

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

Ricardo Mezzomo

**CARACTERIZAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA, MOLECULAR,  
ENZIMÁTICA E COMPATIBILIDADE VEGETATIVA DE *Fusarium*  
*oxysporum* E *F. solani* EM ERVA-MATE**

Santa Maria, RS  
2017

**Ricardo Mezzomo**

**CARACTERIZAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA, MOLECULAR, ENZIMÁTICA E  
COMPATIBILIDADE VEGETATIVA DE *Fusarium oxysporum* E *F. solani* EM  
ERVA-MATE**

Tese apresentada ao curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, Área de Concentração em Silvicultura, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Engenharia Florestal**.

Orientador (a): Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marlove Fátima Brião Muniz

Santa Maria, RS  
2017

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Mezzomo, Ricardo

Caracterização morfofisiológica, molecular, enzimática e compatibilidade vegetativa de *Fusarium oxysporum* e *F. solani* em erva-mate / Ricardo Mezzomo.- 2017.

97 f.; 30 cm

Orientadora: Marlove Fátima Brião Muniz  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, RS, 2017

1. *Ilex paraguariensis* 2. UPGMA 3. Patogenicidade I. Muniz, Marlove Fátima Brião II. Título.

---

© 2017

Todos os direitos autorais reservados a Ricardo Mezzomo. A reprodução de partes ou de todo deste trabalho só poderá ser feita mediante citação da fonte.

Endereço: Departamento de Defesa Fitossanitária, Centro de Ciências Rurais, Prédio 42 - Campus Universitário, Universidade Federal de Santa Maria, CEP: 97105-900 - Santa Maria/RS.

Fone: (55) 3220-8015; e-mail: mezzomoricardo@hotmail.com

---

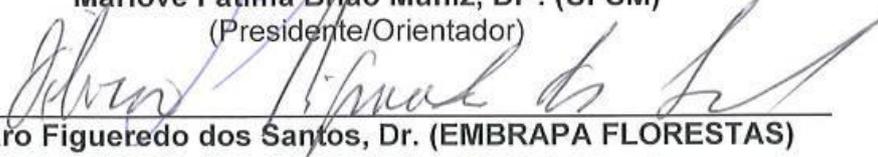
Ricardo Mezzomo

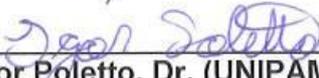
**CARACTERIZAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA, MOLECULAR, ENZIMÁTICA E  
COMPATIBILIDADE VEGETATIVA DE *Fusarium oxysporum* E *F. solani* EM  
ERVA-MATE**

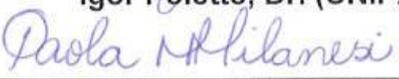
Tese apresentada ao curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, Área de Concentração em Silvicultura, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Engenharia Florestal**.

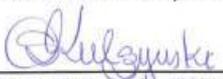
**Aprovado em 17 de fevereiro de 2017:**

  
\_\_\_\_\_  
**Marlove Fátima Brião Múniz, Dr<sup>a</sup>. (UFSM)**  
(Presidente/Orientador)

  
\_\_\_\_\_  
**Alvaro Figueredo dos Santos, Dr. (EMBRAPA FLORESTAS)**

  
\_\_\_\_\_  
**Igor Poletto, Dr. (UNIPAMPA)**

  
\_\_\_\_\_  
**Paola Mendes Milanesi, Dr<sup>a</sup>. (UFFS)**

  
\_\_\_\_\_  
**Stela Maris Kulczynski, Dr<sup>a</sup>. (UFSM/CESNORS)**

Santa Maria, RS  
2017

*À minha mãe Iria Teresinha, pela compreensão, amor e carinho. Aos amigos Jéssica Mengue Rolim e Matheus dos Santos Coelho, fundamentais para conclusão deste trabalho.*

*Dedico e ofereço.*

## AGRADECIMENTOS

À Deus pelo dom da vida.

À toda minha família em especial a minha mãe Iria Teresinha, pelo amor, apoio e incentivo.

À Universidade Federal de Santa Maria que oportunizou a realização desta tese.

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal através da Professora Dr<sup>a</sup>. Marlove Fátima Brião Muniz, pela oportunidade.

Ao órgão financiador CAPES, pelo apoio financeiro com a concessão da bolsa de doutorado.

À professora Dr<sup>a</sup>. Lia Rejane Silveira Reiniger, pela Co-orientação deste trabalho e ajuda nos momentos em que foram solicitados.

À banca examinadora, constituída pelos Dr. Álvaro Figueredo dos Santos, Prof. Dr. Igor Poletto e pelas Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Paola Mendes Milanesi e Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Stela Maris Kulczynski .

À Maria secretária do PPGEF, pela paciência e atenção durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos produtores Sérgio Toigo, Marcos Vitor, Juceli Vicenguera, Sérgio Montagner, Santiago Bagnara, Gilmar Guarda, Luis Dallasta, Caetano Fortunati, Verildo Rufato, Elio Pieri, Lourenzo Baldissera, Anacleto Pieri, Anildo Zeni, Clairton Fonseca pela gentileza de cederem seus ervais para as coletas.

Ao estágio Felipe Bagnara pela disponibilidade no dia das coletas.

Aos extencionistas da Emater Luiz Fernando, Ilvandro, Dario e Janes pela disponibilidade e contato com os produtores.

Ao Sr. Jurandir Marques sempre prestativo quando solicitado para realização das coletas.

Ao Sr. Altair da Ervateira Cambona 4 pela disponibilidade e pela ajuda prestada durante as coletas.

Ao casal Maria e Ivanor Poletto pela receptibilidade e pelo apoio.

Aos colegas de Laboratório Caciara Gonzatto Maciel, Clair Walker, Marília Boff, Felipe Vedovatto, Renata Fontana Favaretto, Rosa Maria Dalla Nora Michelin, Victoria Cozer Rosenthal, Vinicius Fantinel, Adriana Falcão Dutra, Lucas Gracioli Savian, Pamela Oruoski, Emanuele Junges, Camila Maydana Ribeiro, Camila

Santiago, Jaqueline Raquel Tomm Krahn e Jéssica Emília Rabuski pela amizade pelos bons momentos no ambiente de trabalho.

Ao Eng. Ftal. Tales Poletto pela disponibilidade, pelos ensinamentos e paciência.

Um agradecimento especial a Eng. Ftal. Jéssica Mengue Rolim por acreditar que este trabalho era possível, pela ajuda, dedicação, disponibilidade e doação a quem eu devo meu eterno agradecimento.

Ao amigo Matheus dos Santos Coelho pela força e por me mostrar que quando alguém torce e apoia tudo é possível.

Aos funcionários do Departamento de Defesa Fitossanitária, Angelita Sangoi Martins, Marizete Possobom, Fernando Gnocatto e, especialmente, Maria Nevis Deconto Weber pelos ensinamentos, amizade e carinho.

A todos muito obrigado e se precisar contem comigo.

## RESUMO

### CARACTERIZAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA, MOLECULAR, ENZIMÁTICA E COMPATIBILIDADE VEGETATIVA DE *Fusarium oxysporum* E *F. solani* EM ERVA-MATE

AUTOR: Ricardo Mezzomo

ORIENTADOR: Marlove Fatima Brião Muniz

O cultivo da erva-mate (*Ilex paraguariensis*) tem se intensificado no estado do Rio Grande do Sul, fruto da valorização do preço pago ao produtor. Contudo, a demanda de estudos relacionados ao patossistema *Fusarium* x erva-mate ainda são insuficientes, de modo que muitos produtores têm enfrentado perdas significativas na produção dos ervais. Diante do exposto, o objetivo geral deste trabalho foi caracterizar o agente causal da podridão-de-raízes da erva-mate (*I. paraguariensis*). Como objetivos específicos estabeleceram-se os seguintes: a) selecionar caracteres morfofisiológicos eficientes na separação dos isolados em grupos de similaridade; b) avaliar o sequenciamento de diferentes regiões do genoma na identificação dos isolados patogênicos em nível de espécie; c) identificar a formação de grupos de compatibilidade vegetativa (VCG) entre os isolados patogênicos; d) investigar o arsenal enzimático dos isolados patogênicos. Para tanto, foram realizadas coletas em cinco municípios do estado, para isolamento do patógeno. Além disso, foram coletadas amostras de solo para a caracterização da área e também o georreferenciamento dos pontos de coleta. Os isolados de *Fusarium* spp., foram testados quanto a sua patogenicidade através da inoculação em substrato. Não foi possível associar as propriedades químicas do solo das áreas de coleta com a patogenicidade dos isolados em substrato comercial. Os 39 isolados foram caracterizados morfológicamente através das variáveis crescimento micelial, esporulação, comprimento e largura dos macroconídios, formato dos microconídios, pigmentação das colônias e formação de clamidósporos. As variáveis utilizadas na caracterização morfológica foram eficientes na discriminação em sete grupos de isolados, especialmente comprimento dos macroconídios associado a esporulação. Foram identificados sete isolados patogênicos de *Fusarium* spp. Os isolados patogênicos também foram identificados molecularmente através de sequenciamento das regiões do gene ITS, TEF-1 e  $\beta$ -tubulina. O sequenciamento das regiões ITS, TEF-1 $\alpha$  e  $\beta$ -tubulina, consolidou a separação entre os isolados patogênicos em *F. solani* e *F. oxysporum*. Para os mesmos isolados a técnica para obtenção de mutantes *nit* é adequada para a classificação fenotípica, fundamentais nos testes de VCG para espécies de *Fusarium*. Foram obtidos cinco VCG's. Os isolados patogênicos de *Fusarium* spp. produziram as enzimas extracelulares catalase, lacase, celulase, caseinase, amilase, protease, lipase, poligalacturonase e pectato liase.

**Palavras-chave:** *Ilex paraguariensis*. UPGMA. Patogenicidade.

## ABSTRACT

### MORPHOLOGICAL, MOLECULAR, ENZYMATIC CHARACTERIZATION AND VEGETATIVE COMPATIBILITY OF *Fusarium oxysporum* AND *F. solani* IN YERBA-MATE

AUTHOR: RICARDO MEZZOMO  
ADVISOR: MARLOVE FATIMA BRIÃO MUNIZ

The cultivation of Yerba-mate (*Ilex paraguariensis*) has intensified in the state of Rio Grande do Sul, due to the valorization of the price paid to the producer. However, the demand for studies related to the pathosystem *Fusarium* x yerba-mate is still insufficient, so that many producers have faced significant losses in the production of the plantations. Given the above, the aim of this study was to characterize the causal agent of rot-of-roots in Yerba-mate (*I. paraguariensis*). The following specific objectives were established: a) to select efficient morphological characters in the separation of the pathogenic isolates by groups of similarity b) to evaluate the sequencing of different regions of the genome in the identification of the pathogenic isolates at a species level c) to identify the formation of vegetative compatibility groups (VCG) among the pathogenic isolates d) to investigate the enzymatic arsenal of the pathogenic isolates. Therefore, samples were taken in five municipalities of the state, for the pathogen isolation. In addition, soil samples were collected for the area characterization and also for the geo-referencing of collection points. *Fusarium* spp. isolates were tested for their pathogenicity through substrate inoculation. It was not possible to associate the chemical properties of the soil of the collected areas with the pathogenicity of the isolates in commercial substrates. The 39 isolates were morphologically characterized through the variables of mycelial growth, sporulation, length and width of macroconidia, shape of microconidia, pigmentation of the colonies and formation of chlamydospores. The variables used in the morphological characterization were efficient in the discrimination for seven groups of isolates, especially length of macroconidia associated with sporulation. There were identified seven pathogenic isolates of *Fusarium* spp. The pathogenic isolates were also identified molecularly by sequencing the ITS, TEF-1 and  $\beta$ -tubulin regions. The sequencing of the ITS, TEF-1 $\alpha$  and  $\beta$ -tubulin regions, consolidated the separation between the pathogenic isolates in *F. solani* and *F. oxysporum*. For the same isolates, the technique to obtain *nit* mutants is suitable for phenotypic classification, which is fundamental in the VCG tests for *Fusarium* species. Five VCGs were obtained. The pathogenic isolates of *Fusarium* spp. produced extracellular enzymes catalase, laccase, cellulase, caseinase, amylase, protease, lipase, polygalacturonase and pectate lyase.

**Keywords:** *Ilex paraguariensis*. UPGMA. Pathogenicity.

## LISTAS DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Plantas adultas (A e B) e raízes (C e D) de erva-mate com sintomas de podridão-de-raízes .....	41
Figura 2 - Aspectos e coloração das colônias (imagens superiores indicam a pigmentação das colônias e inferiores a coloração do micélio aéreo em meio BDA após 10 dias de incubação. (A): amarelo oliva; (B): marrom escuro; (C): púrpura; (D): amarelo; (E): rosa claro; (F): marrom; (G): amarelo bronzeado .....	46
Figura 3 - Caracterização morfológica de <i>Fusarium</i> spp. (A): microconídios; (B: M5AR1; C: M3AR2; D: AVF2; F: I3AR2; G: ATAR2): macroconídios; (E): clamidósporos .....	48
Figura 4 - Dendrograma mostrando a porcentagem (%) de dissimilaridade entre os 39 isolados de <i>Fusarium</i> spp. O dendrograma foi obtido pela técnica UPGMA, a partir da análise da matriz de distância Euclidiana, com os quatro caracteres morfológicos (esporulação, crescimento micelial, comprimento e largura dos macroconídios) .....	51
Figura 5 - Crescimento micelial de <i>Fusarium</i> spp (M3AR2) em diferentes meios e regimes de luminosidade (horas). (A, E, I): BDA - 0,12, 24h; (B, F, J): BSA - 0, 12, 24h; (C, G, H): MEA - 0, 12, 24h; (D, H, L): V8 - 0, 12, 24 h respectivamente. ....	57
Figura 6 - Dendrograma filogenético baseado no método <i>Neighbor-joining</i> a partir de sequências de DNA da região ITS. Os números sobre os ramos indicam a porcentagem de repetições da análise de bootstrap na qual as repetições foram observadas (1000 repetições). Uma sequência de <i>Lasodiplodia subglobosa</i> foi utilizada como <i>outgroup</i> . ....	65
Figura 7 - Dendrograma filogenético baseado no método <i>Neighbor-joining</i> a partir de sequências de DNA da região do fator de alongação 1- $\alpha$ . Os números sobre os ramos indicam a porcentagem de repetições da análise de bootstrap na qual as repetições foram observadas (1000 repetições). Uma sequência de <i>Lasodiplodia subglobosa</i> foi utilizada como <i>outgroup</i> . ....	67
Figura 8 - Dendrograma filogenético baseado no método <i>Neighbor-joining</i> a partir de sequências de DNA da região beta-tubulina. Os números sobre os ramos indicam a porcentagem de repetições da análise de bootstrap na qual as repetições foram observadas (1000 repetições). Uma sequência de <i>Lasodiplodia subglobosa</i> foi utilizada como <i>outgroup</i> . ....	69
Figura 9 - Sintoma observado em mudas de <i>Ilex paraguariensis</i> transplantadas em substrato infestado com <i>Fusarium</i> spp.: (A): estrangulamento da muda na região do colo; (B): sinais do patógeno. ....	71
Figura 10 - Sintomas reflexos observados em mudas de <i>Ilex paraguariensis</i> transplantadas em substrato infestado com <i>Fusarium</i> spp.: (A) amarelecimento, (B) amarelecimento + encarquilhamento, (C) amarelecimento + encarquilhamento + necrose, (D) amarelecimento + necrose. ....	72

Figura 11 - Teste de patogenicidade em mudas de <i>Ilex paraguariensis</i> 180 dias após o contato com substrato infestado com <i>Fusarium</i> spp.: (A) e (C): Mudas à esquerda em contato com os isolados M3AR2 e M7C1, respectivamente, e à direita muda testemunha; (B) e (D): Raízes à esquerda em contato com os respectivos isolados e à direita, raiz da muda testemunha.....	73
Figura 12 - Produção de setores resistentes a KClO <sub>3</sub> dos isolados de <i>Fusarium solani</i> . (A): M3AR2; (B): M5AR2.....	75
Figura 13 - Classificação fenotípica dos mutantes nit obtidos de isolado patogênicos de <i>Fusarium</i> spp. cultivados em meio mínimo suplementado com diferentes fontes de nitrogênio: nitrato de sódio (NA), hipoxantina (HP) e nitrito de sódio (NO). ....	77
Figura 14 - Teste de complementação em meio mínimo (MM). (A) e (B): autocompatibilidade dos isolados M4 e I8AR1, respectivamente; (C): pareamento entre os isolados I6AR2 e I8AR1 .....	78
Figura 15 - Arsenal enzimático do isolado de <i>Fusarium solani</i> M7C1. (A): catalase; (B): caseinase; (C): celulase; (D): lipase; (E): protease; (F): lacase; (G): Amilase; (H): Poligalacturonase; (I): Pectato liase .....	83

## LISTAS DE TABELAS

Tabela 1 - Áreas de coleta de isolados de <i>Fusarium</i> spp. provenientes de plantios de erva-mate ( <i>Ilex paraguariensis</i> ) no Rio Grande do Sul. ....	30
Tabela 2 - Utilização de diferentes fontes de nitrogênio nos ensaios de fenotipagem.....	36
Tabela 3 - Código dos isolados de <i>Fusarium</i> spp., procedência, idade e data de coleta dos isolados obtidos de raízes sintomáticas e mudas de erva-mate com sintoma de tombamento .....	42
Tabela 4 - Propriedades químicas do solo nas áreas de coletas das raízes sintomáticas de <i>Ilex paraguariensis</i> no Rio Grande do Sul .....	44
Tabela 5 - Características morfológicas dos isolados de <i>Fusarium</i> spp. obtidos de plantas sintomáticas de <i>Ilex paraguariensis</i> .....	49
Tabela 6 - Grupos de isolados de <i>Fusarium</i> spp. com base no método de agrupamento UPGMA .....	52
Tabela 7 - Estimativas da distância Euclidiana entre 39 isolados de <i>Fusarium</i> spp., após agrupamento pela técnica UPGMA.....	53
Tabela 8 - Contribuição relativa dos caracteres (esporulação, taxa de crescimento micelial, comprimento e largura dos macroconídios) para divergência .....	55
Tabela 9 - Crescimento micelial (mm) de isolados <i>Fusarium</i> spp. mensurado aos sete dias em diferentes níveis de luminosidade (horas) e meios de cultura. ....	56
Tabela 10 - Esporulação ( $\times 10^6$ esporos/mL) de <i>Fusarium</i> spp. mensurado aos sete dias em diferentes níveis de luminosidade (horas) e meios de cultura .....	60
Tabela 11 - Acesso no <i>Genbank</i> , cobertura (%), similaridade (%), país de origem e referências das espécies utilizadas na construção do dendrograma filogenético da região genômica ITS. ....	64
Tabela 12 - Acesso no <i>Genbank</i> , cobertura (%), similaridade (%), país de origem e referência das espécies utilizadas na construção do dendrograma filogenético da região do fator de alongação $1-\alpha$ . ....	66
Tabela 13 - Acesso no <i>Genbank</i> , cobertura (%), similaridade (%), país de origem e referência das espécies utilizadas na construção do dendrograma filogenético da região genômica beta-tubulina .....	68
Tabela 14 - Médias de fitomassa seca da parte aérea (FSA), fitomassa seca das raízes (FSR) e o percentual de mudas mortas (% MM) de erva-mate, 180 dias após o contato com o substrato colonizado por <i>Fusarium</i> spp. ....	71
Tabela 15 - Classificação fenotípica dos mutantes nit's obtidos de isolados de <i>Fusarium</i> spp. patogênicos a erva-mate .....	76
Tabela 16 - Produção de enzimas extracelulares de <i>Fusarium</i> spp. isolados de plantas sintomáticas de <i>Ilex paraguariensis</i> , em meios de cultura específicos .....	80

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	17
2.1	<i>Ilex paraguariensis</i> .....	17
2.2	PODRIDÃO-DE-RAÍZES DA ERVA MATE.....	18
2.3	GÊNERO <i>Fusarium</i> .....	19
2.4	CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA.....	20
2.5	CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR .....	22
2.6	VARIABILIDADE DE AGENTES PATOGÊNICOS .....	24
2.7	GRUPOS DE COMPATIBILIDADE VEGETATIVA - VCG .....	25
2.8	ENZIMAS EXTRACELULARES.....	26
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	29
3.1	LOCALIZAÇÃO E CARACTERÍSTICAS GERAIS DO EXPERIMENTO.....	29
3.2	CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO SOLO DAS ÁREAS DE COLETA .....	29
3.3	OBTENÇÃO E PURIFICAÇÃO DE ISOLADOS DE <i>Fusarium</i> .....	29
3.4	CARACTERIZAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA DOS ISOLADOS DE <i>Fusarium</i> spp. ....	31
3.4.1	Taxa de crescimento micelial .....	31
3.4.2	Esporulação .....	32
3.4.3	Pigmentação das colônias.....	32
3.4.4	Caracterização dos conídios .....	32
3.4.5	Crescimento micelial e esporulação em diferentes meios de cultura e níveis de luminosidade. ....	32
3.5	PATOGENICIDADE DOS ISOLADOS DE <i>Fusarium</i> spp. ....	33
3.5.1	Produção do inóculo .....	33
3.5.2	Infestação do substrato e transplante das mudas .....	33
3.5.3	Reisolamento de <i>Fusarium</i> spp.....	34
3.6	CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS ISOLADOS DE <i>Fusarium</i> spp.....	34
3.7	GRUPOS DE COMPATIBILIDADE VEGETATIVA (VCG) .....	35
3.7.1	Obtenção dos mutantes <i>nit</i> .....	35
3.7.2	Caracterização fenotípica dos mutantes <i>nit</i> .....	36
3.7.3	Teste de compatibilidade vegetativa .....	36
3.8	PRODUÇÃO DE ENZIMAS EXTRACELULARES DE ISOLADOS DE <i>Fusarium</i> spp. ....	37
3.8.1	Catalase .....	37
3.8.2	Fenoloxidase-lacase.....	37
3.8.3	Amilase .....	38
3.8.4	Caseinase .....	38
3.8.5	Protease .....	38
3.8.6	Celulose.....	39
3.8.7	Lipase .....	39
3.8.8	Pectinase .....	39
3.9	DELINEAMENTOS ESTATÍSTICOS E ANÁLISES .....	40
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	41
4.1	ISOLADOS OBTIDOS .....	41
4.2	CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO SOLO DAS ÁREAS DE COLETA .....	43

4.3	CARACTERIZAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA DOS ISOLADOS DE <i>Fusarium</i> spp.....	45
4.4	CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE <i>Fusarium</i> spp.....	61
4.5	PATOGENICIDADE DOS ISOLADOS DE <i>Fusarium</i> spp. EM MUDAS DE ERVA-MATE.....	70
4.6	GRUPOS DE COMPATIBILIDADE VEGETATIVA EM ISOLADOS PATOGÊNICOS DE <i>Fusarium</i> spp.....	74
4.6.1	<b>Obtenção de mutantes <i>nit</i></b> .....	74
4.6.2	<b>Classificação fenotípica dos mutantes <i>nit</i></b> .....	75
4.6.3	<b>Grupos de compatibilidade vegetativa (VCG)</b> .....	77
4.7	PRODUÇÃO DE ENZIMAS EXTRACELULARES IN VITRO POR ISOLADOS PATOGÊNICOS DE <i>Fusarium</i> spp. ....	78
5	<b>CONCLUSÕES</b> .....	84
	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	85

## 1 INTRODUÇÃO

Segundo dados da Produção Agrícola Municipal (PAM), no Brasil, em 2015, foram produzidas 602.899 toneladas de erva-mate verde em área correspondente a 94.945 hectares, resultando numa produtividade média de 7.126 kg/ha. O Rio Grande do Sul (RS) concentra a maior parte da produção da erva-mate comercializada e exportada, com 292.386 mil toneladas, o que corresponde a 48,5% do total produzido. Em seguida, está o Paraná com 217.851 mil toneladas ou 36,1% da produção (IBGE, 2015).

O cultivo de erva-mate constitui uma alternativa para a diversificação da produção de pequenas propriedades no RS, devido aos baixos custos iniciais e a facilidade ao emprego de sistemas agrosilvipastoris, possibilitando o fortalecimento da agricultura familiar. Apenas no RS, a cadeia produtiva envolve 35 mil hectares com cerca de 14 mil propriedades, além de 300 viveiristas e 250 indústrias ervateiras, gerando uma renda bruta de aproximadamente R\$ 1 bilhão/ano (FUNDOMATE, 2014).

Além da qualidade das mudas empregadas no plantio, a adubação pode influenciar diretamente a produtividade e o ciclo de vida de fungos com potencial patogênico. A adubação adequada pode interferir no grau de resistência da planta através de modificações histológicas, morfológicas e químicas, ou na combinação entre estes. Sobre os fitopatógenos, os nutrientes provenientes da adubação podem influenciar na quantidade de inóculo produzido, sobrevivência do inóculo no solo, no crescimento e na germinação dos esporos do patógeno (ZAMBOLIM et al., 2005).

No entanto, mesmo adotando os tratamentos silviculturais recomendados, os ervais estão sujeitos ao ataque de patógenos, tais como fungos do gênero *Fusarium*, conhecidos por causar doenças como a podridão-de-raízes, que levam à redução na produtividade e, conseqüentemente, à morte da planta. Entre os principais sintomas da podridão-de-raízes estão o amarelecimento ascendente das folhas, a estagnação do crescimento, queda excessiva das folhas mais velhas, e em muitos casos, morte da planta. Em decorrência do ataque do patógeno as raízes escurecem e apodrecem, comprometendo o desenvolvimento dos ervais. Nos plantios atacados, as perdas na produção podem ser superiores a 30% (POLETTO et al., 2006).

Para que estratégias de controle e prevenção possam ser implantadas são necessários estudos que busquem a correta identificação do fungo causador da

doença. Entre os principais mecanismos empregados na identificação de fungos fitopatogênicos, está a caracterização morfológica, a qual é largamente utilizada e envolve diversas análises como: pigmentação das colônias, textura, forma marginal e velocidade de crescimento micelial, processo de formação, forma e tamanho de esporos (BURGESS et al., 1995). Porém, devido a sua grande similaridade a diferenciação de fungos através de caracteres morfológicos é pouco precisa. Entretanto, por acessar diretamente o DNA, a utilização de técnicas moleculares torna-se mais eficiente e precisa na discriminação de espécies fúngicas (STEENKAMP et al., 2000).

Contudo, em alguns casos, o uso de técnicas moleculares é insuficiente para detectar a variabilidade intraespecífica e as relações patogênicas entre espécies de *Fusarium*. Algumas técnicas envolvendo fisiologia e a identificação de grupos de compatibilidade vegetativa (VCG) podem ser empregadas em estudos de taxonomia, filogenia e na patogênese de espécies de *Fusarium*. Assim, os VCG's são comumente empregados na caracterização da diversidade entre isolados fúngicos, permitindo a distinção entre populações patogênicas e não-patogênicas (ROSALEE et al., 1999). Neste contexto, a compatibilidade vegetativa é empregada como um recurso capaz de gerar variabilidade genética dentro de populações de fungos. Esta técnica baseia-se na anastomose de hifas que expressam alelos homólogos originando a formação de heterocário estável (GLASS et al., 2000). Esta formação entre diferentes linhagens consiste em um papel importante no ciclo de vida de vários fitopatógenos, servindo como base para o ciclo parassexual, resultando na recombinação genética em fungos (LESLIE, 1993).

Além disso, a produção de enzimas extracelulares em meio específico também pode ser utilizada na diferenciação de isolados de *Fusarium* spp. A análise da produção enzimática de fungos em meio sólido é considerada um método simples e rápido para a identificação de variações genéticas em uma população, pela presença ou ausência de enzimas específicas, havendo a possibilidade de associação entre a produção de enzimas extracelulares do patógeno e seu grau de virulência com o hospedeiro (MAHMOUD, 1994).

Diante do exposto, o objetivo geral deste trabalho foi caracterizar o agente causal da podridão-de-raízes da erva-mate (*Ilex paraguariensis*). Como objetivos específicos estabeleceram-se os seguintes: a) selecionar caracteres morfofisiológicos eficientes na separação dos isolados em grupos de similaridade; b)

avaliar o sequenciamento de diferentes regiões do genoma na identificação dos isolados patogênicos em nível de espécie; c) identificar a formação de grupos de compatibilidade vegetativa (VCG) entre os isolados patogênicos; d) investigar o arsenal enzimático dos isolados patogênicos.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 *Ilex paraguariensis*

A erva-mate varia de arvoreta a árvore perenifólia. A altura dessa espécie é variável; quando cultivada, oscila de 3 a 5 metros, mas, na floresta pode atingir até 30 metros de altura e 100 cm de diâmetro da altura do peito (DAP), na idade adulta. Apresenta tronco reto ou pouco tortuoso. Fuste geralmente curto, mas, em alguns casos podendo atingir até 11 metros de comprimento. Copa baixa, com folhagem verde-escura; casca com espessura de até 20 mm, sendo a casca externa cinza-clara acastanhada, áspera à rugosa, com lenticelas formando linhas longitudinais com cicatrizes transversais (CARVALHO, 2003). Seu florescimento é predominante em outubro. Seus frutos amadurecem geralmente entre janeiro e março; porém, em regiões com altitude acima de 800 m, foram encontrados frutos maduros no final de abril e início de maio (DA CROCE & FLOSS, 1999). Segundo Carvalho (1994), a erva-mate ocorre em uma vasta região, compreendida entre 12° e 35° S e 40° e 65° W, sua presença mais frequente pode ser delimitada pelos paralelos 18° e 30° e os meridianos 47° e 58°.

O uso dessa planta era conhecido pelos nativos da América do Sul como bebida tônica e estimulante. Nas primeiras reduções, fundadas pelos jesuítas estabelecidos no Paraguai, o uso das folhas de erva-mate já era difundido entre os índios guaranis. (ABEM, 2000).

O cultivo da erva-mate destaca-se como uma atividade extrativista de grande importância na geração de emprego e renda aos produtores situados na região de ocorrência da espécie (BERGER, 2006). A colheita da cultura caracteriza-se pela remoção dos galhos e ramos para o aproveitamento das folhas e ramos finos, os quais são amplamente utilizados para a produção de diversas bebidas, entre elas, o chimarrão (FLEIG, 2002).

