saúde. Para suprir essa demanda, inúmeros pomares estão sendo implantados, sendo estimado que, no ano de 2016 foram plantadas, comercialmente, em torno de 100 mil mudas.

Por conseguinte, o crescente aumento na área plantada tem desencadeado frequentes epidemias, principalmente de doenças fúngicas, as quais são favorecidas pelo clima úmido e acúmulo de hospedeiros suscetíveis, tanto em campo como em viveiro. Entre as epidemias mais relevantes diagnosticadas até o presente, destacam-se a mancha foliar de cladosporium, causada por fungos pertencentes ao complexo *Cladosporium cladosporioides* (WALKER et al., 2016), a mancha foliar causada por *Pestalotiopsis clavispora* (LAZAROTTO et al., 2012) e o cancro do tronco causado por *Lasiodiplodia subglobosa* (POLETTTO et al., 2016).

Recentemente, uma nova doença, não menos importante, foi diagnosticada nos plantios brasileiros, cujo agente causal é o fungo *Sirosporium diffusum* (Heald & Wolf) Deighton (ELLIS, 1976) e que foi descrita como mancha foliar marrom

(POLETTTO et al., 2017). A doença causa inicialmente, manchas foliares seguida de severa desfolha das plantas, prejudicando a quantidade e qualidade final dos frutos. Além disso, ataca mudas em viveiro causando atraso no seu desenvolvimento (POLETTTO et al., 2017).

O fungo *Sirosporium diffusum* é um importante patógeno da cultura da noqueira-pecã e já foi relatado em diversos países causando mancha foliar, como nos Estados Unidos, México e África do Sul (CHUPP, 1953; CROUS; BRAUN, 2003). Desde que foi descrito pela primeira vez, sofreu várias mudanças taxonômicas, tendo sido registrado, primeiramente, em 1911, como *Clasterosporium diffusum* Heald & Wolf, depois, em 1914, como *Cercospora fusca* Rand e, atualmente, o nome aceito é *Sirosporium diffusum* (Heald and Wolf) Deighton (ELLIS, 1976).

A falta de informações sobre as características morfológicas e moleculares deste patógeno, bem como os respectivos sintomas associados à cultura, tem gerado insegurança e dificuldades no manejo fitossanitário dos pomares. Dyinga e Sinclair (1995) salientam que o estudo de um fitopatógeno requer o seu cultivo em condições que proporcionem bom desenvolvimento, para assim proceder estudos subsequentes sobre taxonomia e/ou genéticos.

A análise dos caracteres morfológicos é uma ferramenta importante em estudos envolvendo caracterização de espécies fúngicas, no entanto, Teixeira, Vieira e Machado (2004) ressaltam que eles podem apresentar instabilidade, induzindo a erros na identificação, como ocorre para as espécies *Acremonium strictum* e *Fusarium verticillioides*. Lanfranco et al. (2001) destacam que é importante realizar análise de caracteres morfológicos conjuntamente com dados moleculares para identificação de espécies fúngicas.

Apesar da importância desse fungo, que é um patógeno importante para a cultura da noqueira-pecã em vários países, não foram encontrados estudos envolvendo a caracterização desse patossistema no Brasil. Diante do exposto, o objetivo deste estudo foi caracterizar os isolados de *Sirosporium* sp., utilizando abordagens morfológicas, moleculares e teste de patogenicidade.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Obtenção dos isolados

Durante os meses de janeiro e fevereiro de 2016 foram coletadas amostras de folíolos sintomáticos em pomares de noqueira-pecã em dez locais diferentes no Estado do Rio Grande do Sul, Brasil, sendo todos os pontos de coleta georreferenciados (Tabela 1). O material vegetal coletado foi identificado e colocado separadamente em caixas gerbox, contendo 20 g de Dióxido de Silício (SiO_2) e a seguir, levado para o Laboratório de Fitopatologia da Universidade Federal de Santa Maria, para a realização das análises. Esse procedimento foi necessário para manter conservadas as estruturas fúngicas, evitando crescimento de fungos saprofíticos indesejados sobre as lesões das folhas, visto que *Sirosporium* sp. apresenta crescimento muito lento e a contaminação de outro organismo na hora do isolamento poderia mascarar o crescimento.

O isolamento do patógeno foi feito pelo método direto, a partir de lesões contendo frutificações do patógeno. Para tanto, foram transferidos conídios para placas de Petri contendo meio de cultura CA (200 ml de extrato aquoso de 200 g de cenoura, 20 g de ágar, 800 ml de água destilada) e incubadas a $20 \pm 1^\circ\text{C}$ com fotoperíodo de 24 h, por 56 dias, conforme descrito por Poletto et al. (2017). Após estarem crescidos, os isolados foram purificados conforme a técnica de cultura monospórica, descrita por Fernandes (1993). Os isolados coletados foram liofilizados e depositados na micoteca do mesmo laboratório e no Herbário SMDB (Santa Maria Departamento de Biologia) do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Santa Maria (Tabela1).

Tabela 1 – Código de acesso no laboratório, no herbário SMDB e no *Genbank*, municípios e coordenadas geográficas dos isolados de *Sirosporium* sp. oriundos de folhas sintomáticas de *Carya illinoensis*.

Isolado	Município	Coordenadas	SMDB*	Acesso <i>Genbank</i>	
				ITS	<i>tef1-α</i>
SS-TP-1	Sentinela do Sul	S 30°36'43" O 51°34'49"	16.431	MG836570	MG786501
IL-GG-1	Ilópolis	S 28°54'36" O 52° 07'08"	16.428	MG836579	MG786510
CZ-AL -1	Cruzeiro do Sul	S 29°30'49" O 51°59'29"	16.430	MG836575	MG786506
EN-MR-1	Encantado	S 29°12'39" O 51°53'57"	16.432	MG836577	MG786508
EN-MR-2	Encantado	S 29°12'39" O 51°53'57"	16.433	MG836578	MG786509
DR-PZ-1	Dr. Ricardo	S 29°05'11" O 51°59'42"	16.425	MG836576	MG786507
AM-EG-1	Arroio do Meio	S 29°19'39" O 55°51'04"	16.429	MG836574	MG786505
AG-RM-1	Anta Gorda	S 28°53'59" O 52°02'55"	16.434	MG836572	MG786503
AG-ZI-1	Anta Gorda	S 28°53'40" O 52°02'23"	16.426	MG836573	MG786504
AG-NT-1	Anta Gorda	S 28°53'30" O 52°01'13"	16.427	MG836571	MG786502

* SMDB: Herbário SMDB (Santa Maria Departamento de Biologia).

3.2.2 Teste de patogenicidade

Para a obtenção da suspensão de esporos de cada isolado, foram adicionados 4 mL de água destilada esterilizada por placa, contendo colônias do fungo com 56 dias de crescimento e com o auxílio de uma alça de Drigalski, foi realizada a raspagem da superfície do meio para a liberação dos conídios. A contagem da concentração de esporos para a inoculação foi realizada com o auxílio da câmara de Neubauer, sendo a suspensão calibrada para 2×10^5 esporos.mL⁻¹ para todos os isolados.

A inoculação foi realizada pelo método de folíolos destacados (Poletto et al., 2017), sendo que folíolos maduros da cultivar Barton, foram submetidos à assepsia superficial, primeiramente com etanol a 70% (v/v) por 30 s, depois com hipoclorito de sódio a 1% (v/v), também por 30 s e, após à três banhos em água destilada e esterilizada. Os folíolos foram acomodados em caixas gerbox previamente esterilizadas contendo duas folhas de papel filtro estéreis e umedecidas e, sobre estas, duas lâminas de vidro esterilizadas. Por fim, os folíolos foram colocados sobre as lâminas de vidro, para evitar o contato direto com o papel umedecido. No pecíolo de cada folíolo foi colocado um algodão umedecido para evitar a sua desidratação.

Utilizaram-se oito folíolos para cada isolado, cada folíolo constituiu uma repetição. Cada folíolo foi inoculado com 100 µL da suspensão, dividida em seis gotas, distribuídas separadamente sobre o lado abaxial do limbo foliar. No tratamento controle, a inoculação foi realizada apenas com água destilada e esterilizada. A seguir, procedeu-se a incubação a $23 \pm 1^\circ\text{C}$ com fotoperíodo de 12 h, sendo que, a cada dois dias, os papéis e os algodões foram reumedecidos.

A quantificação da incidência da doença foi realizada visualmente com a ajuda de um microscópio estereoscópio. Se, em pelo menos uma das gotas depositadas sobre a folha, houve o aparecimento de sintoma, a incidência foi quantificada como positiva, ou, na ausência, como negativa, para cada folíolo (repetição).

Para a quantificação da virulência do patógeno, foi utilizada uma escala com sete níveis (Tabela 2). Para a confirmação da patogenicidade, os patógenos foram reisolados, a fim de completar os Postulados de Koch.

Tabela 2 - Escala de notas para avaliação da virulência de isolados de *Sirosporium* sp. em folíolos de *Carya illinoensis*.

Notas	Locais com lesão	Virulência (%)
1	0	0,0
2	1	16,6
3	2	33,3
4	3	50,0
5	4	67,7
6	5	83,3
7	6	100

3.2.3 Análise morfológica

Primeiramente, foi realizada uma descrição geral dos sintomas em folhas, observando-se visualmente sua forma, coloração, tamanho, distribuição sobre o limbo foliar, evolução das lesões, presença ou ausência de halo entre o tecido sadio e a lesão.

Para a avaliação das características morfológicas de cada isolado, discos de meio de cultura (5 mm de diâmetro) contendo estruturas fúngicas foram transferidos

para o centro de placas de Petri (9 cm de diâmetro) contendo meio cultura CA, e, após, as placas foram incubadas à temperatura de $20 \pm 1^\circ\text{C}$ sob fotoperíodo de 24 h, com seis repetições para cada isolado.

As colônias foram avaliadas quanto à coloração da parte inferior com o auxílio da cartilha de cores de Munsell Soil Color Chart (Munsell Color, Grand Rapids, MI, USA). O crescimento micelial foi obtido através da medição semanal do diâmetro da colônia, com o auxílio do paquímetro digital, sendo realizadas duas medidas em sentidos diametralmente opostos. Em seguida, foi determinada a média de crescimento para cada placa (mm / semana). Esses dados foram utilizados para o cálculo do índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) do fungo, empregando-se a fórmula de Maguire (1962), adaptada por Oliveira (1991): $\text{IVCM} = \sum ((D-D_a)/N)$, em que: D = diâmetro médio atual da colônia, D_a = diâmetro médio da colônia do dia anterior e N = número de semanas. As medições foram realizadas por oito semanas.

Para a caracterização dos conídios, foi avaliado o número de septos, comprimento e largura de 50 conídios tomados aleatoriamente. As medições foram realizadas com o auxílio de uma ocular OSM, acoplada ao microscópio de contraste Olympus BX41® na objetiva de 40x. As estruturas foram visualizadas a partir da confecção de lâminas contendo água destilada e esterilizada.

Os dados quantitativos dos caracteres morfológicos, primeiramente foram submetidos à análise de variância pelo teste F a 1% de probabilidade ($P < 0,01$). Em seguida, os dados foram submetidos à técnica da análise multivariada. Os dados foram testados quanto à multicolinearidade e ajustados pela matriz de distância de Mahalanobis. Um dendrograma de dissimilaridade foi construído utilizando-se o método de agrupamento da distância média (UPGMA), sendo que o ajuste entre a matriz de distâncias e o dendrograma foi estimado pelo coeficiente de correlação cofenética (r) por meio do programa computacional Genes (CRUZ, 2013).

3.2.4 Microscopia Eletrônica de Varredura

A preparação e a observação em microscopia eletrônica de varredura foi realizada no Centro de Microscopia e Microanálise - CMM da Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS. Para tanto, uma colônia do isolado AG-RM-01 foi cultivada em meio CA a $20 \pm 1^\circ\text{C}$ com fotoperíodo de 24h por 56 dias, após foram

retirados discos de meio contendo estruturas do fungo e colocados em Dióxido de Silício (SiO₂) por sete dias para desidratação. Após isso, uma amostra foi montada em suporte de alumínio “stub”, com o auxílio de fita adesiva de carbono dupla face, sendo que, em seguida, foi metalizada com Prata na metalizadora Baltec, modelo SCD 050. Por fim, as estruturas fúngicas foram observadas em Microscópio Eletrônico de Varredura (JSM 6060) na condição de 5 Kv.

3.2.5 Extração de DNA, reação da PCR e sequenciamento

A análise molecular dos isolados foi realizada pelo Instituto Biológico de São Paulo. Para a extração do DNA genômico dos isolados, porções de micélio foram retiradas de culturas monospóricas cultivadas em meio CA por 56 dias. Foi utilizado o método CTAB, descrito por Doyle e Doyle (1991).

As amostras de DNA genômico extraídas foram submetidas à Reação de Polimerase em Cadeia (PCR) para a amplificação das regiões: ITS do rDNA, com os *primers* ITS1 (5' TTCCGTAGGTGAACCTGCGG 3') e ITS4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3') (WHITE et al., 1990); *tef1-α*, com o par de *primers* *tef71F* (5' CAAAATGGGTAAGGAGGASAAGAC 3') and *tef997R* (5' – CAGTACCGGCRGCRATRATSAG – 3') (SHOUKOUHI e BISSETT, 2009).

As reações continham aproximadamente 30 ng de DNA, tampão 5X buffer, 200 μM de cada dNTP, 1,5 nM de MgCl₂, 200 nM de cada um dos oligonucleotídeos iniciadores, 1 U de *GoTaq*[®] DNA polimerase (Promega) e água ultrapura para completar o volume da reação de 25 μL. As reações foram realizadas em termociclador MJ Research, INC. PTC – 100MT, sob as seguintes condições de ciclo: 94°C por 2 min, 40 ciclos de 94°C por 10s, 54°C por 30 s e 72°C por 45 s e, por fim, um ciclo de 72°C por 4 min. Ao final da reação, os produtos da PCR foram mantidos a 4°C. Um controle negativo sem DNA foi incluído nas amplificações do PCR. Os produtos da PCR foram purificados com PEG 8000 (Schmitz e Riesner, 2006) para posterior sequenciamento. O sequenciamento foi efetivado em um sequenciador 3500xL (Applied Biosystems).

As sequências de nucleotídeos obtidas dos isolados foram comparadas com àquelas já existentes no *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) através do procedimento Basic Local Alignment Search Tool - BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) (ALTSCHUL et al., 1997). As sequências do *GenBank*

que apresentaram maior cobertura e similaridade foram selecionadas para realizar a análise filogenética. Para isso, primeiramente as sequências de nucleotídeos foram alinhadas pelo algoritmo ClustalW, utilizando o programa BioEdit (HALL, 1999). Em seguida, a análise filogenética foi conduzida utilizando-se o método “Neighbour-joining” com 1000 replicatas pelo programa MEGA versão 4 (TAMURA et al., 2007).

Após, as sequências-consenso obtidas foram inseridas no *GenBank*, sediado no *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) (ALTSCHUL et al., 1997), recebendo o código de acesso para consultas.

3.3 RESULTADOS

Os isolados de *Sirosporium* sp. estudados mostraram-se patogênicos à *C. illinoensis*. No entanto, houve diferenças quanto às características de patogênese. Os sintomas iniciaram oito dias após a realização da inoculação nos locais do tecido foliar onde foi depositado o inóculo do fungo. Estes iniciaram como pequenos pontos necróticos que correspondiam aos locais de inoculação do patógeno e, posteriormente, coalesciam formando áreas maiores de tecido necrosado (Figura 1: B e C). Nas lesões, foi possível observar grande quantidade de frutificações do patógeno, essas desenvolvidas em conidióforos simples e algumas agrupadas em fascículos. Esses sintomas correspondem aos originais, típicos da doença quando observados em campo. Não houve aparecimento de sintomas da doença no tratamento controle.

Com exceção do isolado SS-TP-1, que apresentou incidência menor (87,5%), ou seja, em apenas 7 dos 8 folíolos inoculados, todos os outros apresentaram incidência máxima (100%), ou seja, os patógenos apresentaram habilidade para infectar o tecido foliar dos folíolos em todas as repetições (Tabela 3). Quanto à virulência, houve variações entre os isolados, em que DR-PZ-1, AG-RM-1 e AG-ZI-1 apresentaram nota sete (virulência de 100%), seguido dos isolados IL-GG-3, EN-MR-1, AG-NT-1, EN-MR-2, AM-EG-2 e CZ-AL-1, os quais tiveram virulência intermediária (nota seis). O isolado que apresentou menor virulência foi o SS-TP-1 (Tabela 3). Para a maioria dos isolados, a colonização do fungo estendeu-se para além dos pontos de inoculação, formando áreas maiores de tecido necrosado.

Tabela 3 – Virulência de isolados de *Sirosporium* sp. e incidência da mancha foliar marrom em folíolos de *Carya illinoensis*, cultivar Barton, após teste de patogenicidade.

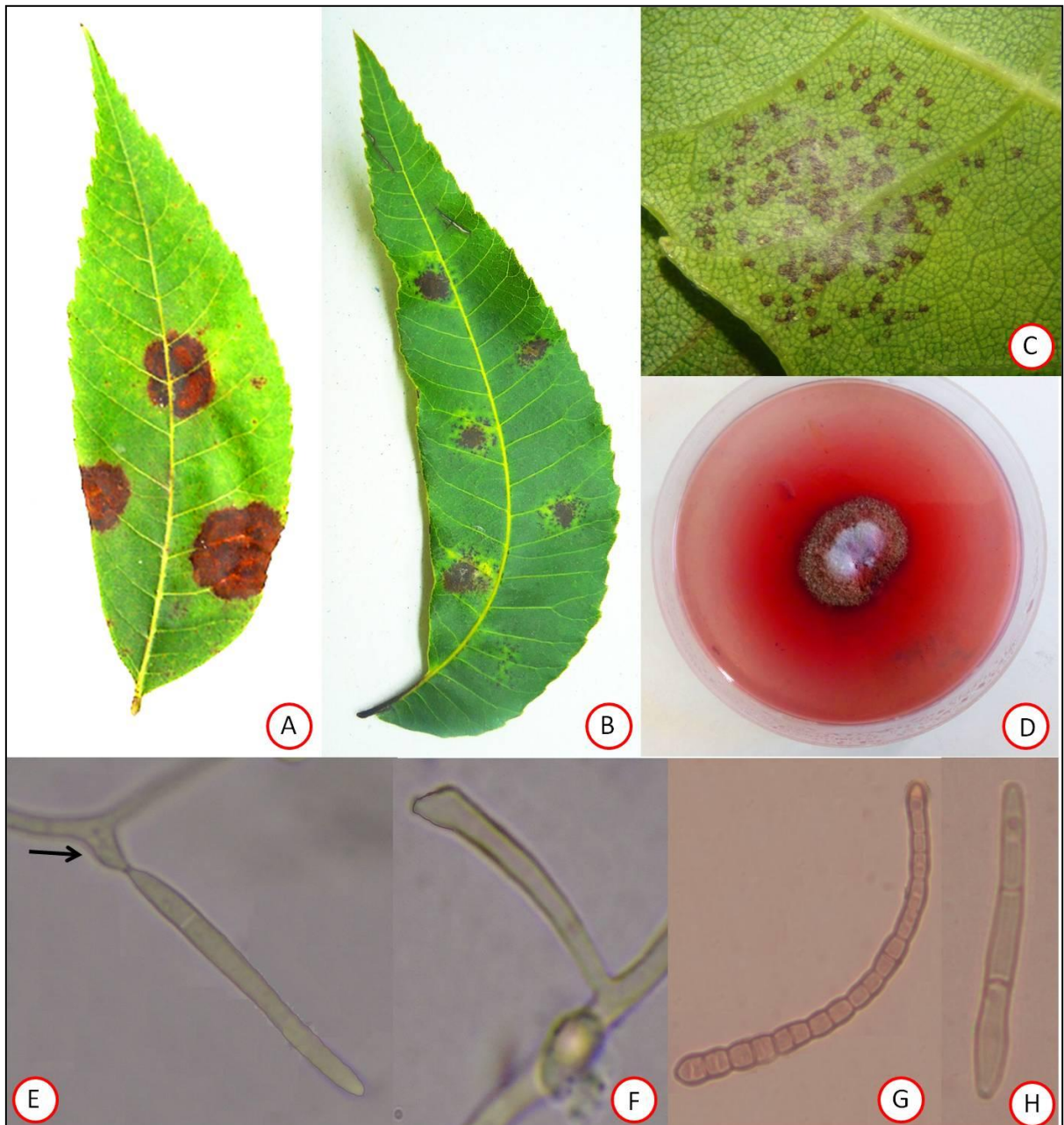
Código	Local de coleta	Virulência	Incidência
		-----%-----	
SS-TP-1	Sentinela do sul	43,8	87,5 ¹
IL-GG-3	Ilópolis	93,8	100 ²
CZ-AL -1	Cruzeiro do Sul	72,9	100
EN-MR-1	Encantado	93,8	100
EN-MR-2	Encantado	89,6	100
DR-PZ-1	Dr. Ricardo	100,0	100
AM-EG-2	Arroio do Meio	85,4	100
AG-RM-1	Anta Gorda	100,0	100
AG-ZI-1	Anta Gorda	100,0	100
AG-NT-1	Anta Gorda	93,8	100

¹ 87,5% - 7 dos 8 folíolos foram infectados

² 100% - 8 dos 8 folíolos foram infectados

Os sintomas da mancha foliar marrom causada por *Sirosporium* sp., observados em campo, iniciam no final da primavera como pequenas manchas irregulares, posteriormente tornam-se bem delimitadas, medindo de 0,5 a 1,5 cm de diâmetro, de coloração marrom avermelhada com halo escuro e que coalesce com o progresso da doença (Figura 1: A). A doença perdura até o final do ciclo vegetativo, causando intensa desfolha. Nas lesões, o fungo produziu conidióforos e conídios abundantes, principalmente no lado abaxial das folhas.

