

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

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE *Fusarium*
spp. e *Pestalotiopsis* spp. ASSOCIADOS A *Carya*
illinoensis NO RIO GRANDE DO SUL**

TESE DE DOUTORADO

Marília Lazarotto

Santa Maria, RS, Brasil.

2013

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE *Fusarium* spp. E
Pestalotiopsis spp. ASSOCIADOS A *Carya illinoensis* NO
RIO GRANDE DO SUL**

Marília Lazarotto

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): Marlove Fátima Brião Muniz

Santa Maria, RS, Brasil.

2013

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

Lazarotto, Marília
IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE *Fusarium* spp. e
Pestalotiopsis spp. ASSOCIADOS A *Carya illinoensis* NO
RIO GRANDE DO SUL / Marília Lazarotto.-2013.
156 p.; 30cm

Orientadora: Marlove Fátima Brião Muniz
Coorientadores: Lia Rejane Silveira Reiniger,
Maristela Machado Araújo
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-
Graduação em Engenharia Florestal, RS, 2013

1. Fitopatologia florestal I. Brião Muniz, Marlove
Fátima II. Silveira Reiniger, Lia Rejane III. Machado
Araújo, Maristela IV. Título.

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Curso de Pós-Graduação em Engenharia Florestal**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a tese de doutorado.

IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE *Fusarium* spp. E *Pestalotiopsis* spp. ASSOCIADOS A *Carya illinoensis* NO RIO GRANDE DO SUL

elaborada por
Marília Lazarotto

como requisito parcial para obtenção do grau de
Doutor em Engenharia Florestal

COMISSÃO EXAMINADORA:

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

Lia Rejane Silveira Reiniger, Dr^a. (UFSM)

Stela Maris Kulczynski, Dr^a. (UFSM/CESNORS)

Cesar Bauer Gomes, Dr. (Embrapa Clima Temperado)

Diego Pascoal Golle, Dr. (UNICRUZ)

Santa Maria, 19 de fevereiro de 2013.

Aos meus pais, Maria Edithe, que sempre será citada e a quem devo quem eu sou, e ao meu pai João Renato que, mesmo presente por poucos anos na minha vida, me ensinou a amar a natureza e a respeitar a vida.

Dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Santa Maria que, através do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal oportunizou a realização desta tese. Ao órgão financiador CAPES, pelo apoio financeiro com a concessão da bolsa de doutorado.

À Prof^a. Dra. Marlove Fátima Brião Muniz pelos mais de sete anos de amizade, orientação e pela ajuda e resolução dos mais diversos problemas ao longo desta trajetória.

Às professoras Dra. Lia Rejane Silveira Reiniger e Dra. Maristela Machado Araújo, pela Co-Orientação deste trabalho.

À banca examinadora, constituída pelos professores Dra. Lia Rejane Silveira Reiniger, Dr. Diego Pascoal Golle, Dra. Stela Maris Kulczynski e Dr. Cesar Bauer Gomes.

Ao Dr. Álvaro Figueredo dos Santos, pesquisador da Embrapa Florestas, por todas as ideias e sugestões que foram de grande valia para a finalização desta tese.

Aos funcionários da UFSM, em especial a secretária do programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, Cerlene Machado.

A todos os amigos de Laboratório de Fitopatologia, os quais foram muito importantes nestes anos. Sentirei muita saudade de vocês! E um agradecimento especial à Tec. Adm. Maria N. D. Weber pelas inúmeras horas de aconselhamento pessoal e profissional.

Às minhas amigas e colegas de Laboratório, Caciara Gonzatto Maciel e Paola Mendes Milanesi pelas discussões homéricas sobre a filogenia do “Dr. *Fusarium*”. A toda minha família: vô, vó, tios, tias, primos e primas e, especialmente, à minha mãe Maria Edithe e meus irmãos Daniel e Gerusa.

Ao meu noivo Rafael, pelos anos de ajuda e compreensão em momentos mais difíceis e também pela companhia nos bons momentos.

À Lolita, companhia e amiga incondicional.

Aos meus amigos de coração que sabem o quanto são importantes para mim e a todas aquelas pessoas que, mesmo não mencionadas, de uma forma ou outra, contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito obrigada!

A ciência nunca resolve um problema sem criar pelo
menos outros dez.