Nos últimos anos, com o aumento da área plantada, foram detectados problemas fitossanitários nos ervais, como a podridão-de-raízes (POLETTTO et al., 2010a). A doença é causada, principalmente, pelo gênero fúngico *Fusarium*, que provoca a destruição do sistema vascular e, na maioria das vezes, causa a morte da planta. No Brasil, a podridão-de-raízes é a principal doença da espécie, atacando desde plântulas, mudas no viveiro a árvores adultas em ervais. (POLETTTO, 2010).

## 2.2 PODRIDÃO-DE-RAÍZES DA ERVA MATE

Grigoletti Junior & Auer (2001) relataram pela primeira vez no Brasil a ocorrência da doença em ervais no estado do Paraná. Já no Rio Grande do Sul, a podridão-de-raízes foi detectada por Poletto et al. (2006), no ano de 2004, em alguns municípios na região do Vale do Taquari.

A podridão-de-raízes pode ocorrer tanto em sementeiras como em mudas repicadas. O gênero *Fusarium* é o principal patógeno associado à doença. (GRIGOLETTI JUNIOR et al., 1996). A doença é observada, na maioria das vezes, em reboleiras de tamanho variável, porém, em alguns casos, as plantas mortas ou com sintomas aparecem espalhadas por todo erval (POLETTTO et al., 2006).

As podridões-de-raízes interferem diretamente no processo de absorção de nutrientes pela planta, os sintomas refletem-se na parte aérea, provocando manchas foliares, amarelecimento, queda de folhas, redução no crescimento, murcha e seca, levando, na maioria das vezes, à morte da muda. No entanto, esses sintomas podem ser facilmente confundidos com práticas inadequadas de manejo das mudas (GRIGOLETTI JUNIOR, et al., 1996).

No viveiro, o tombamento de mudas ocorre em reboleiras. As lesões, caracterizadas pela necrose dos tecidos, concentram-se na região do colo e, conseqüentemente, a muda tomba. A podridão-de-raízes ocorre de forma esparsa na sementeira ou em mudas já transplantadas. Os principais sintomas reflexos são observados na parte aérea da planta como, amarelecimento foliar, estagnação do crescimento, queima e seca de folhas que iniciam a partir da extremidade do limbo, murcha e a morte da muda. No sistema radicular, ocorre a inibição do crescimento, escurecimento e necrose das raízes (POLETTTO, 2010).

Entre os fatores associados com a podridão de raízes, destacam-se a umidade, a composição física do substrato e a contaminação de recipientes das mudas e do próprio substrato. A desinfestação do substrato e o manejo correto da água podem ser adotados como medidas preventivas de controle da doença. Também, é conveniente a retirada de plântulas sintomáticas, afim de prevenir a disseminação do patógeno. Após a detecção da doença, o controle químico mostra-se pouco eficiente (GRIGOLETTI JUNIOR et al., 1996).

### 2.3 GÊNERO *Fusarium*

O gênero *Fusarium* é classificado, atualmente, na família Nectriaceae, ordem Hypocreales, classe Sordariomycetes (INDEX FUGORUM, 2015) e pode ser encontrado habitando o solo, nas mais diversas regiões geográficas da Terra. Especialmente em locais de climas tropicais e subtropicais, esse fungo é capaz de sobreviver por longos períodos. Pela complexidade do sistema solo e pela diversidade de espécies existentes nesse ambiente, o surgimento de variabilidade genética dentro do gênero *Fusarium* é bastante amplo. Existe também, uma vasta diversificação em relação aos sintomas e patogenicidade de uma das espécies quando em contato com o hospedeiro suscetível, fato que dificulta o manejo da doença provocadas por esses patógenos (MILANESI, 2009).

Este gênero inclui espécies que produzem macroconídios hialinos, geralmente septados, possuindo as células basal e apical bastante diferenciadas, o que implica em grande importância em sua taxonomia. Os macroconídios podem apresentar as seguintes formas: delgado, com aspecto de agulha; com curvatura dorsal e ventral; com a curvatura do lado dorsal mais pronunciada que no lado ventral; com as células basal e apical (típico de *Fusarium*); podem ser grossos, papilados, em forma de gancho, afilados, pedicelados e alongados distintamente entalhados e escassamente entalhados. Os microconídios também apresentam diferentes formas, podendo ser: ovais, reniformes ou alantóides, obovóides, com a base truncada, piriformes, napiformes ou globosos. Quanto a clamidósporos, podem estar presentes ou ausentes (HAWKSWORTH et al. 1995).

Algumas espécies do gênero *Fusarium* sobrevivem em restos culturais no solo, através de estruturas de resistência chamadas clamidósporos, o que dificulta o seu controle principalmente em áreas onde a soja (*Glycine max*) é explorada de forma contínua (CAVALCANTI et al., 2002). Além disso, características químicas, físicas e biológicas do solo podem afetar diretamente a distribuição espacial da população de *Fusarium* spp. no solo.

*Fusarium* spp. exibe uma alta variabilidade genética em nível de espécies, tornando necessária a aplicação de ferramentas que possibilitem a diferenciação entre populações do fungo. Dentro desse gênero existem variações de características morfológicas, de patogenicidade e de virulência, o que resulta em uma classificação em seções, *formae specialis* e raças (OLIVEIRA & COSTA,

2002). De acordo com Zhang et al. (2007), membros do complexo de espécies *Fusarium solani* (Mart.) Sacc., que são morfologicamente similares, possuem mais de 45 linhagens distintas.

A busca para identificação de espécies patogênicas do gênero *Fusarium*, requer uma série de estudos que levam em consideração características morfológicas e moleculares desses isolados. Para a identificação deste gênero são levados em consideração três conceitos de espécie: o morfológico, baseado na similaridade dos caracteres morfológicos, como, tamanho dos esporos; o biológico, onde isolados de uma mesma espécie quando pareados são capazes de gerar descendentes viáveis e férteis através da técnica de fertilização cruzada pareando um isolado desconhecido e um isolado padrão já conhecido, resultando na formação de teleomorfos; e o conceito de espécie filogenética, o qual é baseado na análise de sequências do DNA (SUMMERELL et al., 2003).

As podridões radiculares e “*damping-off*” causadas por *Fusarium* spp. são observadas em espécies como *Pinus* spp. e *Eucalyptus* spp. cultivadas no Brasil (KRUGNER et al. 2005). Além disso, o gênero *Fusarium* também é um patógeno de sementes de erva mate (POLETTTO et al., 2005). Segundo Maciel (2012) em plântulas de *Pinus elliotii* os principais sintomas observados foram murcha, tombamento, apodrecimento dos cotilédones e lesão seguida de ruptura do hipocótilo, em decorrência infecção das sementes com *F. sambucinum*.

## 2.4 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA

Na taxonomia de fungos, é de fundamental importância a estabilidade de caracteres morfológicos, em condições ambientais variáveis (TAYLOR et al., 2000). Esta associação de parâmetros acrescida de variações fenológicas, fisiológicas e mutagênica dentro do gênero *Fusarium* tem levado a criação de chaves taxonômicas divididas em seções, *forma speciales* e raças (BENYON et al., 2000; LESLIE & SUMMERELL, 2006; SUMMERELL et al., 2003).

Comumente, há três passos que circundam a delimitação morfológica de espécies: a análise, a designação ou julgamento e a síntese. A análise baseia-se na observação comparativa das diferenças e similaridades presentes entre espécies ou isolados de uma mesma espécie, em relação a características típicas. Nesta análise, é interessante que o fungo seja incubado em diferentes substratos e condições

padronizadas de ambiente, o que possibilita a detecção dos vários tipos culturais e morfológicos, permitindo a determinação dos limites de variação. Com base nas diferenças observadas na análise, o investigador faz o julgamento minucioso da espécie, permitindo a síntese, separar os tipos morfológicos comuns, classificando-os de modo prático das demais espécies do gênero (MENEZES, 2006).

Sutton (1992), em seus estudos, utilizou características morfológicas como formato do apressório, tamanho e forma de conídios para diferenciar isolados do gênero *Colletotrichum*. Segundo o autor, estes caracteres são tradicionalmente utilizados na taxonomia de fungos fitopatogênicos. Para Vinnere (2004) os critérios morfológicos devem ser utilizados com cautela, pois, podem ser insuficientes para determinação de espécies fúngicas, visto que, em sua grande maioria os isolados são cultivados em meios artificiais.

Em estudos onde são consideradas somente as características morfológicas e fisiológicas, essas variáveis são utilizadas apenas para verificar a diversidade dos fungos em uma determinada área ou patógeno que afeta um determinado hospedeiro, porém, não tiveram como objetivo a identificação das espécies fúngicas (LAZAROTTO, 2013). Entretanto, Poletto et al. (2006) obteve êxito na identificação de espécies de *Fusarium* utilizando caracteres morfológicos como, forma e tamanho de macroconídios, microconídios e formação de clamidósporos, seguindo a metodologia descrita por Ventura (2000). Ainda para Lazarotto (2013), a identificação correta de espécies deve considerar a caracterização morfológica dos fungos, já que a ausência destas análises pode inviabilizar a construção de banco de dados moleculares das espécies descritas.

Hosokawa et al. (2003) salientam que, a identificação de espécie pode ser morosa e desgastante, pois há a instabilidade de características morfológicas e biométricas dos esporos, causada por diferentes condições em que ocorre o crescimento, e sobreposição dos valores das medidas apresentadas por diferentes autores associada com a inconsistência ou ausência de ilustrações em trabalhos anteriores associados. Já a identificação morfológica de espécies de *Fusarium*, além de constituir uma tarefa de difícil execução, pode gerar ambiguidade devido à variabilidade dos caracteres fenotípicos utilizados na classificação taxonômica desse gênero (NELSON et al., 1983; VENTURA, 2000).

Todavia, Lima e Furtado (2007) ressaltam que a situação, anteriormente citada, não impede que a identificação das espécies continue a ser feita numa aproximação fenotípica, com base em características morfológicas e culturais.

## 2.5 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR

Em estudos de sistemática, evolução e filogenia, as sequências de DNA proporcionam a relação entre os organismos que permitem elucidar mecanismos de evolução, contribuindo assim, para a definição de grupos sistemáticos e a identificação de espécies (GOUVEIA, 2004). Para Zacarro et al. (2007), a utilização de técnicas moleculares é mais eficiente na discriminação de espécies fúngicas, por acessar diretamente o DNA.

Uma forma precisa para a identificação de variabilidade de patógenos é o uso de técnicas moleculares baseadas na análise de isoenzimas que têm sido aplicadas com êxito em diversas áreas da Micologia, possibilitando o desenvolvimento de métodos rápidos, sensíveis e específicos no diagnóstico de fitopatógenos. Além disso, sua ampla utilização deve-se, principalmente, à sua simplicidade de uso, rapidez, segurança e amplitude dos resultados obtidos (TEIXEIRA et al., 2004).

Uma das principais técnicas utilizadas pela biologia molecular na identificação de espécies de *Fusarium* é a ampliação do DNA através da reação em cadeia da polimerase (PCR), que permite a amplificação de fragmentos específicos de DNA e detecta a presença do DNA de células fúngicas, vivas ou mortas, ainda que estejam misturados a outros DNA's. A amplificação do DNA pode ser obtida com o uso de marcadores de polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (RAPD), polimorfismo de comprimento de fragmento amplificado (AFLP) e ampliação de microssatélite (GRANT et al., 1998; PINHEIRO, 2004). Porém, esses marcadores são usualmente dominantes e sensíveis a pequenas alterações das condições de amplificação e por isso são de baixa reprodutibilidade, além de apresentarem desvantagens como ambiguidade na interpretação das bandas e co-migração de fragmentos de mesmo tamanho (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

As regiões "*Internal Transcribed Spacer*" (ITS) do RNA ribossomal são regiões conservadas do DNA que possibilitam o estabelecimento de relações filogenéticas e da biodiversidade de espécies. A identificação de gêneros fúngicos tem sido realizada por meio de regiões ITS, através da amplificação e

sequenciamento desses isolados, que são comparados com um banco de dados, possibilitando futuramente sua utilização em processos biotecnológicos (AZEVEDO et al., 2002; CHEN et al., 2004; RUBINI et al., 2005).

A estrutura do gene do RNA ribossômico é dividida nas regiões 18S, 5.8S e 28S, além dos espaçadores ITS1 e ITS2. Os genes do RNA ribossômico (RNAr) dos fungos foram selecionados para serem sequenciados e utilizados na construção da árvore filogenética de todos os seres vivos (REIS JUNIOR, et al., 2006). Segundo Visentin et al. (2009) o sequenciamento da região ITS foi eficaz na distinção de isolados de *Fusarium verticillioides* e *Fusarium proliferatum*, coletados em regiões produtoras de milho no noroeste da Itália.

Recentemente, para o estudo do gênero *Fusarium*, várias regiões dos genes têm sido empregadas, como o fator de alongação 1-alfa (TEF-1 $\alpha$ ). A difusão do uso desta região pode ser associada ao seu alto grau de informação ao nível de espécie e ao fato de não ter ocorrido relato sobre o aparecimento de cópias não ortólogas, assim como pela disponibilidade de 'primers' universais baseadas nesse gene (GEISER et al., 2004). A região do fator de alongação 1- $\alpha$  (TEF-1 $\alpha$ ) em eucariotos é altamente conservada e pertence à família das GTPases (enzimas que se ligam e hidrolisam o GTP- guanosina trifosfato), que contem fatores protéicos envolvidos no início, alongamento e fim da tradução (KEELING & INAGAKI, 2004).

Para O'donnell et al. (1998); Seifert e Levesque (2004), estudos envolvendo regiões genômicas, realizados com *Fusarium* spp., demonstraram que a região do fator de alongação 1- $\alpha$  pode ser aplicada como uma ferramenta aceitável para distinguir espécies do fungo, possuindo correlação do gênero *Fusarium* com capacidade micotoxicogênica. Kristensen et al. (2005) reforçam a importância da análise filogenética de TEF-1 $\alpha$ , pois concluíram que esta é capaz de identificar espécies monofiléticas de *Fusarium*.

Segundo Du et al. (2012), a região TEF-1 $\alpha$  foi eficiente na classificação em quatro grupos distintos de espécies quando sequenciaram 41 isolados de *Fusarium*, já que os índices de similaridade foram superiores a 95%.

As tubulinas são as principais proteínas constituintes dos filamentos protéicos cilíndricos chamados microtúbulos, estes são responsáveis pela formação do citoesqueleto das células eucarióticas (STOTZ & LONG, 1999). Wolfgang et al. (2004) reforçam que os estudos de íntrons são fundamentais, já que estes

elementos são essenciais e específicos para a expressão e regulamento de genes de tubulina. Além disso, em fungos, genes que codificam  $\beta$ -tubulina na maioria das vezes variam entre filós, mas são altamente conservados em espécies relacionadas (KAWCHUK et al., 2002; STEFAN et al., 2004). Com base no sequenciamento da região beta-tubulina, Britz et al. (2002) descreveram as espécies *F. mangiferae* e *F. sterilihyphosum* como agentes etiológicos da mal-formação-da-mangueira.

Para Maciel (2012) a região ITS encontrada no DNA é mais estável quando equiparadas com as regiões do fator de alongação 1- $\alpha$  e beta-tubulina, sendo assim, é mais eficaz na separação de gêneros. As regiões com níveis mais altos de mutações são recomendadas para diferenciação entre as espécies. Deste modo, é necessário que seja efetuado o sequenciamento de mais de uma região genômica, já que estas são complementares no processo de identificação de isolados de *Fusarium*.

## 2.6 VARIABILIDADE DE AGENTES PATOGÊNICOS

Estudos sobre a variabilidade de fungos são importantes para entender a dinâmica populacional e traçar estratégias para o estudo da patogenicidade e para o melhoramento das espécies que são atacadas, visando à resistência ao fitopatógeno. Além disso, podem ser identificados isolados mais ou menos agressivos no desenvolvimento de uma doença e ainda, ocorrer diferenças no ataque do patógeno, dependendo do hospedeiro em que este for inoculado (PIVETA, 2013).

Espécies fúngicas, patogênicas de plantas ou animais, exibem variações em importantes aspectos: a variabilidade na morfologia impede a identificação do patógeno, enquanto a variabilidade fisiológica dificulta a avaliação da patogenicidade (POLONI et al., 2008). Tendo em vista que os isolados de um patógeno podem diferir na quantidade de doença induzida no hospedeiro e na velocidade de aparecimento dos sintomas (PARLEVLIT, 1979), componentes da doença podem ser considerados na caracterização da variabilidade de isolados de um patógeno.

Considerando o processo evolutivo, a variabilidade genética das populações dos organismos patogênicos é importante por determinar o potencial de adaptação destes às condições adversas, já no enfoque epidemiológico, a variabilidade patogênica tem implicações diretas no manejo da doença, assim, quanto maior a

agressividade do patógeno, maior deverá ser o uso de fungicidas ou mesmo cuidados na escolha de material genético resistente (KATO et al., 1997).

No Brasil, várias espécies de plantas exibiram sintomas de murcha por meio de inoculação de *Fusarium* spp. Isso demonstra que esse patógeno possui uma ampla variabilidade patogênica, o que inspira cautela em sua classificação como, por exemplo, dentro de uma *formae specialis*. Assim, podem existir outros hospedeiros onde o patógeno se multiplica com pouca severidade ou sem produzir sintomas (CIA et al., 2005; MACHADO, 2008).

## 2.7 GRUPOS DE COMPATIBILIDADE VEGETATIVA - VCG

O termo compatibilidade vegetativa refere-se à habilidade de espécies fúngicas sofrerem anastomose mútua, resultando numa fusão viável de células com núcleos de ambos os isolados em um citoplasma comum. Este termo contrasta com compatibilidade sexual (MENEZES, 2006).

Isolados dentro de um VCG são potencialmente capazes de trocar informação genética via ciclo parassexual. A importância dessa capacidade depende da estrutura da população e do número de parceiros com os quais o patógeno pode compartilhar informação. No ciclo de vida dos fungos anamórficos o fenômeno da heterocariose é um importante componente e serve para a transmissão de fatores de hipovirulência, tais como RNAs de fita dupla, diferindo assim os componentes de virulência ou gama de hospedeiros (LESLIE, 1993).

Mesmo sendo benéfico à formação do heterocário, existem mecanismos genéticos que restringem a sua formação entre indivíduos geneticamente diferentes (GLASS & KULDAU, 1992). Em fungos filamentosos, existe o reconhecimento sexual, que é controlado por locos *mat* (“*mating types*”) e o reconhecimento vegetativo, que é controlado por um loco específico denominado *het* (incompatibilidade de heterocário) ou também pode ser chamado de *vic* (incompatibilidade vegetativa) (SAUPE, 2000).

Para os estudos da compatibilidade vegetativa são empregadas três técnicas: produção de mutantes *nit*, barreiras, e coloração de hifas, sendo a principal técnica para a determinação de VCG's a produção de mutantes *nit*, ou seja, mutantes que não têm a capacidade de utilizar o nitrato do meio. Estes mutantes *nit* podem ser recuperados de setores da colônia resistentes ao clorato de potássio (KClO<sub>3</sub>) com

uma frequência relativamente alta (PUHALLA, 1985). Mutantes *nit* não são capazes de assimilar o nitrato do meio, apresentando assim crescimento ralo e expressando crescimento robusto quando ocorre complementação com outro isolado mutante do mesmo VCG, passando assim a utilizar o nitrato (CORRELL et al., 1987).

Três classes designam os fenótipos mutantes que se baseiam em mutações na via de assimilação do nitrato. As mutações podem ocorrer no locus estrutural de nitrato redutase (*nit 1*), no locus estrutural específico da via metabólica de assimilação do nitrato (*nit 3*) ou no locus que afeta as vias de acesso do co-fator enzimático que contém o molibidênio, necessário à atividade da nitrato redutase e da dehidrogenase purínica (*nit M*) (LESLIE, 1993). Estas classes fenotípicas correspondem às mesmas encontradas para *Fusarium oxysporum* e *Gibberella fujikuroi* (*Fusarium verticillioides*) (CORRELL, et al., 1987). A redução do nitrato na via metabólica de *Fusarium* requer duas enzimas para reduzi-lo a amônia: à nitrato redutase, que converte nitrato a nitrito e a nitrito redutase, que catalisa a redução do nitrito a amônia (LESLIE, 1993).

Numerosos genes controlam as enzimas nitrato redutase e nitrito redutase. O processo de assimilação e redução do nitrato é complexo, requerendo vários genes também para a síntese de um cofator contendo molibidênio, que faz parte do complexo nitrato redutase. Em *Fusarium oxysporum* e *Fusarium verticillioides* há o aparecimento de setores que são resistentes ao clorato, mas que não tem a capacidade de assimilar o nitrogênio em um meio que possua nitrato como única fonte de nitrogênio. Estes mutantes não são usados nos testes de VCG's e portanto, são descartados. Para isolados de *Fusarium oxysporum*, no pareamento entre mutantes *nit M* e *nit 1* ou *nit M* e *nit 3* a formação do heterocário é mais rápida do que no pareamento entre *nit 1* e *nit 3*, o qual pode levar de 2 a 3 semanas para haver a complementação. Existe, porém, um mecanismo genético que restringe a formação do heterocário entre indivíduos geneticamente diferentes, este mecanismo é denominado de incompatibilidade vegetativa, que reduz a possibilidade da transmissão de genótipos agressivos (DEBETS, 1998).

## 2.8 ENZIMAS EXTRACELULARES

A análise da presença de enzimas com a capacidade de degradar a parede celular de plantas, animais e outros micro-organismos, é um método extensivamente

utilizado na caracterização da variabilidade em fungos fitopatogênicos. Neste processo, o patógeno é considerado um invasor passivo, incapaz de apresentar força para suprimir as barreiras estruturais do hospedeiro. Desta forma, sendo o patógeno dependente de enzimas ou outros metabólitos para sua patogenicidade, uma satisfatória produção destes é necessária. A interação fungo-planta é determinada por mecanismos de ataque do patógeno e de defesa da planta, sendo estes também influenciados por fatores ambientais (BOCCHESI, 2003).

Mesmo pouco estudadas quanto à participação nos processos envolvidos na penetração e colonização nos tecidos dos hospedeiros, várias enzimas já foram detectadas em fungos através do cultivo em meios específicos. Estas enzimas são potencialmente importantes na patogênese, pois degradam o plasmalema, componente da parede celular (GRIFFIN, 1994). Dentre as principais exoenzimas estudadas destacam-se as amilases, celulasas, lipases, pectinases, proteases e esterases. (PASCHOLATTI, 1995).

Em geral, fungos utilizam o amido como fonte de energia para o crescimento e esporulação (GRIFFIN, 1994). As amilases são comuns em fungos, causando a hidrólise de amido, mas pouco se sabe sobre sua magnitude na patogênese (DIANESE, 1990). Estudos realizados por Almeida et al. (1998), com variedades de cacau, demonstraram que a quantidade de amido existentes nestas plantas poderia estar associada com o seu grau de tolerância ao fungo *Crinipellis pernicioso*, causador da vassoura-de-bruxa. Produtos da hidrólise do amido poderiam aumentar o potencial osmótico das células, impedindo o crescimento das hifas ou sendo utilizadas em rotas bioquímicas para defesa da planta (POLONI, 2008).

As enzimas celulolíticas desempenham importante papel na patogenicidade, degradando a celulose, principal constituinte da parede celular dos vegetais. As celulasas formam um complexo enzimático constituído por três enzimas:  $\beta$ -1,4 glucanase, exo  $\beta$ -1,4 glucanase e  $\beta$ -1,4 glucosidase (PASCHOLATTI, 1995).

Para Poloni (2008) as enzimas pectinolíticas estão entre as mais pesquisadas quanto ao papel na patogenicidade. Estes estudos estão relacionados ao tratamento de tecidos vegetais com pectinases purificadas, o que ocasiona a separação e morte das células. Este processo ocorre durante o desenvolvimento de muitas doenças, principalmente nas podridões moles, onde os tecidos perdem a rigidez.

Substâncias pécticas são polissacarídeos ácidos de alta massa molar que formam parte das paredes celulares e da lamela média dos vegetais. Devido à sua

função estrutural e à vulnerabilidade desses polímeros, as enzimas pécticas podem causar a degradação dos tecidos como consequência da lise celular e modificações da parede, permitindo a ação de outras enzimas despolimerizantes que atuam sobre outros substratos, como celulose e lignina. Dentre as principais enzimas pectinolíticas estão as esterases, que desesterificam os grupos metoxila da pectina, liberando ácido péctico; e as pectinases, que atacam a pectina fortemente unida ao resto dos componentes da parede celular, liberando pectina solúvel de alta massa molar (ESPOSITO & AZEVEDO, 2004).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 LOCALIZAÇÃO E CARACTERÍSTICAS GERAIS DO EXPERIMENTO

Os experimentos laboratoriais e o ensaio experimental com as mudas de erva-mate foram realizados no Laboratório de Fitopatologia “Eloicy Minussi” e na casa de vegetação pertencente ao Departamento de Defesa Fitossanitária (DFS) do Centro de Ciências Rurais (CCR) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

O experimento para avaliação da patogenicidade em mudas de erva-mate foi conduzido de novembro de 2015 a maio de 2016, em casa de vegetação, com irrigações manuais diárias.

O clima da região caracteriza-se como subtropical úmido, do tipo “Cfa”, segundo a classificação de Köppen, com temperatura média do mês mais frio entre -3 e 18 °C, e do mês mais quente superior a 22 °C e precipitação média anual de 1.769 mm (MORENO, 1961).

#### 3.2 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO SOLO DAS ÁREAS DE COLETA

Foram coletadas amostras de solo com o objetivo de caracterizar as propriedades químicas do solo. A coleta foi realizada nas entrelinhas, fazendo a gradagem como auxílio de uma pá de corte na profundidade de até 20 cm, retirando a camada superior composta de restos vegetais. Em cada ponto foram coletadas cinco subamostras, as quais foram, posteriormente, homogeneizadas formando uma amostra composta.

#### 3.3 OBTENÇÃO E PURIFICAÇÃO DE ISOLADOS DE *Fusarium*

As coletas de amostras foram realizadas em plantios de erva-mate nos municípios de Anta Gorda, Arvorezinha, Putinga, Ilópolis e Machadinho, no Rio Grande do Sul. Todos os pontos de coleta foram georreferenciados com auxílio de um equipamento Global Positioning System (GPS) (Tabela 1).

Tabela 1 - Áreas de coleta de isolados de *Fusarium* spp. provenientes de plantios de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) no Rio Grande do Sul.

<b>Código da área</b>	<b>Data de coleta</b>	<b>Município</b>	<b>Coordenadas (GMS)</b>
AT	jan/15	Anta Gorda	-28°55'48,5" S, -52°10'40,3" W
AV	jan/15	Arvorezinha	-28°52'13,5" S, -52°10'52,3" W
I1	jan/15	Ilópolis	-28°55'42,5" S, -52°08'32,6" W
I2	jan/15	Ilópolis	-28°55'42,7" S, -52°08'33,6" W
I3	jan/15	Ilópolis	-28°56'53,5" S, -52°08'15,1" W
I4	jan/15	Ilópolis	-28°57'03,6" S, -52°04'56,0" W
I5	jan/15	Ilópolis	-28°54'17,6" S, -52°07'31,6" W
I6	jan/15	Ilópolis	-28°53'58,1" S, -52°04'48,0" W
I7	jan/15	Ilópolis	-28°55'55,4" S, -52°11'00,3" W
I8	jan/15	Ilópolis	-28°55'48,6" S, -52°10'40,1" W
PF	jan/15	Putinga	-28°00'34,1" S, -52°06'00,2" W
M1	mar/15	Machadinho	-27°33'41,9" S, -51°39'51,4" W
M2	mar/15	Machadinho	-27°32'23,1" S, -51°,39'40,1" W
M3	mar/15	Machadinho	-27°32'46,6" S, -51°40'47,7" W
M4	mar/15	Machadinho	-27°32'45,9" S, -51°40'48,1" W
M5	mar/15	Machadinho	-27°32'16,1" S, -51°42'32,4" W
M6	mar/15	Machadinho	-27°33'36,6" S, -51°41'34,7" W
M7	mar/15	Machadinho	- 27°33'25,0" S, -51°40'04,2" W

O material vegetal coletado a campo (raízes de plantas adultas e mudas com sintomas de tombamento) foi devidamente identificado e, logo após, levado para o Laboratório de Fitopatologia para posterior análise. Em seguida, o material foi colocado em câmara úmida (caixas plásticas previamente desinfestadas com hipoclorito de sódio a 1% e forradas com duas folhas de papel-filtro umedecido com água esterilizada) e mantido a  $25 \pm 2$  °C, com 12 h de fotoperíodo por, aproximadamente, quatro dias. Em seguida, o material foi observado em microscópios estereoscópico e óptico para verificação da presença de estruturas do patógeno. Em caso positivo, com o auxílio de uma agulha histológica, estruturas do patógeno foram transferidas para placas de Petri contendo meio de cultura batata-dextrose-água (BDA) (extrato de 200 g de batata, 20 g de dextrose, 20 g de água,

1000 mL de água destilada), conforme recomendado por Alfenas et al. (2007). Após sete dias de crescimento, em BDA foi retirada, com auxílio de uma agulha flambada e resfriada, uma pequena quantidade de micélio para um tubo de ensaio contendo 10 mL de água destilada e esterilizada e em seguida transferida para outra placa contendo meio Ágar-Água (AA) (20g de ágar e um litro de água destilada) acrescido de antibiótico (estreptomicina), na concentração de  $100 \mu\text{L. mL}^{-1}$ , em seguida, o excesso de água foi descartada. Posteriormente, as placas foram incubadas a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  no escuro por 24 horas. Após esse período, conídios foram visualizados, sob microscópio estereoscópico. Após a visualização os esporos germinados, foram extraídos com uma agulha flambada e resfriada. Os conídios aderidos à agulha flambada e resfriada foram transferidos para o centro de outra placa de Petri contendo meio BDA, suplementado com antibiótico (estreptomicina). As placas foram colocadas novamente para incubar nas mesmas condições por 15 dias conforme descrito por Fernandez (1993). Os isolados purificados foram depositados na Micoteca do Laboratório de Fitopatologia “Elocy Minussi” da UFSM, onde permaneceram armazenados sob refrigeração em *eppendorffs* contendo solução salina.

### 3.4 CARACTERIZAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA DOS ISOLADOS DE *Fusarium* spp.

As avaliações morfológicas seguiram a metodologia descrita por Michereff et al. (2003), onde cada isolado foi avaliado conforme os parâmetros apresentados na sequência.