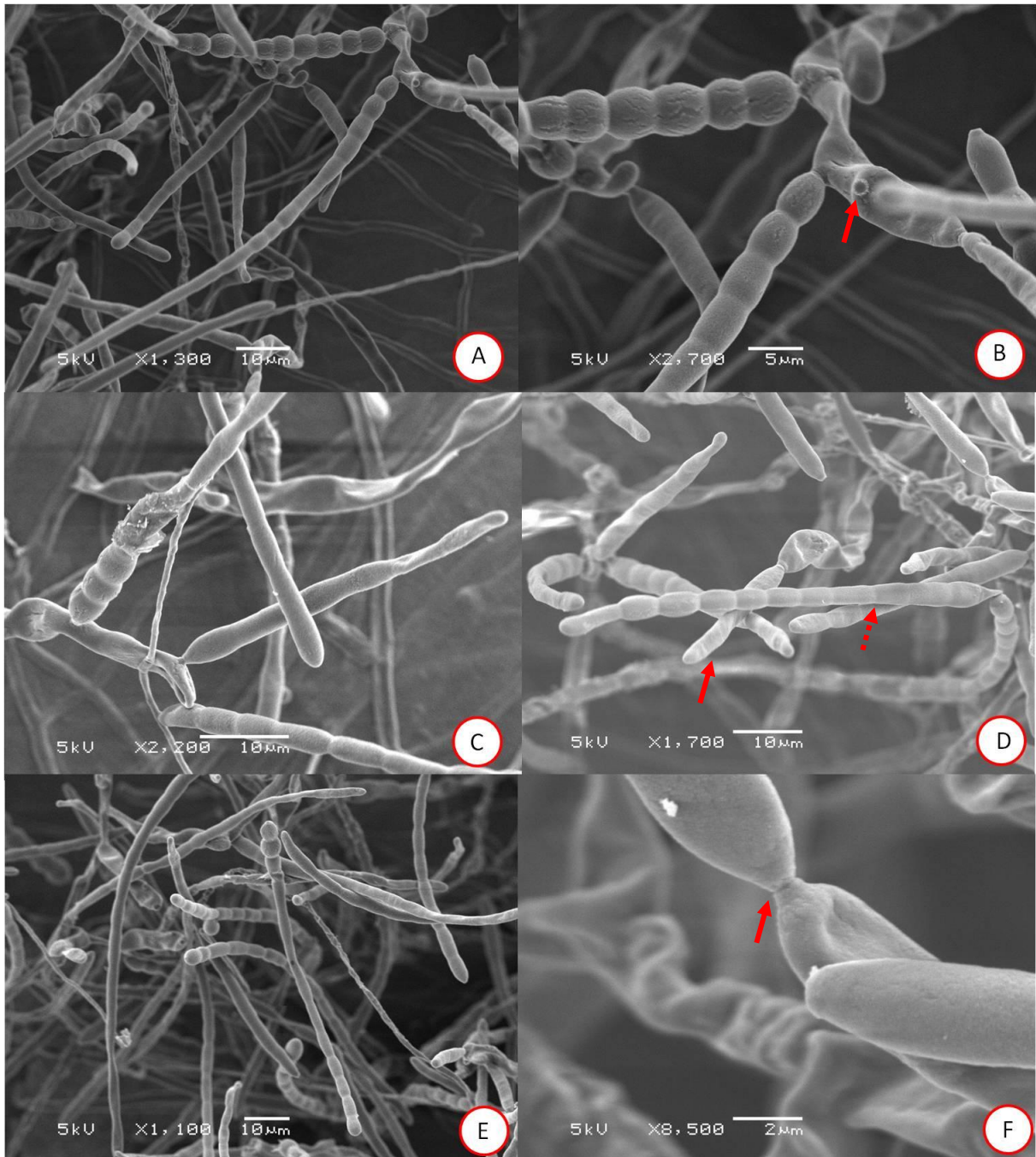
Figura 1 – **A**, sintomas de mancha foliar marrom causada por *Sirosporium* sp. em folíolos de *Carya illinoensis* observados em campo. **B**, folíolo após teste de patogenicidade (seis lesões escuras indicam os locais de inoculação). **C**, detalhe das lesões iniciais formadas no decorrer do teste de patogenicidade. **D**, colônia em meio de cultura cenoura-ágar-água (CA) com halo vermelho difuso no meio de cultura. **E**, conidióforo (seta) e conídio. **F**, conidióforo. **G**, conídio adulto. **H**, conídio jovem.



Em meio CA, independente do isolado, as colônias apresentaram micélio aéreo rasteiro de coloração marrom claro, com hifas septadas. As frutificações originaram-se de conidióforos curtos, isolados ou agrupados em fascículos, de

coloração marrom – claro, ligeiramente geniculados (Figura 1: E, F). Nas extremidades, os conidióforos apresentaram minutas cicatrizes arredondadas oriundas das inserções dos conídios (Figura 2: B, F). Os conídios, quando jovens, são cilíndricos, retos de coloração hialina e possuem poucos a nenhum septo (Figura 1: H; Figura 2: C, D). Já os adultos são cilíndricos a obclavados-cilíndricos, curvados, afilados em direção ao ápice, fortemente contraídos nos septos e possuem parede celular espessa, de coloração marrom (Figura 1: G; Figura 2: A, B e E).

Figura 2 - Estruturas do fungo *Sirosporium* sp. visualizadas em Microscopia Eletrônica de Varredura, cultivadas em meio cenoura - ágar - água (CA). **A** e **C**, conidióforo e conídios; **B**, cicatriz do conídio no conidióforo e constrição nos septos dos conídios; **D**, (seta) conídio jovem e (seta pontilhada) adulto; **E**, conídios adultos; **F**, detalhe da inserção do conídio no conidióforo.



As colônias de todos os isolados apresentaram crescimento micelial lento. Ao final de 56 dias de incubação as colônias não cresceram o suficiente para completar a placa (Figura 1: D). O diâmetro total das colônias variou de 18,7 para o isolado

EN-MR-1 até 26.2 mm para DR-PZ-1 (Tabela 4). O crescimento micelial diário (CMD) máximo foi de apenas 0.47 mm / dia para os isolados SS-TP-1 e DR-PZ-1, enquanto que os isolados EN-MR-1 e EN-MR-2 apresentaram os menores valores, 0.33 e 0.35 mm / dia.

Os isolados também apresentaram diferenças na esporulação, os maiores valores foram para CZ-AL-1 e AM-EG-2 que ultrapassaram os 20×10^5 esporos.mL⁻¹. As colônias formaram setores, ou seja, porções da colônia com características morfológicas diferenciadas onde a frutificação foi mais abundante e formadas em conidióforos simples ou agrupados em fascículos. O comprimento médio dos conídios variou de 73,4 μm até 90,5 μm , dependendo do isolado. No entanto, foi observada uma grande amplitude no comprimento dos conídios de todos os isolados, onde EN-MR-2 apresentou a maior variação, 15 μm até 247,5 μm e a largura variou de 2,5 a 6,3 μm . A septação dos conídios foi bastante variável, entre e dentro de cada isolado. No isolado EN-MR-2 variou de zero (0) até 30 septos. Provavelmente, os conídios asseptados estejam em formação (jovens) e quando adultos, apresentam número de septos definido.

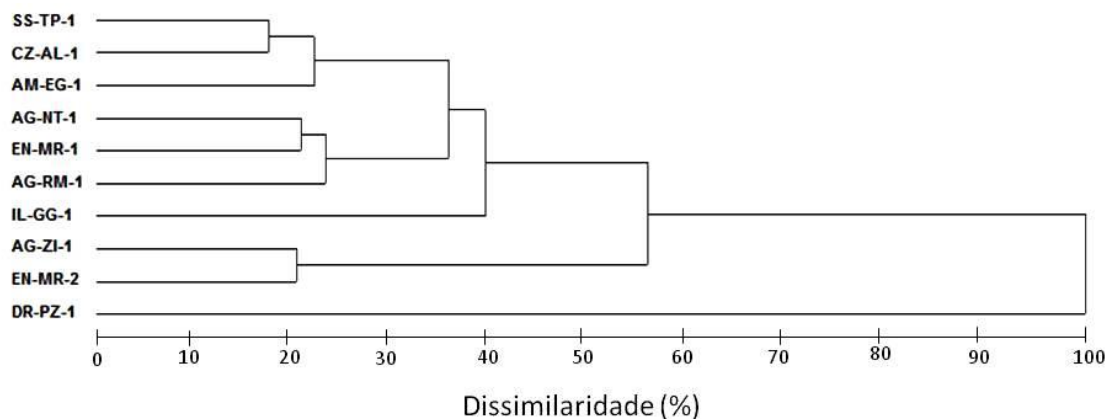
Tabela 4 - Características morfológicas de *Sirosporium* sp. isolados de folhas de *Carya illinoensis* após 56 dias de incubação em meio CA (cenoura - ágar - água), com fotoperíodo de 24 horas, à $20 \pm 1^\circ\text{C}$.

Isolado	Dia-metro. (mm)	CMD (mm/dia)	IVCM	Esporulação ($\times 10^5 \text{ ml}^{-1}$)	Conídio			Coloração da colônia	
					Comprimento -----(μm)-----	Largura	Septo	Reverso	Pigmentação
SS-TP-1	26,1	0,47	1,36	19,4	73,4 (15 - 150)	4,2 (2,8 - 5,3)	9 (0 - 26)	Marrom avermelhada	Vermelho claro
IL-GG-3	25,8	0,46	1,26	11,1	73,4 (17,5 - 165)	4,6 (2,5 - 5,5)	10 (0 - 26)	Marrom avermelhada	Vermelho escuro
CZ-AL -1	23,9	0,43	1,29	22,9	75,4 (20 - 130)	3,7 (2,5 - 5)	9 (0 - 18)	Marrom avermelhada	Vermelho claro
EN-MR-1	18,7	0,33	0,91	15,6	79 (45 - 137,5)	4,3 (3 - 5)	11 (5 - 19)	Marrom avermelhada	Vermelho escuro
EN-MR-2	19,8	0,35	0,86	11,4	84,0 (15 - 247,5)	3,7 (2,5 - 6,3)	7 (0 - 30)	Marrom avermelhada	Vermelho
DR-PZ-1	26,2	0,47	1,49	16,4	69,1 (17,5 - 120)	3,4 (2,5 - 5)	4 (0 - 11)	Marrom avermelhada	Vermelho escuro
AM-EG-2	23,7	0,42	1,17	20,2	90,5 (20,0 - 237,5)	4,0 (2,5 - 5)	9 (0 - 18)	Marrom avermelhada	Vermelho
AG-RM-1	20,1	0,36	1,06	19,7	74,5 (22,5 - 162,5)	4,2 (2,5 - 5)	8 (0 - 21)	Marrom avermelhada	Vermelho escuro
AG-ZI-1	20,8	0,37	1,00	17,5	68 (17,5 - 152,5)	3,5 (2,5 - 5)	8 (0 - 20)	Marrom avermelhada	Vermelho escuro
AG-NT-1	20,9	0,37	1,07	10,0	60,5 (22,5 - 120)	3,9 (2,5 - 5)	7 (0 - 20)	Marrom avermelhada	Vermelho escuro

A coloração das colônias, no reverso da placa de petri, não teve variação, sendo que todas apresentaram coloração marrom avermelhada. No entanto, os isolados produziram uma pigmentação vermelha no entorno das colônias difundindo-se no meio de cultura. Em alguns isolados essa coloração era mais intensa do que em outros (Tabela 3), (Figura 1: D).

No dendrograma de dissimilaridade dos isolados de *Sirosporium* sp. (Figura 3), elaborado pelo método UPGMA a partir dos resultados qualitativos da caracterização morfológica (Tabela 4), podem ser observados três grupos distintos, que assim se separaram a corte de 57% de dissimilaridade. O isolado DR-PZ-1, que formou um clado monofilético, mostrou-se morfológicamente distinto dos demais, apresentando 100% de dissimilaridade em relação aos demais. Os isolados SS-TP-1, CZ-AL-1 e AM-EG-1 foram agrupados com 23% de dissimilaridade, assim como os isolados AG-NT-1, EN-MR-1 e AG-RM-1 em outro clado. O par de isolados AG-ZI-1 e EN-MR-2 apresentou menor dissimilaridade entre si e foi agrupado com aproximadamente 21% de dissimilaridade. O isolado IL-GG-1 quando comparado com o isolado AG-NT-1 e/ou AM-EG-1 mostrou dissimilaridade de 40%.

Figura 3 - Dissimilaridade morfológica (%) entre os 10 isolados de *Sirosporium* sp. obtidos de folhas de *Carya illinoensis*. O dendrograma foi gerado através do método UPGMA, baseado na matriz de distância de Mahalanobis usando as características de crescimento micelial, IVCM, CMD, esporulação, comprimento e largura de conídio e número de septos. O valor do coeficiente de correlação cofenética (r) foi de 0,76.



A análise multivariada também forneceu a contribuição dos caracteres morfológicos para divergência dos isolados. O IVCM foi a característica morfológica que mais contribuiu (40,2%) para diferenciação dos isolados de *Sirosporium* sp.,

seguido pelo CMD, crescimento micelial, largura de conídios, número de septos, esporulação e comprimento de conídios (19,5, 13,7, 13,7, 6,02, 3,8 e 3,0% respectivamente).

Para a construção dos dendrogramas filogenéticos de cada região genômica estudada, ITS (Figura 4) e *tef1- α* (Figura 5), foram escolhidos acessos para comparação, com maior similaridade e cobertura, obtidos a partir do alinhamento *BLAST* no *Genbank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). O tamanho das sequências, ITS e *tef1- α* foram 469 e 646 pares de base, respectivamente. O dendrograma confeccionado com as sequências da região ITS (ITS1, 5.8S e ITS2), agrupou todos os isolados de *Sirosporium* sp. em um único clado (ramo) monofilético. As únicas duas sequências de referência de *Sirosporium diffusum*, uma disponível no *Genbank* (KX 344494), e a outra, obtida do isolado de *Sirosporium diffusum* depositada em 1911 no Westerdijk Fungal Biodiversity Institute, sob número CBS 106.14, também foi agrupada nesse mesmo clado. O suporte de *bootstrap* foi de 99% nesse clado, o que demonstra que a região ITS foi eficaz para a identificação dos isolados do presente estudo, os quais são todos da espécie *S. diffusum*.

Figura 4 – Árvore filogenética obtida a partir das sequências de DNA da região ITS, dos 10 isolados de *Sirosporium diffusum*, patogênicos a noqueira-pecã (*Carya illinoensis*), de acordo com o método estatístico Neighbor-joining. Os números sobre os ramos indicam a porcentagem de repetições da análise de *bootstrap* na qual as repetições foram observadas (1000 repetições).

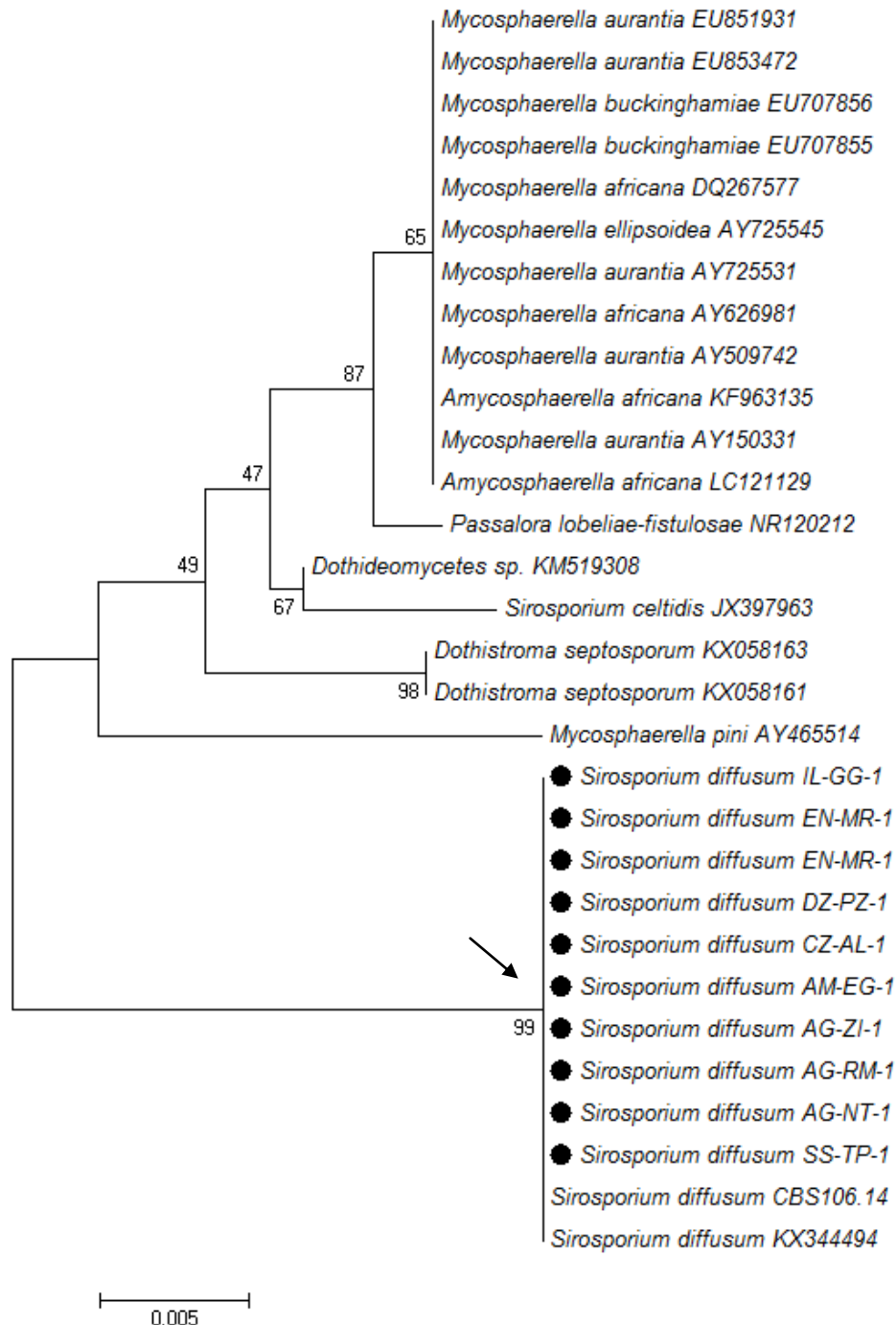
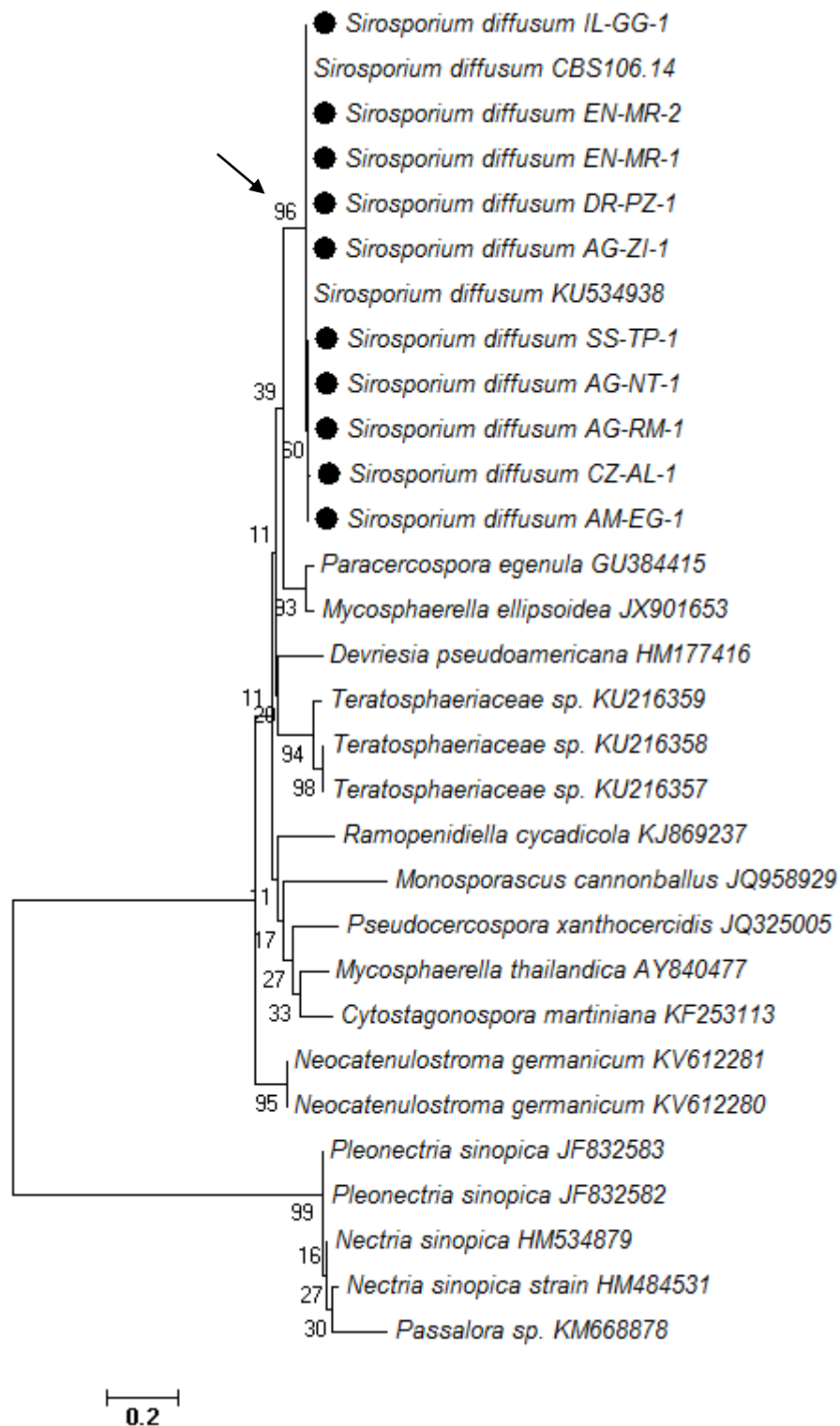


Figura 5 – Árvore filogenética obtida a partir das sequências de DNA do gene *tef1-α*, dos 10 isolados de *Sirosporium diffusum*, patogênicos a noqueira-pecã (*Carya illinoensis*), de acordo com o método estatístico Neighbor-joining. Os números sobre os ramos indicam a porcentagem de repetições da análise de *bootstrap*, na qual as repetições foram observadas (1000 repetições).