(George Bernard Shaw)

RESUMO

Tese de Doutorado
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal
Universidade Federal de Santa Maria

IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE *Fusarium* spp. e *Pestalotiopsis* spp. ASSOCIADOS A *Carya illinoensis* NO RIO GRANDE DO SUL

AUTORA: MARÍLIA LAZAROTTO

ORIENTADORA: MARLOVE FÁTIMA BRIÃO MUNIZ

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 19 de fevereiro de 2013.

O cultivo da noqueira-pecan (*Carya illinoensis* [Wangenh.] K. Koch) tem se intensificado nos últimos anos no estado do Rio Grande do Sul. Entretanto, as pesquisas relacionadas aos problemas fitossanitários da espécie não se desenvolveram na mesma intensidade, de modo que muitos produtores do estado têm enfrentado enfermidades desconhecidas. Diante disto, o objetivo geral do presente trabalho foi identificar e caracterizar os agentes causais de novas doenças que atacam a noqueira-pecan no Rio Grande do Sul. Como objetivos específicos estabeleceram-se: a) coletar e identificar agentes patogênicos em diferentes localidades no Rio Grande do Sul; b) avaliar a patogenicidade de isolados coletados em plantios de noqueira-pecan de diferentes localidades no Rio Grande do Sul; c) caracterizar morfofisiologicamente os isolados coletados de plantas doentes de noqueira-pecan; e d) identificar, em nível de espécie, os isolados provenientes de plantas doentes de noqueira-pecan. Para tanto, foram realizadas coletas em sete municípios do estado, para isolamento de fungos potencialmente patogênicos. Também foram coletadas e analisadas amostras de solo para caracterização da área e georreferenciamento dos pontos. Os patógenos, ainda não relatados, *Fusarium* spp. e *Pestalotiopsis* spp., foram testados quanto a sua patogenicidade. O primeiro foi testado com inoculação em substrato, e o segundo com inoculação foliar por suspensão de esporos. Os isolados patogênicos foram caracterizados morfofisiologicamente através das variáveis crescimento micelial, esporulação, dimensões de conídios, pigmentação das colônias e formação de estruturas específicas de cada gênero. Os mesmos isolados também foram identificados molecularmente através de sequenciamento dos genes ITS e TEF-1 α , para *Fusarium* spp., e ITS e β -tubulina, para *Pestalotiopsis* spp. Foram identificados doze isolados patogênicos de *Fusarium* spp. e onze de *Pestalotiopsis* spp. As variáveis utilizadas na caracterização morfofisiológica foram suficientes na diferenciação dos isolados, especialmente a largura dos conídios, para *Fusarium* spp. e o diâmetro das colônias, para *Pestalotiopsis* spp. O sequenciamento das regiões ITS e TEF-1 α , para *Fusarium* spp., confirmou a separação dos isolados por meio das características morfofisiológicas e identificou cinco espécies, sendo elas *F. chlamydosporum*, *F. oxysporum*, *F. equiseti*, *Giberella fujikuroi* species complex e *F. graminearum* species complex. Para *Pestalotiopsis* spp., o sequenciamento das regiões ITS e β -tubulina permitiu que se identificassem algumas espécies, como é o caso de *P. clavisora* e *P. cocculi*. Outros isolados permaneceram sem identificação precisa da espécie, já que a filogenia do gênero ainda é pouco conhecida.

Palavras-chave: Patogenicidade. Caracteres morfológicos. ITS. TEF-1 α . β -tubulina.

ABSTRACT

Doctorate Thesis
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal
Universidade Federal de Santa Maria

IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF *Fusarium* spp. and *Pestalotiopsis* spp. ASSOCIATED TO *Carya illinoensis* IN RIO GRANDE DO SUL

AUTHOR: MARÍLIA LAZAROTTO

ADVISOR: MARLOVE FÁTIMA BRIÃO MUNIZ

Place and Date of the defense: Santa Maria, February 19th, 2013.