#### 3.4.1 Taxa de crescimento micelial

A taxa de crescimento micelial (T.C.M) foi determinada a partir da transferência de discos de meio BDA com 6 mm de diâmetro, obtidos de colônias com sete dias de crescimento, para outras placas com meio BDA e mantidas a  $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ , com 12 h de fotoperíodo. Para isso, foram utilizadas cinco repetições, sendo cada uma constituída por uma placa. O crescimento micelial de cada isolado foi avaliado aos sete dias de incubação, pela mensuração da média do diâmetro da colônia em dois sentidos diametralmente opostos.

### **3.4.2 Esporulação**

A esporulação foi avaliada aos dez dias de incubação a  $25 \pm 2$  °C, com 12 h de fotoperíodo, através da adição de 20 mL de água destilada estéril em quatro placas de Petri, após procedeu-se a raspagem das colônias e filtragem em camada dupla de gaze, para a posterior estimativa da concentração de conídios (conídios.mL<sup>-1</sup>), com o auxílio da câmara de Neubauer.

### **3.4.3 Pigmentação das colônias**

Foram observadas a coloração e a pigmentação das colônias e do micélio aéreo com o auxílio da Carta de Cores de Munsell (*Munsell Soil Color Chart*).

### **3.4.4 Caracterização dos conídios**

Com o propósito de verificar a forma de macroconídios, formação de microconídios e presença ou ausência de clamidósporos (LESLIE & SUMMERELL, 2006), primeiramente, os isolados foram repicados para meio de cultura folha-de-cravo-ágar - CLA (NELSON, 1983). Para cada isolado, foram medidos 30 macroconídios. Também foi contado o número de septos dos macroconídios. A largura e o comprimento foram medidos em microscópio óptico, com micrômetro acoplado, na magnitude de 40 x (LESLIE & SUMMERELL, 2006).

### **3.4.5 Crescimento micelial e esporulação em diferentes meios de cultura e níveis de luminosidade.**

Os meios de cultura testados para crescimento micelial e esporulação foram: Batata-dextrose-ágar (BDA), Batata-sacarose-ágar, (BSA) (extrato de 200 g de batata, 20 g de sacarose, 20 g de ágar e 1000 mL de água destilada), Extrato de Malte (MEA) (25g de extrato de malte, 20g de ágar e 1000 mL de água destilada), V8 (170 mL de suco de vegetais V8 “Campbell Soup Co.”; 20 g de ágar; 1,5 g de CaCO<sub>3</sub> e 830 mL de água destilada).

Os níveis de luminosidade testados para o crescimento micelial e esporulação foram: (0h) escuro contínuo, (12h) fotoperíodo de 12 horas de luz branca, (24h) luz branca contínua a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  por sete dias.

A avaliação do crescimento micelial e da esporulação segue a metodologia descrita nos itens 3.4.1 e 3.4.2.

### 3.5 PATOGENICIDADE DOS ISOLADOS DE *Fusarium* spp.

#### 3.5.1 Produção do inóculo

A partir da caracterização morfológica, os isolados de *Fusarium* spp. foram multiplicados em grãos de milho e incorporados no substrato, seguindo os procedimentos descritos na sequência. Assim, os grãos de milho foram embebidos em água à temperatura ambiente por, cerca de oito horas, após, o excesso de água foi descartado. Aproximadamente 80 g desses grãos foram colocados em frascos de vidro de 100 mL e autoclavados durante 40 min, duas vezes, em um intervalo de 24 horas. Após o resfriamento, foram transferidos para cada frasco, cinco discos de meio de cultura, de 7 mm de diâmetro, contendo o micélio do patógeno. Os frascos foram incubados a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , com 12 h de fotoperíodo, durante 14 dias, conforme metodologia adaptada de Klingelfuss et al. (2007). Para a testemunha, foram colocados cinco discos de meio de cultura BDA sem o patógeno nos frascos, sendo os demais procedimentos realizados conforme descrito anteriormente.

#### 3.5.2 Infestação do substrato e transplante das mudas

Vasos plásticos (capacidade aproximada de 3,6 L) com orifícios na parte inferior foram preenchidos com substrato comercial autoclavados por duas vezes por 40 minutos cada. Em seguida, 80 cm<sup>3</sup> do inóculo contendo hifas e conídios de *Fusarium* spp. produzido em grãos de milho foram misturados ao substrato, sendo este, então, umedecido com água destilada estéril (LAZAROTTO et al., 2014). Após 15 dias, as mudas de erva-mate foram transplantadas e divididas em quatro repetições de três mudas, onde foram mantidas em casa de vegetação por 180 dias ou até a manifestação dos sintomas quando foram determinadas as médias de

fitomassa seca da parte aérea e raízes conforme descrito por Junges et al. (2016), além do percentual de mudas mortas.

### 3.5.3 Reisolamento de *Fusarium* spp.

Para o reisolamento dos isolados de *Fusarium* spp. a partir das mudas inoculadas, foram utilizados fragmentos das raízes das mudas de erva-mate, através do método descrito no item 3.2.

### 3.6 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS ISOLADOS DE *Fusarium* spp.

Os sete isolados de *Fusarium* spp. (I1AR1, I6AR2, I8AR1, M3AR2, M4, M5AR2 e M7C1) selecionados para o teste de patogenicidade, devidamente identificados com os seus respectivos códigos, foram encaminhados para a extração de DNA, conforme método CTAB, descrito por Doyle e Doyle (1991). As amostras de DNA genômico extraídas foram submetidas à Reação da Polimerase em Cadeia (PCR), para a amplificação da região ITS do rDNA com os oligonucleotídeos iniciadores ITS1 (5' TTCCGTAGGTGAACCTGCGG 3') e ITS4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3') (WHITE et al., 1990), assim como, a região beta-tubulina, amplificada com o par de primers Btub-F (AAGGGHCAYTAYACYGARGG) e Btub-R (CATGTTGGACTCDGCCTC) e, também, para sequenciamento do fator de alongação  $\alpha$ -1, com o par de primers EF1-T (ATGGGTAAGGARGACAAGAC) e EF1-1567R (ACHGTRCCRATAACCACCRATCTT) (REHNER & BUCKLEY, 2005).

A reação foi realizada com 30 ng de DNA, tampão 10X, 2,5  $\mu$ M de cada dNTP, 20 nM de  $MgCl_2$ , 25 pmoles de cada um dos oligonucleotídeos iniciadores, cinco unidades da enzima Taq polimerase e água ultrapura para completar o volume da reação. As reações foram realizadas em termociclador MJ Research, INC. PTC – 100MT, sob as seguintes condições térmicas: 94 °C por 2 min, 30 ciclos de 94 °C por 45 s, 55 °C por 30 s, 72 °C por 35 s e 72 °C por 10 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 fragmentos amplificados e o controle foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1,2 %, em tampão TBE 1X (10,8 g de tris base, 5,5 g de ácido bórico, 4 mL de EDTA a 0,5 M e 4 mL de água

destilada), contendo brometo de etídio, visualizado sob luz ultravioleta. Os produtos da PCR foram purificados com PEG 8000 a 13% e, nas reações de sequenciamento, foram utilizados os oligonucleotídeos ITS1 e ITS4. As sequências geradas continham de 400 a 900 pb, tamanho referente ao segmento que corresponde às regiões ITS1, 5.8S e ITS2. O sequenciamento foi realizado em sequenciador Mega BACE 500 (Amersham). Os fragmentos sequenciados foram analisados através do programa BioEdit (HALL, 1999). As sequências de nucleotídeos obtidas foram comparadas com as já existentes no GenBank, para os patógenos isolados. As sequências do GenBank que apresentaram os maiores scores de cobertura e similaridade foram selecionadas e alinhadas, juntamente com as sequências obtidas no sequenciamento pelo algoritmo ClustalW. A análise filogenética foi conduzida utilizando o método estatístico Neighbour-joining com 1000 replicatas, pelo programa MEGA versão 4 (TAMURA et al, 2007). O modelo utilizado foi escolhido de acordo com o selecionado pelo programa disponível *online*, FindModel, que estabelece o melhor modelo após fornecimento de um arquivo com as sequências escolhidas alinhadas através do BioEdit (HALL, 1999) ou outro programa escolhido. A similaridade das sequências de nucleotídeos entre os isolados foi calculada através do procedimento *Basic Local Alignment Search Tool* - BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

### 3.7 GRUPOS DE COMPATIBILIDADE VEGETATIVA (VCG)

#### 3.7.1 Obtenção dos mutantes *nit*

Os isolados de *Fusarium* spp. utilizados no teste de patogenicidade foram transferidos para placas de Petri contendo meio mínimo (MM) (2g NaNO<sub>3</sub>, 1g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,5g MgSO<sub>4</sub>. 7H<sub>2</sub>O, 0,5g KCl, 30g sucrose, 0,2 mL da solução de elementos traços, 20g ágar, 1L de água destilada) e incubados pelo período de sete dias a 24°C, no escuro. A solução de elementos traço era composta por: 5g ácido cítrico, 5g ZnSO<sub>4</sub>.6H<sub>2</sub>O, 1g Fe(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.6H<sub>2</sub>O, 50mg MnSO<sub>4</sub>, 50mg H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 50mg NaMoO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O, 95mL de água destilada Posteriormente, discos de micélios (cinco mm) dispostos em arranjo triangular foram transferidos para 10 placas de Petri, por isolado, contendo meio mínimo mais clorato de potássio (MMC), na concentração de 1,5, 2,0 e 2,5% acrescidos de 1,6g/L de L-asparagina para a indução de mutantes os

quais se manifestam através de setores na colônia. As placas foram mantidas a  $25 \pm 2$  °C por 14 a 21 dias (CORRELL et al., 1986; PUHALLA, 1985).

Após a constatação da formação dos setores, foi retirado um único setor de cada disco de micélio e transferido para placas contendo meio mínimo. Os isolados que tiveram crescimento ralo em MM foram classificados como mutantes *nit*. Já os setores que apresentaram crescimento robusto foram descartados (LESLIE, 1993).

### 3.7.2 Caracterização fenotípica dos mutantes *nit*

Os mutantes *nit* que apresentaram crescimento ralo em MM foram transferidos para placas de Petri contendo meio de cultura com diferentes fontes de nitrogênio: nitrato de sódio (2 g/L); nitrito de sódio (0,5 g/L) e hipoxantina (0,2 g/L) (CORRELL et al., 1987; PUHALLA, 1985). Após a repicagem nos diferentes meios, as placas foram mantidas a  $25 \pm 2$  °C por um período de 3 a 4 dias (LESLIE & SUMMERELL, 2006). Três classes designam os fenótipos dos mutantes *nit* no gênero *Fusarium*, as quais se baseiam na mutação na rota de assimilação do nitrogênio (Tabela 2) (CORRELL et al., 1987; PUHALLA, 1985).

Tabela 2 - Utilização de diferentes fontes de nitrogênio nos ensaios de fenotipagem

Mutante	Nitrato	Nitrito	Hipoxantina
Selvagem	+	+	+
<i>nit</i> 1	-	+	+
<i>nit</i> 3	-	-	+
<i>nit</i> M	-	+	-

### 3.7.3 Teste de compatibilidade vegetativa

Os pareamentos foram realizados em MM e dispostos em arranjo contendo os mutantes *nit* 1 no centro da placa de Petri e os mutantes *nit* M/*nit* 3 nas extremidades. Em *nit*'s da mesma espécie estudada o controle positivo foi observado com crescimento de micélio aéreo na linha de intersecção entre *nit* 1 e *nit* M/*nit* 3. Entre os diferentes isolados as reações positivas seguem conforme descrito anteriormente, ou seja, foram observadas através do crescimento do micélio aéreo na linha de intersecção entre *nit* 1 e *nit* M/*nit* 3, confirmando a classificação destes

isolados como pertencentes ao mesmo VCG. Reações negativas foram observadas através do crescimento ralo na linha de intersecção entre *nit* 1 e *nit* M/*nit* 3 de espécie diferentes (CORRELL et al., 1987; LESLIE & SUMMERELL, 2006; PUHALLA, 1985).

### 3.8 PRODUÇÃO DE ENZIMAS EXTRACELULARES DE ISOLADOS DE *Fusarium* spp.

Para os testes de produção de enzimas extracelulares foram testados os isolados de *Fusarium* spp. utilizados no teste de patogenicidade em mudas de erva-mate. Os isolados foram crescidos em meio BDA. Posteriormente, discos de cinco mm contendo micélio fúngico foram transferidos para cinco placas de Petri contendo os meios de cultura específicos para cada enzima, conforme descritos a seguir. Como testemunha foram utilizados discos contendo apenas meio de cultura BDA.

#### 3.8.1 Catalase

Para a determinação da atividade da catalase os isolados foram crescidos em meio BDA por sete dias a  $25 \pm 2$  °C e fotoperíodo de 12h. Após o período de incubação foi adicionada uma solução de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) a 3% sobre a cultura fúngica, conforme metodologia de Shin e Kim (1998) modificada por Bueno et al. (2009). A catalase foi mensurada por meio de símbolos, baseando-se na intensidade das bolhas formada no meio: +++ (intensa); ++ (moderada); + (fraca) e – (ausência) (BASTOS, 2005).

#### 3.8.2 Fenoloxidase-lacase

Os isolados foram repicados em meio Bushnell-Hass (0,4g  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0,15g  $CaCl_2$ , 6g  $KH_2PO_4$ , 6g  $NH_4NO_3$ , 0,05g  $FeCl_3$ , 20g ágar, 1L de água destilada) acrescido com 0,5% de ácido gálico, pH 7,2 (ATLAS, 1995). Em seguida, foram incubados a  $30 \pm 2$  °C por de cinco dias. Após este período, foi observada a formação de um halo de coloração âmbar em torno do micélio, característico da "Reação de Bavendamm" (CONCEIÇÃO et al., 2005). A avaliação seguiu a metodologia conforme descrita no item 3.4.1

### 3.8.3 Amilase

Discos contendo micélio e conídios dos isolados de *Fusarium* spp. foram transferidos para placas de Petri contendo meio mínimo (MMA), em que a glucose foi substituída por amido (6 g de  $\text{NaNO}_3$ ; 1,5 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0,5 g de  $\text{KCl}$ ; 0,5 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,01 g de  $\text{FeSO}_4$ ; 0,01 g de  $\text{ZnSO}_4$ ), os mesmos permaneceram a  $25 \pm 2$  °C e fotoperíodo de 12h. Passados cinco dias de cultivo em MMA, procedeu-se a avaliação em que mensurou-se o halo de degradação do amido. Para tanto, foram vertidos 2 mL de solução lugol sobre a superfície do meio de cultura. Após 10 minutos, a solução de lugol foi descartada e a atividade amilolítica detectada pela formação do halo amarelado. Com o auxílio de paquímetro digital, os diâmetros perpendiculares do crescimento micelial e do crescimento micelial mais o halo de degradação do substrato foram medidos (MARCHI et al., 2006). Para o cálculo do Índice Enzimático (I.E) foi utilizada a relação do diâmetro da colônia mais o halo de degradação/diâmetro da colônia (AUER et al., 2014).

### 3.8.4 Caseinase

A produção da caseinase foi verificada em meio caseína-ágar contendo 1% de caseína como fonte de carbono. Após, as placas foram incubadas por quatro dias a  $25 \pm 2$  °C (STANFORD et al., 1998). A atividade enzimática foi revelada com adição de HCl 1N na superfície do meio, deixando reagir com a caseína por 1 hora. Foi considerada positiva a atividade enzimática, quando ao redor do inóculo, surgiu um halo transparente em decorrência da hidrólise da caseína, circundado por um fundo com coloração esbranquiçada que corresponde a área onde a caseína não foi hidrolisada, logo, sendo, desnaturada por ação do ácido clorídrico (FUENTEFRÍA, 2004). O cálculo do I.E seguiu a metodologia descrita no item 3.8.3.

### 3.8.5 Protease

Para a avaliação da atividade proteolítica foi utilizado o meio nutriente ágar acrescido de 40g de gelatina em pó como substrato em pH 6,0. As placas foram incubadas durante sete dias a  $25 \pm 2$  °C sob fotoperíodo de 12 horas. Após o período de incubação dos isolados uma solução saturada de sulfato de amônio

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) foi adicionada sobre as placas. O precipitado desta solução tornou o ágar mais opaco e acentuou as zonas claras ao redor das colônias, onde a gelatina foi degradada (PEREIRA, 2009). O cálculo do I.E seguiu a metodologia descrita no item 3.8.3.

### **3.8.6 Celulose**

Os isolados foram cultivados em ágar carboximetilcelulose (1 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0,5 g de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 0,5 g de asparagina; 0,5 g de KCl; 0,2 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,1 g de  $\text{CaCl}_2$ ; 0,5 g de extrato de levedura; 10 g de carboximetilcelulose; 20 g de ágar; 1 L de água destilada). Em seguida, foram incubados por sete dias a  $25 \pm 2$  °C sob fotoperíodo de 12 horas. Após este período, os isolados foram submetidos a choque térmico por 16 horas a  $50 \pm 2$  °C. Em seguida, foram adicionados 10 mL de solução corante de vermelho congo (2,5 g/L em tampão Tris HCl 0,1 M, pH 8,0). Após 30 minutos a solução foi descartada e as culturas foram lavadas com 5 mL de solução saturada de NaCl 0,5 M para a revelação do halo de degradação da celulose ao redor da colônia (NOGUEIRA & CAVALCANTI, 1996). O cálculo do I.E seguiu a metodologia descrita no item 3.8.3.

### **3.8.7 Lipase**

Os isolados foram transferidos para placas de Petri com meio de cultura contendo Tween-20 como substrato (10 mL de Tween-20, 10 g de peptona, 5 g de NaCl, 0,01 g de  $\text{CaCl}_2$ , 20 g de ágar, 1 L de água destilada e pH ajustado para 6,0). Os isolados permaneceram a  $25 \pm 2$  °C sob fotoperíodo de 12 horas durante sete dias. Após a incubação, as placas foram resfriadas a 4°C por 48 horas. A atividade enzimática das colônias foi observada como um precipitado visível devido a formação de cristais de sais de cálcio (PEREIRA, 2009). O cálculo do I.E seguiu a metodologia descrita no item 3.8.3.

### **3.8.8 Pectinase**

Para detectar a atividade pectinolítica foi utilizado o meio de cultura contendo pectina cítrica como substrato (2g de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 4g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 6g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0,2g

FeSO<sub>4</sub>. H<sub>2</sub>O, 0,2g CaCl<sub>2</sub>, 1mg H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 10 mg MnSO<sub>4</sub>, 70mg CuSO<sub>4</sub>, 50mg MoO<sub>3</sub>, 1g de extrato de malte, 5g de pectina cítrica, 15g de ágar e 1L de água destilada) conforme descrito por Hankin e Anagnostakis (1971). O meio em pH 7,0 foi utilizado para detectar a produção de pectato liase e em pH 5,0 para avaliar a atividade de poligalacturonase. Após a repicagem dos isolados, as placas foram incubadas por cinco dias a 25 ± 2 °C. Para revelar o halo de degradação das pectinases adicionou-se sobre as placas uma solução de brometo de cetil trimetil amônio 1% (C<sub>16</sub>H<sub>33</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>Br) (Cetrimide 1%) que em contato com o meio de cultura reage e precipita a pectina intacta, ocasionando a formação de halos claros ao redor das colônias, indicando a degradação da mesma. O cálculo do I.E seguiu a metodologia descrita no item 3.8.3.

### 3.9 DELINEAMENTOS ESTATÍSTICOS E ANÁLISES

Para avaliação dos resultados do teste de patogenicidade e do índice enzimático (I.E) dos isolados de *Fusarium* spp. foram realizadas as análises de variância, tendo como fontes de variação os diferentes isolados. As variáveis médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott ( $p \leq 0,05$ ), através do programa estatístico Sisvar versão 5.3 (FERREIRA, 2008).

Os dados quantitativos de caracterização morfológica (esporulação, taxa de crescimento micelial, comprimento e largura dos macroconídios) foram submetidos à técnica de análise multivariada para agrupamento dos isolados de *Fusarium* spp. executada no programa GENES (versão 2009.7.0). A matriz de distância Euclidiana padronizada (D2) foi calculada como medida de dissimilaridade e utilizada para agrupamento dos isolados pelo método “Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean” - UPGMA (CRUZ, 2008). Os dados do crescimento micelial e da capacidade de esporulação foram analisados como experimento fatorial (4 meios de cultura e 3 regimes de luminosidade). As médias foram comparadas através do teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ), com o auxílio do programa estatístico SISVAR Versão 5.3.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 ISOLADOS OBTIDOS

Foram obtidos 39 isolados, provenientes de necroses radiculares de erva-mate (um isolado por planta sintomática coletada). Também foram obtidos isolados de mudas com sintomas de tombamento, coletadas em viveiros produtores (AV, PF e M7). Na Figura 1 é possível visualizar plantas e raízes com sintomas, onde foram realizadas as coletas. Na Tabela 3, estão apresentados os códigos dos isolados de *Fusarium* spp., a procedência, a idade do plantio e datas das coletas.

Figura 1 - Plantas adultas (A e B) e raízes (C e D) de erva-mate com sintomas de podridão-de-raízes

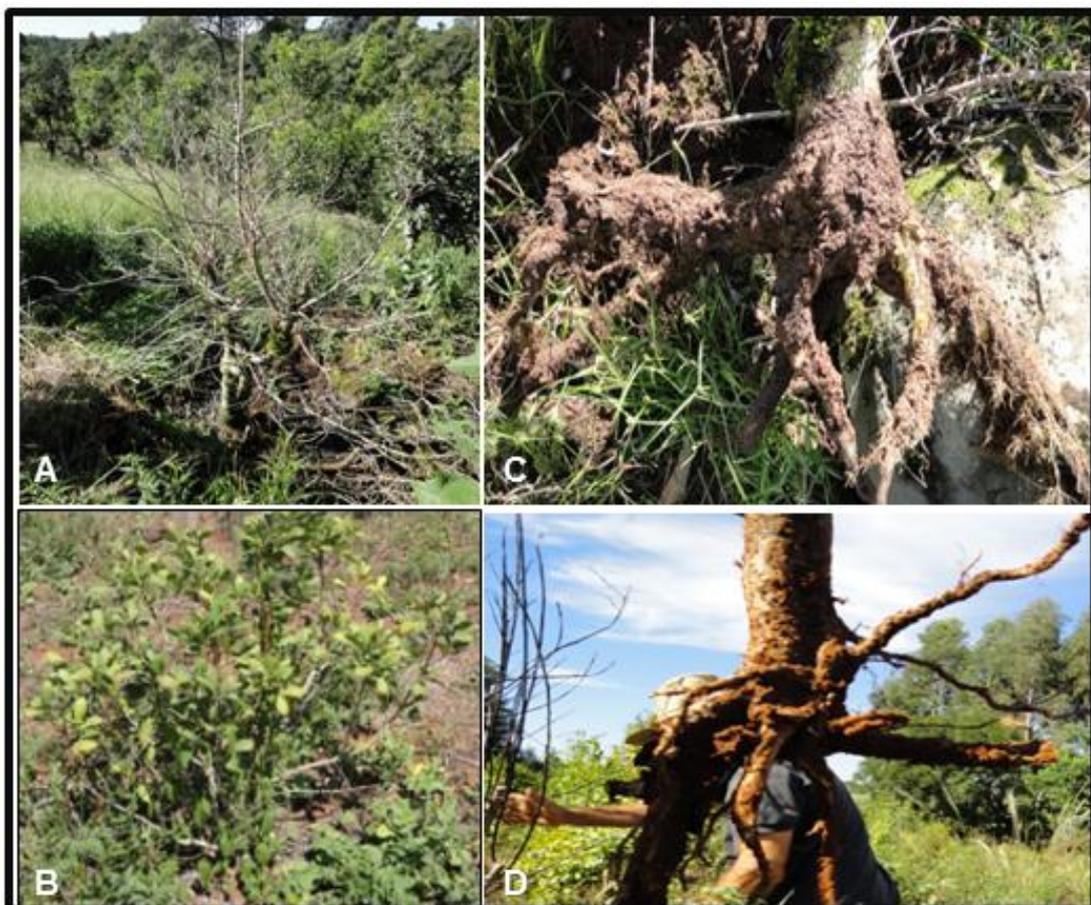


Tabela 3 - Código dos isolados de *Fusarium* spp., procedência, idade e data de coleta dos isolados obtidos de raízes sintomáticas e mudas de erva-mate com sintoma de tombamento

Código do isolado	Procedência	Idade do plantio (anos)	Data de coleta
I1AR1	Ilópolis	3	Jan/15
I1AR2	Ilópolis	3	Jan/15
I2AR1	Ilópolis	10	Jan/15
I2AR2	Ilópolis	10	Jan/15
I3AR1	Ilópolis	10	Jan/15
I3AR2	Ilópolis	10	Jan/15
I3AR3	Ilópolis	10	Jan/15
I4	Ilópolis	9	Jan/15
I5AR1	Ilópolis	20	Jan/15
IR5AR2	Ilópolis	20	Jan/15
I6AR2	Ilópolis	8	Jan/15
I6AR3	Ilópolis	8	Jan/15
I7	Ilópolis	11	Jan/15
I8AR1	Ilópolis	10	Jan/15
I8AR2	Ilópolis	10	Jan/15
ATAR1	Anta Gorda	9	Jan/15
ATAR2	Anta Gorda	9	Jan/15
PF1	Putinga	5 meses	Jan/15
PF2	Putinga	5 meses	Jan/15
AVF1	Arvorezinha	7 meses	Jan/15
AVF2	Arvorezinha	7 meses	Jan/15
AVF3	Arvorezinha	7 meses	Jan/15
M1AR1	Machadinho	4	Mar/15
M1AR2	Machadinho	4	Mar/15
M2	Machadinho	8	Mar/15
M3AR1	Machadinho	14	Mar/15
M3AR2	Machadinho	14	Mar/15
M3AR3	Machadinho	14	Mar/15
M4	Machadinho	8	Mar/15
M4AR2	Machadinho	8	Mar/15
M5AR1	Machadinho	20	Mar/15
M5AR2	Machadinho	20	Mar/15
M5AR3	Machadinho	20	Mar/15
M5V	Machadinho	8 meses	Mar/15
M6AR1	Machadinho	6	Mar/15
M6AR2	Machadinho	6	Mar/15
M7C1	Machadinho	5 meses	Mar/15
M7C2	Machadinho	7 meses	Mar/15
M7C3	Machadinho	8 meses	Mar/15

## 4.2 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO SOLO DAS ÁREAS DE COLETA

Na região do Alto Vale do Taquari (RS) nos municípios de Anta Gorda e Ilópolis, no RS, é predominante o solo do tipo Neossolo Litólito pouco desenvolvido e com ausências de horizontes diferenciados comuns em áreas de relevo ondulado a montanhoso. Entretanto, no município de Machadinho (RS) predominam Latossolos profundos, bem drenados, quimicamente pobres, vermelhos, indicando a presença de ferro (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CIÊNCIA DO SOLO, 2004)

A fim de descrever o ambiente em que os isolados foram coletados, determinou-se a composição química do solo. Na Tabela 4 estão apresentados os resultados da análise dos parâmetros químicos.

Segundo relato dos agricultores, nas áreas sintomáticas do município de Ilópolis (I), a adubação orgânica com dejetos de aves é predominante, com exceção da área I5, onde a adubação é mista, ou seja, química e verde, com a utilização de plantas leguminosas, além da correção da acidez do solo pela adição de calcário. Já nas áreas de coleta dos municípios de Anta Gorda (AT) e Machadinho (M), há o predomínio da adubação química diferindo apenas na propriedade M6 onde há uma mistura entre adubação química e orgânica. Os resultados da análise química do solo das áreas de coleta das raízes sintomáticas de erva-mate foram interpretados com base no Manual de Adubação e Calagem para os Estados do RS e SC (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CIÊNCIA DO SOLO, 2004)

Os percentuais de argila foram maiores no município de Machadinho, por se tratarem de solos mais profundos, sendo que os valores obtidos oscilaram entre 59 (M4 e M5) e 75% (M3). Nos municípios de Anta Gorda e Ilópolis, onde os solos são tipicamente mais jovens, e conseqüentemente, mais rasos, os percentuais de argila variaram de 16 a 57% nas áreas I4 e I8, respectivamente. Solos mais argilosos possuem uma maior capacidade de retenção de umidade, que de certa forma pode influenciar na fisiologia do inóculo. O percentual de matéria orgânica (M.O) das áreas de coleta foi considerado médio, com exceção da área I1 onde o percentual foi considerado alto.

A área M2 apresentou a maior quantidade de fósforo (P), com 174,3 mg/dm<sup>3</sup>, este alto valor em relação as demais áreas pode estar relacionado com uma possível adubação feita antes das coletas de solo. Entretanto, os valores de P das áreas de Machadinho foram determinados como alto ou muito alto.