Os isolados de *S. diffusum* obtidos nesse estudo não apresentaram similaridade com outras espécies, mostrando-se diferentes do restante, dos depósitos no *genbank* até mesmo em relação ao fungo *Sirosporium celtidis* (Biv.) M.B. Ellis (JX397963), os quais pertencem ao mesmo gênero.

Apesar da região ITS ter sido eficiente para identificar a espécie em questão, alguns estudos relataram que essa região do DNA, por ser mais conservada, é mais eficiente na separação de gêneros, sendo que, para a diferenciação entre as espécies, outras regiões do DNA também devem ser sequenciadas, como o gene do Fator de alongação 1- α (*tef1- α*), da Beta tubulina (β -TUB), Histona H3 (HIS), Calmodulina (CAL) e outros.

O dendrograma filogenético, confeccionado a partir das sequências do gene do Fator de alongação 1- α , também foi eficiente na identificação dos isolados deste estudo, os quais foram agrupados em um clado monofilético juntamente com as duas sequências de referência (*Genbank*, KX 344494 e CBS 106.14), ambas de *S. diffusum*, apresentando suporte de *bootstrap* de 96%.

3.4 DISCUSSÃO

Com o intuito de elucidar esse novo patossistema presente nos plantios de noqueira - pecã do Rio Grande do Sul, esse estudo buscou caracterizar o agente causador através de descrições morfológicas, moleculares e patogênicas, além de relatar os sintomas da doença, pois existem poucos trabalhos científicos, que descrevem esse patossistema no Brasil.

Os sintomas da mancha foliar marrom em *C. illinoensis*, observados nos pomares brasileiros, corroboram com os descritos por Chupp (1953), Ellis (1976), Brison (1974), Stein; Mceachern e Nesbitt (2012) e Poletto et al. (2017) identificando o agente causal como *Sirosporium diffusum*.

O teste de patogenicidade realizado com os dez isolados de *Sirosporium* sp., mostrou serem patogênicos à *C. illinoensis*. Os sintomas observados no teste de patogenicidade corresponderam aos originais, típicos da doença quando observados em campo. Uma característica importante da mancha foliar marrom, já observada por Chupp (1953) e Ellis (1976), são as frutificações do patógeno que se desenvolvem principalmente, na face abaxial do limbo foliar, característica que ajuda na identificação da doença. A mesma característica foi observada no teste de patogenicidade neste estudo.

Os isolados apresentaram diferenças quanto às características de patogênese. A maioria teve incidência máxima (100%), ou seja, todos tiveram habilidade para causar a infecção nos folíolos, no entanto, houve variações quanto à

virulência dos isolados. A virulência segundo Shaner et al. (1992) é um componente da patogenicidade e tem caráter qualitativo. A virulência está associada às propriedades bioquímicas do agente, relacionada à produção de toxinas que contribuem para o aumento da severidade da doença. Pascholati (2011) relata que as toxinas são vistas como fatores de virulência, pois contribuem para a severidade da doença sem serem essenciais para a produção da mesma. Nesse estudo os isolados produziram uma pigmentação vermelha no entorno das colônias, difundido-se no meio de cultura, em alguns isolados essa coloração era mais intensa do que em outros.

A produção desse pigmento vermelho difuso no meio de cultura, no entorno das colônias, é comum em espécies do gênero *Cercospora* e já foi relatada em *Cercospora beticola* Sacc. (LYNCH; GEOGHEGAN, 1979), em *C. piaropi* (Jiménez et al., 2010) e em *C. kikuchii* (Tak. Matsumoto & Tomoy.) M.W. Gardne (UPCHURCH et al., 1991). Esse pigmento vermelho é uma toxina nomeada cercosporina, considerada crucial na patogênese de plantas (UPCHURCH et al., 1991). Almeida et al. (2005) relatam haver uma forte correlação entre o teor de cercosporina e a virulência de *C. kikuchii* em *Glycine max* (L.) Merril, sendo que os isolados com colônias mais pigmentadas foram os mais virulentos. Talvez a variação na virulência entre isolados observada no teste de patogenicidade do presente estudo também tenha relação com a pigmentação produzida pelas colônias, pois os isolados mais pigmentados (vermelho escuro), foram os mais virulentos. A composição desse pigmento produzido por *Sirosporium diffusum* ainda é desconhecida, no entanto, em testes *in vitro*, o filtrado desse fungo mostrou forte potencial inibitório frente à *Fusarium oxysporum* Schldl. e *Lasiodiplodia subglobosa*, patógenos da noqueira-pecã (Favaretto et al., 2017; Poletto et al., 2017).

Apesar da taxonomia atual de fungos estar majoritariamente atrelada a análise de DNA, a descrição das características morfológicas é importante para auxiliar na diferenciação desde isolados, gêneros ou até de espécies, sendo as duas técnicas consideradas fundamentais e complementares.

As características morfológicas são importantes para a diferenciação de espécies dentro do gênero *Sirosporium*. Através das características dos conídios, foi composta uma chave para diferenciação das espécies *S. gliricidiae* (Syd. & P. Syd.) Deighton, *S. diffusum*, *S. stylidii* M.B. Ellis, *S. carissae* J.N. Kapoor, *S. sesseae* (Pat.) M.B. Ellis, *S. munduleae* (Syd. & P. Syd.) M.B. Ellis (ELLIS, 1976). Características

morfológicas como forma, coloração, comprimento, largura e septação de conídios, bem como aspectos dos conidióforos e locais das frutificações nas lesões, compuseram a chave proposta por Chupp (1953), para diferenciação entre espécies dos gêneros *Cercospora* e *Sirosporium*, patogênicas à família *Juglandaceae*, os quais possuem similaridades morfológicas.

O dendrograma de dissimilaridade entre os isolados de *Sirosporium* sp., elaborado com os dados quantitativos da caracterização morfológica, pelo método UPGMA, agrupou os isolados em três grupos, adotando 57% dissimilaridades. O IVCM foi o caractere morfológico que mais contribuiu para diferenciação dos isolados de *Sirosporium* sp. Os estudos realizados até o presente, envolvendo taxonomia de espécies do gênero *Sirosporium*, são baseados, principalmente, em características morfológicas, como tamanho, coloração, forma e septação dos conídios, coloração e formato dos conidióforos e locais das frutificações do fungo nas lesões do fungo. (Chupp, 1953; Ellis, 1976), sendo que elencar os caracteres mais importantes para diferenciação, pode auxiliar na identificação inicial entre espécies ou até entre isolados.

Foram observadas variações entre as características morfológicas dos isolados de *S. diffusum*. É comum nos gêneros fúngicos a mudança de suas características morfológicas dependendo das condições de cultivo a que são submetidos. No entanto, no presente estudo, as variações ocorreram mesmo quando foram cultivados em condições fisiológicas idênticas, o que sugere haver uma variabilidade intraespecífica dos isolados estudados. A reprodução sexuada, a qual é rearranjadora de variabilidade, não é conhecida nessa espécie. No entanto, Kistler e Miao (1992) relatam que, para um patógeno sem reprodução sexual conhecida, a variabilidade intraespecífica pode ser explicada por mutações simples e aberrações cromossômicas como deleções, transposições e perdas cromossômicas.

Na análise filogenética o sequenciamento da região ITS e *tef1- α* foi eficiente para a identificação dos isolados do presente estudo, os quais são todos da espécie *S. diffusum*. O mesmo foi relatado no estudo de Almeida et al. (2005) com isolados de *Cercospora kikuchii*, em que a região ITS foi suficiente para a sua identificação. O sequenciamento da região ITS também foi igualmente suficiente para a classificação de *Sirosporium celtidis*, não sendo necessário analisar outras regiões genômicas complementares (BERBEGAL; PÉREZ-SIERRA; ARMENGOL, 2012).

Dianese et al. (2014), para caracterização de *Cercospora jatrohiphila* A.C. Dianese & Dianese, analisou, além do ITS, os genes CAL e HIS. Para a identificação de *C. zebrina* Pass. Bakhshi; Arzanlou; Babai-Ahari, (2012) utilizaram, além do ITS, sequências parciais dos genes Calmodulina e do Fator de alongação 1- α . De acordo com Geiser et al. (2004), o gene do fator de alongação 1- α tornou-se o marcador mais usual, visto que é um gene de cópia única, altamente informativo, indicado para a separação de espécies relacionadas.

Os resultados deste estudo mostraram, através do teste de patogenicidade, que todos os isolados foram patogênicos e a incidência foi de 100% para maioria deles. No entanto, houve diferenças na capacidade de virulência, variando de 43,8 a 100%. Além disso, um metabólito secundário com pigmentação avermelhada, de composição desconhecida, foi sintetizado pelo patógeno e pode estar ligado a sua capacidade de patogênese. Os isolados de *S. diffusum* estudados apresentam variabilidade intraespecífica, uma vez que apresentaram variações em suas características morfológicas e patogênicas, apesar de não ser observada sua fase teleomórfica. As variáveis que mais contribuem para a separação inicial de isolados foi o IVCM, seguido por CMD e crescimento micelial. A análise filogenética identificou os isolados como *S. diffusum*, o agente causador da mancha foliar marrom em *C. illinoensis* no Brasil, confirmando os resultados encontrados por Poletto et al. (2017). Verificou-se que o sequenciamento da região ITS e do gene *tef1- α* podem ser utilizados para a identificação do fungo *S. diffusum*.

As informações geradas nessa pesquisa sobre o patossistema *S. diffusum* - *Carya illinoensis* servem de base para futuros estudos, sejam eles no âmbito epidemiológico, variabilidade do agente patogênico, caracterização taxonômica, entre outros. Além disso, fornecem subsídios para o desenvolvimento de estratégias de controle e prevenção de doenças.

3.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, A. M. R., et al. Pathogenicity, molecular characterization, and cercosporin content of Brazilian isolates of *Cercospora kikuchii*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, n. 6, p. 594-602, 2005

ALTSCHUL, S. F. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, [S.l.], v. 25, n. 17, p. 3389-3402, 1997.

BAKHSHI, M.; ARZANLOU, M.; BABAI-AHARI, A. Morphological and molecular characterization of *Cercospora zebrina* from black bindweed in Iran. **Plant Pathology & Quarantine**, v. 2, n. 2, 125-130, 2012.

BERBEGAL, M.; PÉREZ-SIERRA, A.; ARMENGOL, J. First Report of *Sirosporium celtidis* causing a foliar disease of european hackberry in Spain. **Plant Disease**, v. 96, n. 12, p. 1826-1826. 2012.

CHUPP, C. **A monograph of the fungus genus *Cercospora***. N.Y: Ithaca, p. 1886-1967, 1953.

CROUS, P. W.; BRAUN, U. ***Mycosphaerella* and its anamorphs: 1. Names published in *Cercospora* and *Passalora***. Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS). 2003.

CRUZ, C. D. GENES: a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. **Acta Scientiarum**, v. 35, n. 3, p. 271-276, 2013.

DHINGRA O. D.; SINCLAIR J. B. **Basic Plant Pathology Methods**. Boca Raton FL: Lewis Publishers, 1995, p. 434.

DIANESE, A. C. et al. New *Cercospora* species on *Jatropha curcas* in central Brazil. **Mycology Progress**, v. 13, p. 994. 2014.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, [S.I.], v. 12, p. 13-15, 1991.

ELLIS, M. B. **More dematiaceous Hyphomycetes**. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England. 1976.

FAVARETTO, R. F. et al. Inibição do crescimento de *Lasiodiplodia subglobosa* por filtrado fúngico. I Simpósio Latino-Americano sobre Bioestimulantes na Agricultura. Florianópolis - SC, Brasil, 2017.

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

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, [S.I.], v. 41, n. 41 p. 95-98. 1999.

JIMÉNEZ, M. et al. Isolation, characterization, and production of red pigment from *Cercospora piaropi*, a biocontrol agent for water hyacinth. **Mycopathologia**, v. 169, n. 4, p. 309-314, 2010.

KISTLER, H. C.; MIAO, V. P. W. New modes of genetic change in filamentous fungi. **Annual Review of Phytopathology**, v. 30, n. 1, p. 131-153, 1992.

- LANFRANCO, L. et al. A combined morphological and molecular approach to characterize isolates of arbuscular mycorrhizal fungi in *Gigaspora* (*Glomales*). **New Phytologist**, v. 152, n. 1, 169-179. 2001.
- LAZAROTTO, M. et al. First report of *Pestalotiopsis clavispora* causing leaf spot of *Carya illinoensis* in Brazil. **Plant Disease**, v. 96, n. 12, p. 1826-1826, 2012.
- LYNCH, F. J.; GEOGHEGAN, M. J. The role of pigmentation in survival of the leaf spot fungus *Cereospora beticola*. **Ann. Appl. Biol.** v. 91, n. 3, p. 313-318, 1979.
- MAGUIRE, J. D. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigours. **Crop Science**, Madison, v. 2, n. 1, p. 176-177, 1962.
- OLIVEIRA, J. A. Efeito do tratamento fungicida em sementes no controle de tombamento de plântulas de pepino (*Cucumis sativus* L.) e pimentão (*Capsicum annum* L.). 1991. 111 f. Dissertação (**Mestrado em Fitossanidade**) - Universidade Federal de Lavras. Lavras – MG, 1991.
- PASCHOLATI, S. F. Fisiologia do parasitismo: como os patógenos atacam as plantas. In: Amorim, L.; Rezende, J.A.M. & Bergamin Filho, A. (ed). **Manual de Fitopatologia**. Vol. 1. 4 ed. São Paulo, Ed. Agr. Ceres, Cap. 34 – p. 543-591. 2011.
- POLETTTO, T. et al. First report of *Sirosporium diffusum* causing leaf spot on *Carya illinoensis* in Brazil. **Plant Disease**, n. 101, v. 2, p. 381-381, 2017.
- POLETTTO, T. et al. Efeito do filtrado de *Sirosporium diffusum* sobre o crescimento micelial de *Fusarium oxysporum*. I Simpósio Latino-Americano sobre Bioestimulantes na Agricultura. Florianópolis - SC, Brasil, 2017.
- POLETTTO et al., First report of stem canker caused by *Lasiodiplodia subglobosa* on *Carya illinoensis* in Brazil. **Plant Disease**. v. 100, n. 5, p. 1016, 2016.
- POLETTTO, T. et al. Métodos de superação de dormência da semente de noqueira-pecã *Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch. **Revista Árvore**, v. 39, n. 6, p. 1111-1118, 2015.
- SCHMITZ, A.; RIESNER, D. Purification of nucleic acids by selective precipitation with polyethylene glycol 6000. **Analytical Biochemistry**, v. 354, n. 2, p. 311-313, 2006.
- SHANER, G. et al. Nomenclature and concepts of pathogenicity and virulence. **Annual Review of Phytopathology**, v. 30, n. 1, p. 47-66, 1992.
- SHOUKOUHI, P.; BISSETT, J. **Preferred primers for sequencing the 5'end of the translation elongation factor 1-alpha gene (eEF1a1)**, 2009. Disponível em: <http://www.isth.info/methods>.
- STEIN, L. A.; MCEACHERN, G. R.; NESBITT, M. L. **Texas Pecan Handbook**, Texas A & M AgriLife Extension Service, College Station. p.199. 2012.

TAMURA, K. et al. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v. 24, n. 8, p. 596-1599, 2007.

TEIXEIRA, H.; VIEIRA, M.G.G.C.; MACHADO, J.C. Marcadores morfofisiológicos e isoenzimáticos na análise da diversidade genética de isolados de *Acremonium strictum*. **Fitopatologia Brasileira**, n. 29, p. 413-418, 2004.

UPCHURCH R. G, et al. Mutants of *Cercospora kikuchii* altered in cercosporin synthesis and pathogenicity. **Applied Environmental Microbiology**, v. 57, n. 10, p. 2940-2945, 1991.

WALKER, C. et al. First report of species in the *Cladosporium cladosporioides* complex causing pecan leaf spot in Brazil. **Journal of Plant Pathology**, v. 98, n. 2, p. 370, 2016.

WHITE, T. J. et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. **PCR protocols: A Guide to Methods and Applications**, v. 18, n. 1, p. 315-322, 1990.

4. CAPÍTULO III: EFEITO DO MEIO DE CULTURA, REGIME DE LUZ E TEMPERATURA SOBRE O DESENVOLVIMENTO DE *Sirosporium diffusum*

Resumo

O fungo *Sirosporium diffusum* é um patógeno da noqueira-pecã, o qual causa sérios danos à folhagem de plantas adultas, bem como em mudas no viveiro. Essa espécie fúngica, quando cultivada em meios artificiais não se desenvolve satisfatoriamente. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de diferentes condições físicas no desenvolvimento de *S. diffusum*. No primeiro ensaio, combinaram-se oito meios de cultura e cinco regimes de luz, enquanto no segundo, os três melhores tratamentos do ensaio anterior que conferiram maior esporulação foram combinados com três temperaturas. Os ensaios foram conduzidos em arranjo bifatorial, dispostos em delineamento inteiramente casualizado, com seis repetições. Os meios V8, V8CaCO₃ e CA, sob fotoperíodo de 24h, resultaram em maior esporulação, com 29×10^4 , 35×10^4 e 41×10^4 conídios.mL⁻¹, respectivamente. A temperatura em que houve maior esporulação foi $20 \pm 1^\circ\text{C}$ para todos os meios de cultura, com destaque para o V8CaCO₃ e o CA. As melhores condições artificiais de cultivo, em que *S. diffusum* apresenta bom crescimento micelial e esporulação de forma conjunta, foram obtidas com fotoperíodo de 24h, temperatura de $20 \pm 1^\circ\text{C}$ e com os meios de cultura V8CaCO₃ ou CA.

Palavras chave: *Carya illinoensis*; esporulação; mancha foliar marrom; cultivo *in vitro*

EFFECTS OF CULTURE MEDIUM, LIGHT REGIME AND TEMPERATURE ON THE DEVELOPMENT OF *Sirosporium diffusum*

Abstract

Sirosporium diffusum is a fungal pathogen that attacks pecan trees and seriously damages the foliage of adult plants and seedlings. This fungal species is difficult to grow satisfactorily in a culture medium. Therefore the aim of this study was to evaluate the effects of different physical conditions on the development of *S. diffusum*. In the first assay, eight culture media and five light regimes were combined,

while in the second, the three treatments that promoted highest sporulation were combined with three temperatures. The trials were conducted in a two-factorial arrangement in a fully randomized design with six replicates. V8, V8CaCO₃, and CA media under a 24h photoperiod produced the highest respective sporulations: 29 x 10⁴, 35 x 10⁴, and 41 x 10⁴ conidia.mL⁻¹. The best temperature for sporulation was 20 ± 1°C for all culture media, especially V8CaCO₃ and CA. The best artificial conditions for obtaining good mycelial growth and sporulation consisted of a photoperiod of 24h, temperature of 20 ± 1°C and V8CaCO₃ or CA culture medium.

Keywords: *Carya illinoensis*, sporulation, brown leaf spot; *in vitro* cultivation

4.1 INTRODUÇÃO

A noqueira-pecã [*Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch], família Juglandaceae, é uma árvore decídua nativa de zonas temperadas da América do Norte (POLETTO et al., 2015a). A espécie compõe um dos sistemas florestais exóticos mais antigos da região sul do Brasil, especialmente no estado do Rio Grande do Sul, porém somente nos últimos anos é que a cultura passou a ser valorizada comercialmente (POLETTO et al., 2015b).

No Brasil, os plantios com maiores extensões de área plantada, encontram-se nas regiões do Vale do Taquari, Rio Pardo e Central do Estado do Rio Grande do Sul (POLETTO et al., 2015b). A cultura da noqueira também está presente em inúmeras pequenas propriedades rurais distribuídas no Estado que, além de diversificar a produção, é utilizada em sistemas agrossilvipastoris, sombreamentos de aviários, para fins madeireiros e ornamentais. O cultivo dessa espécie cresce a cada ano, onde novos pomares estão sendo implantados, não somente no Rio Grande do Sul, mas também nos Estados de Santa Catarina e Paraná. Segundo dados do IBGE, (2017) em 2015 o Rio Grande do Sul produziu 2.498.000 kg de frutos perfazendo 48% da produção nacional.

Entre os principais entraves da cadeia produtiva, destaca-se a incidência de doenças, como o cancro do tronco causado por *Lasiodiplodia subglobosa* e, as que causam manchas foliares, como a mancha foliar de cladosporium (*Cladosporium* spp.) e a mancha foliar de pestalotiopsis (*Pestalotiopsis clavispora*) ambas causando

danos em viveiro e em plantios a campo (LAZAROTTO et al., 2012; POLETTO et al., 2016; WALKER et al., 2016).

O fungo *Sirosporium diffusum* (Heald & Wolf) Deighton é um patógeno da cultura da noqueira-pecã. Já foi relatado em diversos países causando mancha foliar na espécie, como nos Estados Unidos, México e África do Sul (CROUS; BRAUN, 2003). No Brasil, a doença foi constatada em 2016, causando inicialmente, manchas foliares e posterior desfolha das plantas prejudicando a quantidade e a qualidade final dos frutos. A doença também ataca mudas em fase de viveiro, ocasionando desfolha e atraso em seu desenvolvimento (POLETTO et al., 2017).

Apesar da importância desse patógeno, não foram encontrados na literatura estudos sobre as condições físicas adequadas para o seu crescimento e desenvolvimento *in vitro*. Essas informações são essenciais para a viabilização de pesquisas subsequentes. O cultivo de fungos fitopatogênicos em condições artificiais é de grande importância em trabalhos que demandam material biológico inoculante puro e em quantidades suficientes, como ocorre em testes de resistência genética de hospedeiros, inoculações artificiais e classificação taxonômica. Por isso, a determinação das condições ótimas de crescimento e esporulação *in vitro* são essenciais. No entanto, quando esses estudos envolvem espécies de fungos que apresentam crescimento lento e esporulação reduzida, como é o caso do *S. diffusum*, essa deficiência pode até inviabilizar a continuidade dos estudos. Da Cruz; Prestes; Maciel, (2009) destacam que pela dificuldade de se conseguir padronizar condições ideais para a esporulação de fungos fitopatogênicos algumas pesquisas tem dificuldades de ser conduzidas.