Cultivation of Walnut-pecan (*Carya illinoensis* [Wangenh.] K. Koch) has intensified in recent years in the state of Rio Grande do Sul. However, the research related to plant pathology has not developed to the same degree, so producing pecan nuts have faced many unknown diseases in the state. The main objective of this study was: a) identify and characterize causal agents of new diseases on Walnut-pecan in Rio Grande do Sul, and as specific objectives: b) to collect and to identify pathogens in different locations in Rio Grande do Sul, c) evaluate the pathogenicity of isolates collected in plantations of Walnut-pecan from different locations in Rio Grande do Sul, d) perform the isolates morphological characterization collected from diseased plants of Walnut-pecan, and e) to identify the isolates species. For this purpose, samples were taken in seven cities in the state for isolating potentially pathogenic fungi which were also collected and analyzed soil samples to characterize the area and georeferencing. Pathogens, *Fusarium* spp. and *Pestalotiopsis* spp. which were not yet reported were tested for their pathogenicity. The first genus was tested by inoculation on substrate, and the second by leaf inoculation with spore suspension. The pathogenic isolates were characterized by mycelial growth, sporulation, conidial dimensions, colony pigmentation and formation of specific structures to each genus. The same isolates were also identified by molecular sequencing of the ITS and TEF-1 α genes for *Fusarium* spp. and ITS and β -tubulin genes for *Pestalotiopsis* spp. Twelve pathogenic isolates of *Fusarium* spp. and eleven of *Pestalotiopsis* spp. were identified. The variables used on morphological characterization were able to differentiate the isolates, especially the width of conidia for *Fusarium* spp. and diameter of the colonies for *Pestalotiopsis* spp. The sequencing of the ITS regions and TEF-1 α to *Fusarium* spp. confirmed the separation of isolates through morphological characteristics and identified five species: *F. chlamydosporum*, *F. oxysporum*, *F. equiseti*, *Giberella fujikuroi* species complex and *F. graminearum* species complex and for *Pestalotiopsis* spp. sequencing of the ITS regions and β -tubulin could identify some species, such as *P. clavisora* and *P. cocculi*, and other isolates remained without precise identification of the species, since the phylogeny of the genus is still poorly known.

Key-words: Pathogenicity. Morphological characters. ITS. TEF-1 α . β -tubulin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Pontos de coleta de isolados de <i>Fusarium</i> spp. e de <i>Pestalotiopsis</i> spp. em plantios de noqueira-pecan, no Rio Grande do Sul (Fonte: Google Earth), 2012.	47
Figura 2- Esquema de amostragem de solo em plantios de noqueira-pecan no Rio Grande do Sul.....	49
Figura 3 - Patogenicidade de isolados de <i>Fusarium</i> spp. inoculados em substrato. Semeadura após a incorporação do inóculo (A); mudas desenvolvidas após 90 dias da inoculação (B).....	51
Figura 4 – Modelo de câmara úmida utilizada para inoculação de fungos em vasos [Adaptado de Alfenas e Ferreira (2007)]......	52
Figura 5 – Inoculação de <i>Pestalotiopsis</i> spp. em frutos verdes de noqueira-pecan, através de gotículas de suspensão de esporos.....	54
Figura 6 - Sintomas observados após inoculação de <i>Fusarium</i> spp. Necrose foliar associada à inoculação do isolado F18 (A); murcha seguida de morte associada à inoculação do isolado F11 (B); estrangulamento do colo associada à inoculação do isolado F7 (C); necrose.....	68
Figura 7– Estruturas reprodutivas (macroconídios e microconídios) e de sobrevivência (clamidósporos) dos 9 isolados patogênicos de <i>Fusarium</i> spp. formados em meio folha-de-cravo-ágar (CLA). Macroconídio (a); Clamidósporo (b); Microconídeo (c). A barra presente em cada imagem corresponde à medida de 20 µm.....	75
Figura 8 - Conídios dos 9 isolados patogênicos de <i>Fusarium</i> spp. , formados em meio folha-de-cravo-ágar (CLA). Clamidósporo (a); “Falsas-cabeças” (b); Microconídeo (c); Macroconídeo (d).	76
Figura 9 - Colônias puras dos 12 isolados patogênicos de <i>Fusarium</i> spp. crescidas em meio BDA.....	77
Figura 10 - Dendrograma mostrando a percentagem de dissimilaridade entre 9 dos 12 isolados patogênicos de <i>Fusarium</i> spp. O dendrograma foi obtido pela técnica UPGMA, a partir da análise da matriz de distância Euclidiana, com os 4 caracteres morfofisiológicos (diâmetro de colônias, esporulação, largura e comprimento de conídios).	78
Figura 11 - Dendrograma mostrando a percentagem de dissimilaridade entre os 12 isolados patogênicos de <i>Fusarium</i> spp. O dendrograma foi obtido pela técnica UPGMA, a partir da análise da matriz de distância Euclidiana, com apenas o diâmetro de colônias.....	81
Figura 12 - Dendrograma filogenético construído para os isolados F ₁ , F ₅ , F ₆ e F ₇ , baseado no método estatístico “Neighbor-joining”, derivado das sequências das regiões ITSrDNA, com base em 1000 réplicas de “bootstrap”. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o modelo Kimura-2-parameter. O número nas ramificações representa o número de “bootstrap”.	90