Tabela 4 - Propriedades químicas do solo nas áreas de coletas das raízes sintomáticas de *Ilex paraguariensis* no Rio Grande do Sul

Áreas	pH (H <sub>2</sub> O)	Al	Ca	Mg	H+Al	CTC ef.	Saturação (%)	
							Bases	Al
		Cmol <sub>c</sub> /dm <sup>3</sup>						
AT	4,2	5,1	1,1	0,5	21,8	7,4	9,7	68,9
I1	3,5	7,6	2,2	0,7	48,6	10,8	6,2	70,4
I2	4,0	2,4	2,4	1,4	13,7	6,5	22,8	36,9
I3	4,0	5,3	2,2	0,8	21,8	8,8	13,8	60,2
I4	4,3	5,0	1,4	0,6	17,3	7,7	13,4	64,9
I5	4,4	1,7	5,2	1,5	15,4	8,9	31,7	19,1
I6	3,6	8,0	0,9	0,2	43,3	9,4	3,1	85,1
I7	3,7	7,1	2,0	0,4	38,6	9,9	6,7	71,7
I8	5,7	0,0	7,8	3,3	3,9	11,8	75,2	0,0
M1	4,1	2,1	3,1	1,3	15,4	7,1	24,7	29,6
M2	4,0	3,8	3,8	1,1	19,4	8,8	23,6	31,8
M3	5,9	0,0	10,3	4,0	3,9	14,9	79,5	0,0
M4	5,8	0,0	8,3	5,1	4,4	13,9	76,0	0,0
M5	5,2	0,5	5,9	2,0	5,5	8,8	60,5	5,7
M6	4,3	3,9	1,1	0,4	13,7	5,8	12,3	67,2
		% Argila	% M.O	P	K	Cu	S	B
Áreas	m/v		mg/dm <sup>3</sup>					
AT		19	3,9	9,30	264,0	0,4	21,2	0,3
I1		21	6,1	68,2	156,0	0,6	15,3	0,4
I2		18	3,4	32,2	124,0	2,4	20,1	0,3
I3		17	4,0	14,4	208,0	0,8	18,2	0,3
I4		16	3,6	5,3	260,0	0,4	26,4	0,2
I5		22	3,9	84,8	168,0	0,1	17,6	0,4
I6		16	4,3	15,3	124,0	0,6	20,5	0,3
I7		19	3,6	30,1	132,0	0,7	18,6	0,3
I8		57	3,0	35,8	252,0	0,5	21,4	0,2
M1		67	3,3	35,8	220,0	11,9	30,8	0,2
M2		62	3,5	174,3	408,0	6,2	22,0	0,8
M3		75	4,2	89,6	264,0	10,1	22,0	0,5
M4		59	3,3	46,0	164,0	9,4	24,4	0,8
M5		59	3,5	21,8	156,0	12,8	22,0	0,4
M6		67	3,2	8,40	152,0	10,0	18,2	0,3

Em relação aos valores de potássio (K), novamente a área M2 apresentou a maior quantidade amostrada, de 408 mg/dm<sup>3</sup>, o que reforça a possibilidade de que a

mesma recebeu adubação. A menor quantidade foi detectada nas áreas I2 e I6 com 124,0 mg/dm<sup>3</sup>, entretanto, a maioria das áreas (9) apresentaram valor de referência muito alto, as demais, alto.

Ainda na Tabela 4, para a concentração de cálcio (Ca), o destaque foi a área M3 com 10,3 Cmol<sub>e</sub>/dm<sup>3</sup> sendo atribuído o valor de referência alto, além desta, nas áreas I5, I8, M4 e M5 os índices também foram considerados altos. Ao contrário, a menor concentração de Ca, segundo a análise, foi detectada na área I6 com 0,9 Cmol<sub>e</sub>/dm<sup>3</sup>, conseqüentemente o valor de referência foi considerado baixo. O mesmo foi observado nas áreas I4, I6, I7 e M6. Nas demais áreas a concentração de Ca foi classificada como média.

As concentrações de magnésio (Mg) variaram de 0,2 (I6) a 5,1 (M4) Cmol<sub>e</sub>/dm<sup>3</sup>. O teor foi considerado baixo nas áreas AT, I6, I7, M6. Em contraponto nas áreas I2, I5, I8, M1, M2, M3, M4 e M5 o teor foi classificado como alto. Nas demais áreas como médio.

O teor de Alumínio (Al) variou de zero nas áreas M3 e M4 a 8,0 Cmol<sub>e</sub>/dm<sup>3</sup> na área I6. Para os valores da acidez potencial (H+Al) as menores concentrações, de 3,9 Cmol<sub>e</sub>/dm<sup>3</sup>, foram observadas nas áreas I8 e M3, ao contrário da área I1 onde a concentração foi maior, com 48,6 Cmol<sub>e</sub>/dm<sup>3</sup>.

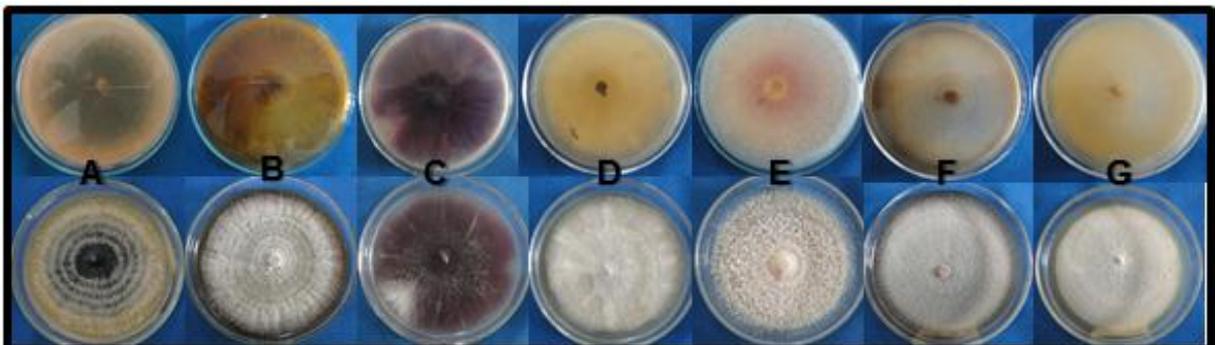
#### 4.3 CARACTERIZAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA DOS ISOLADOS DE *Fusarium* spp.

Os dados da caracterização morfológica dos isolados de *Fusarium* spp. estão apresentados na Tabela 5 e foram observadas diferenças na taxa de crescimento micelial (T.C.M) entre os isolados. O isolado I2AR1 obteve o menor crescimento (4,85 mm/dia), em contrapartida o isolado I5AR1 apresentou a maior taxa, 11,15 mm/dia. Stumpf (2011) obteve taxas médias de crescimento de 8,5 mm/dia para *F. verticillioides* e 15,0 mm/dia para *F. graminearum*. Kuhnem Júnior et al. (2013) registraram médias menores de T.C.M para isolados de *F. verticillioides* (2,73 mm/dia). Ao observar os resultados dos estudos anteriormente citados, notou-se que embora sendo da mesma espécie, os isolados apresentaram uma grande variação na T.C.M. O mesmo foi observado no presente estudo, já que foi possível detectar uma ampla variação nas T.C.M. Segundo os últimos autores citados, esta amplitude entre as taxas pode estar relacionada com a variação fisiológica de cada indivíduo.

Para a variável esporulação o destaque foi para o isolado I1AR2 com média de  $69,66.10^6$  esporos/mL, enquanto que o isolado M4AR2 desempenhou a menor média de esporos/mL ( $2,19.10^6$ ). Entretanto, uma boa parte dos isolados apresentou uma esporulação significava.

A pigmentação da colônia em meio BDA foi determinante para a separação dos isolados em grupos. Sendo assim, estes foram reunidos em sete categorias, de acordo com os tons variáveis de: rosa e rosa claro, púrpura, amarelo, amarelo bronzeado, amarelo esverdeado e amarelo oliva, marrom e marrom pálido, marrom escuro. Em todos os isolados o micélio aéreo exibiu coloração branca (Figura 2). Segundo Walker et al. (2016) *F. acuminatum*, em meio de cultura BDA, apresentou coloração vermelho-carmim, variando entre tons de amarelo bronzeado e marrom. Já o isolado de *F. verticillioides* desenvolveu pigmentação violácea. Poletto et al. (2012) observaram em isolados de *F. solani* uma variação na coloração de bege a azulada e bege a alaranjada. Para *F. oxysporum* foram relatadas variações de violeta a tons de roxo escuro (RODRIGUES & MENEZES, 2006). No presente estudo, as colorações violeta (púrpura), roxo e bege (amarelo) também foram observadas, entretanto, para Summerell et al. (2003) a discriminação de espécies do gênero *Fusarium* através de cores deve ser analisada com cautela, pois, diversos fatores do meio de cultura como, por exemplo, o pH podem influenciar na pigmentação do micélio e da colônia. Além disso, segundo estes autores, apesar de algumas espécies apresentarem pigmentação uniforme, em outras a mesma, pode apresentar ampla variação.

Figura 2 - Aspectos e coloração das colônias (imagens superiores indicam a pigmentação das colônias e inferiores a coloração do micélio aéreo em meio BDA após 10 dias de incubação. (A): amarelo oliva; (B): marrom escuro; (C): púrpura; (D): amarelo; (E): rosa claro; (F): marrom; (G): amarelo bronzeado



Entre as formas dos microconídios, a oval (Figura 3) foi a mais comum, presente em 26 isolados, seguido de reniforme e obovoide, ambas observadas em cinco isolados. Entre as formas menos comuns estão piriforme e napiforme, presentes em dois e um isolados, respectivamente. Barros (2013) observou em sua análise dos microconídios dos isolados a totalidade da forma oval, estes, foram identificados através da chave dicotômica de Nirenberg e O'Donnell (1998) como sendo *F. verticillioides* e *F. proliferatum*. O formato oval também foi observado por Sfalsin (2012), porém, pela classificação de Leslie e Summerell (2006) os isolados foram descritos com *F. decemcellulare*.

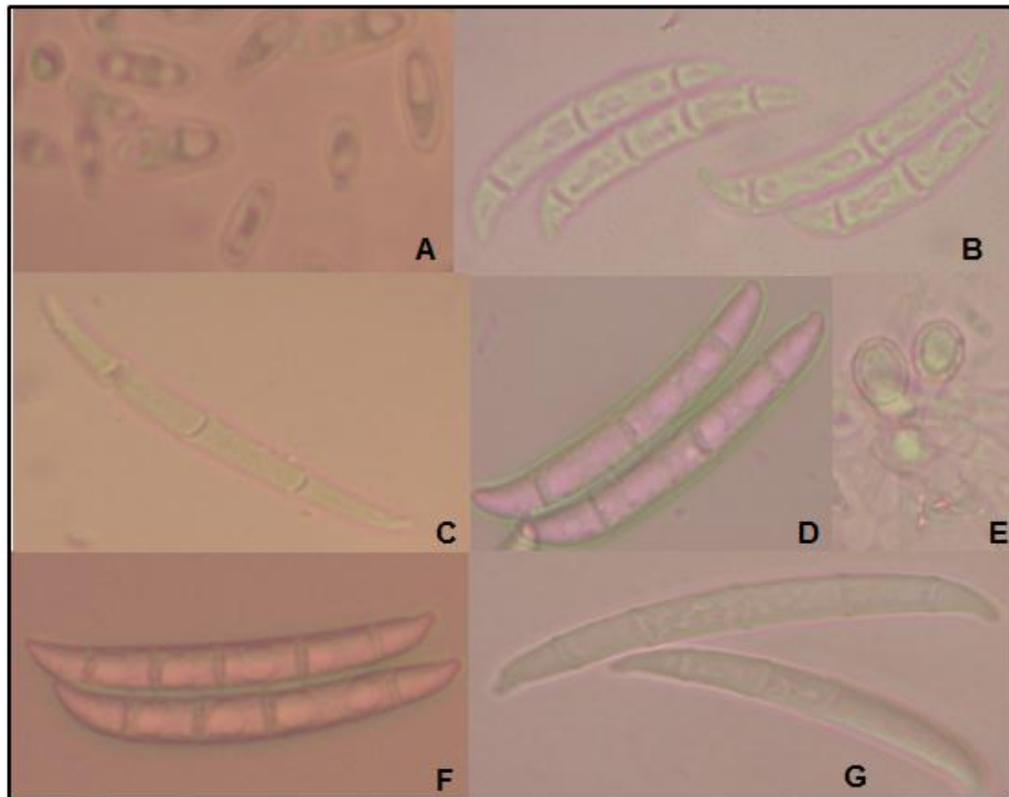
Entretanto, Frias (2014); Poltronieri et al. (2002) e Walker et al. (2016) não citam em suas descrições morfológicas de *Fusarium* spp. o formato dos microconídios, apenas sua presença ou ausência. No presente estudo, foi possível verificar que todos os isolados caracterizados apresentaram formação de microconídios em meio BDA e CLA. Entretanto, a forma do microconídio é um dos diversos elementos analisados na classificação de espécies de *Fusarium* através de caracteres morfológicos, sendo necessária a união com outros parâmetros sob pena de equívoco na determinação da espécie.

Nos macroconídios (Figura 3) foi observada grande variação nas dimensões de comprimento e largura. No comprimento, as médias variaram de 24,02 a 58,90µm nos isolados I1AR1 e I4, respectivamente. Já na largura as médias variaram de 2,90 (I1AR2) a 6,35µm (PF2). Em sua grande maioria, os macroconídios foram detalhados contendo três septos, podendo chegar a sete. Carnielli (2014) em seus estudos identificou seus isolados como *F. guttiforme* e, entre as características dos macroconídios desta espécie estão o comprimento variando de 35 a 71µm, largura de 3 a 4µm e 3 a 5 septos. Nelson et al. (1983) descrevem os macroconídios de *F. oxysporum* como fusóides, ligeiramente curvos, com três a cinco septos, medindo de 3-6 x 25-35 µm. Para os autores anteriormente citados, o tamanho das monofialides pode diferenciar *F. oxysporum* de *F. solani*.

Entre os isolados caracterizados morfológicamente apenas os isolados I5AR1 e M7C3 não apresentaram a formação de clamidósporos em meio CLA. Pfenning e Martins (2000) não detectaram clamidósporos em *F. stilboides* e *F. verticillioides* isolados de cafeeiro. Entretanto, segundo esses autores, em *F. oxysporum* e *F. solani* a presença dos mesmos foi abundante. O mesmo foi observado por Azevedo (2015), em que, isolados de *F. solani* produziram clamidósporos com formato e

disposição semelhantes aos encontrados em *F. oxysporum*. No presente estudo, corroborando com os autores acima citados, verificou-se, que entre os isolados caracterizados prevaleceu a presença de clamidósporos em grande quantidade (Figura 3), aproximando-os de *F. oxysporum* e *F. solani*.

Figura 3 - Caracterização morfológica de *Fusarium* spp. (A): microconídios; (B: M5AR1; C: M3AR2; D: AVF2; F: I3AR2; G: ATAR2): macroconídios; (E): clamidósporos



A partir da caracterização morfológica dos 39 isolados, os dados relacionados à esporulação, crescimento micelial, comprimento e largura dos macroconídios foram submetidos ao método de agrupamento UPGMA (“*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*”) e através do dendograma gerado, os isolados foram agrupados pela similaridade entre as médias dos caracteres. Examinando o dendograma (Figura 4) observa-se a formação de sete grandes grupos (Tabela 6).

Tabela 5 - Características morfológicas dos isolados de *Fusarium* spp. obtidos de plantas sintomáticas de *Ilex paraguariensis*

(continua)

Isolado	Esp. (.10 <sup>6</sup> ) <sup>1</sup>	T.C.M (mm/dia) 1	Microconid. <sup>1,2</sup>	Macroconídios <sup>1</sup>			Pigmentação da colônia <sup>1</sup>		Clamid. <sup>2,3</sup>	Esporod. <sup>2</sup>
				Comp.(µm )	Larg. (µm)	Nº. de septos	Colônia	Micélio aéreo		
<b>I1AR1</b>	4,02	6,69	Oval	24,02	4,95	3 ou 4	Amarelo escuro	Branco	+	Creme
<b>I1AR2</b>	21,03	9,29	Oval	36,03	2,90	3 ou 4	Púrpura	Branco	+	Creme
<b>I2AR1</b>	4,59	4,85	Oval	48,90	4,70	5 ou 6	Marrom	Branco	+	Creme
<b>I2AR2</b>	69,66	9,95	Oval	37,10	4,65	3	Púrpura	Branco	+	Creme
<b>I3AR1</b>	3,36	5,95	Reniforme	39,60	5,00	3-4-5	Púrpura	Branco	+	Creme
<b>I3AR2</b>	7,54	9,62	Oval	36,10	4,82	3 ou 4	Púrpura	Branco	+	Marrom
<b>I3AR3</b>	5,52	10,31	Oval	40,96	5,38	4 ou 5	Verde oliva	Branco	+	Creme
<b>I4</b>	16,30	6,57	Oval	58,90	5,20	5-6-7	Amarela	Branco	+	Creme
<b>I5AR1</b>	14,35	11,15	Reniforme	31,00	4,05	3	Púrpura	Branco	-	Marrom
<b>I5AR2</b>	3,09	7,39	Obovoide	42,90	4,22	5	Amarela	Branco	+	Marrom
<b>I6AR2</b>	45,96	10,02	Reniforme	33,10	4,10	3	Púrpura	Branco	+	Creme
<b>I6AR3</b>	19,85	7,23	Oval	55,70	4,60	5-6-7	Amarelo bronzado	Branco	+	Marrom
<b>I7</b>	2,57	7,74	Oval	37,70	6,15	3-4-5	Amarelo	Branco	+	Creme
<b>I8AR1</b>	6,08	7,05	Piriforme	37,80	4,90	3 ou 4	Amarelo bronzado	Branco	+	Creme
<b>I8AR2</b>	11,32	6,36	Napiforme	39,70	3,85	3 ou 4	Amarelo oliva	Branco	+	Marrom
<b>ATAR1</b>	5,70	7,20	Obovoide	40,80	5,15	3 ou 4	Marrom pálido	Branco	+	Creme
<b>ATAR2</b>	5,32	7,47	Oval	51,00	4,65	4 ou 5	Amarelo bronzado	Branco	+	Creme
<b>PF1</b>	17,05	9,39	Oval	28,40	3,55	3	Púrpura	Branco	+	Creme

(conclusão)

<b>PF2</b>	4,80	8,87	Oval	39,80	6,35	3-4-5	Amarelo	Branco	+	Creme
<b>AVF1</b>	11,32	7,45	Obovoide	38,20	4,40	3 ou 5	Marrom pálido	Branco	+	Creme
<b>AVF2</b>	4,68	6,96	Obovoide	30,90	5,75	3	Amarelo oliva	Branco	+	Creme
<b>AVF3</b>	2,75	8,40	Obovoide	40,00	5,05	3	Amarelo oliva	Branco	+	Creme
<b>M1AR1</b>	6,64	6,72	Oval	38,40	4,70	4 ou 5	Marrom escuro	Branco	+	Creme
<b>M1AR2</b>	6,39	7,30	Piriforme	47,90	4,95	5	Marrom escuro	Branco	+	Creme
<b>M2</b>	2,73	7,92	Oval	38,40	4,93	3 ou 4	Amarelo	Branco	+	Creme
<b>M3AR1</b>	8,00	7,90	Reniforme	45,50	5,03	3 ou 4	Amarelo	Branco	+	Creme
<b>M3AR2</b>	6,39	7,30	Reniforme	46,30	5,10	4 ou 3	Amarelo	Branco	+	Creme
<b>M3AR3</b>	8,72	7,48	Oval	41,50	5,12	3-4-5	Amarelo	Branco	+	Creme
							bronzado			
<b>M4</b>	15,9	9,05	Oval	43,60	4,68	4 ou 3	Amarelo	Branco	+	Creme
							bronzado			
<b>M4AR2</b>	2,19	9,03	Oval	42,50	5,05	3-4-5	Amarelo claro	Branco	+	Creme
<b>M5AR1</b>	2,60	6,95	Oval	31,80	4,75	3 ou 4	Amarelo escuro	Branco	+	Creme
<b>M5AR2</b>	14,84	6,48	Oval	42,40	4,10	3-4-5	Castanho escuro	Branco	+	Creme
<b>M5AR3</b>	9,16	7,32	Oval	40,90	4,95	3 ou 4	Amarelo	Branco	+	Creme
<b>M5V</b>	6,45	8,38	Oval	32,50	4,28	3 ou 4	Amarelo	Branco	+	Creme
<b>M6AR1</b>	13,85	8,49	Oval	40,60	5,05	3 ou 4	Amarelo	Branco	+	Creme
<b>M6AR2</b>	11,88	7,66	Oval	44,20	5,10	3-4-5	Amarelo	Branco	+	Creme
<b>M7C1</b>	5,72	7,41	Oval	55,40	4,75	4 ou 5	Marrom escuro	Branco	+	Creme
<b>M7C2</b>	11,88	6,99	Oval	48,40	4,70	4 ou 5	Marrom escuro	Branco	+	Creme
<b>M7C3</b>	7,62	9,46	Oval	30,14	5,12	4 ou 5	Marrom escuro	Branco	-	Creme

Onde: Esp.: Esporulação aos sete dias; Taxa de Crescimento Micelial (T.C.M) (mm/dia); Microconid.: microconídios; (\*) forma dos microconídios; Comp.: comprimento; Larg.: largura; Clamid.: clamidósporo; Esporod.: esporodóquio; 1: meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar; 2: meio de cultura Folha-de-cravo-Ágar; 3: Presença (+) e ausência (-). Valores médios de cada isolado.

Figura 4 - Dendrograma mostrando a porcentagem (%) de dissimilaridade entre os 39 isolados de *Fusarium* spp. O dendrograma foi obtido pela técnica UPGMA, a partir da análise da matriz de distância Euclidiana, com os quatro caracteres morfológicos (esporulação, crescimento micelial, comprimento e largura dos macroconídios)

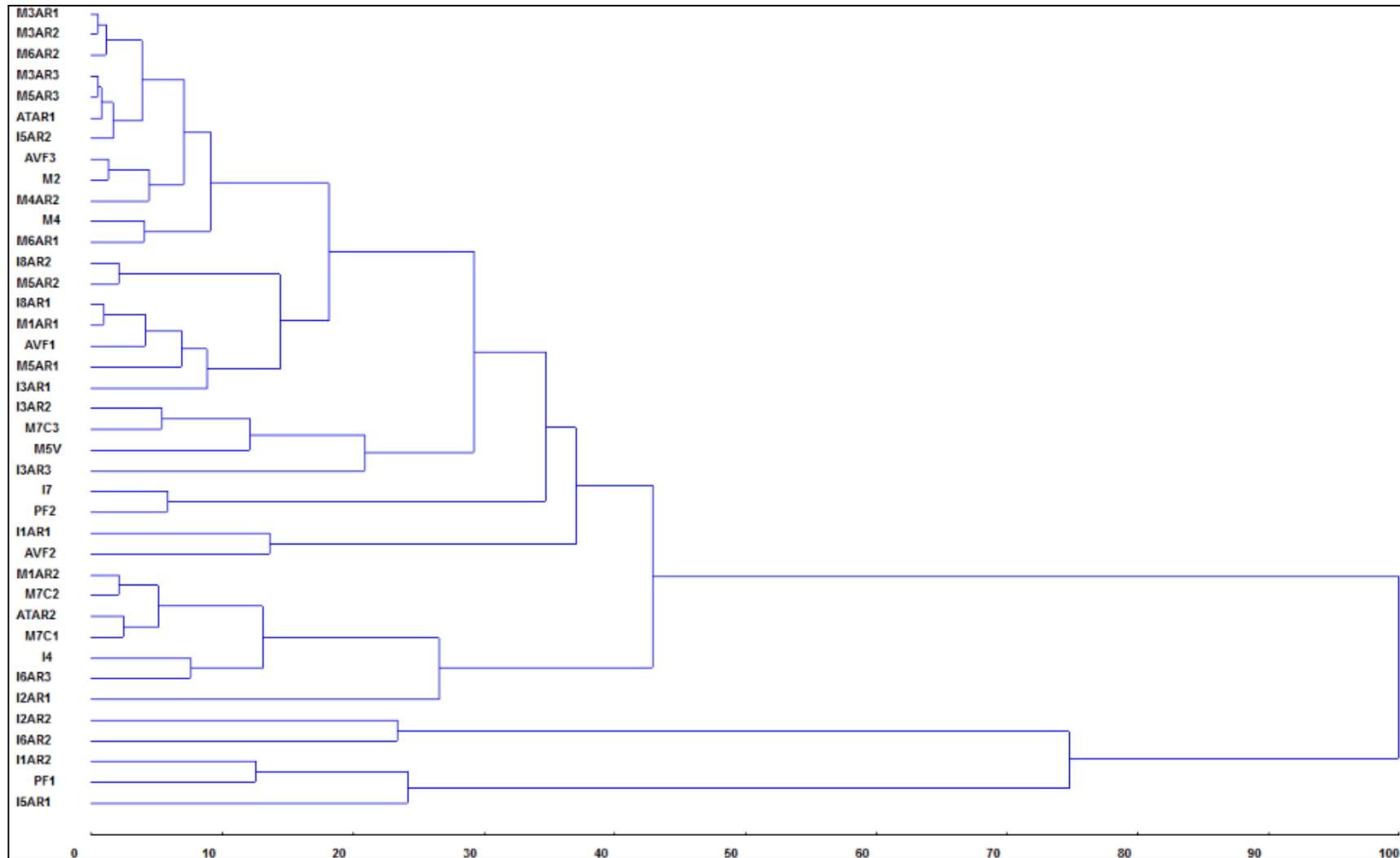


Tabela 6 - Grupos de isolados de *Fusarium* spp. com base no método de agrupamento UPGMA

Grupos	Isolados
1	M3AR1, M3AR2, M6AR2, M3AR3, M5AR3, ATAR1 e I5AR2
2	AVF3, M2, M4AR2, M4 e M6AR1
3	I8AR2, M5AR2, I8AR1, M1AR1, AVF1, M5AR1 e I3AR1
4	I3AR2, M7C3, M5V e I3AR3
5	I7, PF2, I1AR1 e AVF2
6	M1AR2, M7C2, ATAR2, M7C1, I4 e I6AR3
7	I2AR1, I2AR2, I6AR2, I1AR2, PF1 e I5AR1

Ainda no dendrograma da Figura 4, nota-se que a dissimilaridade entre os isolados do grupo 7 é superior a 70%, o que demonstra diferenças significativas entre os parâmetros utilizados na análise, entretanto, foram alocados em um mesmo clado, já que, o objetivo da análise é a separação dos isolados em grandes grupos. A menor dissimilaridade foi observada nos grupos 1 e 2 (inferior a 10%). Seguido do grupo 3 com menos de 20%. Já os grupos 4, 5 e 6 apresentaram dissimilaridade, entre os isolados, superior a 20. Faia (2011) observou que os isolados do gênero *Cladosporium* foram alocados em 2 *clusters* diferentes, com coeficientes de similaridade de 80,1% e 96,9%. Segundo a autora, isolados muito semelhantes ao gênero *Cladosporium* agruparam-se em um *cluster* com coeficiente de similaridade de 78,4%, sugerindo que, semelhanças morfológicas aproximaram os isolados, então desconhecidos, aos do gênero *Cladosporium*.

Além do dendrograma, o procedimento de agrupamento UPGMA também fornece as distâncias Euclidianas entre os isolados, assim, as menores distâncias sugerem proximidade entre os parâmetros submetidos à análise. Ao contrário, maiores distâncias sugerem a diferença entre os caracteres analisados. Estas distâncias são utilizadas na confecção do dendrograma que unem isolados similares em um mesmo clado. As estimativas das distâncias Euclidianas entre os isolados estão dispostas na Tabela 7.

Tabela 7 - Estimativas da distância Euclidiana entre 39 isolados de *Fusarium* spp., após agrupamento pela técnica UPGMA

Isolado	Maior distância		Menor distância	
	Isolado	Valor	Isolado	Valor
I1AR1	I2AR2	1.16724	M5AR1	.23507
I1AR2	PF2	1.03634	PF1	.29509
I2AR1	I2AR2	1.30388	I3AR1	.33086
I2AR2	I2AR1	1.30388	I6AR2	.40259
I3AR1	I2AR2	1.17651	M1AR1	.16139
I3AR2	I2AR2	.92386	M7C3	.19340
I3AR3	I2AR2	.98184	M4AR2	.23412
I4	I2AR2	1.15298	I6AR3	.22892
I5AR1	I2AR1	1.14882	PF1	.32589
I5AR2	I2AR2	1.09251	ATAR1	.80206
I6AR2	I2AR1	1.13351	I2AR2	.40259
I6AR3	I2AR2	1.00797	M7C1	.21596
I7	I2AR2	1.14068	PF2	.20062
I8AR1	I2AR2	1.05146	M1AR1	.08043
I8AR2	I2AR2	1.06382	M5AR2	.11969
ATAR1	I2AR2	1.05900	M3AR3	.06672
ATAR2	I2AR2	1.10595	M1AR2	.12822
PF1	I4	1.09263	I1AR2	.29509
PF2	I2AR2	1.09650	I7	.20062
AVF1	I2AR2	.95401	M1AR1	.16187
AVF2	I2AR2	1.13404	I7	.26030
AVF3	I2AR2	1.03168	M2	.09549
M1AR1	I2AR2	1.06625	I8AR1	.08043
M1AR2	I2AR2	1.07691	M7C2	.12041
M2	I2AR2	1.04683	AVF3	.09549
M3AR1	I2AR2	1.00559	M3AR2	.05742
M3AR2	I2AR2	.97066	M3AR1	.05742
M3AR3	I2AR2	1.00199	M5AR3	.05841
M4	I2AR2	.82307	M6AR1	.16651
M4AR2	I2AR2	1.02895	AVF3	.12331
M5AR1	I2AR2	1.11291	I8AR1	.18545
M5AR2	I2AR2	1.00600	I8AR2	.11970
M5AR3	I2AR2	.99888	M3AR3	.05841
M5V	I2AR2	.98423	AVF1	.23335
M6AR1	I2AR2	.87261	AVF3	.16603
M6AR2	I2AR2	.96123	M3AR1	.08099
M7C1	I2AR2	1.15618	ATAR2	.12992
M7C2	I2AR2	1.02922	M1AR2	.12041
M7C3	I2AR2	.95391	I3AR2	.19340

Percebe-se na Tabela 7, que o isolado I2AR2 apresenta as maiores distâncias entres os demais. Seguramente, isso estaria relacionado com a média de esporulação, que chega a ser 10 vezes maior quando comparadas com outros isolados, como, por exemplo, o I2AR1, I8AR1 e M1AR1.

Outro dado fornecido pela análise multivariada (UPGMA) é contribuição relativa dos caracteres para divergência, isto é, o quanto cada variável utilizada contribuiu para o agrupamento dos isolados em clados. A esporulação foi a varável que mais contribuiu, com 72,22%, seguido do comprimento dos macroconídios (26,77%), as demais variáveis praticamente não contribuíram para a divergência dos isolados (Tabela 8).

Lazarotto (2013) utilizou, em seus estudos, diâmetro de colônias, esporulação, largura e comprimento de conídios para o agrupamento UPGMA a fim de diferenciar morfologicamente isolados de *Fusarium* spp. Como resultado, a largura dos conídios foi responsável por 99,98% da contribuição relativa dos caracteres. A autora destaca que esta variável, praticamente sozinha, foi capaz de discriminar os isolados em grupos. Os caracteres diâmetro de colônia aos sete dias, esporulação e comprimento de conídios praticamente não interferiram no agrupamento dos isolados.