Fatores abióticos, como a temperatura, luminosidade e composição do meio de cultura, são capazes tanto de induzir ou inibir o desenvolvimento vegetativo e reprodutivo da grande maioria dos fungos (DHINGRA; SINCLAIR, 1995; BRUNELLI et al., 2006). Em *Magnaporthe grisea* (T.T. Hebert) M.E. Barr, por exemplo, a composição do meio de cultura influencia as características culturais das colônias fúngicas e a esporulação (DIAS NETO et al., 2010). A produção de proteínas e enzimas é influenciada pela temperatura e são responsáveis pela manutenção da célula fúngica. Enquanto que a luminosidade, tem ação direta na célula fúngica, isso significa que pode induzir ou inibir a formação das estruturas de reprodução, embora algumas espécies são indiferentes a quantidade e/ou qualidade da luz (GRIFFIN, 1994; HAWKER, 1957).

Estudos sobre o efeito de meios de cultura, regimes de luz e temperaturas para fungos, em condições artificiais, já foram realizados em alguns fungos, como em *Paracercospora fijiensis* (M. Morelet) Deighton (HANADA; GASPAROTTO; PEREIRA, 2002), *Cercospora zea-maydis* Tehon & E.Y. Daniels (BRUNELLI et al., 2006), *Magnaporthe grisea* (DIAS NETO et al., 2010), *Cercospora coffeicola* Berk. & Cooke (SILVA et al., 2016), *Pseudocercospora vitis* (Lév.) Speg. (MAIA et al., 2015), *Passalora sojina* (Hara) Poonam Srivast. (CAMARA et al., 2014). No entanto, não há estudos sobre a influência de agentes físicos no desenvolvimento de *S. diffusum*. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de diferentes meios de cultura, regimes de luz e temperaturas no crescimento e na esporulação de *S. diffusum*, patógeno da noqueira-pecã.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Local dos experimentos

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Fitopatologia, pertencente ao Departamento de Defesa Fitossanitária da Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil.

Para a realização dos testes foi utilizado um isolado caracterizado utilizado no capítulo II (AG-RM-1), de *S. diffusum*, obtido em folhas sintomáticas de noqueira-pecã coletadas no município de Anta Gorda, Estado do Rio Grande do Sul, Brasil, o qual está depositado na micoteca do mesmo laboratório e no Herbário SMDB (Santa Maria Departamento de Biologia) do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Santa Maria sob código de acesso 16.434. Para a produção do inóculo, a cultura do fungo foi repicada para placas de Petri contendo meio V8, e mantidas em incubadora a $24 \pm 1^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12 h por 56 dias.

4.2.2 Ensaio 1: efeito do meio de cultura e regime de luz

Neste experimento foram combinados diferentes meios de cultura e regimes de luminosidade. O delineamento estatístico utilizado foi o inteiramente casualizado em arranjo bifatorial, sendo utilizadas seis repetições.

Os meios de cultura utilizados foram: **V8** [100 mL de V8 (Spicy Hot), 20 g de ágar e 900 mL de água destilada], **V8 CaCO₃** (100 mL de V8 (Spicy Hot), 2 g de CaCO₃, 20 g de ágar e 900 mL de água destilada), **BCA** (200 mL de extrato aquoso de 20 g de batata e 20 g de cenoura, 20 g de ágar e água destilada, quantidade suficiente para 1.000 mL), **CA** (200ml de extrato aquoso de 200 g cenoura, 20 g de ágar e água destilada, quantidade suficiente para 1.000 mL) **ACA** (1.000 mL de água de coco (Ducoco®) e 20 g de ágar), **STT** (200 mL de suco de tomate temperado (Superbom®), 20 g de ágar e água destilada, quantidade suficiente para 1.000 mL) **BDA** (extrato de 200 g de batata, 20 g de dextrose, 20 g de ágar e água destilada, quantidade suficiente para 1.000 mL), e **AV** (50 g de farinha de aveia, 15 g de ágar e 1.000 mL de água destilada). Todos os meios de cultura preparados foram autoclavados a 120 °C por 30 min.

Os regimes de luz foram compostos por: **EC** (escuro contínuo), **SEQ E-UV** (sete dias no escuro / sete dias sob luz negra), **SEQ E-L** (sete dias no escuro / sete dias sob luz fluorescente), **FT-12h** (fotoperíodo de 12h sob luz fluorescente), **FT-24h** (fotoperíodo de 24h sob luz fluorescente).

Nos tratamentos que incluíram regime de luz em que parte ou todo tempo ocorreu no escuro, as placas foram envoltas por papel alumínio e colocadas em uma caixa de papelão para que não recebessem qualquer luminosidade. Com SEQ E-UV foi utilizada uma lâmpada de luz negra fluorescente compacta (Golden, 46 W), emitindo radiação com comprimento de onda próximo ao ultravioleta (NUV, de *near ultraviolet*) com potência de 46 w, permanecendo a 45 cm de distância das placas. Nos tratamentos que incluíram fotoperíodo foram utilizadas quatro lâmpadas fluorescentes (General Electric F40T, 40W).

Na implantação do ensaio, um disco de meio de cultura V8 de 5 mm de diâmetro contendo micélio de *S. diffusum* com 56 dias de crescimento foi transferido para o centro das placas de Petri (90 mm de diâmetro), as quais continham os diferentes meios de cultura, conforme o tratamento e mantidos em temperatura de 24 ± 1°C em incubadora.

Em cada tratamento foram avaliados o crescimento micelial semanal e o total, aos 56 dias, sendo realizadas duas medidas da colônia em sentidos diametralmente opostos. Posteriormente, foi determinada a média de crescimento em cada placa (mm/semana). Esses dados foram utilizados para o cálculo do Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) do fungo, empregando-se a fórmula de Maguire

(1962), adaptada por Oliveira (1991): $IVCM = ((D-Da)/N)$, onde: IVCM = índice de velocidade de crescimento micelial; D = diâmetro médio atual da colônia; Da = diâmetro médio da colônia do dia anterior; N = número de semanas após a inoculação.

Para a avaliação da esporulação aos 56 dias, foram adicionados 4 mL de água destilada e autoclavada em cada placa, sendo este volume suficiente em função do tamanho da colônia ser relativamente pequena. Após, foi realizada a raspagem da superfície da colônia para a liberação dos conídios. A seguir, a suspensão foi pipetada e filtrada em camada de dupla gaze para retenção de fragmentos de micélio e meio de cultura. A contagem da concentração de esporos foi realizada com o auxílio da câmara de Neubauer.

4.2.3 Ensaio 2: efeito do meio de cultura e temperatura

Um segundo experimento foi realizado com o intuito de avaliar o comportamento de *S. diffusum* quando submetido a diferentes temperaturas. O delineamento estatístico utilizado foi o inteiramente casualizado em arranjo bifatorial, sendo utilizadas seis repetições.

Para isso, selecionaram-se os meios de cultura que promoveram maior esporulação média no ensaio 1 (V8, V8CaCO₃ e CA) e, também o meio BDA, por ser um meio padrão para crescimento de fungos. Além disso, foi utilizado o regime de luminosidade que gerou maior esporulação média - fotoperíodo contínuo (FT-24h), no ensaio anterior. O isolado inoculado nos diferentes meios de cultura foi submetido a três diferentes temperaturas $20 \pm 1^\circ\text{C}$, $24 \pm 1^\circ\text{C}$ e $28 \pm 1^\circ\text{C}$. Estas temperaturas foram escolhidas considerando a temperatura ótima de crescimento para a maioria dos fungos e, portanto, verificar se pequenas variações são suficientes para induzir ou inibir o desenvolvimento do fungo e não testar os limites térmicos de crescimento das espécie. A composição dos meios de cultura, a implantação do ensaio e as variáveis avaliadas foram idênticas àquelas descritas no ensaio 1.

4.2.4 Procedimento estatístico

Inicialmente, foi verificado se os dados de ambos os ensaios, apresentavam distribuição normal pelo teste de Shapiro-Wilk, utilizando-se o *software* BioEstat 5.0

(AYRES et al., 2007). Os dados de IVCM e esporulação, os quais não seguiram a distribuição normal, foram transformados segundo $\sqrt{(x+0,5)}$ antes da análise da variância. A comparação das médias entre os tratamentos foi feita pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro, utilizando-se o *software* SISVAR 5.3 (FERREIRA, 2008).

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Ensaio 1: efeito do meio de cultura e regime de luz

Houve interação significativa entre o meio de cultura e o regime de luz, demonstrando que o crescimento micelial, o índice de velocidade de crescimento micelial e a esporulação são influenciados pelos dois fatores integrados (meio de cultura e luminosidade) aos quais o fungo foi submetido, diminuindo a contribuição estatística dos fatores isolados (Tabela 1).

Os resultados da esporulação demonstraram uma variação comportamental do fungo em função das diferentes condições de luminosidade e nutrientes a que foi submetido (Tabela 2). Não houve esporulação das colônias quando submetidas ao regime escuro - luz negra (SEQ E-UV) em nenhum dos meios de cultura, o que indica que esse regime de luz é muito prejudicial ao desenvolvimento do fungo, assim como foi observado nas outras duas variáveis analisadas, IVCM e crescimento micelial.

Tabela 1- Resumo da análise de variância para as variáveis crescimento micelial, índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) e esporulação de *Sirosporium diffusum* cultivado em diferentes meios de cultura e regimes de luz, e sua interação.

Meios x Luminosidade				
FV	GL	Q.M		
		Crescimento micelial	IVCM	Esporulação
Meios (M)	7	173,62*	0,14*	341228,43*
Luz (L)	4	1824,89*	9,08*	768262,95*
M x L	28	41,73*	0,78*	80285,75*
Resíduo	200	15,08	0,08	7367,92
Total	239			
CV(%)		20,39	10,10	58,65

* Significativo pelo teste F, ao nível de 95% de confiança.

Igualmente, o escuro contínuo (EC) não estimulou a produção de esporos de *S. diffusum*, já em fotoperíodo de 12 h (FT-12h), houve início de esporulação, apesar de baixa, nos meios CA, BCA, V8, V8CaCO₃ (Tabela 2), indicando que a luz é um fator fundamental para promover a esporulação nessa espécie. O fotoperíodo de 24 horas (FT-24h) e sequencial luz escuro (SEQ E-L) proporcionaram a produção de esporos em todos os meios de cultura testados, destacando-se CA, V8 e V8CaCO₃ (Tabela 2).

No presente ensaio, um dos meios de cultura que melhor induziu à produção de esporos foi o meio CA, juntamente com V8 e V8CaCO₃. No meio CA, contudo, os conídios apresentaram características que mais se aproximaram das originais quando do isolamento inicial a partir de folhas com sintomas. Dessa forma, esse pode ser o meio de cultura mais adequado para estudos envolvendo caracterização morfológica.

Tabela 2 – Médias de esporulação de *Sirosporium diffusum* em função da interação entre diferentes meios de cultura e regimes de luz.

Meio de Cultura ¹	Regime de luminosidade ²				
	Esporulação (x10 ⁴ conídios.mL ⁻¹) ³				
	SEQ E-UV	FT-12h	EC	SEQ E-L	FT-24h
V8 ¹	0,0 aC*	6,0 aB	0,0 aC	15,0 aA	29,0 aA
V8CaCO ₃	0,0 aC	4,3 aB	0,0 aC	25,0 aA	35,0 aA
BDA	0,0 aB	0,0 aB	0,0 aB	2,4 bA	3,4 bA
ACA	0,0 aB	0,0 aB	0,0 aB	1,9 bA	4,9 bA
BCA	0,0 aA	4,1 aA	3,9 aA	2,0 bA	5,0 bA
CA	0,0 aB	7,1 aB	3,6 aB	21,0 aA	41,0 aA
STT	0,0 aA	0,0 aA	0,0 aA	1,4 bA	0,5 bA
AV	0,0 aB	0,0 aB	0,0 aB	1,0 bB	4,5 bA

* Médias seguidas por mesma letra minúscula não diferem na coluna e médias seguidas por mesma letra maiúscula não diferem na linha pelo teste de Scott-Knott a 5% de erro.

¹ Meio de cultura: **V8**: V8 (Spicy Hot®) - ágar; **V8CaCO₃**: V8 (Spicy Hot®) - CaCO₃ - ágar; **BDA**: batata - dextrose - ágar; **ACA**: água de coco - ágar; **BCA**: batata - cenoura - ágar; **CA**: cenoura - ágar; **STT**: suco de tomate temperado - ágar; e **AV**: farinha de aveia - ágar.

² Regimes de luminosidade: **SEQ E-UV**: sete dias em escuro / sete dias em luz negra; **FT-12h**: fotoperíodo de 12h em luz fluorescente; **EC**: escuro contínuo; **SEQ E-L**: sete dias em escuro / sete dias em luz fluorescente; **FT-24h**: fotoperíodo de 24h de luz fluorescente.

³ Concentração de esporos obtida pela adição de 4 mL de água por placa.

Para a variável crescimento micelial, as maiores médias foram obtidas em fotoperíodo de 24 horas (FT-24h) nos meios de cultura V8 e BCA e em SEQ E-L nos meios V8, BDA e BCA, embora outros regimes de luz também apresentaram bons resultados, como EC juntamente com o meio AV (Tabela 3). O regime sequencial escuro luz negra (SEQ E-UV) prejudicou o desenvolvimento das colônias, o qual teve as menores médias de crescimento. Provavelmente, o fungo tenha sido exposto à dose excessiva da luz negra ou não tolera esse tipo de luz para seu desenvolvimento.

Tabela 3 – Médias de crescimento micelial (mm) de *Sirosporium diffusum* em função da interação entre meios de cultura e regimes de luz.

Meio de Cultura ¹	Regime de luminosidade ²				
	SEQ E-UV ²	FT-12h	EC	SEQ E-L	FT-24h
V8	8,5 aD*	16,2 aC	22,0 cB	27,0 aA	28,8 aA
V8CaCO ₃	9,6 aB	18,1 aA	19,3 cA	21,1 bA	22,9 bA
BDA	9,4 aC	17,4 aB	24,8 bA	25,0 aA	23,3 bA
ACA	9,1 aB	17,6 aA	21,6 cA	20,3 bA	22,2 bA
BCA	9,6 aD	19,8 aC	24,3 bB	29,0 aA	31,2 aA
CA	8,2 aB	18,9 aA	19,4 cA	20,8 bA	20,9 bA
STT	7,2 aB	15,1 aA	18,6 cA	17,9 bA	14,9 cA
AV	8,1 aC	20,4 aB	29,9 aA	21,7 bB	21,8 bB

* Médias seguidas por mesma letra minúscula não diferem na coluna e médias seguidas por mesma letra maiúscula não diferem na linha pelo teste de Scott-Knott a 5% de erro.

¹ Meio de cultura: **V8**: V8 (Spicy Hot®) - ágar; **V8CaCO₃**: V8 (Spicy Hot®) - CaCO₃ - ágar; **BDA**: batata - dextrose - ágar; **ACA**: água de coco - ágar; **BCA**: batata - cenoura - ágar; **CA**: cenoura - ágar; **STT**: suco de tomate temperado - ágar; e **AV**: farinha de aveia - ágar.

² Regimes de luminosidade: **SEQ E-UV**: sete dias em escuro / sete dias em luz negra; **FT-12h**: fotoperíodo de 12h em luz fluorescente; **EC**: escuro contínuo; **SEQ E-L**: sete dias em escuro / sete dias em luz fluorescente; **FT-24h**: fotoperíodo de 24h de luz fluorescente.

De acordo com os resultados, *S. diffusum* expressou as maiores médias para a variável Índice de velocidade de crescimento micelial nos meios de cultura BCA, V8 e V8CaCO₃ quando submetidos ao regime de luz contínua (FT-24h) (Tabela 4). Já em regime de luz sequencial escuro luz (SEQ E-L) as maiores médias foram nos meios V8, BDA e BCA e AV. Em regime escuro contínuo (EC) o meio AV foi o que proporcionou maior IVCM. Apesar da significância da interação, de maneira geral, os

melhores resultados para IVCM foram no regime de luz FT-24h e SEQ E-L, os quais estimularam o fungo a formar a colônia com maior rapidez.

Tabela 4 – Médias de Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) de *Sirosporium diffusum* em função da interação entre meios de cultura e regimes de luz.

Meio de Cultura ¹	Regime de luminosidade ²				
	SEQ E-UV	FT-12h	EC	SEQ E-L	FT-24h
V8	3,6 aC*	6,4 aB	7,8 cB	10,4 aA	10,8 aA
V8CaCO ₃	4,2 aC	8,1 aB	7,1 cB	8,2 bB	10,5 aA
BDA	4,3 aC	6,9 aB	9,4 bA	10,1 aA	9,5 bA
ACA	3,7 aB	7,3 aA	8,7 cA	8,3 bA	9,5 bA
BCA	3,7 aC	8,2 aB	8,8 cB	10,2 aA	12,1 aA
CA	3,1 aB	7,8 aA	7,5 cA	7,9 bA	8,9 bA
STT	2,4 aB	5,7 aA	7,5 cA	6,4 bA	6,3 cA
AV	4,5 aC	7,3 aB	11,3 aA	9,5 aA	9,8 bA

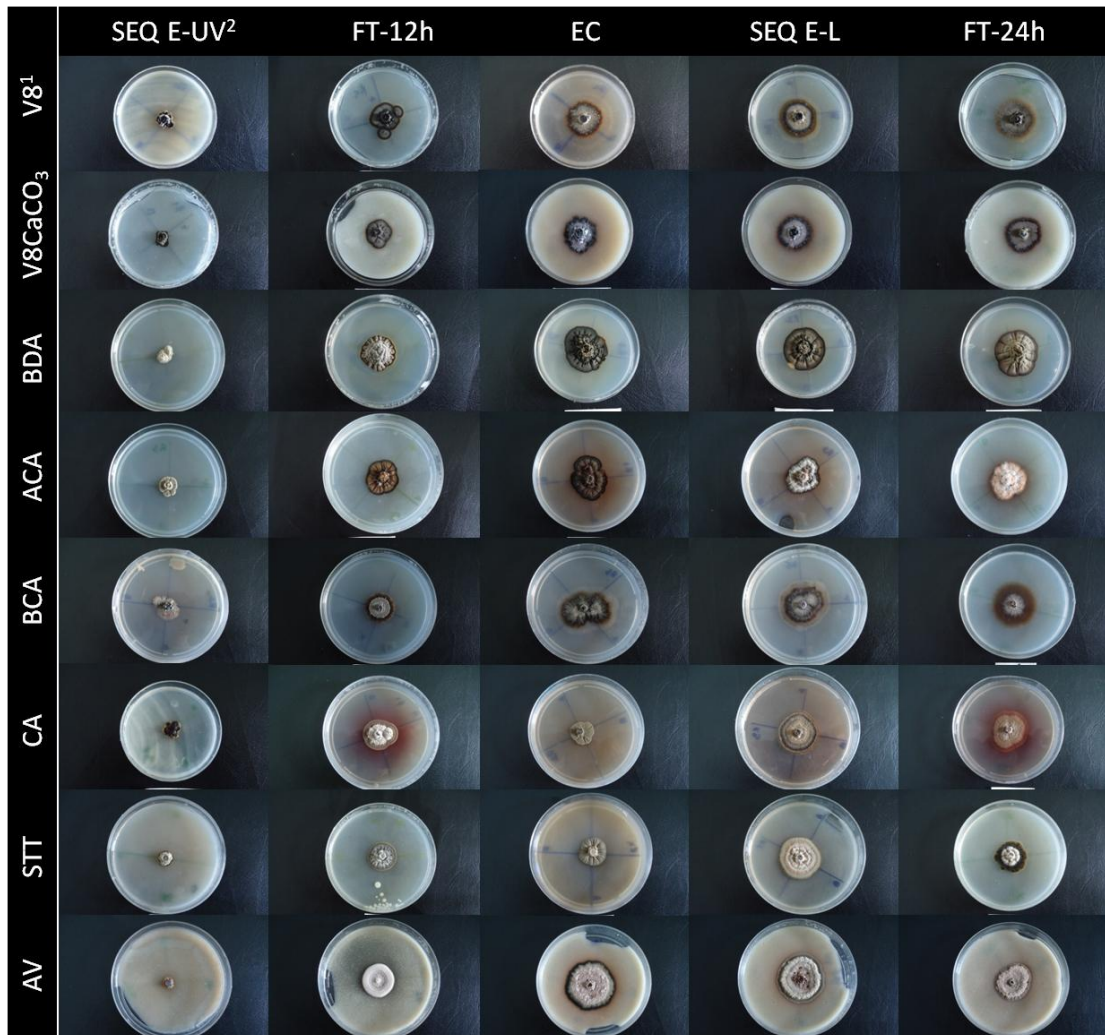
* Médias seguidas por mesma letra minúscula não diferem na coluna e médias seguidas por mesma letra maiúscula não diferem na linha pelo teste de Scott-Knott a 5% de erro.

¹ Meio de cultura: **V8**: V8 (Spicy Hot®) - ágar; **V8CaCO₃**: V8 (Spicy Hot®) - CaCO₃ - ágar; **BDA**: batata - dextrose - ágar; **ACA**: água de coco - ágar; **BCA**: batata - cenoura - ágar; **CA**: cenoura - ágar; **STT**: suco de tomate temperado - ágar; e **AV**: farinha de aveia - ágar.

² Regimes de luminosidade: **SEQ E-UV**: sete dias em escuro / sete dias em luz negra; **FT-12h**: fotoperíodo de 12h em luz fluorescente; **EC**: escuro contínuo; **SEQ E-L**: sete dias em escuro / sete dias em luz fluorescente; **FT-24h**: fotoperíodo de 24h de luz fluorescente.