Figura 13 - Dendrograma filogenético construído para os isolados F ₁ , F ₅ , F ₆ , e F ₇ , baseado no método estatístico “Neighbor-joining”, derivado das sequências da região TEF - 1 α , com base em 1000 réplicas de “bootstrap”. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o modelo Tamura-Nei. O número nas ramificações representa o número de “bootstrap”.....	91
Figura 14 - Dendrograma filogenético construído para os isolados F ₃ , F ₁₉ e F ₂₀ , baseado no método estatístico “Neighbor-joining”, derivado das sequências das regiões ITSrDNA, com base em 1000 réplicas de “bootstrap”. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o modelo Kimura-2-parameter. O número nas ramificações representa o número de “bootstrap”.....	93
Figura 15 - Dendrograma filogenético construído para os isolados F ₃ , F ₁₉ , e F ₂₀ , baseado no método estatístico “Neighbor-joining”, derivado das sequências da região TEF - 1 α , com base em 1000 réplicas de “bootstrap”. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o modelo Tamura 3-parameter O número nas ramificações representa o número de “bootstrap”.....	94
Figura 16 - Dendrograma filogenético construído para os isolados F ₈ , F ₉ e F ₁₁ , baseado no método estatístico “Neighbor-joining”, derivado das sequências das regiões ITSrDNA, com base em 1000 réplicas de “bootstrap”. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o modelo Tamura-Nei. O número nas ramificações representa o número de “bootstrap”.....	95
Figura 17 - Dendrograma filogenético construído para os isolados F ₈ , F ₉ , e F ₁₁ , baseado no método estatístico “Neighbor-joining”, derivado das sequências da região TEF - 1 α , com base em 1000 réplicas de “bootstrap”. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o modelo Kimura 2-parameter. O número nas ramificações representa o número de “bootstrap”.....	97
Figura 18 - Dendrograma filogenético construído para o isolado F ₁₇ , baseado no método estatístico “Neighbor-joining”, derivado das sequências das regiões ITSrDNA, com base em 1000 réplicas de “bootstrap”. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o modelo Tamura-Nei. O número nas ramificações representa o número de “bootstrap”.....	98
Figura 19 - Dendrograma filogenético construído para o isolado F ₁₇ , baseado no método estatístico “Neighbor-joining”, derivado das sequências da região TEF - 1 α , com base em 1000 réplicas de “bootstrap”. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o modelo Tamura-Nei. O número nas ramificações representa o número de “bootstrap”.....	99
Figura 20 - Dendrograma filogenético construído para o isolados F ₁₈ , baseado no método estatístico “Neighbor-joining”, derivado das sequências das regiões ITSrDNA, com base em 1000 réplicas de “bootstrap”. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o modelo Jukes-Cantor. O número nas ramificações representa o número de “bootstrap”.....	100
Figura 21 - Dendrograma filogenético construído para o isolado F ₁₈ , baseado no método estatístico “Neighbor-joining”, derivado das sequências da região TEF - 1 α , com base em 1000 réplicas de “bootstrap”. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o modelo Tamura-Nei. O número nas ramificações representa o número de “bootstrap”.....	102