Para Pereira (2001) a utilização de variáveis morfológicas na análise UPGMA permitiu a separação em nível de gênero de fungos micorrízicos associados à *Epidendrum secundum*. Segundo o autor, os resultados obtidos foram extremamente satisfatórios para a formação de três grupos contendo os gêneros *Epulorhiza*, *Ceratorhiza*. Para seu estudo, o autor supracitado comparou dados de diâmetro da colônia, em diferentes meios, largura e comprimento das células monilióides e diâmetro de hifa.

Figueiredo (2006) optou por realizar a análise de agrupamento utilizando as seguintes características morfológicas: crescimento, morfologia, coloração, tipo de micélio, bordos da colônia; presença ou ausência de acérvulos sobre a colônia; modificação na coloração do meio; taxa de esporulação; comprimento de apêndices; comprimento, largura e coloração dos conídios. A autora discriminou as variáveis descritas atribuindo-as notas 0 ou 1, onde 0 representou ausência da característica e 1 presença. Os resultados que compuseram o dendrograma de similaridade morfológica sugeriram a formação de 3 grupos isolados de *Pestalotiopsis* spp endófitos a *Maytenus ilicifolia*.

Tabela 8 - Contribuição relativa dos caracteres (esporulação, taxa de crescimento micelial, comprimento e largura dos macroconídios) para divergência

Caracteres (médias)	Valor (%)
Esporulação	72,22
Taxa de crescimento micelial	0,83
Comprimento dos macroconídios	26,77
Largura dos macroconídios	0,18

Em suma, a análise multivariada sugere que para este conjunto de 39 isolados de *Fusarium* spp., a esporulação seria, em tese, suficiente para separar os isolados em grupos de dissimilaridade. Ao associar os dados da esporulação ao comprimento dos macroconídios, tem-se 98,99% de contribuição para a discriminação dos isolados de *Fusarium* spp. ou seja, as demais variáveis poderiam ser desprezadas. Contudo, é necessário prudência neste tipo de análise, pois os isolados devem ser submetidos a outros processos de identificação como, por exemplo, o sequenciamento de regiões do DNA, a fim de consolidar a veracidade do uso de apenas duas variáveis para discriminação dos isolados.

A partir da caracterização morfológica e do agrupamento pelo método UPGMA os 39 isolados de *Fusarium* spp. foram submetidos a um teste de patogenicidade piloto em sementes de fumo (*Nicotiana tabacum*). Com base nas três análises foram selecionados sete isolados de *Fusarium* spp. (I1AR1, I6AR2, I8AR1, M3AR2, M4, M5AR2, M7C1) para a caracterização molecular e para os testes de: crescimento micelial e esporulação em diferentes meios, patogenicidade, grupos de compatibilidade vegetativa (VCG) e produção de enzimas extracelulares.

Na Tabela 9 estão dispostas as médias do crescimento micelial dos isolados I1AR1, I6AR2, I8AR1, M3AR2, M4, M5AR2 e M7C1 em diferentes meios de cultura e regimes de luminosidade. O crescimento micelial do isolado I1AR1 sob os regimes de luminosidade de 12 e 24 horas diferiram estatisticamente, no caso de 12 horas o maior crescimento foi constatado no meio V8 (69,90 mm), porém não diferiu estatisticamente do meio MEA, com média de 67,88 mm. Quando incubado no fotoperíodo zero não houve diferença no crescimento micelial entre os meios estudados. Quando analisada a interação meio x fotoperíodo apenas o BDA diferiu estatisticamente.

Já o crescimento micelial do isolado I6AR2 não apresentou diferença estatística entre os diferentes fotoperíodos nem entre os diferentes meios de cultura. Entretanto, foi possível observar que o mesmo apresenta um bom crescimento micelial tanto nos diferentes meios de cultura quanto nos diferentes regimes de luminosidade, pois, apenas no meio BDA/12h a média do diâmetro da colônia ficou abaixo dos 72,40 mm.

Para o crescimento micelial do isolado I8AR1 apenas o fotoperíodo 0h não diferiu estatisticamente entre os diferentes meios, com médias variando entre 55,40 a 61,42 mm. Nos três regimes de luminosidade testados, as menores médias foram observadas no BDA, de 47,58 (12h) a 57,14 mm (24h). Entre as interações fotoperíodo x meio apenas no BSA não houve diferença estatística.

Tabela 9 - Crescimento micelial (mm) de isolados *Fusarium* spp. mensurado aos sete dias em diferentes níveis de luminosidade (horas) e meios de cultura.

(continua)

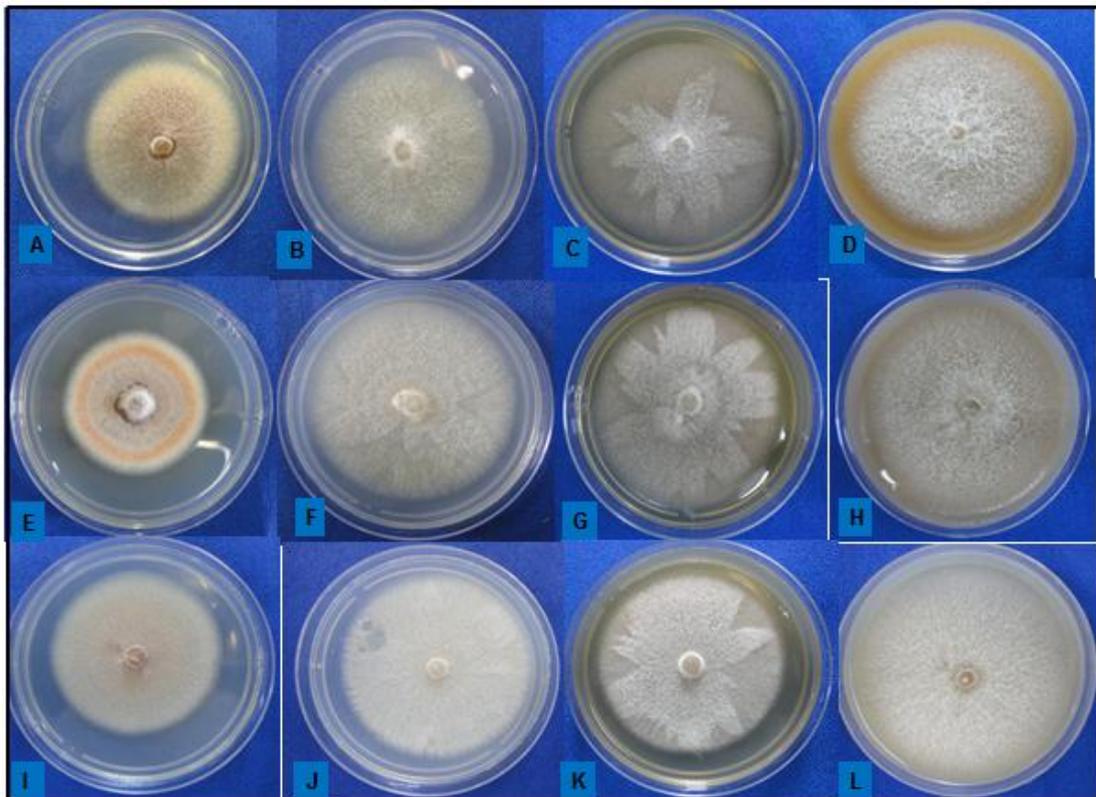
Isolado I1AR1	Meios de cultura			
	BDA	MEA	V8	BSA
0 h	56,52 a* A*	59,22 a A	66,29 a A	59,05 a A
12 h	45,49 c B	67,88 ab A	69,90 a A	58,98 b A
24 h	56,85 b A	62,81 ab A	68,30 a A	59,47 ab A
Isolado I6AR2	Meios de cultura			
	BDA	MEA	V8	BSA
0	74,83 a A	74,87 a A	72,40 a A	75,13 a A
12	67,46 a A	75,42 a A	73,91 a A	76,47 a A
24	74,40 a A	73,44 a A	71,24 a A	74,81 a A
Isolado I8AR1	Meios de cultura			
	BDA	MEA	V8	BSA
0	55,40 a AB	60,90 a B	61,42 a B	57,79 a A
12	47,58 c B	71,90 ab A	76,82 a A	61,94 b A
24	57,14 b A	67,84 a AB	71,06 a A	60,80 ab A
M3AR2	Meios de cultura			
	BDA	MEA	V8	BSA
0	61,40 b A	72,70 a A	73,66 a A	68,47 ab A
12	53,06 b A	69,91 a A	71,15 a A	70,12 a A
24	59,40 b A	70,31 a A	72,83 a A	71,96 a A
Isolado M4	Meios de cultura			
	BDA	MEA	V8	BSA
0	63,50 b A	64,51 ab A	74,17 a A	66,96 ab A
12	50,81 b B	70,94 a A	78,85 a A	70,84 a A
24	61,12 b A	70,54 ab A	72,57 a A	63,33 ab A
Isolado M5AR2	Meios de cultura			
	BDA	MEA	V8	BSA
0	48,90 b A	73,13 a A	73,11 a A	63,43 a A
12	50,24 b A	67,20 a A	68,93 a A	64,62 aA
24	44,54 b A	40,82 b A	70,32 a A	44,49 b B

(conclusão)

Isolado M7C1	Meios de cultura			
	BDA	MEA	V8	BSA
0	58,43 b A	68,35 ab A	71,42 a A	70,09 a A
12	52,90 b AB	65,71 a AB	74,81 a A	68,16 a A
24	48,70 a B	56,55 a A	58,73 a B	50,46 a B
C.V (%)	8,85			

\* Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na linha e maiúscula na coluna, não diferem pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Sendo: BDA: batata-dextrose-ágar, MEA: extrato de malte-ágar; BSA: batata-sacarose-ágar e C.V: coeficiente de variação.

Figura 5 - Crescimento micelial de *Fusarium* spp (M3AR2) em diferentes meios e regimes de luminosidade (horas). (A, E, I): BDA - 0,12, 24h; (B, F, J): BSA - 0, 12, 24h; (C, G, H): MEA - 0, 12, 24h; (D, H, L): V8 - 0, 12, 24 h respectivamente.



Ainda na Tabela 9, o isolado M3AR2 apresentou o menor crescimento micelial quando cultivado no meio BDA, independentemente do fotoperíodo, diferindo estatisticamente dos demais meios (exceto BSA às 0h). Entretanto, os demais isolados não diferiram estatisticamente entre si nos três regimes de luminosidade testados. Na interação fotoperíodo x meio nenhuma das simulações testadas diferiu estatisticamente.

Já o isolado M4, quando incubado no escuro em meio V8 obteve a maior média de crescimento micelial, com 74,17 mm de diâmetro, diferindo

estatisticamente somente do meio BDA, com média de 63,50 mm. O mesmo foi observado nos fotoperíodos de 12 h e 24 h nos quais o meio V8 obteve média de 78,85 e 72,57 mm e o meio BDA de 50,81 e 61,12 mm, respectivamente. Entre as interações fotoperíodo x meio apenas o meio BDA no fotoperíodo de 12h diferiu estatisticamente dos demais, apresentando o menor crescimento micelial, com média de 50,81 mm.

De maneira geral, quando observamos apenas o crescimento micelial, verifica-se que para os isolados de *Fusarium* spp. obtidos de erva-mate os meios V8 e MEA alternaram as maiores médias entre os regimes de luminosidade testados. Para Leão et al. (2012), o meio V8 modificou proporcionou maior crescimento da colônia de *Ascochyta cucumis* quando submetido ao regime de 0h e menor diâmetro médio quando submetido ao regime de 24h. Meios de cultura que possuem em sua composição extratos e sucos oriundos de folhas ou de partes vegetais, como o V8, composto por oito vegetais, normalmente estimulam não só o crescimento micelial mas também a esporulação de vários fungos (DHINGRA & SINCLAIR, 1985).

No caso do isolado M5AR2 nos regimes de luminosidade 0 e 12h o crescimento micelial comportou-se de maneira semelhante. As maiores médias foram obtidas no meio V8 que diferiu estatisticamente apenas do BDA. O mesmo não foi observado no regime de 24h, onde o V8 diferiu estatisticamente dos meios MEA, BSA e BDA. Para a interação fotoperíodo x meio apenas o BSA/24h diferiu estatisticamente dos outros dois regimes pesquisados.

Nos fotoperíodos 0 e 12h o crescimento micelial do isolado M7C1 foi menor no meio BDA, que diferiu estatisticamente dos demais meios testados (exceto MEA 0h). Porém, no fotoperíodo de 24h não foram observadas diferenças estatísticas em V8, MEA, BDA e BSA.

Quanto aos regimes de luminosidades, observou-se que todos os regimes favoreceram o crescimento micelial dos isolados. Segundo Teixeira et al. (2001) o crescimento *in vitro* de *F. oxysporum* f.sp. *vasinfectum* foi consideravelmente maior quando incubado em escuro contínuo. Entretanto, segundo estes autores, o crescimento micelial de *F. verticillioides* não sofreu influência quanto à presença ou ausência de fontes de luz. Lazarotto et al. (2014) constataram que o BSA proporcionou maiores médias no crescimento micelial de *F. chlamydosporum*. Segundo os mesmos autores o escuro contínuo desfavoreceu os diâmetros das colônias de *F. chlamydosporum*. Resultados semelhantes foram relatados por Silva e Teixeira (2012) onde a ausência de luz inibiu o crescimento de *F. solani*. Em

relação aos meios de cultura, estes autores corroboram com os resultados de Lazarotto et al. (2014), em que os meios BSA e BDA apresentaram as maiores médias nos diâmetros das colônias de *F. solani*

No isolado I1AR1 os melhores índices de esporulação (Tabela 10) foram detectados no meio MEA, nos três regimes de luminosidade testados (4,34 a 5,60 x 10<sup>6</sup> esporos/mL), quando comparadas no regime de 24 h as médias não diferiram estatisticamente. Na interação regimes de luminosidade x meios somente no meio V8 foi possível observar diferença estatística entre as médias, onde a luz contínua diferiu estatisticamente dos demais regimes de luminosidade.

Em contraponto, o meio MEA desfavoreceu a esporulação do isolado I6AR2 quando comparadas as médias nos três fotoperíodos testados, entretanto, não diferiu estatisticamente das médias do BDA. As médias da interação fotoperíodo x meio não diferiram estatisticamente nos meios MEA e V8. Já o meio BSA favoreceu a esporulação nos tratamentos BSA 0h e BSA 12h, as médias apresentaram pouca variação, de 5,55 e 5,70x10<sup>6</sup> esporos/mL, respectivamente.

As médias da esporulação do isolado I8AR2 não diferiram estatisticamente nos diferentes regimes de luminosidade e meios de cultura, o mesmo foi observado nas interações dos regimes de luminosidade x meios de cultura.

O regime de luminosidade de 24h foi o que mais favoreceu a esporulação do isolado M3AR2, quando cultivado em meio BSA, porém, estas não diferiram estatisticamente do MEA. As piores médias da esporulação deste isolado foram obtidas em meio V8.

O isolado M4 quando incubado em fotoperíodo de 24h não apresentou diferença estatística para a variável esporulação. Para este isolado o tratamento MEA 0h obteve o maior índice de esporulação (7,44x10<sup>6</sup> esporos/mL). Entre os meios de cultura a única interação fotoperíodo x meios nos quais as médias de esporulação diferiram estatisticamente foi a do MEA.

Corroborando com os resultados obtidos no presente trabalho, Silva e Teixeira (2012) afirmaram que meios ricos em carboidratos como o BDA e o BSA quando incubados sob regime de 24h induzem um aumento na produção de conídios de *F. solani*. Segundo Camera et al. (2014), analisando o crescimento e esporulação de *Alternaria brasiliensis* em diferentes regimes de luminosidade, o menor número de conídios/mL foi observado quando o patógeno foi cultivado em BDA. Contudo, os mesmos autores afirmaram que o regime de luz contínua apresentou as melhores médias na concentração de esporos de *A. brasiliensis*.

Tabela 10 - Esporulação ( $\times 10^6$  esporos/mL) de *Fusarium* spp. mensurado aos sete dias em diferentes níveis de luminosidade (horas) e meios de cultura

Isolado I1AR1	Meios de cultura			
	BDA	MEA	V8	BSA
0	2,21 bc* A*	5,60 a A	1,52 c B	3,73 ab A
12	3,55 ab A	4,44 a A	1,95 b B	2,36 ab A
24	3,61 a A	4,34 a A	2,86 a A	2,95 a A
Isolado I6AR2	Meios de cultura			
	BDA	MEA	V8	BSA
0	2,72 b AB	2,25 b A	3,51 ab A	5,55 a B
12	1,60 b B	1,71 b A	5,66 a A	5,70 a A
24	3,68 ab A	2,44 b A	3,73 ab A	4,54 a B
Isolado I8AR1	Meios de cultura			
	BDA	MEA	V8	BSA
0	3,46 a A	3,20 a A	3,35 a A	4,82 a A
12	2,56 a A	3,39 a A	2,44 a A	4,08 a A
24	4,45 a A	3,73 a A	3,79 a A	4,18 a A
M3AR2	Meios de cultura			
	BDA	MEA	V8	BSA
0	2,94 a A	3,20 a B	2,90 a A	3,75 a B
12	2,31 a A	2,09 a B	3,05 a A	3,68 a B
24	3,85 b A	6,57 a A	2,62 b A	7,04 a A
Isolado M4	Meios de cultura			
	BDA	MEA	V8	BSA
0	3,40 b A	7,44 a A	2,98 b A	3,40 b A
12	4,85 a A	1,39 b B	1,70 b A	3,09 ab A
24	4,47 a A	3,15 a B	2,85 a A	3,75 a A
Isolado M5AR2	Meios de cultura			
	BDA	MEA	V8	BSA
0	2,32 b B	4,61 a A	1,90 b B	3,58 ab B
12	3,70 a B	3,14 a A	3,73 a AB	3,01 a B
24	6,80 a A	4,79 ab A	4,42 b A	5,90 ab A
Isolado M7C1	Meios de cultura			
	BDA	MEA	V8	BSA
0	3,61 b C	4,98 ab B	5,55 ab B	6,46 a A
12	5,88 a B	3,64 b B	4,21 ab B	2,68 b B
24	8,27 a A	8,53 a A	9,32 a A	4,91 b A
C.V (%)		29,34		

\* Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na linha e maiúscula na coluna, não diferem pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Em que: BDA: batata-dextrose-ágar, MEA: extrato de malte-ágar; BSA: batata-sacarose-ágar e C.V: coeficiente de variação.

Seguindo na Tabela 10, para o isolado M5AR2, o meio BDA exibiu as melhores médias, com destaque para o regime de luminosidade de 24 h com média de  $6,80 \times 10^6$  esporos/mL. O tratamento V8/0h obteve baixo índice de esporulação com média de  $1,90 \times 10^6$  esporos/mL. A relação níveis de luminosidade x MEA não diferiu estatisticamente.

Além do isolado M3AR2, o fotoperíodo 24h mostrou-se promissor para a esporulação do isolado M7C1 quando crescido nos meios V8, MEA e BDA, onde as médias não diferiram estatisticamente. Aliás, na interação fotoperíodo x meio de

cultura os valores de esporulação do meio BDA diferiram estatisticamente entre si quando comparados os três fotoperíodos testados, sendo que a utilização da luz contínua proporcionou maior esporulação.

Para a variável esporulação, os meios MEA e BSA assumiram posições de destaque. Entretanto, de uma maneira geral, todos os meios testados ofereceram concentrações de nutrientes quando combinados com a fisiologia dos isolados, proporcionando índices satisfatórios de esporulação, principalmente na condição de luz contínua. Lazarotto et al. (2014) indicaram os meios BSA e BDA combinados com regime de luminosidade contínua para a produção massal de macroconídios de *F. chlamyosporum*.

A maioria dos fungos demonstra estar mais adequada ao regime diário, alternando períodos entre escuro e luz obedecendo ao regime típico da natureza. Contudo, alguns fungos sensíveis à luz esporulam e/ou crescem quando submetidos à luz contínua (TEIXEIRA et al., 2001).

#### 4.4 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Fusarium* spp.

Nas Tabelas 11, 12 e 13, são apresentados os acessos utilizados para a comparação filogenética, obtidos a partir do *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), acompanhados de seu número de acesso, percentual de cobertura e similaridade. Foram selecionados os acessos com maior similaridade e cobertura, para a confecção dos dendogramas, determinados após o alinhamento das sequências.

A partir do alinhamento foram gerados dendogramas filogenéticos para cada região genômica: ITS (Figura 6), fator alongação 1-  $\alpha$  (Figura 7) e beta – tubulina (Figura 8).

Com o sequenciamento da região ITS (ITS1, 5.8S e ITS2) e com o dendrograma resultante da análise (Figura 6) foi possível determinar as espécies em questão.

Os isolados M3AR2 e M4 foram alocados em um grande *clado* (ramo) juntamente com as sequências de *Fusarium solani* utilizadas na comparação com suporte de *bootstrap* de 99%. Os isolados I1AR1, I8AR1, assim como, M5AR2 e M7C1 foram alocados em dois *clados* distintos com suporte de *bootstrap* de 61 e 63%, respectivamente. Entretanto, quando comparadas com as demais sequências de *F. solani*, o suporte de *bootstrap* aumenta para 99% de similaridade.

Mesmo com valores de *bootstrap* baixos (61,63 e 65%) observa-se que o sequenciamento da região ITS permitiu a separação dos isolados de *F. solani* por regiões, isto é, os isolados obtidos em Machadinho - RS (M3AR2, M4, M5AR2 e M7C1) foram destinados a ramos distintos aos coletados em Ilópolis (I1AR1 e I8AR1).

Durante o alinhamento, o isolado I6AR2 foi designado a um único *clado* agregado às outras 10 sequências utilizadas, com suporte de *bootstrap* de 99% de similaridade, sendo então, identificado como *F. oxysporum*.

Corroborando com os resultados do presente estudo, o dendrograma obtido por Shahnazi et al. (2012) reserva claramente a formação de dois clados, discriminando as espécies de *F. solani* e *F. proliferatum*. Ademais, esse resultado foi sustentado por um alto valor de *bootstrap* (100%).

Segundo Poletto et al. (2012), o uso apenas da região ITS1 não apresentou nenhum sítio informativo que possibilitasse a separação de diferentes isolados dentro da mesma espécie de *Fusarium* spp. patogênicos à erva-mate. Apesar disso, os autores citados anteriormente, ressaltam que o uso e a ampliação desta região do rDNA já encontra-se consolidada pela sua utilização e eficácia para a discriminação entre espécies. O mesmo foi verificado por Maciel (2012), em que o sequenciamento da região ITS não foi conclusiva em nível de espécie, já que, o percentual do suporte *bootstrap* foi inferior a 90%.

Para Datta et al. (2011) o uso de primers específicos para as regiões ITS1 e ITS2 foi efetivo na distinção de 12 isolados de *Fusarium* spp. obtidos de diferentes regiões da Índia. Porém, os autores supramencionados revelaram uma leve presença de polimorfismo na região amplificada do rDNA, dificultando a separação de alguns isolados em três grupos distintos. Abd-Elsalam et al. (2003) utilizando genes rRNA na identificação de *Fusarium*, consideraram particularmente apropriado para fornecer sequências alvo na caracterização molecular em nível de gênero.

O sequenciamento da região do fator de alongação 1- $\alpha$  (TEF-1 $\alpha$ ) (Figura 8) reforçou a identificação dos isolados I1AR1, I8AR1, M3AR2, M4, M5AR2, M7C1 (*F. solani*) e I6AR2 (*F. oxysporum*). Os altos valores do suporte *bootstrap*, 99 e 100%, respectivamente, aumentaram a confiabilidade do alinhamento.

Complementando a análise anterior, o sequenciamento da região do fator de alongação 1- $\alpha$  promoveu uma diferenciação intraespecífica mais ampla, posto que, os isolados de *F. solani* foram distribuídos em ramos distintos. Os obtidos em

Machadinho (exceto M7C1) foram designados à clados mais próximos. Entre os coletados em Ilópolis a similaridade foi de 88%.

Hsuan et al. (2011) obtiveram êxito na identificação de isolados de *Fusarium* sp., pertencentes ao complexo *Gibberella fujikuroi* obtidos de milho (*Zea mays*), arroz (*Oryza sativa*) e cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) na Malásia. De acordo com os autores citados, o sequenciamento do TEF-1 $\alpha$  consolida-se como uma importante ferramenta para a diferenciação de espécies do gênero *Fusarium*, alicerçada por valores elevados de *bootstrap*. O polimorfismo revelado pela análise do TEF 1- $\alpha$  foi suficiente para discriminar até mesmo espécies de *Fusarium* estreitamente relacionadas. Além disso, o dendrograma resultante foi gerado de maneira clara, com boa estrutura e resolução na distribuição dos ramos (CHANDRA et al., 2011; NITSCHKE et al., 2009).

Segundo O'Donnell (1998), para a determinação de espécies de *Fusarium* o sequenciamento do TEF-1 $\alpha$  torna-se mais vantajoso frente à região ITS em virtude da alta qualidade das informações filogenéticas fornecidas.

O sequenciamento da região beta-tubulina ratificou e consolidou a identificação dos isolados em *F. solani* (I1AR1, I8AR1, M3AR2, M4, M5AR2, M7C1) e *F. oxysporum* (I6AR2). Em ambos os casos, verificou-se a formação de um único clado por espécie. Apesar do elevado suporte de *bootstrap* (99%), esta análise não proporcionou a diferenciação intraespecífica dos isolados de *F. solani* observados nos sequenciamentos anteriores.

Corroborando com os resultados do presente trabalho, Soares (2011), o sequenciamento da região  $\beta$ -tubulina possibilitou a identificação de uma nova linhagem filogenética dentro do Complexo *Gibberella fujikuroi* (GFC). Entretanto, segundo a autora, o baixo valor de suporte *bootstrap* aponta para a complementação da análise filogenética com outras regiões genômicas. O mesmo foi observado por Bogale et al. (2009) onde a região  $\beta$ -tubulina permitiu a separação de isolados de *Fusarium solani* em dois clados distintos. Segundo Jacobs et al. (2010), isolados de *F. ananatum* e *F. guttiforme*, causadores da fusariose-do-abacaxizeiro, foram nitidamente separados em clados diferentes utilizando os genes do fator de alongação 1- $\alpha$  e  $\beta$ -tubulina.

Tabela 11 - Acesso no *Genbank*, cobertura (%), similaridade (%), país de origem e referências das espécies utilizadas na construção do dendrograma filogenético da região genômica ITS.

Espécie	Acesso no GenBank	Cobertura (%)	Similaridade (%)	País de origem	Referência
<i>F. oxysporum</i>	KU527801	100	99	Índia	Katoch (2016)
<i>F. oxysporum</i>	KT876684	100	99	Reino Unido	Al-Maqtoofi & Thornton (2015)
<i>F. oxysporum</i>	KF264963	100	99	Índia	Patil et al. (2013)
<i>F. oxysporum</i>	KC810062	100	99	Brasil	Lazarotto et al. (2014)
<i>F. oxysporum</i>	KC790519	100	99	China	Long e Zhu (2013)
<i>F. oxysporum</i>	JX669526	100	99	China	Su e Fu (2013)
<i>F. oxysporum</i>	JX669525	100	99	China	Su e Fu (2013)
<i>F. oxysporum</i>	HQ907948	100	99	China	Cao e Song (2011)
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>gladioli</i>	FJ158124	100	99	Índia	Thimmappa et al. (2008)
<i>F. oxysporum</i>	KT269788	100	99	Alemanha	Glynou et al. (2015)
<i>F. solani</i>	KU377510	99	100	Equador	Perez-Martinez et al. (2016)
<i>F. solani</i>	KU097267	99	100	Índia	Kashyap et al. (2016)
<i>F. solani</i>	KU296243	99	100	Holanda	Manikandan et al. (2016)
<i>F. solani</i>	KU296242	99	100	Holanda	Manikandan et al. (2016)
<i>F. solani</i>	KU296241	99	100	Holanda	Manikandan et al. (2016)
<i>F. solani</i>	LN828149	99	100	Espanha	Guevara (2016)
<i>F. solani</i>	LN828141	99	100	Espanha	Guevara- Suarez et al. (2016)
<i>F. solani</i>	LN828138	99	100	Espanha	Guevara (2016)
<i>F. solani</i>	LN828133	99	100	Espanha	Guevara- Suarez et al. (2016)
<i>F. solani</i>	LN828113	99	100	Espanha	Guevara- Suarez et al. (2016)
<i>F. solani</i>	LN828110	99	100	Espanha	Guevara- Suarez et al. (2016)
<i>F. solani</i>	KJ467100	99	100	Arábia Saudita	Saleh et al. (2015)
<i>F. solani</i>	KM980008	99	100	Brasil	Fernandes e Queiroz (2015)
<i>L. subglobosa</i>	KF234560	-	-	Brasil	Machado et al. (2014)

Figura 6 - Dendrograma filogenético baseado no método *Neighbor-joining* a partir de sequências de DNA da região ITS. Os números sobre os ramos indicam a porcentagem de repetições da análise de bootstrap na qual as repetições foram observadas (1000 repetições). Uma sequência de *Lasodiplotia subglobosa* foi utilizada como *outgroup*.