Em decorrência da formação de diferentes condições físicas, proporcionadas pelos meios de cultura com composição variada e regimes de luz, notou-se, visualmente, uma expressiva diferenciação nas características qualitativas das colônias. Em meio AV, por exemplo, as colônias desenvolveram micélio aéreo cotonoso de coloração clara (Figura 1). Em outras interações as quais incluíram meio BDA e V8 as colônias apresentaram predominantemente micélio rasteiro de coloração escura. Em meio CA, as colônias formaram um micélio rasteiro de coloração marrom avermelhado, além de produzir um halo periférico de coloração avermelhada bem expressiva (Figura 1).

Figura 1 – Colônias de *Sirosporium diffusum* após 56 dias de crescimento cultivadas em diferentes meios de cultura e regimes de luz.



¹ Meio de cultura: **V8**: V8 (Spicy Hot®) - ágar; **V8CaCO₃**: V8 (Spicy Hot®) - CaCO₃ - ágar; **BDA**: batata - dextrose - ágar; **ACA**: água de coco - ágar; **BCA**: batata - cenoura - ágar; **CA**: cenoura - ágar; **STT**: suco de tomate temperado - ágar; e **AV**: farinha de aveia - ágar.

² Regimes de luminosidade: **SEQ E-UV**: sete dias em escuro / sete dias em luz negra; **FT-12h**: fotoperíodo de 12h em luz fluorescente; **EC**: escuro contínuo; **SEQ E-L**: sete dias em escuro / sete dias em luz fluorescente; **FT-24h**: fotoperíodo de 24h de luz fluorescente.

4.3.2 Ensaio 2: efeito do meio de cultura e temperatura

Houve efeito significativo da interação entre o meio de cultura e a temperatura (Tabela 5). A interação que promoveu melhor crescimento micelial ocorreu com a combinação do meio de cultura V8 e temperatura de $24 \pm 1^\circ\text{C}$. As interações entre os meios de cultura V8CaCO₃, BDA e CA e as temperatura de $20 \pm 1^\circ\text{C}$ e $24 \pm 1^\circ\text{C}$ não diferiram entre si. Com o aumento da temperatura para $28 \pm 1^\circ\text{C}$ não foi obtido bom desenvolvimento das colônias, essa temperatura prejudicou o crescimento micelial de *S. diffusum* (Tabela 6).

Tabela 5 - Resumo da análise de variância para as variáveis crescimento micelial, índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) e esporulação de *Sirosporium diffusum* em função de diferentes meios de cultura e temperaturas, e sua interação.

Meios x Temperaturas				
FV	GL	Q.M		
		Crescimento micelial	IVCM	Esporulação
Meios (M)	3	57,14*	0,36*	2275548,55*
Temperatura (T)	2	795,95*	8,62*	10902124,00*
M x T	6	31,35*	0,14*	1358012,88*
Resíduo	60	12,77	0,07	53591,54
Total	71			
CV(%)		18,62	10,32	32,33

* Significativo pelo teste F, ao nível de 95% de confiabilidade.

De uma forma geral, *S. diffusum* teve um melhor crescimento quando submetido à temperatura de $24 \pm 1^\circ\text{C}$, seguido pela temperatura de $20 \pm 1^\circ\text{C}$. Já para a variável IVCM a temperatura de $24 \pm 1^\circ\text{C}$ proporcionou os maiores valores, independente do meio de cultura, ou seja, nessa temperatura as colônias desenvolveram-se rapidamente, diferindo das médias obtidas nos demais tratamentos.

Tabela 6 – Crescimento micelial (mm), índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) e esporulação de *Sirosporium diffusum* submetido a quatro meios de cultura e três temperaturas sob fotoperíodo contínuo.

Meio de cultura ¹	Crescimento micelial		
	Temperatura (± 1 °C)		
	20	24	28
V8	21,6 aB	28,8 aA	13,3 aC
V8CaCO ₃	23,6 aA	22,9 bA	13,9 aB
BDA	19,2 aA	23,3 bA	10,0 aB
CA	18,8 aA	20,9 bA	14,0 aB

Meio de cultura	IVCM		
	Temperatura (°C)		
	20	24	28
V8	7,1 aB	10,8 aA	3,9 aC
V8CaCO ₃	7,6 aB	10,5 aA	3,4 aC
BDA	5,5 bB	9,5 aA	2,1 bC
CA	5,5 bB	8,9 aA	4,2 aB

Meio de cultura	Esporulação ($\times 10^4$ conídios.mL ⁻¹) ²		
	Temperatura (°C)		
	20	24	28
V8	99,7 cA	29,0 aB	3,5 aB
V8CaCO ₃	769,3 aA	35,0 aB	8,1 aB
BDA	91,8 cA	3,4 aB	0,8 aB
CA	198,3 bA	41,0 aB	26,2 aB

* Médias seguidas por mesma letra minúscula não diferem na coluna e médias seguidas por mesma letra maiúscula não diferem na linha pelo teste de Scott-Knott a 5% de erro.

¹ Meio de cultura: **V8**: V8 (Spicy Hot®) - ágar; **V8CaCO₃**: V8 (Spicy Hot®) - CaCO₃ - ágar; **BDA**: batata - dextrose - ágar; e **CA**: cenoura - ágar;

² Concentração de esporos obtida pela adição de 4 mL de água por placa.

Um aumento na esporulação foi obtido quando as colônias de *S. diffusum* foram cultivadas à temperatura de 20 ± 1 °C em todos os meios de cultura testados. No entanto, a maior média foi obtida em V8CaCO₃, o qual diferiu dos demais, seguido pelo meio CA que também teve uma esporulação satisfatória. Nos meios V8 e BDA apresentou médias inferiores. Os resultados desse experimento evidenciaram uma forte influência da temperatura na esporulação do fungo.

4.4 DISCUSSÃO

Os dados deste estudo mostraram que *S. diffusum* não teve bom desenvolvimento quando submetido aos regimes escuro contínuo e regime escuro - luz negra. No entanto, foi evidenciada uma considerável dependência quanto à luminosidade para a esporulação em ambiente artificial, para todos os meios de cultura utilizados.

Fatores injuriantes da colônia, como fonte de luz, são comumente utilizados para indução da esporulação de fungos em ambiente artificial. A luz UV utilizada neste estudo influenciou negativamente o desenvolvimento de *S. diffusum*. Pulz et al. (2009) salientam que há uma relação muito tênue entre os efeitos da luz UV na esporulação e o efeito danoso desse tipo de radiação em ácidos nucleicos, Leach (1962) ressaltou que a luz ultravioleta (UV) ou com comprimento de onda próximo do ultravioleta (NUV, de *near ultraviolet*), normalmente induzem a esporulação, mas quando em dosagens excessivas podem inibi-la.

A luminosidade pode ter efeito indutor ou inibidor sobre a formação de estruturas reprodutivas. Trione e Leach (1976) relataram que para fungos cuja esporulação é induzida pela luz, este agente físico age diretamente na ativação de enzimas-chave envolvidas na esporogênese. No entanto, evidenciam que a quantidade e a qualidade da luz necessária para induzir a formação de estruturas reprodutivas variam de acordo com a espécie fúngica.

Em estudos realizados por Hanada; Gasparotto; Pereira (2002) foi observado que a luminosidade é um fator fundamental para esporulação, de *Mycosphaerella fijiensis* M. Morelet, enquanto que, em regime escuro contínuo, não ocorreu esporulação. A luminosidade também foi um fator determinante para a esporulação de *Corynespora cassicola*, independente do meio de cultura utilizado (MELO; REIS, 2010). Essa tendência foi observada para *Fusarium solani* (Mart.) Sacc., uma vez que, no regime fotoperíodo de 24 h foram observadas as maiores médias para esporulação diferindo estatisticamente de fotoperíodo de 12 h e escuro contínuo (SILVA; TEIXEIRA, 2012).

O fotoperíodo contínuo também estimulou a esporulação em *Corynespora cassicola* (Berk. & M.A. Curtis) C.T. Wei, enquanto que em escuro total, o fungo apresentou baixa produção de esporos (CELOTO et al., 2015). Kuhnem Júnior et al. (2012) concluíram que a luminosidade foi fundamental para a produção de esporos

de *Stenocarpella maydis* (Berk.) B. Sutton. Além disso, Brunelli et al. (2006) obtiveram boa indução de esporulação de *Cercospora zea-maydis* quando cultivado em meio de cultura V8 sob luz sequencial. Esses autores também ressaltaram que esse substrato apresenta maior quantidade de carboidratos complexos que podem induzir à esporulação de fungos mitospóricos, e pode-se inferir que características semelhantes sejam encontradas também no meio CA.

Assim, foi comprovado pelos resultados obtidos no presente estudo, que a luminosidade foi um fator fundamental na esporulação de *S. diffusum*. Além disso, os meios de cultura V8, V8CaCO₃ e CA mostraram-se mais adequados para a esporulação em condições de luz contínua e/ou sequencial de luz e escuro.

Não foi observada influência dos regimes de luminosidade no crescimento micelial de *S. diffusum*, com exceção do regime escuro - luz negra, o qual prejudicou seu crescimento. Leach (1967) apud Teixeira et al., (2001) demonstraram que há variações no comportamento de fungos em relação à dependência de luminosidade para crescimento e esporulação, como é o caso de *Curvularia* sp., que pode crescer tanto na presença quanto na ausência de luz. O mesmo foi observado com *Fusarium moniliforme* J. Sheld., que não manifesta diferença em seu crescimento micelial influenciado por fonte de luz (TEIXEIRA et al., 2001). Para *Corynespora cassicola*, os regimes de luz contínua, fotoperíodo de 12 h e ausência de luz, não influenciaram no seu crescimento micelial (CELOTO et al., 2015). Santos et al. (2005) igualmente, não verificaram diferença no crescimento micelial de raças de *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magnus) Briosi & Cavara quando cultivadas em escuro contínuo, fotoperíodo de 12h e luz negra. No entanto, a esporulação variou em função da raça. Estudos específicos que analisem o comportamento do gênero *Sirosporium* em condições artificiais são escassos, embora Berbegal; Pérez-Sierra; Armengol (2012) relataram haver crescimento e esporulação cultivando um isolado de *Sirosporium celtidis*, em meio BDA sob escuro contínuo.

As colônias de *S. diffusum* observadas no presente estudo, apresentaram grande variação nas características morfológicas em decorrência da formação de diferentes condições físicas. Dias Neto et al. (2010) também verificaram grande variação entre as características culturais das colônias de *Magnaporthe grisea* quando cultivadas em diferentes meios de culturas, como na coloração das colônias, esporulação e crescimento micelial. Esta variação também foi observada em isolados de *Cryptosporiopsis perennans* (Zeller & Childs) Wollenw., quando

cultivados em diferentes meios de cultura (BOGO et al., 2008). Outra característica preponderante de *S. diffusum* é seu crescimento lento, demorando em torno de 60 dias para formar a colônia. Essa característica também foi relatada por Berbegal; Pérez-Sierra; Armengol (2012) ao cultivar *S. celtidis* em meio BDA, o qual foi cultivado por 60 dias para que então possibilitasse a análise das características morfológicas.

O crescimento micelial foi desfavorecido à temperatura de $28 \pm 1^\circ\text{C}$, ao passo que, a temperatura de $20 \pm 1^\circ\text{C}$ e $24 \pm 1^\circ\text{C}$ favoreceu seu crescimento, não diferindo entre elas para a maioria dos meios de cultura testados. Resultados semelhantes foram obtidos por Maia et al. (2011), evidenciando que o melhor crescimento micelial de isolados de *Colletorichum* spp., patógeno de *Mangifera indica* L., ocorreu na faixa de temperatura de 20 a 25°C .

A esporulação foi influenciada pela temperatura, sendo que *S. diffusum* apresentou maior esporulação a $20 \pm 1^\circ\text{C}$ e à medida que a temperatura aumentou, a esporulação diminuiu. Vivas et al. (2015), evidenciaram que tanto isolados de *Hansfordia pulvinata* (Berk. & M.A. Curtis) S. Hughes quanto de *Acremonium* spp. tiveram crescimento e esporulação expressivos em temperaturas mais amenas, entre 20°C e 22°C , ao passo que temperaturas superiores a 25°C não se mostraram propícias ao seu desenvolvimento. Já Poltronieri; Azevedo; Silva (2013), verificaram que a temperatura ótima para produção de esporos de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. foi 28°C . O mesmo ocorreu para *Thielaviopsis paradoxa* (De Seynes) Höhn., em que a temperatura ideal para o crescimento micelial e produção de conídios se situa em torno de 28°C (DA COSTA et al., 2011).

Os resultados deste estudo mostraram as condições mais propícias para o cultivo de *S. diffusum* em condições artificiais, envolvendo os fatores meio de cultura, luminosidade e temperatura. O conhecimento dessas condições serve de base para futuros estudos, os quais requerem produção massal de inóculo, como em teste de patogenicidade em plantas, para a identificação de fontes de resistência ao patógeno fúngico, para trabalhos que visem a caracterização taxonômica de fungos, para estudos que envolvam sensibilidade a agentes de controle, entre outros.

4.5 CONCLUSÃO

As melhores condições artificiais para o cultivo de *S. diffusum* para obter bom crescimento micelial e esporulação consistem em fotoperíodo de 24 h, temperatura de $20 \pm 1^\circ\text{C}$ e meios de cultura V8CaCO₃ ou CA.

4.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AYRES M. et al. BioEstat 5.0 - Aplicações Estatísticas nas Áreas das Ciências Biológicas e Médicas: **Sociedade Civil Mamirauá**, Belém. CNPq, Brasília. 2007. 290 p.
- BERBEGAL, M.; PÉREZ-SIERRA, A.; ARMENGOL, J. First Report of *Sirosporium celtidis* causing a foliar disease of european hackberry in Spain. **Plant Disease**. v. 96, n. 12, p. 1826-1826, 2012.
- BOGO, A. et al. Caracterização morfológica de isolados de *Cryptosporiopsis perennans* em diferentes meios de cultura. **Tropical Plant Pathology**, v. 33, n. 3, p. 248-251, 2008.
- BRUNELLI, K. R. et al. Efeito do meio de cultura e do regime de luz na esporulação de *Cercospora zea-maydis*. **Summa Phytopatologica**, v. 32, n. 1, p. 92-94, 2006.
- CAMERA, J. N. et al. Development of races of *Passalora sojina* on different substrates and light regimes. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 35, n. 4, p. 1793-1800, 2014.
- CELOTO, M. I. B. et al. Efeitos da temperatura e regime de luz sobre *Corynespora cassiicola* e da temperatura e período de molhamento foliar no desenvolvimento da mancha-alvo em acerola. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 82, p. 01-07, 2015.
- DA COSTA, R. R. et al. Efeito da temperatura no crescimento micelial, produção e germinação de esporos de *Thielaviopsis paradoxa* isolado de coqueiros em Sergipe. **Scientia Plena**, v. 7, n. 9, p. 0-0, 2011.
- CROUS, P. W.; BRAUN, U. **Mycosphaerella and its anamorphs: 1. Names published in Cercospora and Passalora**. Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS). 2003.
- DA CRUZ, M. F. A.; PRESTES, A. M.; MACIEL, J. L. N. Esporulação de *Pyricularia grisea* em diferentes meios de cultura e regimes de luz. **Ciência Rural**, v. 39, n. 5, p. 1562-1564, 2009.
- DHINGRA, O. D.; SINCLAIR, J. B. **Basic Plant Pathology Methods**. Boca Raton, Florida: Lewis Publishers, 1995. p.

DIAS NETO, J. J. et al. Influência do meio de cultura na esporulação de *Magnaporthe Grisea* e da concentração de conídios na severidade da brusone do arroz. **Bioscience Journal**, v. 26, n. 2, p. 173-179, 2010.

FERREIRA, D. F. SISVAR: um programa para análises estatísticas e ensino de estatística. **Revista Symposium**, v. 6, n. 2, p. 36-41, 2008.

GRIFFIN, D. H. **Fungal physiology**. New York: Wiley-Liss, 1994. 458 p.

HANADA, R. E.; GASPAROTTO, L.; PEREIRA, J. C. R. Esporulação de *Mycosphaerella fijiensis* em diferentes meios de cultura. **Fitopatologia Brasileira**, v. 27, n. 2, p. 170-173, 2002.

HAWKER, L. E. **The physiology of reproduction in fungi**. Cambridge: Cambridge University Press, 1957. 128 p.

IGBE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção Agrícola Municipal 2015**. Rio de Janeiro: IBGE, 2016. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/estadosat/perfil.php?sigla=rs>>. Acesso em: 17 de maio de 2017.

KUHNEM JÚNIOR, P. R. et al. Effects of temperature, light regime and substrates on the production and germination of *Stenocarpella maydis* pycnidiospores. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 34, n. 1, p. 11-16, 2012.

LAZAROTTO, M. et al. First report of *Pestalotiopsis clavispora* causing leaf spot of *Carya illinoensis* in Brazil. **Plant Disease**, v. 96, n. 12, p. 1826-1826, 2012.

LEACH, C. M. Sporulation of diverse species of fungi under near ultraviolet radiation. **Canadian Journal of Botany**, v. 40, n. 1, p. 151-161, 1962.

MAIA, F. G. M. et al. Efeito da temperatura no crescimento micelial, produção e germinação de conídios de *Colletotrichum* spp. isolados de mangueira com sintomas de antracnose. **Bioscience Journal**, v. 27, n. 2, p. 545-552, 2011.

MAIA, A. J. et al. Spore production and effect of temperature and light on germination and infection by *Pseudocercospora vitis* in grape plants. **Summa Phytopathologica**, v. 41, n. 4, p. 287-291, 2015.

MELO, M. M. D.; Reis, E. M. Efeito de substratos, luz e sobreposição de papel de filtro na esporulação de *Corynespora cassicola*. **Summa Phytopathologica**, v. 36, n. 3, p. 251-253, 2010

POLETTTO, I. et al. Germination and development of pecan cultivar seedlings by seed stratification. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 50, n. 12, p. 1232-1235, 2015.

POLETTTO, T. et al. First report of *Sirosporium diffusum* causing leaf spot on *Carya illinoensis* in Brazil. **Plant disease**, n. 101, v. 2, p. 381, 2017.

POLETTI, T. et al. First report of stem canker caused by *Lasiodiplodia subglobosa* on *Carya illinoensis* in Brazil. **Plant Disease**, v. 100, n. 5, p. 1016, 2016.

POLETTI, T. et al. Métodos de superação de dormência da semente de nogueirapecã *Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch. **Revista Árvore**, v. 39, n. 6, p. 1111-1111, 2015.

POLTRONIERI, T. P. S.; AZEVEDO, L. A. S.; SILVA, D. E. M. Efeito da temperatura no crescimento micelial, produção e germinação de conídios de *Colletotrichum gloeosporioides*, isolados de frutos de palmeira Juçara (*Euterpe edulis* Mart). **Summa Phytopathologica**, v. 39, n. 4, p. 281-285, 2013.

PULZ, P.; NELSON, S.; MASSOLA J. R. Efeito de meios de cultura e fatores físicos no crescimento e esporulação de *Alternaria dauci* e *A. solani*. **Summa phytopathologica**, v. 35, n. 2, p. 121-126, 2009.

SANTOS, J. et al., Crescimento e esporulação de três raças de *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magn.) sob quatro condições de luminosidade. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 11, n. 4, p. 493-495, 2005.

SILVA, J. L.; TEIXEIRA, R. N. V. Esporulação e crescimento micelial de *Fusarium solani* em diferentes meios de cultura e regimes de luminosidade. **Revista Agrombiente On-line**, v. 6, n. 1, p. 47-52, 2012.

SILVA, M. G. D., et al. Temperature and light intensity interaction on *Cercospora coffeicola* sporulation and conidia germination. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 40, n. 2, p. 198-204, 2016

TEIXEIRA, H. et al., Efeito de diferentes fontes de luz no crescimento e esporulação *in vitro* de fungos fitopatogênicos. **Ciência e agrotecnologia**, v. 25, n. 6, p.1314-1320, 2001.

TRIONE, E. J.; LEACH, C. M. Light-induced sporulation and sporogenic substances in fungi. **Phytopathology**, v. 59, n. 8, p. 1077-1083. 1969.

VIVAS, J. M. S. Efeito da temperatura sobre o crescimento e esporulação *in vitro* de fungos hiperparasitas de *Asperisporium caricae*. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 45, n. 1, p. 73-81, 2015.

WALKER, C. et al. Morphological and molecular characterization of *Cladosporium cladosporioides* species complex causing pecan tree leaf spot. **Genetics and Molecular Research**, v. 15, n. 3, p. 1-11, 2016.

5 CAPÍTULO IV: ESCALA DIAGRAMÁTICA PARA QUANTIFICAR A SEVERIDADE DA MANCHA FOLIAR MARROM EM NOGUEIRA-PECÃ

Resumo

A mancha foliar marrom, causada pelo fungo *Sirosporium diffusum*, tem causado prejuízos na silvicultura da noqueira-pecã e sua correta quantificação é fundamental para a realização de estudos epidemiológicos, estabelecer níveis de perdas de produtividade e a avaliação de estratégias de controle a serem tomadas. Assim, o objetivo do presente trabalho foi desenvolver e validar uma escala diagramática para a avaliação da severidade da mancha foliar marrom em noqueira-pecã. Para tanto, foram coletados 240 folíolos sintomáticos, em árvores adultas no município de Anta Gorda – RS, Brasil, a partir dos quais obteve-se a severidade real da doença em termos percentuais. Para a construção da escala, utilizaram-se os limites observados de severidade mínima e máxima da doença, sendo os seis níveis intermediários da escala definidos de acordo com a “Lei do estímulo visual de Weber-Fechner”: A escala foi composta por oito níveis (1,5; 4,6; 10,6; 17,3; 39,5; 65,1; 77,5 e 98%). A validação foi realizada por oito avaliadores, os quais estimaram a severidade de 40 folíolos de noqueira-pecã sintomáticos, primeiramente sem o uso da escala e, na sequência, utilizando-a. A escala diagramática proporciona maior precisão, acurácia e repetibilidade das estimativas podendo ser utilizada para realizar estudos epidemiológicos com maior confiabilidade.

Palavras chave: *Carya illinoensis*; *Sirosporium diffusum*; dano da área foliar; epidemiologia

DIAGRAMMATIC SCALE FOR QUANTIFYING SEVERITY OF BROWN LEAF SPOT ON *Carya illinoensis*

Abstract

Brown leaf spot, caused by the fungus *Sirosporium diffusum*, is responsible for heavy losses in pecan orchards, and quantification is essential in order to conduct epidemiological studies and assess control strategies. Therefore, the aim of this study was to develop and validate a diagrammatic scale for assessing the severity of brown leaf spot in pecan. To do this, 240 symptomatic leaflets were collected from adult trees in Anta Gorda, in the Brazilian state of Rio Grande do Sul, and used to

assess the current percentage severity of the disease. The scale was based on the minimum and maximum observed severity of the disease, with six graduations defined according to the Weber-Fechner Visual Stimulus Law. The scale therefore consisted of eight levels (1.5, 4.6, 10.6, 17.3, 39.5, 65.1, 77.5 and 98%). The estimates of eight evaluators provided a basis for validating the scale. They made estimates of disease severity on 40 symptomatic pecan lamellae, first without using the scale and then referring to it. The scale was found to provide greater precision, accuracy and reproducibility of estimates and should result in more reliable epidemiological studies.

Keywords: pecan; *Sirosporium diffusum*; leaf area damage; epidemiology

5.1 INTRODUÇÃO

O cultivo de noqueira-pecã [*Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch] família Juglandaceae, compõe um dos sistemas florestais exóticos mais antigos e importantes da região sul do Brasil, especialmente no Estado do Rio Grande do Sul. Entretanto, nos últimos anos, seu cultivo aumentou expressivamente (POLETTTO et al., 2015). A grande demanda de mercado aliada ao alto preço pago pela fruta contribuiu para que a cultura fosse considerada como um investimento altamente rentável (POLETTTO et al., 2015).

A espécie é de grande porte, com hábito caducifólio, sendo que suas folhas surgem em meados de setembro e perduram até maio. As folhas adultas são compostas, imparipenadas e alternas. Os folíolos, geralmente em número de nove a 17, apresentam formato lanceolado, com margem serrilhada, de coloração que varia do verde amarelado até o verde escuro (EDWARD; WATSON, 1993; VENDRAME; WETZSTEIN, 2005).

No que diz respeito às doenças que causam danos à cultura, as principais são ocasionadas por fungos, dentre as quais se destaca a mancha foliar marrom, relatada em plantios brasileiros pela primeira vez em 2016, causando manchas foliares (POLETTTO et al., 2017). O fungo causador, *Sirosporium diffusum* (Heald & Wolf) Deighton, tendo como sinonímia *Cercospora fusca* Rand e *Clasterosporium diffusum* Heald & Wolf (ELLIS, 1976), já foi relatado em vários países causando

danos em *C. illinoensis*, como nos Estados Unidos, México, Venezuela e África do Sul (CHUPP, 1953; CROUS; BRAUN, 2003).

Os sintomas iniciam nas folhas mais baixas como pequenos pontos escuros, que aumentam de tamanho formando manchas marrom-avermelhadas, com halo escuro, bem delimitadas e de formato arredondado, medindo de 0,5 a 1,5 cm de diâmetro. Posteriormente, as lesões coalescem formando áreas maiores de tecido necrosado. Trata-se de uma doença importante, pois prejudica o desenvolvimento das plantas, na fase de viveiro, causa desfolha intensa e atraso no crescimento das mudas. Já em pomares adultos, pela intensa desfolha, há redução na produtividade e na qualidade dos frutos (ELLIS, 1976; CHUPP, 1953; STEIN et al., 2012; POLETTTO et al., 2017).

Na maioria dos patossistemas economicamente importantes, quantificar a severidade das doenças corretamente é fundamental, pois permite estudar a sua epidemiologia, a redução na produtividade e avaliar estratégias de controle a serem tomadas. A avaliação da severidade de uma doença utilizando critérios subjetivos pode induzir a erros nas estimativas, portanto, a utilização de critérios precisos na quantificação de doenças é importante (MAZARO et al., 2006; LENZ et al., 2009). Adicionalmente, para que sejam minimizados os erros, o método utilizado para quantificação de doenças deve ser capaz de fornecer resultados acurados, precisos e reproduzíveis (SPOSITO et al., 2004).

As escalas diagramáticas tem a função de orientar os avaliadores nas estimativas visuais para se obter mais precisão e acuracidade nas avaliações de severidade de doenças, haja vista que permite ao avaliador situar suas estimativas dentro de um intervalo menor ganhando precisão e acuracidade (SUSSEL; POZZA; CASTRO, 2009; SPOSITO et al., 2004; AMORIM, 1995).

Uma vez elaborada, a escala precisa ser validada, ou seja, testada por vários avaliadores para comprovar sua eficiência na estimativa da severidade (SPOSITO et al., 2004; LENZ et al., 2009). A eficiência é comprovada por meio de parâmetros como, precisão, acurácia e reprodutibilidade das estimativas de cada avaliador. Martins et al. (2004) salientaram que no caso de produzirem resultados insatisfatórios, as escalas devem ser corrigidas.

Na literatura, são inúmeros os trabalhos envolvendo escalas diagramáticas para avaliação da severidade de doenças, como, por exemplo, para mancha de *Teratosphaeria* (*Teratosphaeria nubilosa* (Cooke) Crous & U. Braun) em *Eucalyptus*

globulus Labill. (PASSADOR et al., 2013), para mancha-preta em frutos *Citrus* sp. causada por *Guignardia citricarpa* Kiely (SPOSITO et al., 2004), para cancro bacteriano da videira (*Vitis vinifera* L.) causado por *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (NASCIMENTO et al., 2005), cercosporiose em pimentão (*Capsicum annuum* L.) causada por *Cercospora capsici* Heald & F.A. Wolf (MICHEREFF et al., 2006 a), cercosporiose em alface (*Lactuca sativa* L.) causada por *Cercospora longissima* Cooke & Ellis (GOMES et al., 2004), bacteriose em pessegueiro (*Prunus persica* L.) causada por *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* (CITADIN et al., 2008), antracnose em *Annona squamosa* L. causada por *Colletotrichum gloeosporioides* (CORREIA et al., 2011) e outros.

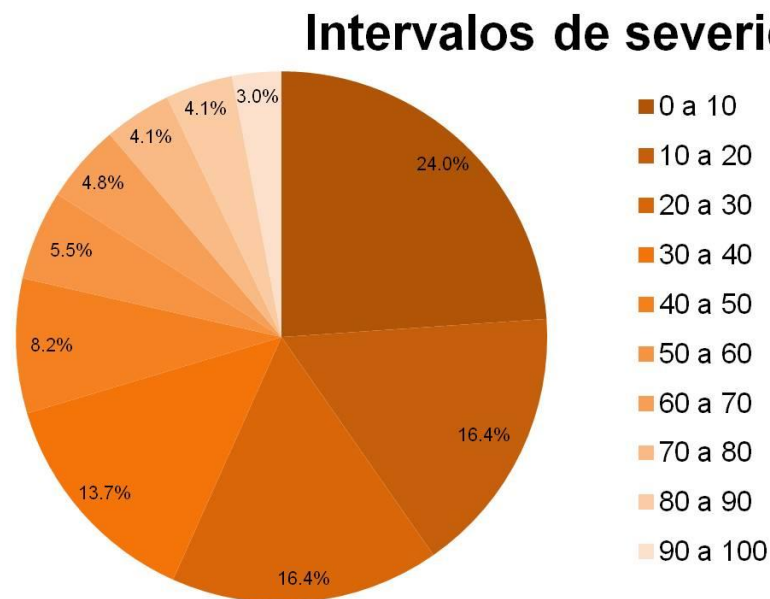
No entanto, apesar da importância da mancha foliar marrom em noqueira-pecã, não foram observadas escalas diagramáticas para quantificação dessa doença, o que limita a realização de estudos epidemiológicos, dificultando as medidas de controle. Diante do exposto, o objetivo do presente trabalho foi desenvolver e validar uma escala diagramática para a avaliação da severidade da mancha foliar marrom em folíolos de *C. illinoensis*.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

Na elaboração da escala diagramática, foram inicialmente coletados 240 folíolos de plantas com 20 anos de idade no mês de fevereiro de 2017. As coletas foram realizadas em plantios comerciais localizados no município de Anta Gorda - RS (O 52°02'04" e S 28°53'41"). Os folíolos coletados apresentaram diferentes níveis de área lesionada (mancha foliar marrom) causadas pelo fungo *S. diffusum*. Optou-se por utilizar folíolos para análise, pois as folhas inteiras são incompatíveis com os equipamentos utilizados e, além disso, poderiam ocorrer perdas na qualidade da imagem em função do tamanho. Cada folíolo foi escaneado individualmente em scanner HP Deskjet 2050 e, em seguida, foi quantificada a porcentagem de área lesionada, de modo a obter a severidade real da doença, utilizando-se o *software* Compu Eye Leaf & Symptom Area (BAKR, 2005).

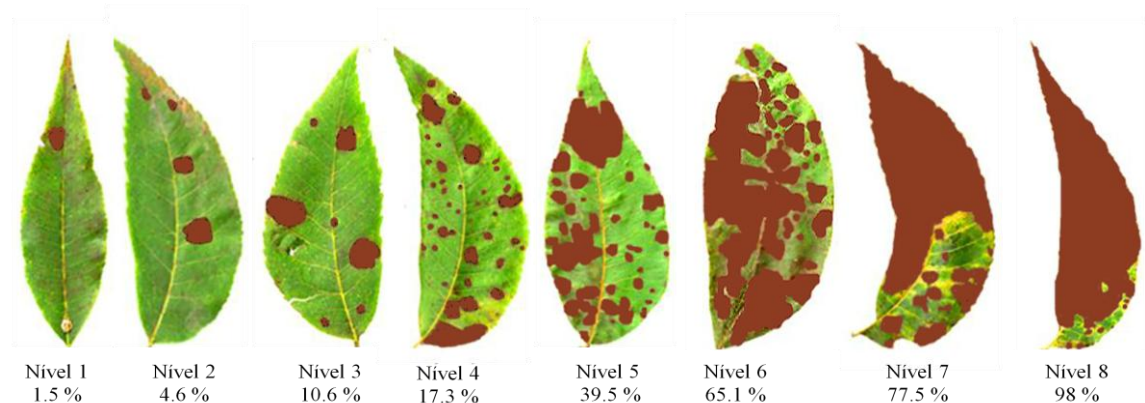
A frequência das severidades mensuradas em diferentes intervalos mostrou que a maioria esteve entre os intervalos de 0 a 10% da área foliar sintomática, seguido pelo intervalo de 10 a 20% e 20 a 30%. Apesar disso, a doença apresentou altos níveis de severidade, acima de 90% (Figura 1).

Figura 1- Proporção de folhas de noqueira-pecã (total de 240 folíolos) com diferentes severidades (% de área sintomática) de mancha foliar marrom mensuradas usando análise de imagens.



Os níveis que compuseram a escala diagramática foram formados pelos valores máximo e mínimo de severidade da mancha foliar marrom encontrados em folíolos de noqueira-pecã como sendo os extremos da escala diagramática, mais seis níveis intermediários definidos de acordo com a “Lei do estímulo visual de Weber-Fechner” (HORSFALL; COWLING, 1978), da mesma forma como foi utilizada em trabalhos como o de Bock et al. (2009) e Valeriano et al. (2015). Desta forma, a escala diagramática foi composta por oito níveis de severidade: 1,5%, 4,6%, 10,6%, 17,3%, 39,5%, 65,1%, 77,5% e 98% de área foliar lesionada (Figura 2).

Figura 2- Escala diagramática elaborada para avaliação da severidade da mancha foliar marrom em folíolos de *Carya illinoensis*. Valores em porcentagem da área foliar sintomática.



Uma vez estabelecidos os níveis de severidade da escala, imagens digitalizadas de folíolos com as respectivas porcentagens de severidade, foram selecionadas para representar cada nível da escala diagramática. Optou-se por este método para manter as características da doença em cada nível de severidade o mais próximos do real (TOVAR-SOTO et al., 2002; MALAGI et al., 2011; TERAMOTO et al., 2011; LAZAROTO et al., 2012).

Para validar a escala diagramática, foram selecionadas e impressas em papel foto 40 imagens digitalizadas de folíolos sintomáticos, com diferentes porcentagens de área foliar afetada pela mancha foliar marrom. A severidade foi estimada por oito avaliadores (A até H), os quais possuíam experiência em avaliações de doenças, sendo estes discentes de pós-graduação e docentes dos cursos de Engenharia Florestal e Agronomia. Para isso, em um primeiro momento, os avaliadores estimaram a severidade sem o auxílio da escala diagramática e, posteriormente, estimaram a severidade da doença com o auxílio da mesma.

A eficiência da escala foi testada pela precisão e a acurácia das estimativas dos avaliadores realizada por meio de análise de regressão simples, considerando-se a severidade real como variável independente e a estimada, como variável dependente. O coeficiente de determinação da regressão (R^2) e os valores dos erros absolutos (severidade estimada menos severidade real) foram utilizados para avaliar a precisão das estimativas (MICHEREFF et al., 2006a; PASSADOR et al., 2013).

O teste t foi aplicado ao intercepto (a) e ao coeficiente angular da reta (b) de cada regressão linear para testar as hipóteses $H_0: a = 0$ e $H_1: b = 1$, a nível de 5% de probabilidade de erro, a fim de determinar a acurácia das estimativas de cada avaliador. Valores de interceptos significativamente diferentes de zero mostram a presença de desvios constantes, enquanto que valores de coeficientes angulares da reta significativamente diferentes de 1,0 indicam a presença de desvios sistemáticos (MICHEREFF et al., 2006 a; MICHEREFF et al., 2006 b; BARGUIL et al., 2008; TERAMOTO et al., 2011).

Outro indicador de eficiência da escala diagramática utilizado foi a reprodutibilidade das estimativas entre os avaliadores. Para isso, foi obtido o coeficiente de determinação R^2 de regressões lineares entre as severidades estimadas combinando-se pares de avaliadores, conforme Nutter Jr. e Schultz (1995). As análises de regressão foram realizadas com o auxílio dos *softwares* R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2010) e o Microsoft Excel 2007[®].

5.3 RESULTADOS

A severidade máxima da mancha foliar marrom em folíolos de noqueira-pecã foi de 98% e o valor mínimo, de 1,5%, com média de 29,8%. A maioria frequência de severidades da doença foi encontrada nos níveis baixos (0 a 10%), perfazendo um total de 24% dos folíolos analisados. Nessa escala, os níveis superiores a 39,5% apresentaram áreas de tecido foliar com lesões coalescidas, que são características dessa doença.

A escala diagramática proporcionou melhorias na acurácia das estimativas de severidade da doença dos avaliadores (Tabela 1). Os valores do coeficiente linear (*a*) e angular (*b*) não foram significativos, indicando que as estimativas não apresentam desvios constantes e/ou erros sistemáticos. A escala mostrou-se eficiente na orientação das estimativas visuais dos avaliadores, quanto à acuracidade, haja vista que os valores se aproximaram dos reais (Figura 3: A – H).

Por outro lado, ao estimar a severidade da doença sem a utilização da escala diagramática, os oito avaliadores não tiveram acuracidade em suas estimativas (Tabela1). Os valores do intercepto (*a*) foram estatisticamente diferentes de zero variando de -9,31 a 8,44, distanciando-se bastante do valor ideal zero. A maioria desses avaliadores, com exceção dos avaliadores D e F, tiveram valores acima de zero superestimando a severidade da mancha foliar marrom, indicando a presença de desvios constantes e positivos nas estimativas (Figura 1: I -Q). Os valores do coeficiente angular (*b*) da reta, também sem a utilização da escala, foram estatisticamente diferentes de 1,0 para dois avaliadores (B e G), indicando que, suas estimativas apresentam erros sistemáticos (Tabela 1). Para os outros avaliadores, os valores do coeficiente (*b*) não diferiram de 1,0, mostrando ausência de erro sistemático (Figura 1: I - Q).

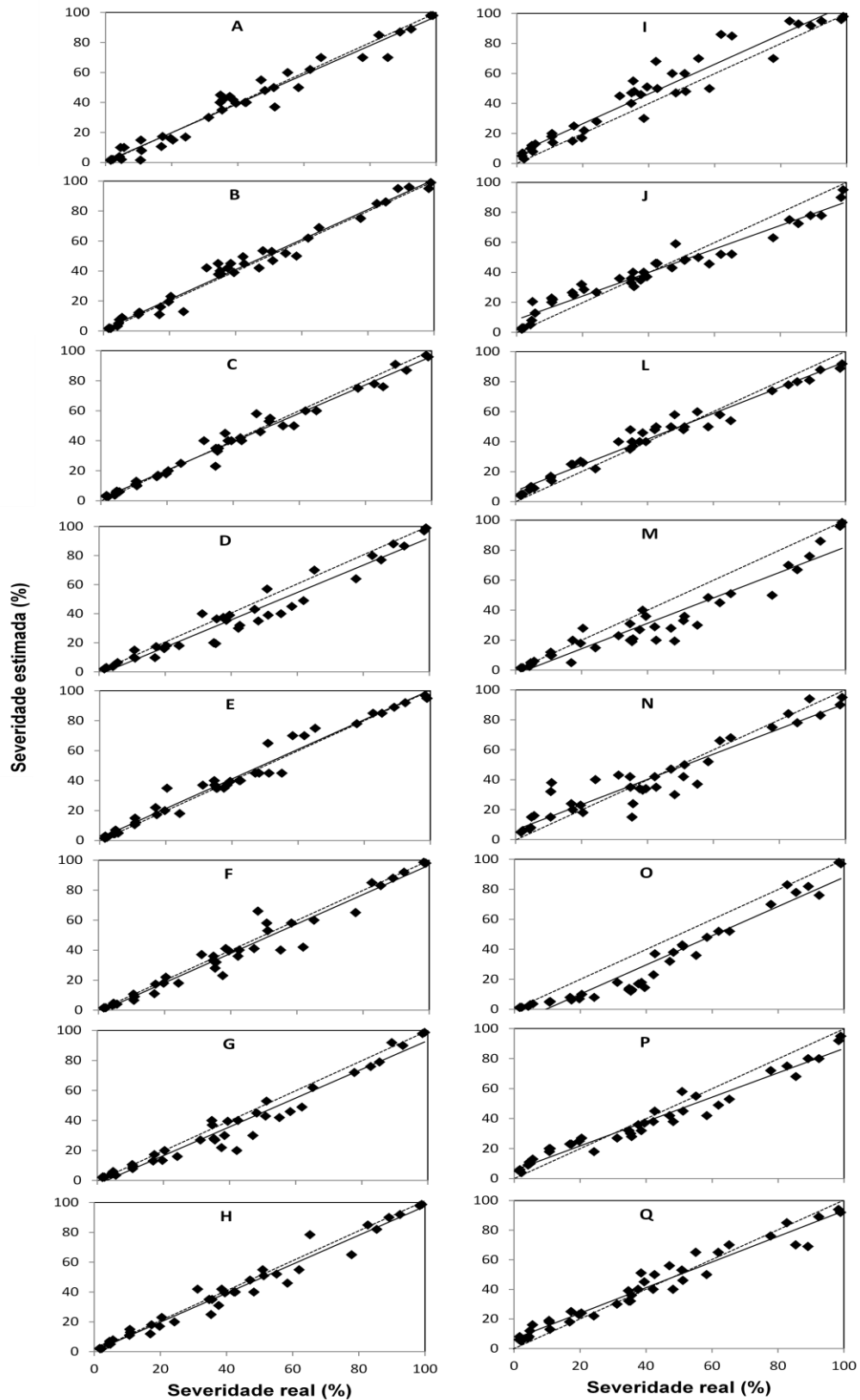
Tabela 1 - Coeficientes linear (*a*), angular (*b*), de determinação R^2 e erro absoluto em modulo (EA), obtidos nas regressões entre severidade real e estimada da doença, a partir de folíolos de *Carya illinoensis* apresentando sintomas de mancha foliar marrom com e sem o uso da escala diagramática.

Avaliador	Com escala				Sem escala			
	a	b	R ²	EA	a	b	R ²	EA
A	0,44 ^{ns}	0,97 ^{ns}	0,96	4,1	6,63*	0,99 ^{ns}	0,92	8,2
B	1,02 ^{ns}	0,99 ^{ns}	0,98	3,4	8,44*	0,78*	0,95	6,7
C	1,44 ^{ns}	0,94 ^{ns}	0,98	2,9	7,21*	0,86 ^{ns}	0,95	5,3
D	-1,86 ^{ns}	0,94 ^{ns}	0,95	5,5	-2,67*	0,85 ^{ns}	0,91	9,4
E	1,54 ^{ns}	0,99 ^{ns}	0,97	3,3	6,43*	0,84 ^{ns}	0,89	7,3
F	-1,32 ^{ns}	0,98 ^{ns}	0,95	4,1	-9,31*	0,97 ^{ns}	0,93	10,3
G	-2,67 ^{ns}	0,95 ^{ns}	0,96	5,0	5,52*	0,81*	0,96	6,5
H	0,44 ^{ns}	0,97 ^{ns}	0,97	3,3	6,57*	0,86 ^{ns}	0,95	5,5
Média	1,34	0,97	0,97	3,9	6,6	0,87	0,93	7,4

* - situações em que a hipótese nula ($a=0$ ou $b=1$) foi rejeitada pelo teste *t*, respectivamente, em nível de significância de 5%. ns – diferença não significativa.

Ao comparar os valores médios dos coeficientes (*a*) e (*b*) das regressões obtidas sem e com escala notou-se uma aproximação maior aos valores reais, 0 e 1,0 respectivamente. O coeficiente linear (*a*) passou de 6,6 sem escala para -0,12 com escala e, os valores do coeficiente angular (*b*), foram 0,87 e 0,97 antes e depois da utilização da escala respectivamente. A utilização da escala diagramática proporcionou a todos os avaliadores maior exatidão em suas estimativas de severidade da mancha foliar marrom.