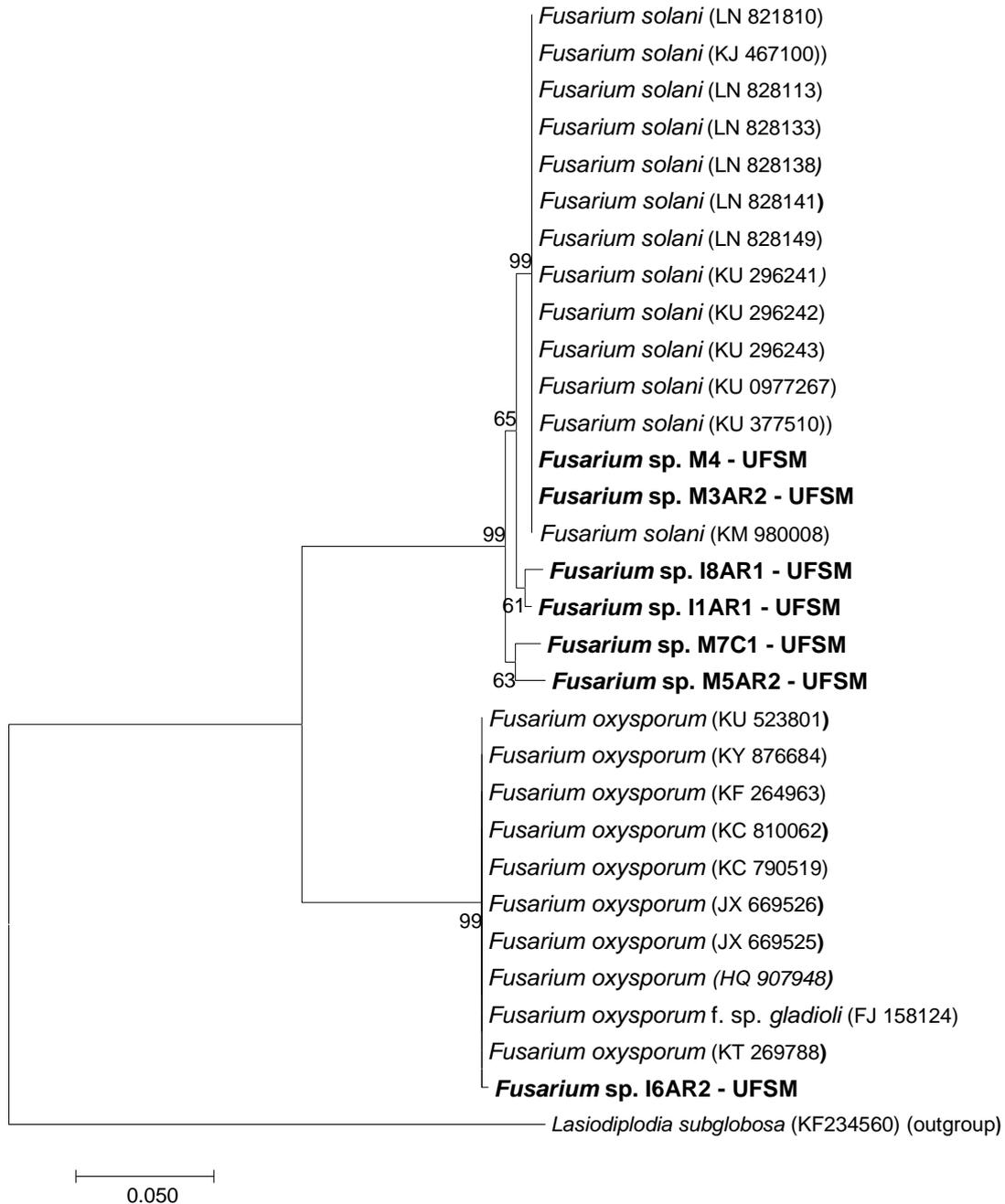


Tabela 12 - Acesso no *Genbank*, cobertura (%), similaridade (%), país de origem e referência das espécies utilizadas na construção do dendrograma filogenético da região do fator de alongação 1- $\alpha$ .

Espécie	Acesso no GenBank	Cobertura (%)	Similaridade (%)	País de origem	Referência
<i>F. oxysporum</i>	KP710623	99	99	Polônia	Stefanczyk et al. (2016)
<i>F. oxysporum</i>	KT006896	100	99	Coreia do Sul	Park et al. (2015)
<i>F. oxysporum</i>	KP400689	100	99	Polônia	Stefanczyk et al. (2016)
<i>F. oxysporum</i>	KJ648634	100	99	Malásia	Kartiekasari et al. (2014)
<i>F. oxysporum</i>	KP868657	100	99	China	Guan e Gao (2014)
<i>F. oxysporum</i>	JQ965451	100	99	China	Zhang e Gao (2013)
<i>F. oxysporum</i>	JX669525	100	99	China	Su e Fu (2013)
<i>F. oxysporum</i>	JF740853	100	99	EUA	O'Donnell et al. (2014)
<i>F. oxysporum</i>	KR139824	100	99	Paquistão	Rafique (2016)
<i>F. oxysporum</i>	KT265340	100	99	EUA	Gordon e Kirkpatrick (2015)
<i>F. oxysporum</i>	KP400693	100	99	Polônia	Stefanczyk et al. (2016)
<i>F. oxysporum</i>	KF574848	100	99	Tunísia	Hannachi et al. (2013)
<i>F. solani</i>	KP674196	98	100	Polônia	Stefanczyk et al. (2016)
<i>F. solani</i>	KR935896	98	100	México	Rivera-Jimenez et al. (2015)
<i>F. solani</i>	KR108788	100	100	China	Wang e Gao et al. (2015)
<i>F. solani</i>	JX118990	98	100	Holanda	Davari et al. (2012)
<i>F. solani</i>	KX001801	98	100	Brasil	Almeida Jr e Del Negro (2016)
<i>F. solani</i>	KJ648656	98	100	Malásia	Kartiekasari et al. (2014)
<i>F. solani</i>	KT286755	98	100	Turquia	Tekeoglu et al. (2015)
<i>F. solani</i>	KU315472	98	100	Tailândia	Dorlom et al. (2015)
<i>F. solani</i>	KR935896	100	100	México	Rivera-Jimenez et al. (2015)
<i>F. solani</i>	KP143718	100	100	China	Liu et al. (2016)
<i>F. solani</i>	FN689821	100	100	Noruega	Hageskal et al. (2016)
<i>F. solani</i>	KY091148	100	98	China	Sui et al. (2016)
<i>F. solani</i>	HQ731056	100	98	Espanha	Jimenez-Fernandes et al. (2011)
<i>F. solani</i>	KF429224	100	99	Malásia	Azuddin e Salleh (2013)
<i>F. solani</i>	KM580565	100	99	Malásia	Wafa e Latiffah (2014)
<i>F. solani</i>	KM886217	100	99	Malásia	Nur Ain Izzati et al. (2014)
<i>F. solani</i>	KT224175	98	99	China	Wang e Wu (2016)
<i>F. solani</i>	KF429215	100	98	Malásia	Azuddin e Salleh (2013)
<i>F. solani</i>	LN827988	100	98	Espanha	Guevara-Suarez (2016)
<i>L. subglobosa</i>	KT895370	-	-	Brasil	Poletto et al. (2015)

Figura 7 - Dendrograma filogenético baseado no método *Neighbor-joining* a partir de sequências de DNA da região do fator de alongação 1- $\alpha$ . Os números sobre os ramos indicam a porcentagem de repetições da análise de bootstrap na qual as repetições foram observadas (1000 repetições). Uma sequência de *Lasiodiplodia subglobosa* foi utilizada como *outgroup*.

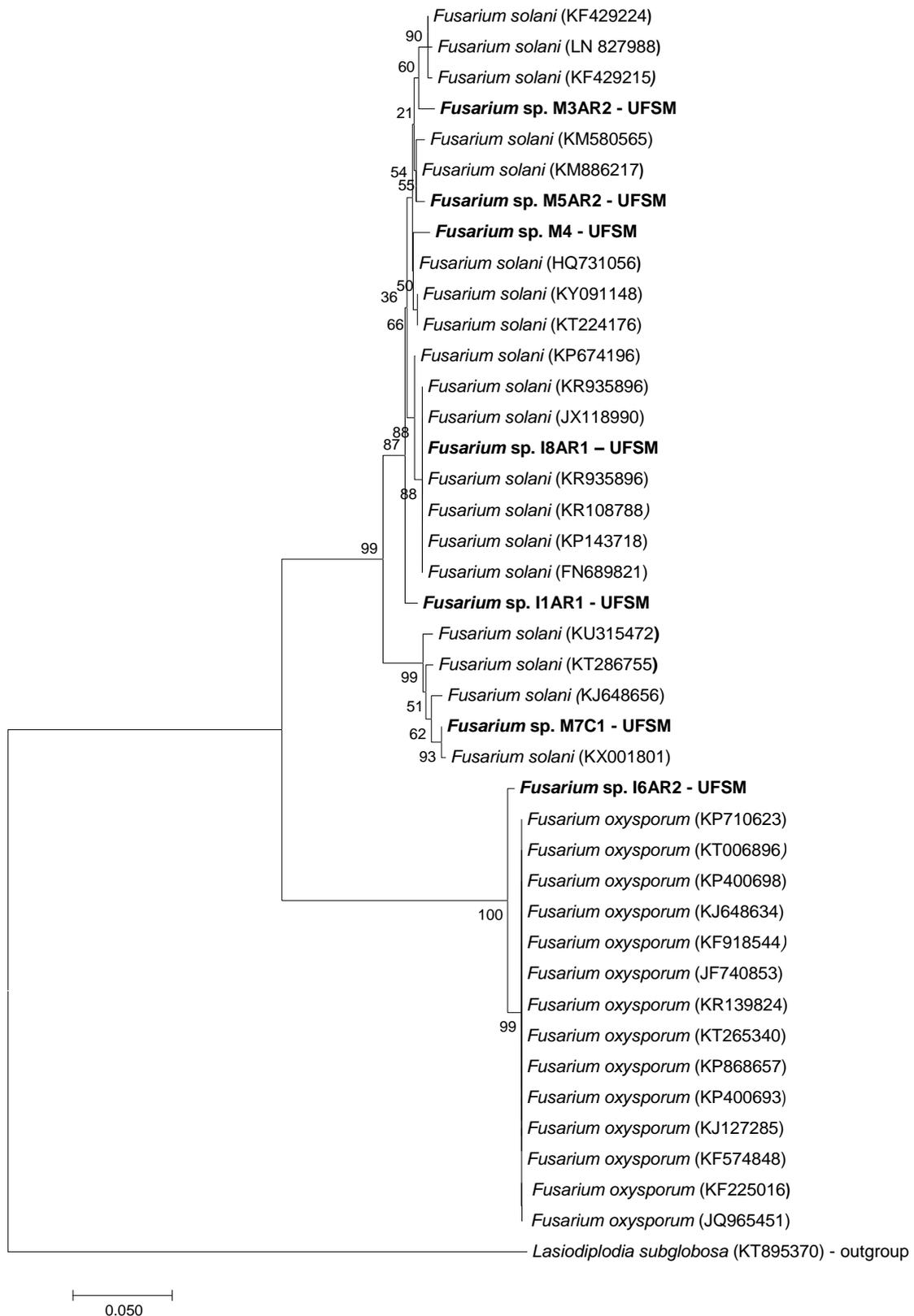
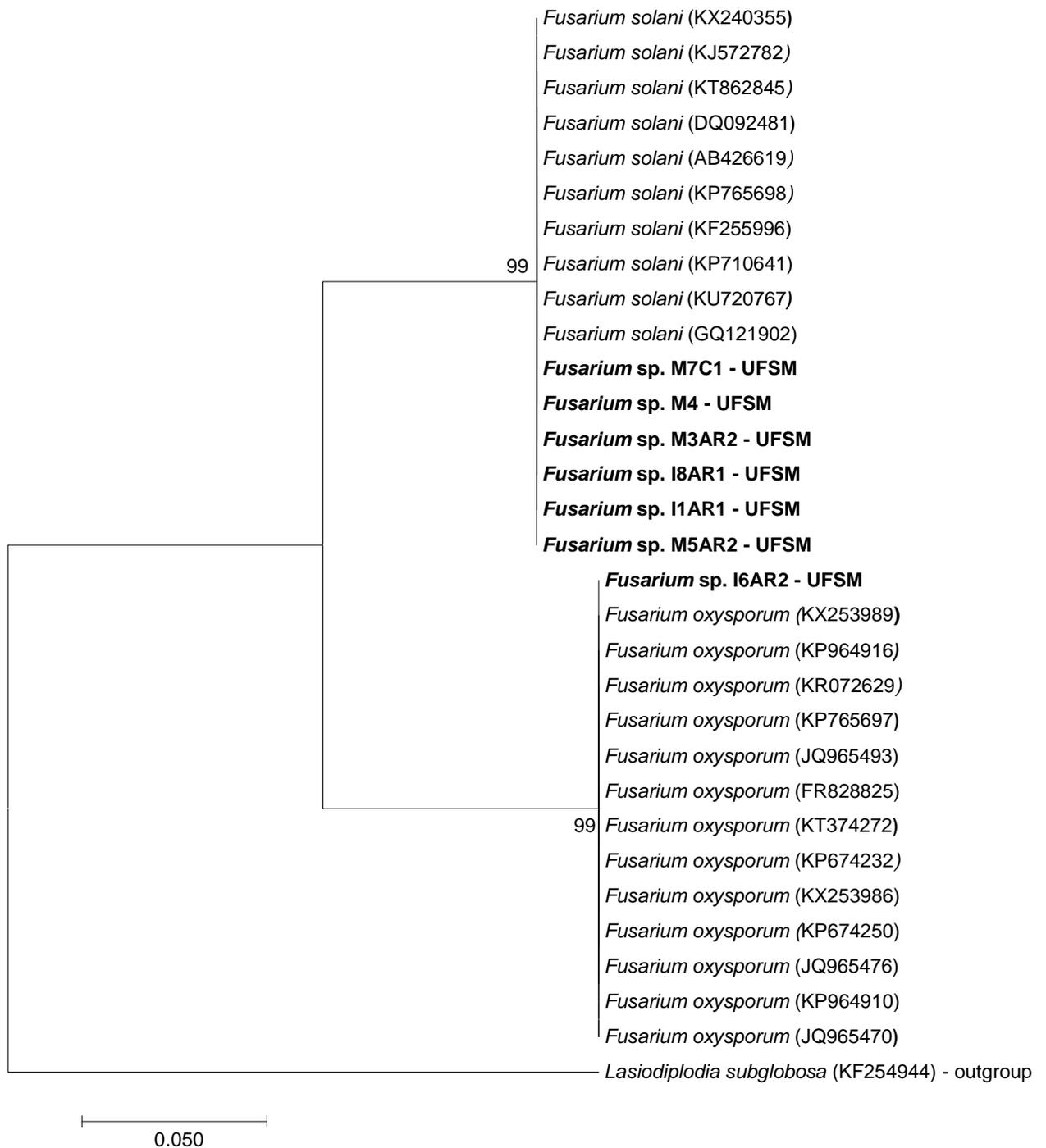


Tabela 13 - Acesso no *Genbank*, cobertura (%), similaridade (%), país de origem e referência das espécies utilizadas na construção do dendrograma filogenético da região genômica beta-tubulina

<b>Espécie</b>	<b>Acesso no GenBank</b>	<b>Cobertura (%)</b>	<b>Similaridade (%)</b>	<b>País de origem</b>	<b>Referência</b>
<i>F. oxysporum</i>	KX253989	99	100	China	Hu (2016)
<i>F. oxysporum</i>	KP964916	99	100	Reino Unido	Taylor et al. (2015)
<i>F. oxysporum</i>	KR072629	99	100	China	Wang et al. (2016)
<i>F. oxysporum</i>	KP765697	99	100	Polônia	Stefanczyk et al. (2015)
<i>F. oxysporum</i>	JQ965493	99	100	China	Zhang e Gao (2012)
<i>F. oxysporum</i>	FR828825	99	100	Itália	Polizzi et al. (2016)
<i>F. oxysporum</i>	KT374272	99	99	Irã	Ayoubi e Soleimani (2016)
<i>F. oxysporum</i>	KP674232	99	100	Polônia	Stefanczyk et al. (2016)
<i>F. oxysporum</i>	KX253986	99	99	China	Hu (2016)
<i>F. oxysporum</i>	KP674250	99	100	Polônia	Stefanczyk et al. (2016)
<i>F. oxysporum</i>	JQ965476	99	100	China	Zhang e Gao et al. (2012)
<i>F. oxysporum</i>	KP964910	99	100	Reino Unido	Taylor et al. (2015)
<i>F. oxysporum</i>	JQ965470	99	100	China	Zhang e Gao et al. (2012)
<i>F. solani</i>	KX240355	100	96	China	Tang et al. (2016)
<i>F. solani</i>	KJ572782	100	96	China	Guan e Gao (2014)
<i>F. solani</i>	KT862845	99	97	China	Cai (2016)
<i>F. solani</i>	DQ092481	99	97	Coreia do Sul	Lee e Min (2005)
<i>F. solani</i>	AB426619	99	97	Japão	Tomioka et al. (2016)
<i>F. solani</i>	KP710641	100	98	Polônia	Stefanczyk et al. (2016)
<i>F. solani</i>	KF255996	100	98	China	Wang et al. (2013)
<i>F. solani</i>	KP765698	99	97	Polônia	Stefanczyk et al. (2015)
<i>F. solani</i>	KU720767	99	98	Suíça	Bohni et al. (2016)
<i>F. solani</i>	GQ121902	97	96	Argentina	Casasnovas et al. (2016)
<i>L. subglobosa</i>	KF254944	-	-	Brasil	Machado et al. (2014)

Figura 8 - Dendrograma filogenético baseado no método *Neighbor-joining* a partir de sequências de DNA da região beta-tubulina. Os números sobre os ramos indicam a porcentagem de repetições da análise de bootstrap na qual as repetições foram observadas (1000 repetições). Uma sequência de *Lasiodiplodia subglobosa* foi utilizada como *outgroup*.



#### 4.5 PATOGENICIDADE DOS ISOLADOS DE *Fusarium* spp. EM MUDAS DE ERVA-MATE

Na Tabela 14 estão dispostas as médias de fitomassa seca da parte aérea (FSA), fitomassa seca das raízes (FSR) e o percentual de mudas mortas (% MM) após 180 dias de contato com o substrato colonizado por *Fusarium* spp.

Analisando as médias de FSA, nota-se, a formação de quatro grupos de isolados. O primeiro formado por M7C1 que diferiu estatisticamente dos demais e da testemunha, seguido pelo isolado M3AR2 que manteve a mesma característica do M7C1. O terceiro grupo constituído pelos isolados I1AR1, I8AR1, M4 e M5AR2 não diferiram entre si, mas dos demais e da testemunha e o último grupo integrado pelo isolado I6AR2, que exibiu a menor média, diferindo estatisticamente dos isolados de *F. solani* e da testemunha.

Para a variável FSR as médias seguiram a mesma tendência das observadas em FSA, com exceção do isolado M4 incorporado ao quarto grupo juntamente com o isolado I6AR2. Para o %MM o isolado M7C1 destacou-se frente aos demais com 66,67%, sucedido por M5AR2 (50,00%), M3AR2 (41,67%), I1AR1, I6AR2, (ambos com 16,67%). O menor percentual de mudas mortas (8,33%) foi revelado pelos isolados I8AR1 e M4.

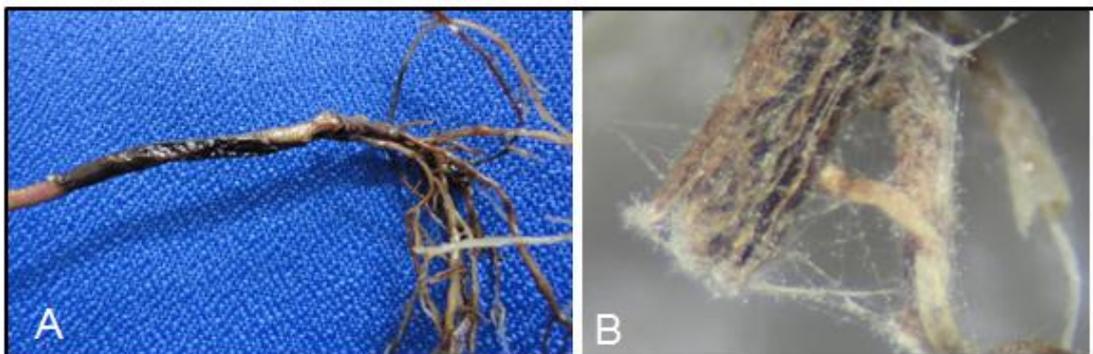
Tabela 14 - Médias de fitomassa seca da parte aérea (FSA), fitomassa seca das raízes (FSR) e o percentual de mudas mortas (% MM) de erva-mate, 180 dias após o contato com o substrato colonizado por *Fusarium* spp.

Isolado	FSA (g)	FSR (g)	% MM
I1AR1 <sup>1</sup>	6,05 c*	1,95 c	16,67 d
I6AR2 <sup>2</sup>	10,53 d	2,66 d	16,67 d
I8AR1 <sup>1</sup>	6,51 c	2,19 c	8,33 e
M3AR2 <sup>1</sup>	4,46 b	1,21 b	41,67 c
M4 <sup>1</sup>	7,35 c	2,76 d	8,33 e
M5AR2 <sup>1</sup>	5,55 c	1,81 c	50,00 b
M7C1 <sup>1</sup>	1,79 a	0,53 a	66,67 a
TEST.	19,98 e	9,54 e	0,00 f
C.V. %	11,39	8,60	18,16

Onde: (\*) = Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem pelo teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ). (1): *F. solani*; (2): *F. oxysporum*. C.V.(%): Coeficiente de variação

Durante o teste de patogenicidade foram observadas duas sintomatologias principais nas mudas de erva-mate. A primeira identificada pelo estrangulamento da muda na região do colo (Figura 9), a segunda, a qual foi classificada de acordo com os sintomas reflexos da parte aérea em decorrência da interação dos isolados com as raízes.

Figura 9 - Sintoma observado em mudas de *Ilex paraguariensis* transplantadas em substrato infestado com *Fusarium* spp.: (A): estrangulamento da muda na região do colo; (B): sinais do patógeno.

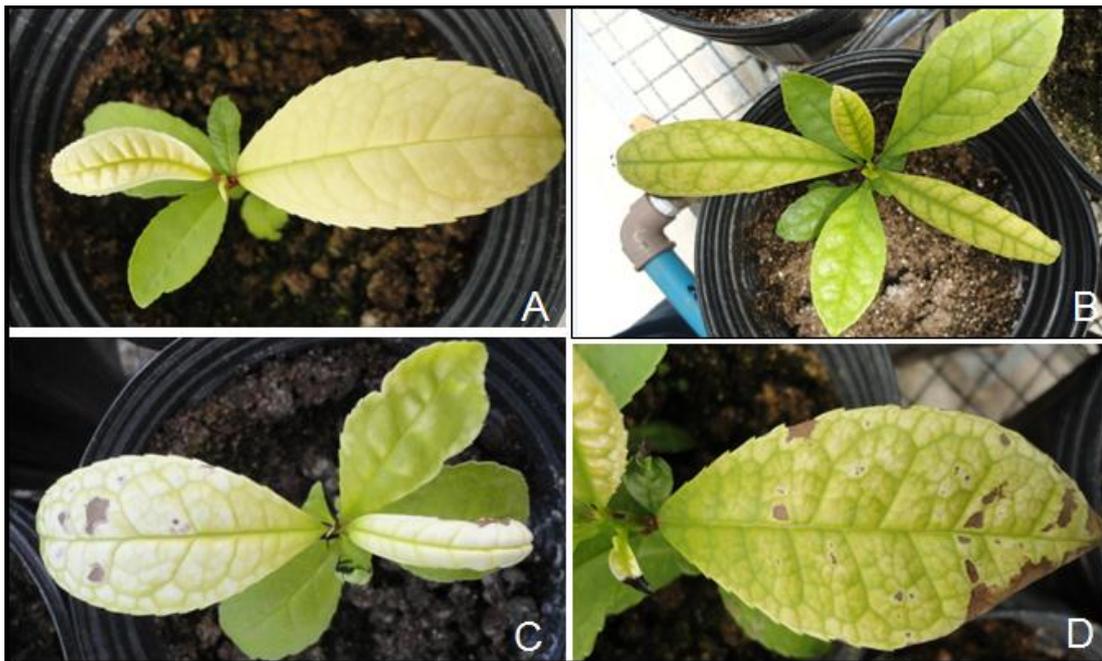


Aproximadamente 20 dias após o transplante, as mudas apresentaram os primeiros sintomas, tais como murcha temporária (durante o período mais quente do dia), queda repentina das folhas e posterior morte. O estrangulamento da muda na

região do colo foi observado nas plantas em contato com substrato infestado com os isolados de *Fusarium solani* M3AR2, M5AR2 e M7C1.

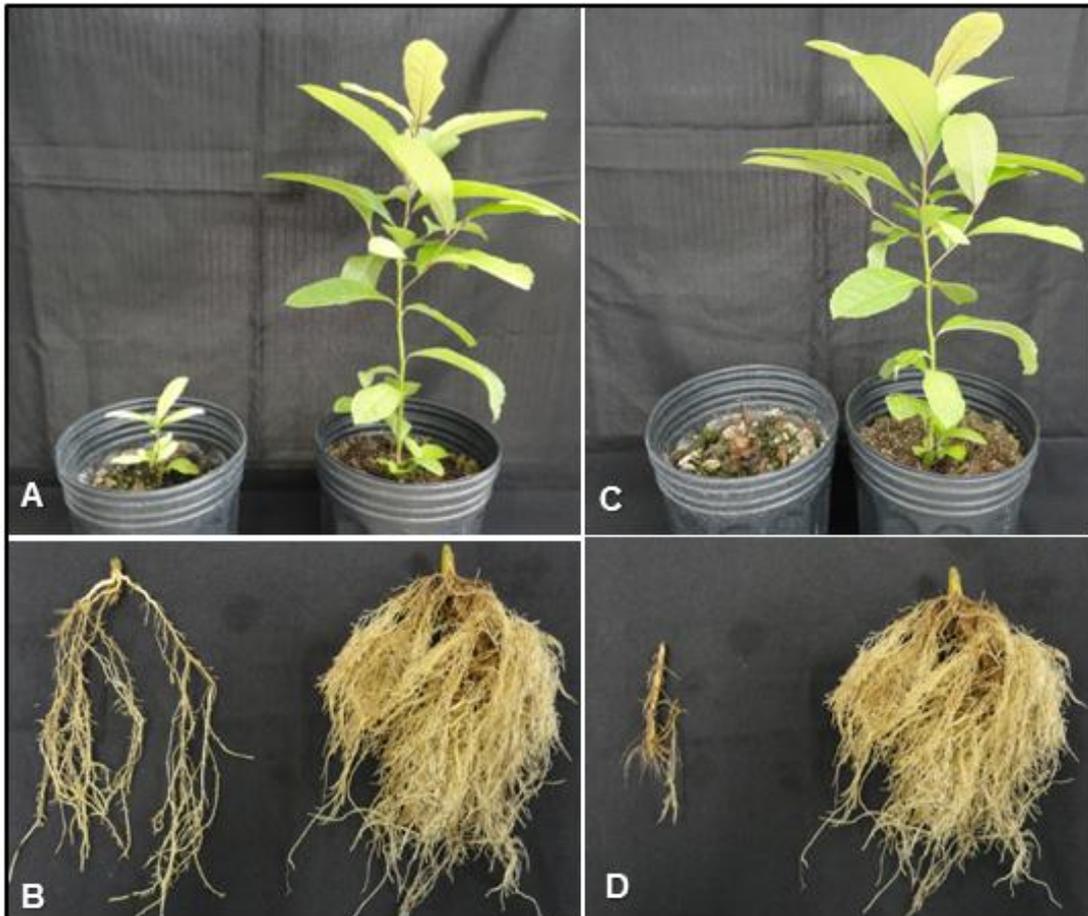
Os sintomas reflexos observados foram amarelecimento do ápice e das folhas, amarelecimento seguido de encarquilhamento, amarelecimento, acompanhado de encarquilhamento e posterior necrose das folhas e amarelecimento e necrose das folhas (Figura 10). Decorridos 30 dias do teste de patogenicidade com o surgimento dos sintomas reflexos notou-se uma estagnação do crescimento das mudas.

Figura 10 - Sintomas reflexos observados em mudas de *Ilex paraguariensis* transplantadas em substrato infestado com *Fusarium* spp.: (A) amarelecimento, (B) amarelecimento + encarquilhamento, (C) amarelecimento + encarquilhamento + necrose, (D) amarelecimento + necrose.



Em alguns casos, além da estagnação do crescimento, queda das folhas e murcha foi possível verificar a morte das plantas. Quando retiradas do substrato, as raízes mostraram-se pouco evoluídas e escuras sugerindo a íntima relação entre os sintomas reflexos e a podridão-de-raízes, ocasionada pelo ataque de *F. oxysporum* e *F. solani* presentes no substrato (Figura 11).

Figura 11 - Teste de patogenicidade em mudas de *Ilex paraguariensis* 180 dias após o contato com substrato infestado com *Fusarium* spp.: (A) e (C): Mudas à esquerda em contato com os isolados M3AR2 e M7C1, respectivamente, e à direita muda testemunha; (B) e (D): Raízes à esquerda em contato com os respectivos isolados e à direita, raiz da muda testemunha



Grigoletti Júnior e Auer (2001) relataram, pela primeira vez, a podridão de raízes em plantas adultas de erva-mate ocasionada por isolados patogênicos de *Fusarium* spp. em plantios no estado do Paraná. Segundo os autores, as árvores apresentavam sintomas como o amarelecimento e perda das folhas, estagnação do crescimento, raízes escuras, e em casos mais severos, a morte. Sintomas semelhantes foram mencionados por Poletto et al. (2006) e Poletto et al. (2007) em que os isolados patogênicos manifestaram, inicialmente, amarelecimento e queda de folhas, evoluindo para seca e morte das plantas. Ainda, segundo os autores, os sintomas são típicos em reboleiras distribuídas pela área de plantio. Poletto et al. (2015) observaram que isolados de *Fusarium* spp. patogênicos à erva-mate

produziram indícios de manchas necróticas no sistema radicular e escurecimento nas pontas das raízes.

Ressaltando os resultados do presente estudo, Lazarotto et al. (2014) obtiveram resultados equivalentes, com sintomas reflexos semelhantes nas plantas analisadas. Segundo os autores, isolados de *Fusarium* spp. patogênicos a *Carya illinoensis* desencadearam sintomas como estrangulamento de colo, necrose foliar, murcha da parte aérea e morte de plantas, consolidando a sintomatologia típica da podridão-de-raízes. Silva et al. (2011) exemplifica que a colonização das raízes de pimenta-do-reino (*Piper nigrum*) por *Fusarium solani* f. sp. *piperis* reflete-se na parte aérea, as folhas ficam amareladas e flácidas, ocasionando a queda prematura e à medida que a doença evolui, ocorre a morte da planta.