Figura 3 – Severidade estimada (linhas cheias) e severidade real (linha pontilhada) para mancha foliar marrom em folíolos de *Carya illinoensis*. A-H: avaliadores com escala. I-Q: sem a utilização da escala.

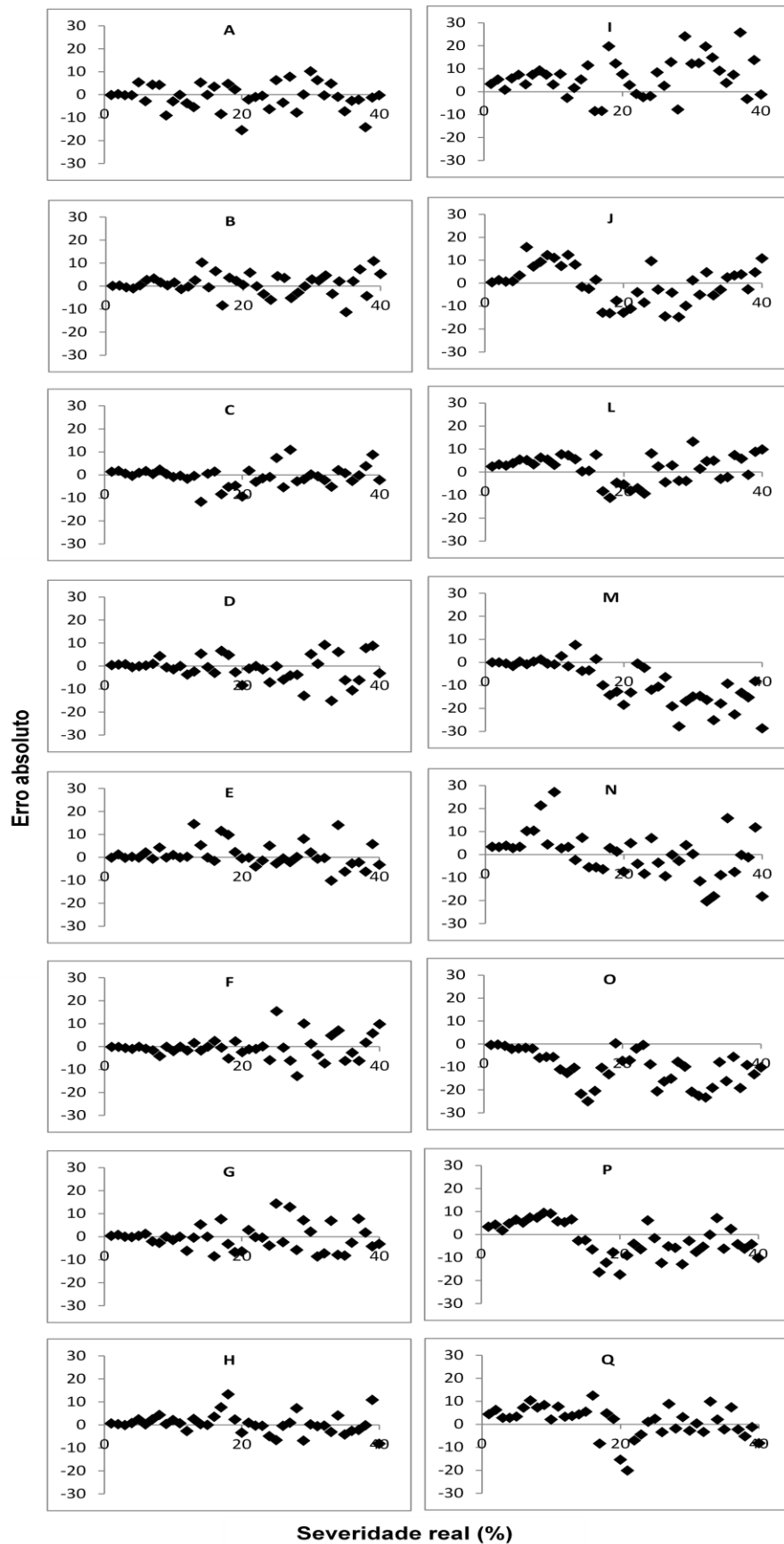


Todos os avaliadores ao utilizarem a escala diagramática em suas estimativas melhoraram sua precisão, mostrando que a escala, além de proporcionar acuracidade, é também precisa, visto que os coeficientes de determinação foram próximos de 1, variaram de 0,94 a 0,99 (Tabela 1). Além disso, a escala diagramática proporcionou melhor ajuste dos dados estimados em relação aos dados de severidade real. Comparando-se os valores médios sem e com a escala notou-se que o coeficiente de determinação aumentou de 0,93, para 0,97, ganhando precisão nas estimativas.

Os valores do erro absoluto cometidos pelos avaliadores sem escala variaram de -28.7 a 27.1 e não se apresentaram de forma equilibrada em relação à linha zero (ausência de erro) (Figura 4: I – Q). No entanto, com o auxílio da escala, o erro absoluto variou apenas de -15,1 a 15,4 e a maioria das estimativas tiveram erros concentrados na faixa de 10% para mais ou para menos em relação à severidade real (Figura 4). Além disso, os erros tiveram distribuição equilibrada proporcionalmente, acima e abaixo da linha que representa o resíduo zero (Figura 4: A – H). Essa mesma distribuição equilibrada não ocorreu com os erros das estimativas sem a utilização da escala.

O valores médio do erro absoluto em módulo sem escala foi de 7,4%, enquanto que, com o uso da escala, houve uma redução para 3,9%. Em termos percentuais, o uso da escala proporcionou redução do erro absoluto médio em 47,3% nas estimativas de severidade (Tabela 1).

Figura 4 - Erros absolutos (severidade estimada menos severidade real) para oito avaliadores de mancha foliar marrom em folíolos de *Carya illinoensis*.



A reprodutibilidade das estimativas entre avaliadores com escala, calculada por meio do coeficiente de determinação (R^2) das regressões lineares combinadas entre pares de avaliadores foi satisfatória e os valores dos coeficientes variaram de 0,86 a 0,98 (Tabela 2). Em contraponto, os coeficientes de determinação das estimativas foram mais baixos quando os avaliadores não fizeram uso da escala em suas estimativas, variando de 0,72 a 0,91.

Tabela 2 - Coeficiente de determinação (R^2) como medida de reprodutibilidade das estimativas da mancha foliar marrom causada por *Sirosporium diffusum* em folíolos de *Carya illinoensis* entre avaliadores com e sem escala diagramática.

Com escala							
Avaliador	B	C	D	E	F	G	H
A	0,98	0,97	0,96	0,96	0,95	0,95	0,97
B		0,92	0,96	0,97	0,97	0,97	0,88
C			0,97	0,91	0,96	0,96	0,98
D				0,96	0,93	0,95	0,98
E					0,96	0,86	0,97
F						0,97	0,97
G							0,97
Sem escala							
Avaliador	B	C	D	E	F	G	H
A	0,78	0,80	0,74	0,78	0,75	0,78	0,80
B		0,83	0,78	0,90	0,79	0,72	0,90
C			0,77	0,85	0,88	0,81	0,91
D				0,77	0,79	0,79	0,83
E					0,82	0,77	0,90
F						0,81	0,88
G							0,81

5.4 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste estudo mostram que a escala diagramática é adequada para a avaliação da severidade da mancha foliar marrom em *Carya illinoensis*. Conforme foi evidenciando nesse trabalho, com a evolução da doença há o coalescimento das lesões no limbo foliar. Por conseguinte, essa característica dificultou as estimativas nos níveis mais elevados de severidade, causando erros maiores nas estimativas dos avaliadores. Os dados deste estudo corroboraram com

o de Michereff et al. (2006 a), em folhas de pimentão (*Capsicum annuum*) e de Gomes et al. (2004), em folhas de alface (*Lactuca sativa*), que também evidenciaram o coalescimento das lesões a partir de níveis de severidade mais elevados. Teramoto et al. (2011) igualmente evidenciaram que o coalescimento das lesões em níveis mais elevados, dificulta as estimativas visuais resultando em erros maiores.

Para a maioria dos avaliadores, quando não fizeram o uso da escala diagramática, suas estimativas apresentaram baixa acuracidade com tendência à superestimação da severidade da doença, além de alguns avaliadores cometerem erros sistemáticos nas estimativas. Em contraponto, com a utilização da escala, todos os avaliadores tiveram maior acurácia em suas estimativas, ou seja foram mais próximas da severidade real. Quando os valores de intercepto (a) diferem significativamente de 0 (zero) indicam que as estimativas apresentam superestimação (>0) ou subestimação (<0) da severidade real em níveis baixos de intensidade da doença e quando os valores de coeficiente angular (b) da regressão diferem significativamente de 1 (um), indicam superestimativa (>1) ou subestimativa (<1) sistemática da severidade real da doença em todos os níveis de intensidade (MICHEREFF et al., 2006 b). Em outros estudos de validação de escalas diagramáticas para severidade também houveram casos em que os avaliadores cometeram tendenciosidades quando não fizeram uso da escala, verificando-se superestimação com cercosporiose em pimentão (*Capsicum annuum*) (MICHEREFF et al., 2006 a) e com antracnose em bastão do imperador [*Etlíngera elatior* (Jack) Smith] (BARGUIL et al., 2008).

A precisão das estimativas, avaliada pelo coeficiente de determinação da regressão (R^2), considera que, quanto mais próximo de 1 for o coeficiente de determinação, maior é a precisão. Todos os avaliadores ao utilizarem a escala diagramática melhoraram a precisão em suas estimativas em relação às estimativas sem uso da escala diagramática, haja vista que os coeficientes de determinação ficaram próximos de 1.

O erro absoluto, que é dado pela diferença entre a severidade estimada e a real, apresentou uma redução considerável nas estimativas com o auxílio da escala diagramática, quando comparado com o erro absoluto das estimativas obtidas sem a utilização da escala. O erro absoluto cometido pelos avaliadores sem escala foi maior do que com o auxílio da escala. A maioria das estimativas com o uso da escala, tiveram erros concentrados na faixa de 10% para mais ou para menos em

relação à severidade real. Essa magnitude de erro é considerada aceitável segundo critérios observados em outros estudos de avaliação de escalas diagramáticas, como àquelas que foram propostas por Michereff et al. (2006 a), Teramoto et al. (2011) e Lucas et al. (2012). Por conseguinte, a escala contribuiu para que os avaliadores não apresentassem tendenciosidades em suas estimativas, não resultando em super ou subestimação da severidade em comparação à severidade real.

Outro parâmetro indicador de eficiência da escala diagramática utilizado foi a reprodutibilidade das estimativas de severidade pelos avaliadores utilizando-se a mesma escala. A escala confeccionada neste estudo proporcionou a reprodutibilidade das estimativas pelos diferentes avaliadores. Spodito et al. (2004) ressaltaram que, quando a escala diagramática proporciona reprodutibilidade, a severidade da doença pode ser estimada por qualquer avaliador, gerando resultados semelhantes, além de proporcionar padronização em experimentos conduzidos por avaliadores distintos.

Diante do conjunto de resultados obtidos, pode-se inferir que a escala diagramática confeccionada no presente estudo proporcionou maior acuracidade, precisão e reprodutibilidade nas estimativas da severidade da mancha foliar marrom em folíolos de noqueira-pecã. Lenz et al. (2009) ressaltaram que, uma vez satisfeitos esses critérios, uma escala pode ser adotada em estudos epidemiológicos, trazendo confiabilidade nos resultados, reduzindo a subjetividade das estimativas, além de proporcionar padronização nas avaliações da severidade da doença, permitindo a comparação de resultados entre diferentes instituições ou locais.

5.5 CONCLUSÃO

A escala diagramática proposta para a avaliação de mancha foliar marrom em *Carya illinoensis* proporciona boa acurácia, precisão e reprodutibilidade das estimativas aos avaliadores, além de ser de fácil utilização, sendo adequada para estudos epidemiológicos da doença.

5.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMORIM, L. Avaliação de doenças. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Eds.). **Manual de Fitopatologia**, v. 1. São Paulo. Editora Ceres. p. 647-671,1995.
- BAKR, E. M. A new software for measuring leaf area, and area damaged by *Tetranychus urticae* Koch. **Journal of Applied Entomology**, v. 129, n. 3, p.173 175, 2005.
- BARGUIL B. M. et al. Escala diagramática para avaliação da severidade da antracnose em bastão do imperador. **Ciência Rural**, v. 38, n. 3, p. 807-810, 2008.
- BOCK, C. H.; et al. The Horsfall-Barratt scale and severity estimates of citrus canker. **European journal of plant pathology**, v.125, n.1, p. 23-38, 2009.
- CHUPP, C. **A monograph of the fungus genus Cercospora**. Ithaca, N.Y., p. 1886-1967, 1953.
- CITADIN, I. et al., Escala diagramática para avaliação da severidade de bacteriose em pessegueiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, n. 2, p. 327-330, 2008.
- CORREIA, K. C. et al. Escala diagramática para avaliação da severidade da antracnose em pinha. **Revista Ciência Rural**, v. 41, n. 1, p.1-4. 2011.
- CROUS, P. W.; BRAUN, U. **Mycosphaerella and its anamorphs: 1. Names published in Cercospora and Passalora**. Utrecht, Centraalbureau voor Schimmelcultures CBS Biodiversity Series, v. 1, 2003. 571p.
- EDWARD, F. G.; WATSON, D. G. "**Carya illinoensis, Pecan**". University of Florida. *Fact Sheet ST-122*. 1993. Disponível em: <http://hort.ufl.edu/database/documents/pdf/tree_fact_sheets/carilla.pdf>. Acesso em: 20 Fev. 2016.
- ELLIS, M. B. **More dematiaceous Hyphomycetes**. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England. 1976.
- GOMES, A. M. A.; MICHEREFF, S. J.; MARIANO, R. L. R. Elaboração e validação de escala diagramática para cercosporiose da alface. **Summa Phytopathologica**, v. 30, n. 1, p. 38-42, 2004.
- HORSFALL, J. G.; COWLING, E. B. Pathometry: the measurement of plant disease. **Plant Disease: an advanced treatise-how disease develops in populations**, v. 2, p. 119-136, 1978.
- LAZAROTO, A. et al. Escala diagramática para avaliação de severidade da helmintosporiose comum em milho. **Revista Ciência Rural**, v. 42, n. 12, p. 2288-2294, 2012.

LENZ G. et al., Escala diagramática para avaliação de severidade de mancha-de-septoria em girassol. **Ciência Rural**, v. 39, n. 8, p. 2527-2530, 2009.

LUCAS, D. D. P. et al. Escala diagramática de quantificação de dano causado por granizo em folhas de girassol. **Revista Ciência Agronômica**, v. 43, n. 4, p. 822-826, 2012.

MALAGI, G. et al. Elaboração e validação da escala diagramática para avaliação da mancha branca do milho. **Revista Ciência Agronômica**, v. 42, n. 03, p. 797-804, 2011.

MARTINS, M. C. et al. Escala diagramática para quantificação do complexo de doenças foliares de final de ciclo em soja. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 2, p. 179-184, 2004.

MAZARO, S. M. et al. Escala diagramática para avaliação de severidade da mancha-de-dendrophoma em morangueiro. **Ciência Rural**, v. 36, n. 5, p. 1630-1633, 2006.

MICHEREFF, S. J. et al. Elaboração e validação de escala diagramática para a cercosporiose do pimentão. **Summa Phytopathologica**, v. 32, n. 3, p. 260-266, 2006 a.

MICHEREFF, S. J. et al. Elaboração e validação de escala diagramática para avaliação da severidade do carvão da folha do caupi. **Summa Phytopathologica**, v. 32, n. 1, p. 51-56, 2006 b.

NASCIMENTO, A. R. P. et al. Elaboração e validação de escala diagramática para cancro bacteriano da videira. **Summa Phytopathologica**, v. 31, n.1, p. 59-64, 2005.

NUTTER JR., F.W.; SCHULTZ, P.M. Improving the accuracy and precision of disease assessments: selection of methods and use of computer-aided training programs. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 17, n. 1, p. 174-184, 1995.

PASSADOR, M. M. et al. Escala diagramática para quantificação da severidade de manchas em folhas de *Eucalyptus globulus* Labill. causadas por *Teratosphaeria nubilosa* (Cooke) Crous & U. Braun. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 23, n. 2, p. 521-528, 2013.

POLETTO, T. et al. First report of *Sirosporium diffusum* causing leaf spot on *Carya illinoensis* in Brazil. **Plant disease**, n. 101. v. 2, p. 381, 2017.

POLETTO, T. et al. Métodos de superação de dormência da semente de noqueira-pecã *Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch. **Revista Árvore [online]**, vol. 39, n. 6, p. 1111-1118, 2015.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R: a language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Áustria, p. 3-36, 2010.

SPOSITO, M. B. et al. Elaboração e validação de escala diagramática para avaliação da severidade da mancha preta em frutos cítricos. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, n. 1, p. 81-5, 2004.

STEIN, L. A.; MCEACHERN, G. R.; NESBITT, M. L. **Texas Pecan Handbook**, Texas A & M AgriLife Extension Service, College Station. p.199. (eds.). 2012.

SUSSEL, A. A. B.; POZZA, E. A.; CASTRO, H. A. **Escala diagramática para avaliação do mofo-cinzento-da-mamoneira**. Embrapa Cerrado, 2009. 22 p.

TERAMOTO, A. et al. Escala diagramática para avaliação da severidade da mancha alvo em folhas de pepineiro. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 41, n. 3, p. 439-445 2011.

TOVAR-SOTO, A. et al. Escala logarítmica diagramática de severidad de la mancha negra (*Colletotrichum gloeosporioides* Penz.) en chirimoyo (*Annona cherimola* Mill.). **Revista Mexicana de Fitopatología**, v. 20, p.103-109. 2002.

VALERIANO, R. et al. Diagramatic scale and diferencial reaction of clones for powdery mildew in *Eucalyptus*. **Scientia Forestalis**, v. 43, p. 51-61, 2015.

VENDRAME, W.; WETZSTEIN, H. **Carya illinoensis Pecan** In: LITZ, R.E. (Ed.) Biotechnology of Fruit and Nut Crops, CAB International, Wallingford Oxon. p. 298. 2005.

6 DISCUSSÃO GERAL

O cultivo de noqueira-pecã compõe um dos sistemas florestais exóticos mais antigos e importantes da região sul do Brasil, especialmente no estado do Rio Grande do Sul, porém somente nos últimos anos a cultura passou a ser valorizada comercialmente. No entanto, mesmo com mais de meio século de cultivo da espécie, poucas são as pesquisas voltadas para a melhoria da cultura, mesmo com a grande valorização e incentivos.

Entre os principais entraves da cadeia produtiva, destaca-se a incidência de doenças, em especial as que causam manchas foliares, como a mancha foliar de cladosporium (*Cladosporium* spp.) e a mancha foliar de pestalotiopsis (*Pestalotiopsis clavispora*) ambas causando danos em viveiro e em plantios a campo (LAZAROTTO et al., 2012; WALKER et al., 2016). Outra doença, não menos importante, a qual causa sérios danos à folhagem da noqueira-pecã é a mancha-foliar-morrom, causada pelo fungo *Sirosporium* sp. e, que no Brasil, a sua diagnose era confundida com outras manchas foliares presentes na cultura.

A primeira ocorrência desta doença em pomares brasileiros corresponde ao **capítulo I**, neste estudo foi identificado o fungo *S. diffusum* como agente causal. A partir deste primeiro relato, outros três estudos foram desenvolvidos com o intuito de elucidar esse novo patossistema presente nos plantios de noqueira - pecã do Rio Grande do Sul. Para isso, buscou-se caracterizar o agente causal através de descrições morfológicas e moleculares, além de relatar os sintomas da doença, haja vista que inexistem trabalhos científicos descrevendo os sintomas desse patossistema no Brasil. Além do mais, não há estudos mostrando as condições ideais requeridas para o desenvolvimento do fungo, uma vez que o mesmo apresenta crescimento extremamente lento em condições artificiais. Também, não foram encontradas escalas diagramáticas para quantificação da severidade da doença, como já existe para sarna da noqueira-pecã elaborada por Yadav et al. (2013).

A mancha foliar marrom de *S. diffusum* já foi relatada ocorrendo nos principais países produtores de nozes, Estados Unidos e México e, em outros, como África do Sul, Moçambique, Malawi, Cuba e Venezuela (CROUS; BRAUN, 2003) sempre associada a espécies da família Jugladaceae, como a *Carya illinoensis* e *Juglans regia*. A descrição sintomatológica dessa doença, bem como a caracterização

morfológica do patógeno, estão presentes nos trabalhos publicados por Chupp, (1953), Ellis (1976) e Brison (1974), os quais foram importantes para a comparação com os resultados obtidos no presente estudo. No entanto, não há trabalhos científicos disponíveis mais aprofundados sobre o patossistema em questão.

Os sintomas da mancha foliar marrom em *C. illinoensis*, observados nos pomares brasileiros, corroboram com os descritos por Chupp (1953), Ellis (1976) e Brison (1974). Essa doença pode ser diferenciada da mancha de cladosporium e da mancha de pestalotiopsis por vários caracteres. Os sintomas da mancha foliar marrom caracterizam-se por iniciarem no final da primavera e início do verão, as manchas tem coloração marrom avermelhadas com halo escuro de formato arredondado e bem delimitadas. Os sintomas perduram até o final do ciclo vegetativo causando intensa desfolha, no entanto, a doença não acomete os frutos.

Em contraponto, a mancha foliar de cladosporium tem início logo após a emissão das brotações no início da primavera, as lesões iniciais são pequenas de coloração cinza escuro à preto, a doença acometem ramos tenros, folhas ou frutos, as lesões geralmente coalescem e forma grandes áreas de tecido necrótico, em casos graves pode haver mumificação e abortamento dos frutos (JOHNSON; BLACK 2012; YADAV et al., 2013). E, a mancha de pestalotiopsis, ataca folhas maduras, suas lesões caracterizam-se por apresentar coloração cinza claro que se expandem necrosando o limbo foliar (LAZAROTTO et al., 2012). Geralmente esta doença inicia a necrose gradualmente das bordas para o centro dos folíolos e, logo após, causa abscisão foliar.

No **capítulo II**, o estudo realizado com os isolados de *Sirosporium* sp., mostrou que os mesmos foram patogênicos à *C. illinoensis*. Os sintomas observados no teste de patogenicidade corresponderam aos originais, típicos da doença quando observados em campo. Uma característica importante da mancha foliar marrom, já observada por Chupp (1953) e Ellis (1976), são as frutificações do patógeno, que se desenvolvem principalmente, na face abaxial do limbo foliar, característica que ajuda na identificação da doença. A mesma característica foi observada no teste de patogenicidade neste estudo.

Os isolados apresentaram diferenças quanto às características de patogênese (**capítulo II**). A maioria teve incidência máxima (100%), ou seja, todos tiveram habilidade para causar a infecção nos folíolo, no entanto, houve variações quanto à virulência dos isolados. A virulência, segundo Shaner et al. (1992) é um

componente da patogenicidade e tem caráter qualitativo. A virulência está associada às propriedades bioquímicas do agente, relacionada à produção de toxinas que contribuem para o aumento da severidade das doenças. Pascholati (2011) relata que as toxinas são vistas como fatores de virulência, pois contribuem para a severidade da doença sem serem essenciais para produção da mesma. No estudo aqui relatado, os isolados produziram uma pigmentação vermelha no entorno das colônias, difundindo-se no meio de cultura, em alguns isolados essa coloração era mais intensa do que em outros. Em *Cercospora kikuchii* o pigmento vermelho é uma toxina nomeada cercosporina, considerada crucial na patogênese de plantas (UPCHURCH et al., 1991). Almeida et al. (2005), relata haver uma forte correlação entre o teor de cercosporina e a virulência de *C. kikuchii* em *Glycine max* sendo que os isolados com colônias mais pigmentadas foram os mais virulentos. Talvez a variação na virulência entre isolados observada no teste de patogenicidade no presente estudo, também tenha relação com a pigmentação produzida pelas colônias, pois os isolados mais pigmentados (vermelho escuros), foram os mais virulentos.

Apesar da taxonomia atual de fungos estar majoritariamente atrelada a análises de DNA, a descrição das características morfológicas é importante para auxiliar na diferenciação desde isolados, gêneros ou até de espécies, sendo as duas técnicas consideradas fundamentais e complementares. O dendrograma de dissimilaridade entre os isolados de *Sirosporium* sp., elaborado com os dados quantitativos da caracterização morfológica, pelo método UPGMA, agrupou os isolados em três grupos, adotando 57% de dissimilaridade. O IVCN foi o caractere morfológico que mais contribuiu para a diferenciação dos isolados de *Sirosporium* sp.

Foram observadas variações entre as características morfológicas dos isolados. É comum nos gêneros fúngicos a mudança de suas características morfológicas, dependendo das condições de cultivo a que é submetido. No entanto, as variações ocorreram mesmo com os isolados sendo cultivados nas mesmas condições fisiológicas, isso sugere haver uma variabilidade intraespecífica dos isolados estudados. A reprodução sexuada, a qual é rearranjadora de variabilidade, não é conhecida nessa espécie. No entanto, Kistler e Miao, (1992), relatam que, para um patógeno sem reprodução sexual identificada, a variabilidade

intraespecífica pode ser explicada por mutações simples e aberrações cromossômicas como deleções, transposições e perdas cromossômicas.

Para a análise filogenética realizada a partir das sequências de DNA genômico da região ITS (Internal transcribed spacer) e do gene do Fator de alongação 1- α (*tef1- α*), foram construídos dendrogramas filogenéticos para cada região genômica estudada, os acessos para comparação com maior similaridade e cobertura, foram obtidos a partir do alinhamento BLAST no *Genbank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) (**capítulo II**). O dendrograma confeccionado com as sequências da região ITS, agrupou todos os isolados de *Sirosporium* sp. em um único clado (ramo) monofilético. As únicas duas sequências de referência de *Sirosporium diffusum*, uma disponível no Genbank (KX 344494), e a outra obtida do isolado de *S. diffusum* depositada em 1911 no Westerdijk Fungal Biodiversity Institute (CBS 106.14), também foi agrupada nesse mesmo clado. O suporte de *bootstrap* foi de 100% nesse clado, concluindo que a região ITS pode ser utilizada para separação das espécies, confirmando que os isolados obtidos nesse estudo são de *S. diffusum*.

O dendrograma filogenético confeccionado com as sequências do gene do Fator de alongação 1- α foi eficiente para a identificação dos isolados deste estudo, os quais foram agrupados em um clado monofilético juntamente com as duas sequências de referência (Genbank, KU 534938) e (CBS 106.14), ambas de *S. diffusum*, apresentando suporte de *bootstrap* de 96%. De acordo com Geiser et al. (2004), o gene do Fator de alongação 1- α tornou-se o marcador mais usual, visto que é um gene de cópia única, altamente informativo, indicado para separação de espécies relacionadas.

Apesar da importância desse patógeno, não foram encontrados na literatura estudos sobre as condições físicas adequadas para o seu crescimento e desenvolvimento *in vitro*, essas informações são essenciais para a viabilização de pesquisas subsequentes. No **capítulo III**, no primeiro ensaio, foi avaliada a interação do meio de cultura e regime de luz sobre o desenvolvimento de *S. diffusum*. Os meios de cultura V8, V8CaCO₃ e CA mostraram-se mais adequados para a esporulação em condições de luz contínua e/ou sequencial luz escuro. No meio CA, contudo, os conídios apresentaram características que mais se aproximaram das originais quando do isolamento inicial a partir de folhas com sintomas. Dessa forma,

este pode ser o meio de cultura mais adequado para estudos envolvendo caracterização morfológica. Em adição, em decorrência da formação de diferentes condições físicas, proporcionados pelos meios de cultura com composição variada e regimes de luz, notou-se, visualmente, uma expressiva diferenciação nas características qualitativas das colônias.

No segundo ensaio, realizado no **capítulo III**, avaliou-se o efeito do meio de cultura e temperatura sobre o desenvolvimento de *S. diffusum*. Um aumento na esporulação foi obtido quando as colônias de *S. diffusum* foram cultivadas à temperatura de $20 \pm 1^\circ\text{C}$ em todos os meios de cultura testados. No entanto, a maior média foi obtida em V8CaCO₃, seguido pelo meio CA que também teve uma esporulação satisfatória. Os resultados desse experimento evidenciaram uma forte influência da temperatura na esporulação do fungo.

Fatores abióticos, como a temperatura, luminosidade e composição do meio de cultura, são capazes tanto de induzir ou inibir o desenvolvimento vegetativo e reprodutivo da grande maioria dos fungos (DHINGRA; SINCLAIR, 1995; BRUNELLI et al., 2006). Em *Magnaporthe grisea*, por exemplo, a composição do meio de cultura influencia as características culturais das colônias fúngicas e a esporulação (DIAS NETO et al., 2010). A produção de proteínas e enzimas é influenciada pela temperatura e são responsáveis pela manutenção da célula fúngica. Enquanto que a luminosidade, tem ação direta na célula fúngica, isso significa que pode induzir ou inibir a formação das estruturas de reprodução, embora algumas espécies são indiferentes a quantidade e/ou qualidade da luz (HAWKER, 1957; GRIFFIN, 1994).

No **capítulo IV** buscou-se elaborar uma escala diagramática para quantificação da severidade da mancha foliar marrom. As escalas diagramáticas são utilizadas na orientação da estimativa visual de tal modo que a avaliação torne-se mais precisa e acurada após a comparação da amostra com a representação no diagrama (SPOSITO et al., 2004; SUSSEL; POZZA; CASTRO, 2009). A escala diagramática, confeccionada neste trabalho, considerou o nível máximo e o mínimo de severidade da doença como sendo os valores extremos da escala diagramática. Já os seis níveis intermediários foram definidos de acordo com a “Lei do estímulo visual de Weber-Fechner” (HORSFALL; COWLING, 1978), da mesma forma como foi utilizada em trabalhos anteriores como o de Bock et al. (2009) e Valeriano et al. (2015). A escala diagramática foi composta por oito níveis de severidade: 1,5%, 4,6%, 10,6%, 17,3%, 39,5%, 65,1%, 77,5% e 98% de área foliar lesionada.

Os parâmetros que indicam a eficiência de uma determinada escala diagramática são a precisão, acurácia e reprodutibilidade das estimativas de cada avaliador. A acurácia, neste caso, mede a proximidade da severidade estimada da severidade real da doença e será tanto maior quanto mais próximo de 1,0 for o coeficiente angular e mais próximo de zero for o coeficiente linear da equação entre a severidade estimada e a real (BERGAMIN FILHO; AMORIM, 1996; SPÓDITO et al., 2004). Com a utilização da escala, as estimativas de severidade da mancha foliar morrom foram próximas da severidade real, ou seja, melhoraram a acuracidade em relação as estimativas sem o uso da escala. Os valores do coeficiente linear (a) não diferiram de zero para todos os avaliadores, indicando ausência de desvios constantes nas estimativas. Além disso, nenhum avaliador apresentou valor do coeficiente angular (b) significativamente diferente de 1,0, descartando-se haver erro sistemático nas estimativas.

Já a precisão pode ser quantificada pela variação do erro absoluto das estimativas e também pelo coeficiente de determinação da regressão linear (R^2), de modo que, quanto maior for o valor (mais próximo de 1,0), maior será a precisão das estimativas (NUTTER JR.; SCHULTZ, 1995). Todos os avaliadores, ao utilizarem a escala diagramática em suas estimativas melhoraram sua precisão, mostrando que a escala, além de proporcionar acuracidade, é também precisa, visto que, os coeficientes de determinação variaram de 0,94 a 0,99. O erro absoluto, que é dado pela diferença entre a severidade estimada e a real, apresentou uma redução considerável nas estimativas com o auxílio da escala diagramática, quando comparado com o erro absoluto das estimativas obtidas sem a utilização da escala. Por conseguinte, a escala contribuiu para que os avaliadores não apresentassem tendenciosidades em suas estimativas, não resultando em super ou subestimação da severidade em comparação à severidade real.

Com a utilização da escala diagramática, a reprodutibilidade das estimativas, calculada por meio do coeficiente de determinação (R^2) das regressões lineares combinadas entre pares de avaliadores foi satisfatória e os valores dos coeficientes variaram de 0,86 a 0,98. Spodito et al. (2004) ressaltaram que, quando a escala diagramática proporciona reprodutibilidade, a severidade da doença pode ser estimada por qualquer avaliador, gerando resultados semelhantes, além de proporcionar padronização em experimentos conduzidos por avaliadores distintos.

Assim, pode-se inferir que a escala diagramática confeccionada no presente estudo, proporcionou maior acuracidade, precisão e reprodutibilidade nas estimativas da severidade da mancha foliar marrom em folíolos de noqueira-pecã. Lenz et al. (2009) ressaltaram que, uma vez satisfeitos esses critérios, uma escala pode ser adotada em estudos epidemiológicos, trazendo confiabilidade nos resultados, reduzindo a subjetividade das estimativas, além de proporcionar padronização nas avaliações da severidade da doença, permitindo a comparação de resultados entre diferentes instituições ou locais.

As informações geradas nessa pesquisa tem caráter inédito, e possibilitaram a descrição desse novo patossistema, *Sirosporium diffusum* - *Carya illinoinesis* no Rio Grande do Sul. Os resultados encontrados servem de base para futuros estudos, sejam eles com âmbito epidemiológico, variabilidade do agente patogênico, caracterização taxonômica, programas de melhoramento genético, entre outros. Além disso, fornecem subsídios para o desenvolvimento de estratégias de controle e prevenção de doenças.

7 CONCLUSÕES

Sirosporium diffusum é o agente causador da mancha foliar marrom em *Carya illinoensis*.

Os resultados deste estudo mostraram através do teste de patogenicidade, que todos os isolados de *Sirosporium diffusum* obtidos foram patogênicos à *Carya illinoensis*, no entanto, houve diferenças na virulência.

Um metabólito secundário com pigmentação avermelhada, de composição desconhecida, foi produzido pelo patógeno em meio de cultura cenoura - ágar - água e pode estar ligada a sua virulência.

Os isolados de *Sirosporium diffusum* estudados apresentam variabilidade intraespecífica, uma vez que apresentaram variações em suas características morfológicas e patogênicas, apesar de não ser observada sua fase teleomórfica.

As variáveis morfológicas que mais contribuíram para separação dos isolados de *S. diffusum* foram o IVCM, seguido pelo CMD e crescimento micelial.

O sequenciamento da região ITS (espaçador interno transcrito) e do gene Fator de alongação 1- α (*tef1- α*) podem ser utilizados na identificação de *Sirosporium diffusum*.

As melhores condições artificiais de cultivo em que *Sirosporium diffusum* apresenta bom crescimento micelial e esporulação de forma conjunta foi obtida com fotoperíodo de 24h, temperatura de $20 \pm 1^\circ\text{C}$ e com os meios de cultura V8CaCO₃, como também no CA.

A escala diagramática proposta para a avaliação da severidade da mancha foliar marrom em *Carya illinoensis* proporciona boa acurácia, precisão e reprodutibilidade das estimativas aos avaliadores, além de ser de fácil utilização, sendo adequada para estudos epidemiológicos da doença.

8 REFERÊNCIAS GERAIS

- ALMEIDA, A. M. R. et al. Pathogenicity, molecular characterization, and cercosporin content of Brazilian isolates of *Cercospora kikuchii*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, n. 6, p. 594-602, 2005.
- BERGAMIN FILHO, A.; AMORIM, L. **Doenças de plantas tropicais: epidemiologia e controle econômico**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1996. 299p.
- Bock, C. H. et al. The Horsfall-Barratt scale and severity estimates of citrus canker. **European journal of plant pathology**, v. 125, n.1, p. 23-38, 2009.
- BOCK, C. H. et al. Severity of scab and its effects on fruit weight in mechanically hedge-pruned and topped pecan trees. **Plant Disease**, v. 101, n. 5, p. 785-793, 2017.
- BRISON, F. R. **Pecan Culture**. Capitol Printing, Austin, Texas. p. 292. 1974.
- BRUNELLI, K. R. et al. Efeito do meio de cultura e do regime de luz na esporulação de *Cercospora zeaemaydis*. **Summa Phytopatologica**, v. 32, n. 1, p. 92-94, 2006.
- CHUPP, C. **A monograph of the fungus genus Cercospora**. Ithaca, N.Y., p. 1886-1967, 1953.
- CROUS, P. W; BRAUN, U. **Mycosphaerella and its anamorphs: 1. Names published in Cercospora and Passalora**. Utrecht, Centraalbureau voor Schimmelcultures CBS Biodiversity Series, v. 1, 2003. 571p.
- DHINGRA, O. D.; SINCLAIR, J. B. **Basic Plant Pathology Methods**. Lewis Publishers, Boca Raton, Florida. 1995.
- DIAS NETO, J. J. et al. Influência do meio de cultura na esporulação de *Magnaporthe Grisea* e da concentração de conídios na severidade da brusone do arroz. **Bioscience Journal**, v. 26, n. 2, p. 173-179, 2010.
- ELLIS, M. B. **More dematiaceous Hyphomycetes**. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England. 1976.
- GEISER, D. M. et al. FUSARIUM-ID v.1.0: A DNA sequence database for identifying *Fusarium*. **European Journal of Plant Pathology**, [S.l.], v. 110, n. 5-6, p. 473-479, 2004.
- GRIFFIN, D. H. **Fungal physiology**. New York: Wiley-Liss, 1994. 458 p.
- HAWKER, L. E. **The physiology of reproduction in fungi**. Cambridge: Cambridge University Press, 1957. 128 p.
- Horsfall, J. G.; Cowling, E. B. Pathometry: the measurement of plant disease. **Plant Disease: an advanced treatise-how disease develops in populations**, v. 2, p. 119-136, 1978.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção Agrícola Municipal 2015**. Rio de Janeiro: IBGE, 2016. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/estadosat/perfil.php?sigla=rs>>. Acesso em: 17 de maio de 2017.

JOHNSON, J. D.; BLACK, M. C. Pecan Disease Identification and Control. IN: STEIN, L. A., MCEACHERN, G. R. & NESBITT, M. L. **Texas Pecan Handbook**, Texas A & M AgriLife Extension Service, College Station. 2012, 199 p.

KISTLER, H. C.; MIAO, V. P. W. New modes of genetic change in filamentous fungi. **Annual Review of Phytopathology**, v. 30, n. 1, p.131- 152, 1992.

LANFRANCO, L. et al. A combined morphological and molecular approach to characterize isolates of arbuscular mycorrhizal fungi in *Gigaspora (Glomales)*. **New Phytologist**, v. 152, n. 1, 169-179. 2001.

LAZAROTTO, M. et al. First report of *Pestalotiopsis clavispora* causing leaf spot of *Carya illinoensis* in Brazil. **Plant Disease**, v. 96, n. 12, p. 1826-1826. 2012.

LAZAROTTO, M. et al. Morphological and molecular characterization of *Fusarium* spp. pathogenic to pecan tree in Brazil. **Genetics and Molecular Research**, v. 13, p. 9390-9402. 2014.

LENZ G. et al. Escala diagramática para avaliação de severidade de mancha-de-septoria em girassol. **Ciência Rural**, v. 39, n. 8, p. 2527-2530, 2009.

MAGNANI, M., et al. Molecular identification of *Aspergillus* spp. isolated from coffee beans. **Scientia Agricola**, v. 62, n. 1, p. 45-49, 2005.

NUTTER JR., F.W.; SCHULTZ, P. M. Improving the accuracy and precision of disease assessments: selection of methods and use of computer-aided training programs. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 17, n. 1, p. 174-184, 1995.

PASCHOLATI, S. F. Fisiologia do parasitismo: como os patógenos atacam as plantas. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de Fitopatologia: princípios e controle**. São Paulo: Editora Agronômica Ceres. 4. Ed. v. 2, cap. 34, p. 543-591, 2011.

POLETTO T. et al. First report of stem canker caused by *Lasiodiplodia subglobosa* on *Carya illinoensis* in Brazil. **Plant Disease**, v. 101, n. 5, p. 1016, 2016.

POLETTO, T. et al. Métodos de superação de dormência da semente de noqueira-pecã *Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch. **Revista Árvore**, v. 39, n. 6, p. 1111-1118, 2015.

RHODES, C. **Texas Plant Disease Handbook: Pecan**. Texas AgriLife Extension Service. Texas, 2014. Disponível em: <<https://plantdiseasehandbook.tamu.edu/food-crops/nut-crops/pecan/>>. Acesso em: 03 de março de 2018.

SEAPI - Secretário da Agricultura, Pecuária e Irrigação do Estado do Rio Grande do Sul. **Programa Estadual de Desenvolvimento da Pecanicultura – Pró-Pecã**. 2017. Disponível em: <<http://www.agricultura.rs.gov.br/pro-peca>>. Acesso em: 21 de fevereiro de 2018.

SHANER, G. et al. Nomenclature and concepts of pathogenicity and virulence. **Annual Review of Phytopathology**, v. 30, n. 1, p. 47–66, 1992.

SHI, H. J. et al. First report of *Pestalotiopsis microspora* as a causal agent of black spot of pecan (*Carya illinoensis*) in China. **Plant Disease**, v. 99, n. 9, p. 1276. 2015.

SOUTO, E. R.; TESSMAN, D. J.; NUNES, W. N. C. Métodos de PCR aplicados à Fitopatologia. **Fitopatologia Brasileira**, v. 27, p. 22-46. 2000.

SPOSITO, M. B. et al. Elaboração e validação de escala diagramática para avaliação da severidade da mancha preta em frutos cítricos. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, n. 1, p. 81-5, 2004.

SUSSEL, A. A. B.; POZZA, E. A.; CASTRO, H. A. **Escala diagramática para avaliação do mofo-cinza-da-mamoneira**. Embrapa Cerrado, 2009.

TEMELLI, F. et al. Supercritical Fluid Extraction of Specialty Oils. In: MARTINEZ, J. L. (Ed.). **Supercritical Fluid extraction of nutraceutical and bioactive compounds**. Estados Unidos: CRC Press. cap. 3, p. 52-91, 2007.

TEIXEIRA, H.; VIEIRA, M.G.G.C.; MACHADO, J.C. Marcadores morfofisiológicos e isoenzimáticos na análise da diversidade genética de isolados de *Acremonium strictum*. **Fitopatologia Brasileira**. n. 29, p. 413-418, 2004.

TURECHEK, W. W.; STEVENSON, K. L. Effects of host resistance, temperature, leaf wetness duration, and leaf age on infection and lesion development of pecan scab. **Phytopathology**, n. 88, p. 1294-1301, 1998.

UPCHURCH R.G, et at. Mutants of *Cercospora kikuchii* altered in cercosporin synthesis and pathogenicity. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, n. 10, p. 2940, 1991.

VALERIANO, R. et al. Diagramatic scale and differential reaction of clones for powdery mildew in Eucalyptus. **Scientia Forestalis**. v.43, p.51-61, 2015.

VILLARREAL-LOZOYA, J. E.; LOMBARDINI, L.; CISNEROS-ZEVALLOS, L. Phytochemical constituents and antioxidant capacity of different pecan [*Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch] cultivars. **Food Chemistry**, v. 102, n. 4, p. 1241-1249, 2007.

VIDEIRA, S. I. R. et al. Mycosphaerellaceae—Chaos or clarity?. **Studies in Mycology**, v. 87, p. 257-421, 2017.

WALKER C. et al. Morphological and molecular characterization of *Cladosporium cladosporioides* species complex causing pecan tree leaf spot. **Genetics and Molecular Research**, v.15, n.3, p.1-11, 2016.

YADAV, N. V. S. et al. Development and validation of standard area diagrams to aid assessment of pecan scab symptoms on fruit. **Plant Pathology**, n. 62, p. 325–335, 2013.

YANG, J. Brazil nuts and associated health benefits: A review. **LWT - Food Science and Technology**, v. 42, n. 10, p. 1573-1580, 2009.