#### 4.6 GRUPOS DE COMPATIBILIDADE VEGETATIVA EM ISOLADOS PATOGÊNICOS DE *Fusarium* spp.

##### 4.6.1 Obtenção de mutantes *nit*

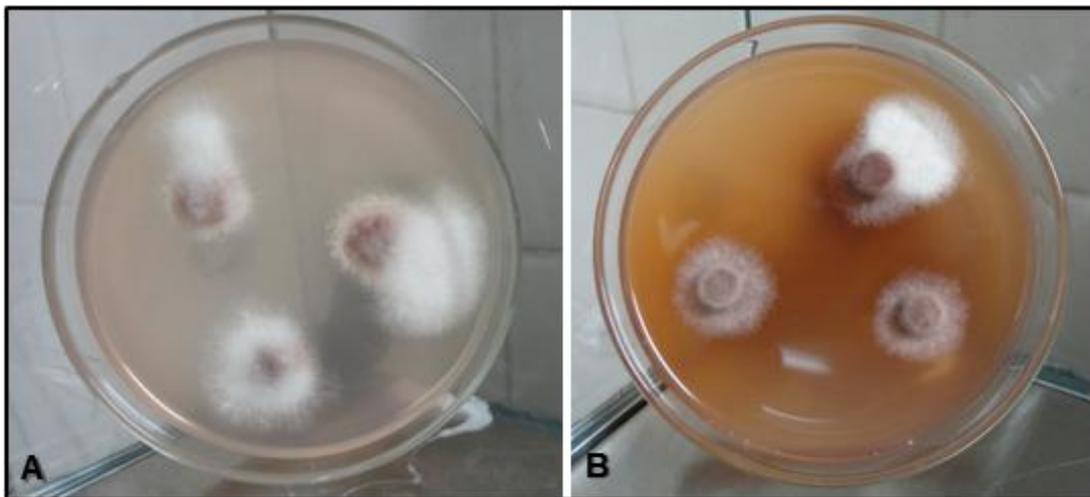
Dos sete isolados patogênicos de *Fusarium* spp. apenas I1AR1 e M7C1 não formaram setores resistentes quando cultivados em meio mínimo (MM) suplementado com agente mutagênico clorato de potássio (MMC). Os demais isolados apresentaram setores resistentes, sendo então classificados como mutantes *nit* (Figura 12). O isolado de *F. oxysporum* (I6AR2) foi o único a formar mais de um setor por bloco, porém, não necessariamente, o mais expressivo em número de setores, posto que para a análise foi utilizado um setor por bloco.

Os primeiros sinais de micélio denso (setores) foram observados 12 dias após a repicagem em MMC. Contudo, a média geral entre os isolados foi verificada aos 16 dias de incubação. Para Saabale e Dubey (2014) os primeiros sinais de setores foram verificados entre a segunda e a terceira semana de incubação. Em seus estudos os autores anteriormente citados analisaram 499 setores resistentes a  $KClO_3$  provenientes de 39 isolados de *F. oxysporum* f. sp. *ciceri*, agente causal da murcha-do-grão-de-bico (*Cicer arietinum*), coletados em 13 regiões da Índia. Kiproo et al. (2002) relata resultados semelhantes para o surgimento de setores entre a primeira e a segunda semana de cultivo em MMC de *F. udum* provenientes de feijão-guandu (*Cajanus cajan*) em plantios no Kênia, Índia e Malawi.

Do total de 38 setores resistentes a clorato de potássio identificados, o maior número foi obtido na concentração de 1,5%. Entretanto, a concentração de 2,5% foi responsável pela formação de 20% dos mesmos. Já a de 2,0% não contribuiu para mutação dos isolados. Doze setores apontaram crescimento robusto em meio mínimo (MM) e foram descartados.

Segundo Altinok et al. (2013) a concentração de 2,0% proporcionou o maior número de mutantes gerados por *F. oxysporum* f. sp. *melongenae* isolados de berinjela (*Solanum melongena*). Para Alcázar et al. (2006) a adição de 30g/L de clorato de potássio no MM proporcionou a melhor composição dos setores de isolados de *F. oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* provenientes de plantios de pepino (*Cucumis sativus* L.) na província de Almería na Espanha. Dias et al. (2014) logrou êxito na restauração de setores utilizando a concentração de 50g/L. De acordo com os autores, a frequência média foi de 0,50 a 1,40 setores/isolado de *F. oxysporum* f. sp. *cubense* quando cultivados em MMC.

Figura 12 - Produção de setores resistentes a  $KClO_3$  dos isolados de *Fusarium solani*. (A): M3AR2; (B): M5AR2



#### 4.6.2 Classificação fenotípica dos mutantes *nit*

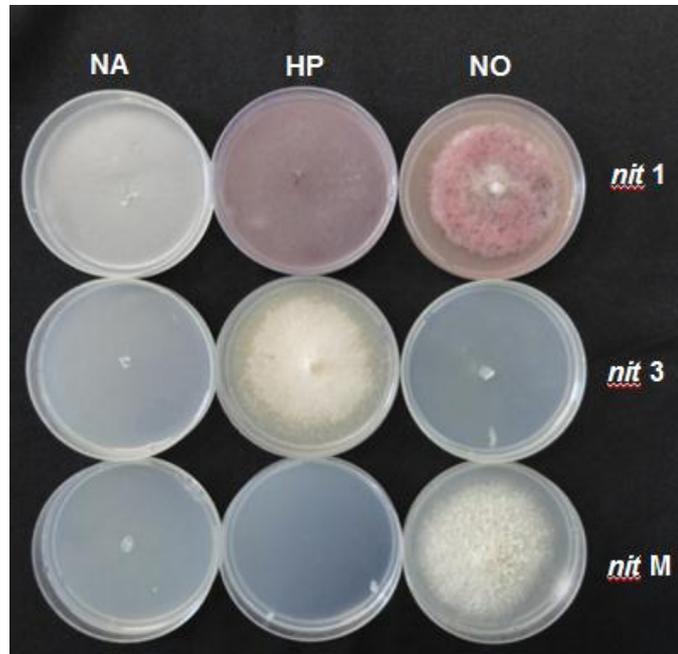
Após o crescimento em MM contendo nitrato (NA), nitrito (NO) e hipoxantina (HP) como fontes de nitrogênio (Figura 13), foram recuperados 10 mutantes *nit* 1 (38,46%), 10 *nit* M (38,46%) e 6 mutantes *nit* 3 (23,08%) (Tabela 15).

Krnjaja et al. (2007) evidenciaram o predomínio do *nit* 1 (58,79%), seguido do *nit* M (5,77%) durante a classificação fenotípica os mutantes de *F. verticillioides* oriundos de milho (*Zea mays*). Ainda, segundo estes autores, não foi possível detectar a presença do *nit* 3. Segundo Ilić et al. (2013), o fenótipo *nit* 3 (43%) prevaleceu entre os 230 mutantes recuperados de 16 isolados de *F. oxysporum* coletados em quatro regiões da Croácia. Alvarado et al. (2012), consolidaram a hegemonia do *nit* 1 (36,91%) dos 149 *nit* restaurados de 15 isolados de *F. mexicanum*, causador da malformação da mangueira (*Manguiфера indica*), em Jalisco no México. Segundo os autores supracitados, os percentuais dos fenótipos *nit* M e *nit* 3 foram de 28,18 e 19,46%, respectivamente, divergindo dos resultados do presente estudo, em que o *nit* 3 ficou com o menor percentual entre os fenótipos identificados.

Tabela 15 - Classificação fenotípica dos mutantes *nit*'s obtidos de isolados de *Fusarium* spp. patogênicos a erva-mate

Isolado	Fenótipo dos mutantes <i>nit</i>			Nº. total de mutantes <i>nit</i>
	<i>nit</i> 1	<i>nit</i> 3	<i>nit</i> M	
I6AR2	1	-	4	5
I8AR1	2	1	2	5
M3AR2	3	-	1	4
M4	1	3	-	4
M5AR2	3	2	3	8
Nº. total de fenótipos	10	6	10	26

Figura 13 - Classificação fenotípica dos mutantes *nit* obtidos de isolado patogênicos de *Fusarium* spp. cultivados em meio mínimo suplementado com diferentes fontes de nitrogênio: nitrato de sódio (NA), hipoxantina (HP) e nitrito de sódio (NO).



#### 4.6.3 Grupos de compatibilidade vegetativa (VCG)

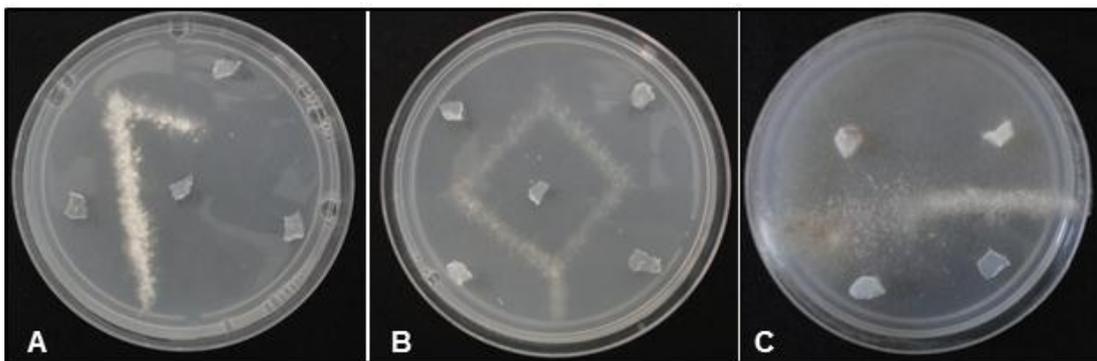
No teste de autocompatibilidade os mutantes *nit* revelaram-se compatíveis em todos isolados, ou seja, formaram heterocário estável (Figura 14). Segundo Leslie (1993), os mutantes que não formam heterocário estável são denominados como autoincompatíveis e não podem ser utilizados para a determinação de VCG's.

De acordo com os resultados obtidos no teste complementação, os diferentes isolados foram alocados em cinco VCG's distintos (Figura 14). Cada VCG foi composto por um isolado. A distribuição dos isolados em diferentes VCG's sugere a existência de variabilidade genética, principalmente entre os isolados de *F. solani* como apontado no sequenciamento das regiões ITS e do TEF-1 $\alpha$ . Reforçando os resultados do presente estudo, Jusoh et al. (2013) obteve 12 VCG's compostos por apenas um isolado, a partir do pareamento de 12 isolados de *F. solani* (5 patogênicos e 7 não patogênicos) obtidos de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) em cinco regiões produtoras na costa leste da Malásia. Os autores anteriormente citados atribuíram à reprodução sexuada ao grau de diversidade genética dos isolados.

Resultados semelhantes foram relatos por Crespo (2010) onde isolados da mesma região foram classificados em VCG's diferentes, suportando indícios de variabilidade local. Ainda segundo a autora, a presença de isolados de diferentes regiões em um mesmo VCG indicaria a disseminação do patógeno de uma região para outra. De acordo com Elena e Pappas (2002) dos 23 isolados de *F. oxysporium* f. sp. *phaseoli* obtidos em diferentes regiões da Grécia, seis foram classificados como VCG's únicos. Ainda segundo estes autores, a presença de 15 isolados no mesmo VCG pode estar relacionada com a homogeneidade genética presente na população de *F. oxysporium* f.sp. *phaseoli* estudada. Puhalla (1985) afirma que isolados pertencentes ao mesmo VCG são geneticamente similares o que reforça a hipótese da existência de variabilidade genotípica entre os isolados utilizados no presente estudo.

Entretanto, o reduzido número de isolados incluídos neste estudo restringe a ampla conclusão sobre a influência da formação de VCG na diversidade genética dos isolados obtidos de erva-mate. Sendo assim, os resultados revelados neste estudo ressaltam a necessidade de estudos adicionais sobre o número e a distribuição de VCG's presentes no patossistema *Fusarium* x erva-mate.

Figura 14 - Teste de complementação em meio mínimo (MM). (A) e (B): autocompatibilidade dos isolados M4 e I8AR1, respectivamente; (C): pareamento entre os isolados I6AR2 e I8AR1



#### 4.7 PRODUÇÃO DE ENZIMAS EXTRACELULARES IN VITRO POR ISOLADOS PATOGÊNICOS DE *Fusarium* spp.

A produção da enzima catalase pelos isolados patogênicos de *Fusarium* spp. segue a mesma tendência do percentual de mudas mortas revelado pelo teste de patogenicidade. Assim, a intensidade na formação de bolhas de oxigênio foi moderada nos isolados M7C1, M5AR2, M3AR2 e fraca nos demais. (Tabela 16). Bueno et al. (2009) relataram que a catalase foi produzida de maneira fraca e igual por nove isolados de *F. solani* obtidos de maracujazeiro amarelo. De acordo com Elias et al. (2015), isolados patogênicos de *Rhizoctonia* spp., *Cylindrocladium* spp., *Sclerotium* spp., *Ceratocystis* spp., *Sclerotinia* spp. e *Verticillium* spp. produziram catalase de maneira fraca, entretanto, o destaque foi para o gênero *Fusarium*, superando o desempenho dos demais. Segundo Hansberg et al. (2012) em ascomicetos, a catalase possui relevância no processo de crescimento e diferenciação celular, além de atuar na germinação dos esporos o que corrobora com os resultados do presente estudo onde os maiores percentuais de mudas mortas (Tabela 14) foram observados pelos isolados que mais produziram a catalase.

As testemunhas de todas as enzimas testadas diferiram estatisticamente dos isolados. Ademais, não foi possível evidenciar a atividade enzimática nas testemunhas, motivo, pelo qual, foi atribuída a média zero ao índice enzimático.

Para a produção da enzima lacase apenas os isolados I1AR1 e M7C1 não diferiram estatisticamente entre si, ao contrário dos outros isolados (Tabela 16). Nota-se que o isolado I6AR2 apresentou o maior crescimento micelial (77,62 mm) embora tenha exibido as maiores médias de fitomassa seca de parte aérea e raízes. Neste caso, fica evidente que as maiores médias de crescimento micelial foram verificadas nos isolados que apresentaram os menores índices de estagnação do crescimento das mudas (Tabela 14). Apesar da relação entre crescimento micelial e o percentual de mudas mortas ser inversamente proporcional, o desenvolvimento do patógeno em meio específico sugere a participação da lacase no processo de patogênese. Para Leonowicz et al. (2001) a atividade da lacase está diretamente relacionada com a degradação da lignina, um dos compostos aromáticos responsáveis pela resistência natural das plantas. Durante o ataque de *Botrytis cinerea* a frutos de pepino, a secreção da lacase, além de reduzir o processo de lignificação, protegeu o patógeno da ação de metabólitos tóxicos presentes no hospedeiro (CAÑERO e RONCERO, 2007; SCHOUTEN et al., 2002).

Os maiores valores do índice enzimático (I.E) da celulase (Tabela 16) foram observados nos isolados M7C1 e I1AR1, não diferindo estatisticamente entre si. Já o isolado I8AR1 diferiu dos restantes. Os demais isolados não diferiram entre si. Segundo Ramos (2012) *F. verticillioides* apresentou o maior índice enzimático quando comparado com outros cinco gêneros fúngicos (*Aspergillus*, *Rhizopus*, *Paecilomyces*, *Thielavia*, *Thielaviopsis*) utilizando bagaço de cana-de-açúcar como substrato. Braga et al. (2009) relataram que 92% dos isolados de *Fusarium* sp. estudados produziram a enzima celulase. Já Bueno et al. (2009) destacaram que todos os isolados patogênicos de *F. solani* degradaram celulose em meio de cultura. Porém, Stamford et al. (1998), não evidenciaram a produção da enzima por isolados de *Fusarium* endofíticos a jacatupé (*Pachyrhizus erosus*). Segundo Poloni (2008) a celulase desempenha um papel relevante na patogênese, posto que a celulose é a principal constituinte da parede celular das plantas. Em conformidade com a autora acima, no presente estudo o isolado que foi superior em mortalidade das mudas (M7C1) (Tabela 14), foi também, o maior produtor desta enzima.

Tabela 16 - Produção de enzimas extracelulares de *Fusarium* spp. isolados de plantas sintomáticas de *Ilex paraguariensis*, em meios de cultura específicos

Isolados	Enzimas extracelulares								
	Catalase <sup>1</sup>	Lacase <sup>2</sup>	Celulase <sup>3</sup>	Caseinase <sup>3</sup>	Amilase <sup>3</sup>	Protease <sup>3</sup>	Lipase <sup>3</sup>	Poligalacturonase <sup>3</sup>	Pectato liase <sup>3</sup>
I1AR1 <sup>4</sup>	+	62,39 c*	1,204 a	1,178 c	1,058 b	1,180 a	1,136 b	1,078 c	1,020 b
I6AR2 <sup>5</sup>	+	77,62 a	1,130 c	1,074 d	1,214 b	1,156 a	1,116 b	1,052 d	1,012 b
I8AR1 <sup>4</sup>	+	47,99 d	1,164 b	1,134 c	1,040 b	1,072 b	1,082 b	1,158 a	1,020 b
M3AR2 <sup>4</sup>	++	38,12 e	1,110 c	1,148 c	1,070 b	1,100 b	1,098 b	1,042 d	1,038 b
M4 <sup>4</sup>	+	68,88 b	1,126 c	1,228 b	1,062 b	1,126 a	1,164 b	1,106 b	1,032 b
M5AR2 <sup>4</sup>	++	29,15 f	1,102 c	1,252 b	1,078 b	1,050 b	1,222 a	1,126 b	1,066 a
M7C1 <sup>4</sup>	++	59,21 c	1,236 a	1,342 a	1,856 a	1,158 a	1,282 a	1,092 c	1,074 a
TEST	-	0,00 g	0,00 d	0,00 e	0,00 c	0,00 c	0,00 c	0,00 e	0,00 c
C.V. (%)	-	10,94	2,77	5,34	20,79	4,53	6,06	2,28	1,77

Onde: (1): avaliação simbólica: (+) = fraca; (++) = moderada; (+++)= intensa; (2): crescimento micelial (mm); (3): Índice Enzimático (I.E) = diâmetro do halo formado (mm)/diâmetro da colônia (mm); (4) = *F. solani*; (5) = *F. oxysporum*; TEST: testemunha; (\*) = Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem pelo teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ); C.V.(%): Coeficiente de variação

O isolado I6AR2 viabilizou a menor produção de caseinase, diferindo estatisticamente dos demais. A produção intermediária da enzima originou a formação de dois grupos (I1AR1, I8AR1, M3AR2 e M4, M5AR2) que não diferiram

entre si dentro de cada grupo. O isolado M7C1 garantiu a maior média do I.E, diferindo dos demais (Tabela 16) indicando a participação da caseínase na patogenicidade do isolado de *F. solani* em mudas de erva-mate. Afirmando os resultados do presente estudo, Dória (2012) descreve diferenças significativas nos índices enzimáticos de caseinase mensurados em isolados de *Fusarium* spp. obtidos de seringueira (*Hevea brasiliensis*).

Houve diferença significativa entre os índices enzimáticos de amilase. O maior I.E foi proporcionado pelo isolado M7C1, portanto, diferindo estatisticamente dos demais isolados que apresentaram índices medianos, e não diferindo entre si (Tabela 16). Dória (2012) cita a produção de amilase por todos os isolados de *Fusarium* spp. utilizados em sua pesquisa. Conforme Machi et al. (2006) isolados de *Alternaria solani* classificados como bons sintetizadores de amilase, foram descritos como fracos produtores de pectinases. Pandey et al. (2000) e Sun et al. (2010) alegam que a degradação de amido do tecido do hospedeiro pode contribuir para os processos de crescimento e esporulação de fungos fitopatogênicos, o que reforça os resultados do presente estudo, já que o isolado que apresentou o maior I.E. foi também o responsável pelo maior percentual de mudas mortas (Tabela 14).

Quanto à decomposição de gelatina em meio específico para a detecção da protease (Tabela 16) o isolado I6AR2 surpreendeu positivamente, exibindo a segunda maior média do I.E, não diferindo estatisticamente dos isolado M7C1 e I1AR1, respectivamente, primeira e terceira maiores médias. Os isolados restantes não diferiram entre si. Adejuwon e Olutiola (2005) relataram a atividade de protease em extrato de frutos de tomates (*Solanum lycopersicum*) degradados pela infecção de *F. oxysporum*. Singh e Saxena (1989) vincularam a produção de proteases e outras exoenzimas à murcha da couve-flor (*Brassica oleracea*) por *F. solani*. No presente estudo, o isolado I6AR2 figurou médias satisfatórias do I.E o que geralmente afastaria a hipótese da ação da protease na patogenicidade de *F. oxysporum* em mudas de erva-mate. Em contrapartida, o destaque do isolado M7C1 indica o possível vínculo da protease com a patogênese de *F. solani* em mudas de erva-mate.

Para a atividade da enzima lipase o destaque foi novamente para o isolado M7C1, o qual não diferiu estatisticamente do isolado M5AR2 (Tabela 16). Os isolados remanescentes não diferiram entre si. Voigt et al. (2005) caracterizaram o gene FGL1, responsável pela codificação de algumas lipases em *F. graminearum*

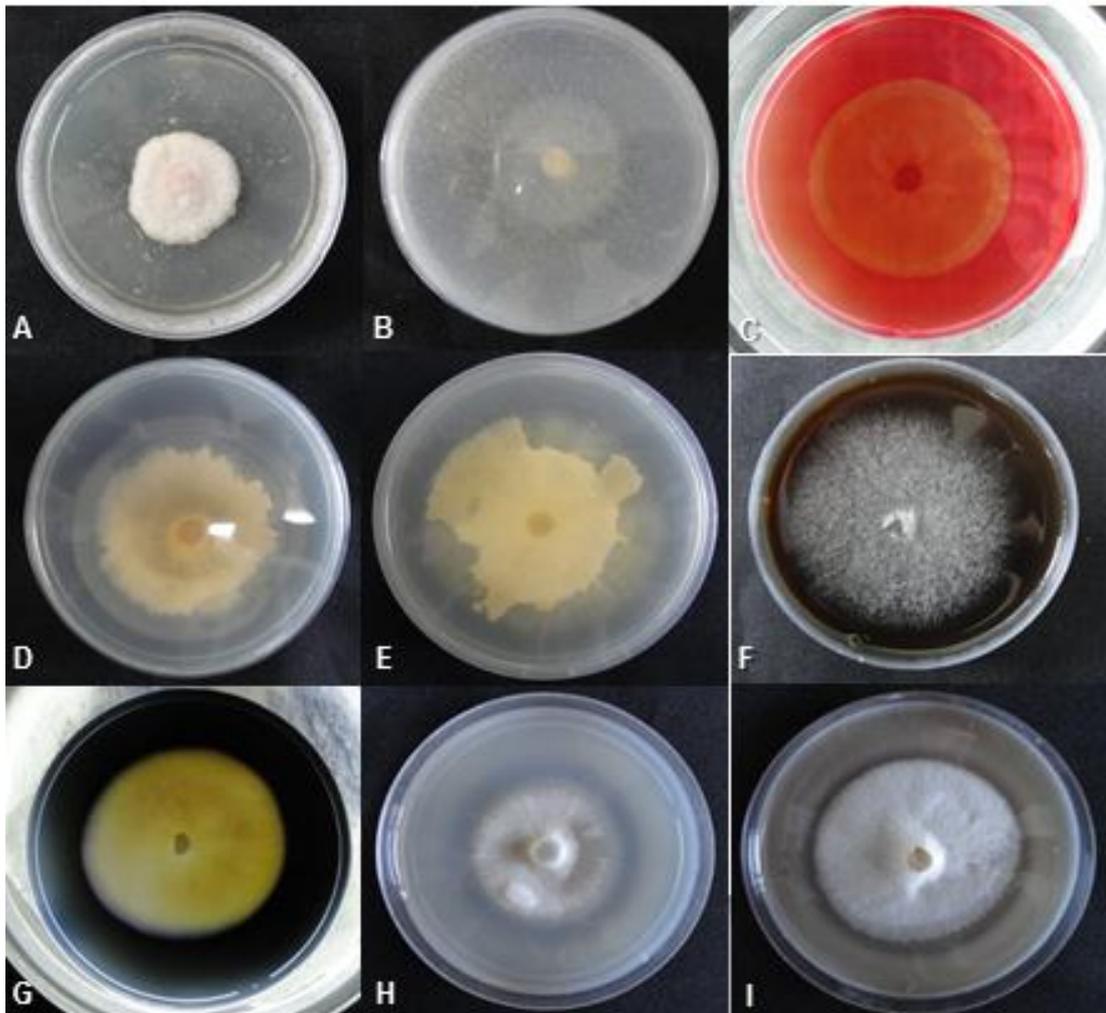
associado a cereais. Para os autores, há indícios suficientes para comprovar a ligação do gene com a virulência do patógeno. O melhor desempenho na degradação do substrato rico em lipídios, neste caso, o “Tween-20” preconiza a eficiência do arsenal enzimático dos isolados M7C1 e M5AR2, responsáveis pela morte de 66,67 e 50,00% das mudas de erva-mate, respectivamente (Tabela 14). Avivando os resultados do presente trabalho, Di Pietro et al. (2009), Rogers et al. (1994) e Walton (1994), enfatizaram que a produção de enzimas lipolíticas permitem aos fungos patogênicos sua penetração no tecido do hospedeiro através da decomposição das ceras, cutículas e da parede celular auxiliando na patogênese e na disseminação.

Houve divergência na atividade pectinolítica medida pelas enzimas poligalacturonase e pectato liase. Para poligalacturonase, pela primeira vez, o isolado I8AR1, figurou a maior relação entre o halo de degradação e o crescimento micelial diferindo das demais médias. Os isolados restantes foram dispostos em duplas formadas pelos isolados M5AR2, M4; M7C1, I1AR1 e M3AR2, I6AR2, não diferindo estatisticamente dentro dos pares. Para pectato liase os maiores índices enzimáticos foram observados em M7C1 e M5AR2, respectivamente, não diferindo entre si. Seguem em ordem decrescente M3AR2, M4, assim como I1AR1 e I8AR1. O menor desempenho no I.E ficou com o isolado I6AR2 (Tabela 16).

Özer (2009) suporta que em *Alternaria alternata*, a produção de poligalacturonase foi mais acentuada no isolado que garantiu a maior capacidade de infectar grãos de trigo. Em isolados de *A. solani* obtidos de solanáceas, Marchi et al. (2006) narram que bons produtores de pectinases desenvolveram lesões maiores em plantas de tomateiro. De acordo com Jorge et al. (2006) a produção de enzimas de degradação da parede celular (CWDE), as quais, estão inseridas a poligalacturonase (PG) e a pectato-liase (PL) está fortemente ligada a podridão-de-raízes do grão-de-bico (*Cicer arietinum*) causado por *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* (Foc). Os autores, acima nomeados, testaram os isolados Foc-0 (ligeiramente virulento, associado a sintomas de amarelecimento) e Foc-5 (altamente virulento associado a sintomas de murcha), e concluíram que o maior índice de PG associava-se à Foc-0, assim como, o maior valor de PL estava relacionado com o isolado Foc-5. Os resultados obtidos no presente estudo, vão ao encontro das constatações supramencionadas, visto que os sintomas de murcha e, conseqüentemente, os altos percentuais de mudas mortas (%MM) foram causados

pelos isolados M7C1 e M5AR2 (Tabela 14), que estão relacionados com as maiores médias dos índices enzimáticos de pectato liase.

Figura 15 - Arsenal enzimático do isolado de *Fusarium solani* M7C1. (A): catalase; (B): caseinase; (C): celulase; (D): lipase; (E): protease; (F): lacase; (G): Amilase; (H): Poligalacturonase; (I): Pectato liase



## 5 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos no presente trabalho, pode se chegar as seguintes conclusões:

- O carácter morfológico comprimento de macroconídios e a esporulação são eficientes na diferenciação dos isolados de *Fusarium oxysporum* e *F. solani* em erva-mate.
- As regiões ITS, beta-tubulina e fator de alongação 1 - alpha são eficientes e dão maior confiabilidade na identificação das espécies de *Fusarium* spp., quando utilizadas de maneira conjunta.
- Há diferença entre os isolados de *F. solani* e *F. oxysporum* na produção de resistentes a  $KClO_3$ .
- A técnica para obtenção de mutantes *nit* é adequada para a classificação dos fenótipos *nit* 1, *nit* M e *nit* 3, essenciais nos testes de VCG para espécies de *Fusarium* da erva-mate.
- Isolados patogênicos de *F. oxysporum* e *F. solani* coletados no Rio Grande do Sul apresentaram diversidade genética. Dos utilizados no estudo foram obtidos cinco VCG's.
- Os isolados de *Fusarium* spp. patogênicos a erva-mate produzem as enzimas extracelulares: catalase, lacase, celulase, caseinase, amilase, protease, lipase, poligalacturonase e pectato liase.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABD-ELSALAM, K. A. et al. PCR identification of *Fusarium* genus based on nuclear ribosomal-DNA sequence data. **African Journal of Biotechnology**. [S.l.], v. 2, n. 4, p. 82-85, 2003.
- ADEJUWON, A. O.; OLUTIOLA, P. O. Protease in tomato fruits infected by *Fusarium oxysporum*. **Plant Pathology Journal**. Faisalabad, v. 4, n. 1, p.43-45, 2005.
- ALCÁZAR, M. G. et al. Grupos de compatibilidad vegetativa de *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* em la Provincia de Almería. **Boletín de Sanidad Vegetal Plagas**. [S.l.], v. 32, p. 535-543, 2006.
- ALFENAS, A. C. et al. Isolamento de fungos fitopatogênicos. In: ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. (Eds.). **Métodos em fitopatologia**. Editora: UFV, Viçosa, 2007. p. 53-91.
- ALMEIDA, L. C. C. et al. Efeito de remoções de partes doentes do cacauero associadas a intervalos de aplicação de óxido cuproso no controle da vassoura-de-bruxa na Bahia. **Agrotropica**, v. 10, n. 2, p. 95-102, 1998.
- ALTINOK, H. H. et al. Vegetative Compatibility, Pathogenicity and Virulence Diversity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melongenae* Recovered from Eggplant. **Journal Phytopathology**, Berlin, v. 161, p. 651-660, 2013.
- ALVARADO, G. R. et al. Caracterización de Grupos de Compatibilidad Vegetativa de *Fusarium mexicanum* Causante de la Malformación del Mango en Jalisco, México. **Revista Mexicana de Fitopatología**. Texcoco, v. 30, n. 2, p. 128-140, 2012.
- ANUÁRIO BRASILEIRO DA ERVA MATE. **Gazeta Grupo de Comunicações**, Santa Cruz do Sul, RS. 2000 64p.
- ATLAS, R. M. Bioremediation of petroleum pollutants. **International Bioremediation & Biodegradation**. p. 317-327, 1995.
- AUER, C. G. et al. Atividades degradativas de celulase e de fenóis por fungos isolados de acículas de *Pinus taeda*. **Revista Floresta**, Curitiba, v. 44, n. 2, p. 179 - 184, 2014.
- AZEVEDO, D. M. Q. **Patogenicidade de *Fusarium* spp. a grão-de-bico e controle biológico com *Trichoderma* sp.** 2015. 119f. Dissertação. (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Federal de Minas Gerais, Montes Claros, 2015.
- AZEVEDO, J. L. et al. Microrganismos endofíticos e seu papel em plantas tropicais. In: SERAFINI, L. A. et al. **Biotecnologia: avanços na agricultura e na agroindústria**. Caxias do Sul: EDUSC, cap. 8, p. 235-268, 2002.
- BARROS, N. L. **Caracterização morfológica e molecular de isolados de *Fusarium* associados a grãos de milho.** 2013. 40f. Dissertação. (Mestrado em Produção Agrícola) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Garanhuns, 2013.

BASTOS, C. N. Produção de enzimas extracelulares por *Crinipellis pernicioso*. **Fitopatologia Brasileira**. v. 30, n. 3, p. 286-288, 2005.

BENYON, F. H. L. et al. Molecular genetic investigations and reclassification of *Fusarium* species in sections *Fusarium* and *Roseum*. **Mycological Research**, Cambridge, v. 104, n. 10, p. 1164-1174, 2000.

BERGER, G. **Biomassa em plantios de erva mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.), no município de Nova Prata, RS**. 2006. 94f. Dissertação. (Mestrado em Engenharia Florestal). Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2006.

BOCCHESI, C. A. C. et al. Virulência, atividade enzimática e padrões de isoesterases de isolados de *Pyrenophora avenae*, agente etiológico da mancha de grãos e folhas de aveia. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 1, p. 11-16, 2003.

BOGALE, M. et al. Diverse *Fusarium solani* isolates colonise agricultural environments in Ethiopia. **Eur. J. Plant. Pathol.** [S.l.], v. 124, p. 369-378, 2009.

BRITZ, H. et al. Two new species of *Fusarium* section *Liseola* associated with mango malformation. **Mycologia**, Lawrence, v. 94, n. 4, p. 722-730, 2002.

BUENO, C. J. et al. Produção de enzimas extracelulares por *Fusarium solani* de maracujazeiro amarelo. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 34, n. 5, p. 343-346, 2009.

BURGESS, T. et al. Variation in *Pisolithus* and basidiospore morphology, culture characteristics and analysis of polypeptides using 1D SDS-PAGE. **Mycological Research**, Edinburg, v. 99, n. 1, p. 1-13, jan. 1995.

CAMERA, J. N. et al. Desenvolvimento de *Passalora sojina* em diferentes meios de cultura e regimes luminosos. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 35, n. 4, p. 1793-1800, 2014.

CAÑERO, D. C.; RONCERO, M. I. G. Functional Analyses of Laccase Genes from *Fusarium oxysporum*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 98, n. 5, p. 509-518, 2007.

CARNIELLI, L. **Detecção molecular de *Fusarium guttiforme* agente etiológico da fusariose do abacaxizeiro**. 2014. 51f. Dissertação. (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2014.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies arbóreas brasileiras**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica; Colombo, PR: Embrapa Florestas, 2003. 1039p.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira**. Colombo: Embrapa - CNPF; Brasília: Embrapa-SPI, 1994. 640p.

CAVALCANTI, L. S. et al. Utilização de dois métodos de inoculação na avaliação de resistência de cultivares e linhagens de feijoeiro a *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 32, p. 1-5, 2002.

- CHANDRA, N. S. et al. Prospects of molecular markers in *Fusarium* species diversity. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** v. 90, p. 1625-1639, 2011.
- CHEN, C. A. et al. Secondary structure and phylogenetic utility of the Ribosomal Internal Transcribed Spacer 2 (ITS2) in Scleractinian corals. **Zoological Studies.** v. 43, p. 759-771, 2004.
- CONCEIÇÃO, D. M. et al. Fungos filamentosos isolados do rio Atibaia, SP e refinaria de petróleo biodegradadores de compostos fenólicos. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v. 72, n. 1, p. 99-106, 2005.
- CORRELL, J. C.; KLITTICH, C. J. R.; LESLIE, J. F. Nitrate nonutilizing mutants of *Fusarium oxysporum* and their use in vegetative compatibility tests. **Phytopathology**, St. Paul, v. 77, n. 12, p. 1640-1646, Dec. 1987.
- CORRELL, J. C.; PUHALLA, J. E.; SCHNEIDER, R. W. Identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *apii* on the basis of colony size, virulence, and vegetative compatibility. **Phytopathology**, St. Paul, v. 76, n. 4, p. 396-400, Apr. 1986.
- CRESPO, N. C. **Diversidade genética de isolados do agente etiológico da fusariose do abacaxizeiro no Brasil.** 2010. 45f. Dissertação. (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.
- CRUZ, C. D. **Programa Genes: Diversidade Genética.** Viçosa: Ed. UFV. 2008. 278p
- DA CROCE, D. M.; FLOSS, P. A. **Cultura da erva-mate no estado de Santa Catarina.** Epagri, Boletim Técnico, n. 100, Florianópolis, SC, 1999. 81p.
- DATTA, S. et al. Polymorphism in the internal transcribed spacer (ITS) region of the ribosomal DNA among different *Fusarium* species. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, [S.l.], v. 44, n. 6, p. 558-566, 2011.
- DEBETS, A. J. M. Paraxesuality in fungi: mechanisms and significance in wild population In: COUTEAUDIER, P. B. Y; CLARKSON, J. **Molecular Variability of Fungal pathogens.** New York: CAB International, v. 3, p. 41-53, 1998.
- DHINGRA, O. D.; SINCLAIR, J. B. **Basic Plant Pathology Methods.** Boca Raton: Lewis Publishers, 1995.
- DI PIETRO, A. et al. From tools of survival to weapons of destruction: The role of cell wall-degrading enzymes in plant infection. In: **Plant Relationships**, 2nd ed. Springer-Verlag, Berlin, 2009.
- DIANESE, J. C. **Patologia vegetal: agressão e defesa em sistemas planta-patógeno.** Brasília, Universidade de Brasília, 139 p., 1990.
- DIAS, J. S. A. et al. Caracterização de isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cupense* (Foc) quanto à compatibilidade vegetativa e à patogenicidade em cultivares de bananeira diferenciadoras de raças no Brasil. **Biota Amazônia.** Macapá, v. 4, n. 4, p. 60-65, 2014.

DÓRIA, K. M. A. B. V. S. **Caracterização morfológica, cultural, molecular e enzimática de isolados de *Fusarium* spp. de seringueira.** 2012. 130f. Tese. (Doutorado em Ciências Florestais) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2012.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v. 1, p. 13-15, 1991.

DU, M. et al. Characterization of *Fusarium* spp. causing potato dry rot in China and susceptibility evaluation of chinese potato germplasm to the pathogen. **Potato Research**, [S.l.], v. 55, p. 175-184, 2012.

ELENA, K.; PAPPAS, A. C. Pathogenicity and Vegetative Compatibility of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* in Greece. **Journal Phytopathology**. Berlin, v. 150, p. 495-499, 2002.

ELIAS, A. et al. Produção *in vitro* de enzimas extracelulares por fungos e sua relação com os sintomas descritos em planta hospedeira. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 41, n. 4, p. 315-317, 2015.

ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia.** Caxias do Sul, EDUCS, 510 p., 2004.

FAIA, A. M. **Isolamento e identificação de fungos filamentosos e leveduras em alguns pontos de uma rede de distribuição de água.** 2011. 52f. Dissertação. (Mestrado em Biologia Celular e Biotecnologia) – Universidade de Lisboa, Lisboa, 2011.

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

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

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética.** 3. ed. Brasília: EMBRAPA – CENARGEM, 1998, 220 p.

FIGUEIREDO, J. A. G. **Bioprospecção, caracterização morfológica e molecular de enfófitos de *Maytenus ilicifolia*, com ênfase em *Pestalotiopsis* spp.** 2006. 152f. Dissertação. (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

FLEIG, F. D. **Morfometria e quantificação da biomassa comercial e residual da poda de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) em reflorestamentos.** 2002. 140f. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2002.

FRIAS, A. G. **Caracterização de isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactuceae* obtidos de campos de produção comercial no estado de São Paulo e avaliação de genótipos de alface.** 2014. 56f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2014.

FUENTEFRIA, A. M. **Identificação e avaliação do potencial biotecnológico de leveduras e fungos semelhantes a leveduras isolados de filoplano do *Hibiscus rosa-sinensis***. 2004. 120f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.

FUNDO DE DESENVOLVIMENTO E INOVAÇÃO DA CADEIA PRODUTIVA DE ERVA-MATE. **Guia da erva-mate**. FUNDOMATE, Porto Alegre. p. 1-15, 2014.

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.

GLASS, N. L.; KULDAU, G. A. Mating type and vegetative incompatibility in filamentous ascomycetes. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 30, p. 201-224, 1992.

GLASS, N. L. et al. The genetics of hyphal fusion and vegetative incompatibility in filamentous ascomycetes. **Annual Review of Genetics**, Palo alto, v. 34, p. 165-186, 2000.

GOUVEIA, M. E. M. **Métodos Moleculares na identificação, caracterização e detecção de *Phytophthora cambivora* (Petri) Buisman e *Phytophthora cinnamomi* Rands associados a doença da tinta do castanheiro**. 2004. 182f. Tese (Doutorado Ciências Agrônômicas/Proteção de Plantas). Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real, 2004.

GRANT, D. et al. Molecular hybridization. In: CAETANO-ANOLLÈS, G. et al. **DNA Marker: Protocols, application, and overvienws**. New York: Wiley- Vch, 1998.

GRIFFIN, D. H. **Fungal physiology**. 2. ed. New York: John Wiley & Sons, 458p, 1994.

GRIGOLETTI JUNIOR, A. et al. Doenças em Ervamate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hill) na região sul do Brasil. **Boletim de Pesquisa Florestal**, n. 32/33, p.43-51 Embrapa Florestas. Colombo. 1996.

GRIGOLETTI JÚNIOR, A.; AUER, C. G. Podridão de raízes em erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hill.) causada por *Fusarium* sp. **Fitopatologia Brasileira**, v. 26, p. 572, 2001.

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

HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S. L. The use of solid media for detection of enzymes production by fungi. **Mycologia**, v. 67, p. 597-607, 1971.

HANSBERG, W. et al. Fungal catalases: Function, phylogenetic origin and structure. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. [S.l.], v. 525, p. 170-180, 2012.

HAWKSWORTH, D. L. et al. **Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi**. 8. ed. CAB international: Oxon, UK, 1995.

HOSOKAWA et al. Conidium morphology of *Curvularia geniculata* and allied species. **Mycoscience**, v. 44, p. 227-237, 2003.

HSUAN, H. M. et al. Molecular Identification of *Fusarium* Species in *Gibberella fujikuroi* Species Complex from Rice, Sugarcane and Maize from Peninsular Malaysia. **International Journal of Molecular Sciences**. Basel, v. 12, p. 6722-6732, 2011.

ILIĆ, J. et al. Vegetative compatibility of *Fusarium oxysporum* isolated from weeds in eastern Croatia. **Poljoprivreda**, Osijek, v. 19, n. 1, p. 20-24, 2013.

INDEX FUNGORUM. Disponível em <http://www.indexfungorum.org>. Acesso em: 10 mar. 2015.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção Agrícola e Municipal**. IBGE, Rio de Janeiro, v. 42, p. 1-100, 2015.

JACOBS, A. et al. *Fusarium ananatum* sp. nov. in the *Gibberella fujikuroi* species complex from pineapples with fruit rot in South Africa. **Fungal Biology**, Oxford, v. 114, n. 7, p. 515-527, 2010.

JORGE, I. et al. Cell wall degrading enzymes in fusarium wilt of chickpea: correlation between pectinase and xylanase activities and disease development in plants infected with two pathogenic races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *Ciceris*. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, n. 84, p. 1395-1404, 2006.

JUNGES et al. *Trichoderma* spp. na produção de mudas de espécies florestais. **Floresta e Ambiente**. Seropédica, v. 23, n. 2, p. 237-244, 2016.

JUSOH, M. N. B. et al. Vegetative compatibility group of *Fusarium solani* pathogenic to tobacco plant in peninsular Malaysia. **Songklanakarín Journal of Science and Technology**. Songkhla, v. 35, n. 6, p. 615-621, 2013.

KATO, M. et al. Sensitivity to protectant fungicides and pathogenic fitness of clonal lineages of *Phytophthora infestans* in the United States. **Phytopathology**. v. 87. p. 973-978, 1997.

KAWCHUK, L. M. et al. Isolation of the  $\beta$ -tubulin gene and characterization of thiabendazole resistance in *Gibberella pulicaris*. **Plant Pathology**, v. 24, p. 233-238, 2002.

KEELING, P. J.; INAGAKI, Y. A class of eukaryotic GTPase with a punctuate distribution suggesting multiple functional replacements of translation elongation factor 1 alpha. **Proceedings of the National Academy of Science**, Washington DC, v. 101, n. 43, p. 15380-15385, 2004.

KIPROP, E. K. et al. Cultural characteristics, pathogenicity and vegetative compatibility of *Fusarium udum* isolates from pigeonpea (*Cajanus cajan* (L.) Millsp.) in Kenya. **European Journal of Plant Pathology**. Dordrecht, v. 108, p. 147-154, 2002.

- KLINGELFUSS, L et al. Métodos de Inoculação para quantificação de resistência em soja a *Fusarium solani* f. sp. *glycines*, em casa-de-vegetação. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, p. 050-055, 2007.
- KRISTENSEN, R. et al. Phylogeny and toxigenic potential is correlated in *Fusarium* species as revealed by partial translation elongation factor 1 alpha gene sequences. **Mycol. Res.** London, v. 109, v. 2, p. 173-186, 2005.
- KRNJAJA, V. S. et al. Pathogenicity and diversity of vegetative compatibility of *Fusarium verticillioides*. **Proc. Nat. Sci.** Novi Sad, v. 113, p. 103-111, 2007.
- KRUGNER, T. L.; AUER, C. G. Doenças dos pinheiros (*Pinus* spp.). In: KIMATI, H. et al. **Manual de Fitopatologia**, 4. ed. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, 2005, v. 2, p. 517-522.
- KUHNEM JUNIOR, P. R. et al. Características patogênicas de isolados do complexo *Fusarium graminearum* e de *Fusarium verticillioides* em sementes e plântulas de milho. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 43, n. 4, 2013.
- LAZAROTTO, M. et al. Mycelia growth and sporulation of *Fusarium chlamydosporum* species complex under different culture conditions. **Revista de Ciências Agrárias/ Amazonian Journal of Agricultural and Environmental Sciences**, Belém, v. 57, n. 1, p. 35-40, 2014.
- LAZAROTTO, M. et al. Morphological and molecular characterization of *Fusarium* spp pathogenic to pecan tree in Brazil. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 13, n. 4, p. 9390-9402, 2014.
- LAZAROTTO, M. **Identificação e caracterização de *Fusarium* spp. e *Pestalotiopsis* spp. associados a *Carya illinoensis* no Rio Grande do Sul.** 2013. 156f. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal). Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2013.
- LEÃO, E. U. Crescimento micelial e produção de conídios de *Ascochyta cucumis* em diferente meios de cultura e regimes de luz. **Biosci. J.**, Uberlândia, v. 28, n. 2, p. 325-331, 2012.
- LEONOWICZ, A. et al. Fungal laccase: properties and activity on lignina. **Journal of Basic Microbiology**. Berlim, v. 41, n. 3-4, p. 185-227, 2001.
- LESLIE, J. F. Fungal vegetative compatibility. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 31, p. 127-150, 1993.
- LESLIE, J. F.; SUMMERELL, B. A. **The Fusarium Laboratory Manual**. Ames: Blackwell Publishing, 2006. 388 p.
- LIMA, A.; FURTADO, M. Espécies do gênero *Curvularia* (fungos anamórficos: Hyphomycetes) na Ilha de Santiago, Cabo Verde. **Portugaliae Acta Biol.** Lisboa, v. 22, p. 145-156, 2007.

- MACHADO, L. P. **Seleção de Resistência para á Murcha-de-Fusário em Genótipos de Algodoeiro**. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal Rural de Pernambuco: Recife, 2008.
- MACIEL, C. G. ***Fusarium sambucinum* associado a sementes de *Pinus elliottii*: patogenicidade, morfologia, filogenia molecular e controle**. 2012. 93p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria – RS, 2012.
- MAHMOUD, A. L. E. Enzymatic activity and mycotoxin – producing potencial of isolated rotted lemons. **Cryptomic Micologie**, Paris, v. 15, n. 2, p. 117-124, 1994.
- MARCHI, C. E. et al. Atividades amilolítica e pectinolítica de *Alternaria solani* e a relação com a agressividade em tomateiro. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 32, n. 4, p. 345-352, 2006.
- MENEZES, M. Aspectos biológicos e taxonômicos do gênero *Colletotrichum*. Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica. **Anais...** Recife, v. 3, p. 170-179, 2006.
- MICHEREFF, S. J. et al. Variabilidade de isolados de *Alternaria brassicicola* no estado de Pernambuco. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 6, p. 656-663, nov./dez. 2003.
- MILANESI, P. M. **Caracterização, toxicidade e patogenicidade de *Fusarium* spp. em genótipos de soja em sistema de plantio direto**. 2009. 91f. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2009.
- MORENO, J. A. **Clima do Rio Grande do Sul**. Secretaria da Agricultura, Porto Alegre, 1961. 73 p.
- NELSON, P. E. et al. ***Fusarium* species, an illustrated manual for identification**. University Park: Pennsylvania State University Press, 1983. 193p.
- NIRENBERG, H. I.; O'DONNELL, K. New species and combinations within the *Gibberella fujikuroi* species complex. **Mycologia**, New York, v. 90, n. 3, p. 434-458, 1998.
- NITSCHKE, E. et al. Differentiation of Eleven *Fusarium* spp. Isolated from Sugar Beet, Using Restriction Fragment Analysis of a Polymerase Chain Reaction–Amplified Translation Elongation Factor 1 $\alpha$  Gene Fragment. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 99, n. 8, p. 921-929, 2009.
- NOGUEIRA, E. B. S.; CAVALCANTI, M. A. Cellulolytic fungi isolated from processed oats. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 27, p. 7-9, 1996.
- O'DONNELL, K. et al. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: Concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. **Proceedings of the National Academy Science**, Washington, DC, v. 95, p. 2044-2049, 1998.

OLIVEIRA, V. C.; COSTA, J. L. S. Análise de restrição de DNA ribossomal amplificado (ARDRA) pode diferenciar *Fusarium solani* f.sp. *phaseoli* de *F. solani* f.sp. *glycines*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, p. 631-634, 2002.

ÖZER, N. Pectolytic enzymes produced by *Alternaria alternata* in culture and during colonization of common wheat kernels. **Micology and Phytopathology (МИКОЛОГИЯ И ФИОПАТОЛО ИЯ)**, [S.l.], v. 43, n. 6, 2009.

PANDEY, A. et al. Advances in microbial amylases. **Biotechnology and Applied Biochemistry**. [S.l.], v. 31, p. 135-152, 2000.

PARLEVLIET, J. E. Components of resistance that reduce the rate of epidemic development. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 17, p. 203-222, 1979.

PASCHOLATTI, S. F. Fitopatógenos: arsenal enzimático. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.) **Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos**. São Paulo: Agronômica Ceres, v. 1, cap.19, p.343-364, 1995.

PEREIRA, O. L. **Caracterização morfológica e molecular de fungos micorrízicos de sete espécie de orquídeas neotropicais**. 2001. 55f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2001.

PEREIRA, W. V. **Caracterização e identificação molecular de espécies de *Colletotrichum* associadas à antracnose da goiaba no Estado de São Paulo**. 2009. 80f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade de São Paulo – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2009.

PFENNING, L. H.; MARTINS, M. F. Espécies de *Fusarium* associadas ao cafeeiro na região sul de Minas Gerais. In: I Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil, 2000. Poços de Caldas, MG. **Anais...** Brasília DF: EMBRAPA Café, 2000. v. 1. p. 283-286.

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

PIVETA, G. **Morfologia, caracterização molecular e patogenicidade de *Ceratocystis fimbriata* no Rio Grande do Sul**. 2013. 67f. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal). Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2013.

POLETTI, I. **Epidemiologia da podridão-de-raízes da erva mate em ervais e viveiros**. 2010. 101f. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal). Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2010.

POLETTI, I. et al. Aspectos epidemiológicos da podridão-de-raízes da erva-mate (*Ilex paraguariensis*). **Ciência Florestal**. Santa Maria, v. 25, n. 2, p. 281-291, 2015.

POLETTI, I. et al. Caracterização e patogenicidade de isolados de *Fusarium* spp. causadores de podridão-de-raízes da erva mate. **Floresta**, Curitiba, PR, v. 42, n. 1, p. 95-104, 2012.

- POLETTTO, I. et al. Influência da inoculação de *Fusarium* spp. e níveis de sombreamento no crescimento e desenvolvimento da erva mate. **Revista Ciência Florestal**. Santa Maria, v. 20, n. 3, p. 513-521, 2010a.
- POLETTTO, I. et al. Ocorrência de *Fusarium* sp. causando mortalidade de mudas de erva-mate em viveiro na região alta do Vale do Taquari, RS. In: Seminário Sobre Reflorestamento e Recuperação Ambiental: ambiente e tecnologia: o desenvolvimento sustentável, 2005, Lajeado. **Anais...** Lajeado: UNIVATES, 2005. p. 126-132.
- POLETTTO, I. et al. Primeira ocorrência de *Pythium* sp. e *Rhizoctonia* sp. causando podridão-de-raízes em ervais no Rio Grande do Sul. **Ciência Florestal**. Santa Maria, v. 17, n. 1, p. 65-69, 2007.
- POLETTTO, I. et al. Zoneamento e identificação de *Fusarium* spp. causador de podridão-de-raízes em plantios de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.) na região do Vale do Taquari-RS. **Ciência Florestal**, v. 16, n. 1, p. 1-10, 2006.
- POLONI, A. **Estudo da virulência e variabilidade fisiológica e genética do fungo *Bipolaris sorokiniana***. 2008. 112f. Dissertação (Mestrado Microbiologia Agrícola e do Ambiente) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre- RS, 2008.
- POLONI, A. et al. Análise da variabilidade morfológica e taxa de crescimento de culturas policonidiais e monoconidiais de *Bipolaris sorokiniana*. **Biociências**, v. 16, n. 1, p. 52-63, 2008.
- POLTRONIERI, L. S. et al. Incidência de *Fusarium solani* em mandioca no estado do Pará. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27 n. 5, p. 544, 2002.
- PUHALLA, J. E. Classification of strains of *Fusarium oxysporum* on the bases of vegetative compatibility. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 63, n. 2, p. 179-183, 1985.
- RAMOS, E. H. S. **Avaliação da produção de celulases por fungos filamentosos utilizando bagaço de cana como substrato**. 2012. 71f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Fisiologia) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, 2012.
- REHNER, S. A.; BUCKLEY, E. A. *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1-sequences: evidence for cryptic diversification and links to Cordyceps teleomorphs. **Mycologia**, [S.l.], v. 97, n. x, p. 84-98, 2005.
- REIS JUNIOR, F. B. et al. Restrição do 16S-23S DNAr intergênico para avaliação da diversidade de *Azospirillum amazonense* isolado de *Brachiaria* spp. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 3, p. 431-438, 2006.
- RODRIGUES, A. A. C.; MENEZES, M. Identification and pathogenic characterization of endophytic *Fusarium* species from cowpea seeds. In: Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica. **Anais...** Recife, v. 3, p. 203-215, 2006.
- ROGERS, L. M. et al. Cutinase Gene Disruption in *Fusarium solani* f sp *pisi* Decreases Its Virulence on Pea. **The Plant Cell**, Waterbury, v. 6, p. 935-945, 1994.

- ROSALEE, A. et al. Grupos de compatibilidade vegetativa entre insolados de *Fusarium oxysporum* não patogênicos ao feijoeiro e de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 24, n. 4, p. 546-548, 1999.
- RUBINI, M. R. et al. Diversity of endophytic fungal community of cacao (*Theobroma cacao* L.) and biological control of *Crinipellis pernicioso*, causal agent of Witches' Broom Disease. **Int. J. Biol. Sci.** v. 1, p. 24-33, 2005.
- SAABALE, P. R.; DUBEY, S. C. Pathogenicity and vegetative compatibility grouping among Indian populations of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* causing chickpea wilt. **Phytoparasitica**, Bet Dagan, v. 42, p. 465-473, 2014.
- SAUPE, S. J. Molecular Genetics of Heterokaryon Incompatibility in Filamentous Ascomycetes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 64, n. 3, p. 489-502, 2000.
- SCHOUTEN, A. et al. Resveratrol acts as a natural profungicide and induces self-intoxication by a specific laccase. **Molecular Microbiology**. [S.l.], v. 43, n. 4, p. 883-894, 2002.
- SEIFERT, K. A.; LEVESQUE, C. A. Phylogeny and molecular diagnosis of mycotoxigenic fungi. **European Journal of Plant Pathology**, [S.l.], v.110, p. 449-471, 2004.
- SFALSIN, E. **Caracterização morfológica e molecular de *Fusarium decemcellulare* agente etiológico da galha-floral em cacauero**. 2012. 38f. Dissertação. (Mestrado em Agronomia/Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.
- SHAHNAZI, S. et al. Morphological and molecular characterization of *Fusarium* spp. associated with yellowing disease of black pepper (*Piper nigrum* L.) in Malaysia. **Journal of General Plant Pathology**, [S.l.], v. 78, p. 160-169, 2012.
- SHIN, K-S.; KIM, C-J. Decolorisation of artificial dyes by peroxidase from the white-rot fungus, *Pleurotus ostreatus*. **Biotechnology Letters**, [S.l.], v. 20, n. 6, p.569-572,1998.
- SILVA, B. S. O. et al. Pimenta-do-reino: importância da defesa fitossanitária para a sustentabilidade da atividade na região norte do Espírito Santo. **Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável (RBAS)**. Viçosa, v. 1, n. 1, p. 88-92, 2011.
- 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.
- SINGH, R.; SAXENA, V. C. Pectinolytic, cellulolytic, amylase ad protease production by three isolates of *Fusarium solani* variable in their virulence. **Indian Journal of Mycology and Plant Pathology**, Udaipur, v. 19, p. 22-29, 1989.

SOARES, J. S. **Caracterização morfológica, molecular e patogênica do agente etiológico da fusariose do abacaxizeiro no Brasil**. 2011. 59f. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitopatologia). Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CIÊNCIA DO SOLO. **Manual de Adubação Calagem para os Estados do RS e SC**. Porto Alegre, 10. ed., 2004, 394 p.

STANFORD, T. L. M. et al. Atividade enzimática de microorganismos isolados de jacupé (*Pachyrhizus erosus* L. Urban). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 18, n. 4, p. 382-385, 1998.

STEENKAMP, E. T et al. Molecular characterization of *Fusarium subglutinans* associated with mango malformation. **Molecular Plant Pathology**, London, v. 1, n. 3, p. 187-193, 2000.

STEFAN, G. R. et al. Cloning of *b*-tubulin and succinate dehydrogenase genes from *Uromyces fabae* and establishing selection conditions for their use in transformation. **Plant Pathology**, v. 110, p. 767-777, 2004.

STOTZ, H. U.; LONG, S. R. Expression of the pea (*Pisum sativum* L.) alpha-tubulin gene is correlated with cell division activity. **Plant Molecular Biology**, v. 41, p. 1-14, 1999.

STUMPF, R. **Prevalência, perfil toxigênico e agressividade de espécies de *Fusarium* associadas aos grãos de milho do estado do Rio Grande do Sul**. 2011. 132f. Dissertação (Mestrado em Fitoctenia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

SUMMERELL et al. A utilitarian approach to *Fusarium* identification. **Plant Disease**, New York, v. 87, v. 2, p. 117-128, 2003.

SUN, H. et al. Recent advances in microbial raw starch degrading enzymes. **Biotechnology and Applied Biochemistry**. [S.l.], p. 160, p. 988-1003, 2010.

SUTTON, B. C. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. In: BAILEY, J. A.; JEGER, M. J. **Colletotrichum: biology, pathology and control**. Wallingford: Redwood, 1992. 388 p.

TAMURA, K. et al. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v. 24, p. 1596-1599, 2007.

TAYLOR, J. W. et al. Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 31, n. 1, p. 21-32, jan. 2000.

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

TEIXEIRA, H. et al. Marcadores morfofisiológicos e isoenzimáticos na análise da diversidade genética de isolados de *Acremonium strictum*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29 n. 4 July/aug. 2004.

VENTURA, J. A. Taxonomia de *Fusarium* e seus segredos. Parte II - Chaves para identificação. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 8, p. 303-338, 2000.

VINNERE, O. Approaches to species delineation in anamorphic (mitosporic) fungi: a study on two extreme cases. **Uppsala: Faculty of Science and Technology**, 2004. 72p.

VISENTIN, I. et al. The ITS region as a taxonomic discriminator between *Fusarium verticillioides* and *Fusarium proliferatum*. **Mycological Research**, Londres, v. 113, p. 1137-1145, 2009.

VOIGT, C. A. et al. A secreted lipase of *Fusarium graminearum* is a virulence factor required for infection of cereals. **The Plant Journal**, v. 42, p. 364-375, 2005.

WALKER, C. et al. Caracterização morfológica, molecular e patogenicidade de *Fusarium acuminatum* e *Fusarium verticillioides* a *Cordia americana*. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 26, n. 2, p. 463-473, 2016.

WALTON, J. D. Deconstructing the cell wall. **Plant Physiology**, Rockville, v. 104, p. 1113-1118, 1994.

WOLFGANG J. et al. A large plant  $\beta$ -tubulin family with minimal C-terminal variation but differences in expression. **Gene**, v. 340, p. 151-160, 2004.

ZAMBOLIM, L et al. Nutrição mineral e patógenos radiculares. In: MICHEREFF, S. J. et al. (Eds). **Ecologia e Manejo de Patógenos Radiculares em Solos Tropicais**. UFRPE Imprensa Universitária. Recife, 2005.

ZHANG, J. B. et al. Determination of the trichothecene mycotoxin chemotypes and associated geographical distribution and phylogenetic species of the *Fusarium graminearum* clade from China. **Mycological Research**, Manchester, v. 111, p. 967-975, 2007.