Figura 22 - Escala nominal e diagramática para manchas foliares causadas por <i>Pestalotiopsis</i> spp. em <i>Carya illinoensis</i>	103
Figura 23 - Teste de patogenicidade de isolados de <i>Pestalotiopsis</i> spp. Sintoma classificado como de alta severidade da mancha foliar associada à inoculação do isolado P7 (A); conídios de <i>Pestalotiopsis</i> sp. observados em microscópio em aumento 40x (B); mudas em câmara úmida logo após a inoculação foliar (C); detalhe, visto em lupa, de mancha foliar causada pela inoculação de <i>Pestalotiopsis</i> ssp. (D); detalhe, visto em lupa, dos cirros (cordões de conídios) formados por <i>Pestalotiopsis</i> sp. (E).	104
Figura 24 - Conídios dos 11 isolados patogênicos de <i>Pestalotiopsis</i> spp. apêndices filiformes (a); Célula central mais escura (b); Conídio com células centrais de coloração uniforme (c). A barra presente em cada imagem corresponde à medida de 20 µm.	111
Figura 25 - Colônias puras dos 11 isolados patogênicos de <i>Pestalotiopsis</i> spp. crescidas em meio BDA, aos sete dias.	112
Figura 26 - Dendrograma mostrando a percentagem de dissimilaridade entre 11 isolados patogênicos de <i>Pestalotiopsis</i> spp. O dendrograma foi obtido pela técnica UPGMA, a partir da análise da matriz de distância Euclidiana com os quatro caracteres morfofisiológicos avaliados (diâmetro de colônias, esporulação, largura e comprimento de conídios).	113
Figura 27 - Dendrograma filogenético construído para os isolados P ₁ , P ₂ e P ₁₄ , baseado no método estatístico “Neighbor-joining”, derivado das sequências das regiões ITSrDNA, com base em 1000 réplicas de “bootstrap”. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o modelo Tamura-Nei. O número nas ramificações representa o número de “bootstrap”.	120
Figura 28 - Dendrograma filogenético construído para os isolados P ₁ , P ₂ e P ₁₄ , baseado no método estatístico “Neighbor-joining”, derivado das sequências do gene da β-tubulina, com base em 1000 réplicas de “bootstrap”. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o modelo Tamura-Nei. O número nas ramificações representa o número de “bootstrap”.	121
Figura 29 - Dendrograma filogenético construído para o isolado P ₄ , baseado no método estatístico “Neighbor-joining”, derivado das sequências das regiões ITSrDNA, com base em 1000 réplicas de “bootstrap”. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o modelo Kimura-2-parameter. O número nas ramificações representa o número de “bootstrap”.	122
Figura 30 - Dendrograma filogenético construído para os isolados P ₃ , P ₅ e P ₁₀ , baseado no método estatístico “Neighbor-joining”, derivado das sequências das regiões ITSrDNA, com base em 1000 réplicas de “bootstrap”. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o modelo Tamura-Nei. O número nas ramificações representa o número de “bootstrap”.	123
Figura 31 - Dendrograma filogenético construído para os isolados P ₃ , P ₅ e P ₁₀ , baseado no método estatístico “Neighbor-joining”, derivado das sequências do gene da β-tubulina, com base em 1000 réplicas de “bootstrap”. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o modelo Kimura-2-parameter. O número nas ramificações representa o número de “bootstrap”.	125

Figura 32 - Dendrograma filogenético construído para os isolados P₇, P₉ e P₁₁, baseado no método estatístico “Neighbor-joining”, derivado das sequências das regiões ITSrDNA, com base em 1000 réplicas de “bootstrap”. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o modelo Tamura-Nei. O número nas ramificações representa o número de “bootstrap”..... 126

Figura 33 - Dendrograma filogenético construído para os isolados P₇, P₉ e P₁₁, baseado no método estatístico “Neighbor-joining”, derivado das sequências do gene da β -tubulina, com base em 1000 réplicas de “bootstrap”. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o modelo Kimura-2-parameter. O número nas ramificações representa o número de “bootstrap”..... 127

Figura 34 - Dendrograma filogenético construído para o isolado P₁₆, baseado no método estatístico “Neighbor-joining,” derivado das sequências das regiões ITSrDNA, com base em 1000 réplicas de “bootstrap”. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o modelo Tamura-Nei. O número nas ramificações representa o número de “bootstrap”..... 128

Figura 35 - Dendrograma filogenético construído para o isolado P₁₆, baseado no método estatístico “Neighbor-joining”, derivado das sequências do gene da β -tubulina, com base em 1000 réplicas de “bootstrap”. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o modelo Kimura-2-parameter. O número nas ramificações representa o número de “bootstrap”..... 129

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Coordenadas dos pontos de coleta de isolados fúngicos provenientes de pomares de noqueira-pecan no RS.	48
Tabela 2 - Gêneros fúngicos, procedência e data de coleta dos isolados obtidos de flores, raízes e folhas de noqueira-pecan.	59
Tabela 3 – Propriedades químicas do solo nos pontos de coleta de plantas sintomáticas de noqueira-pecan no Rio Grande do Sul.....	63
Tabela 4 - Descrição dos sintomas observados em mudas de noqueira-pecan em substrato inoculado com doze isolados de <i>Fusarium</i> spp.....	66
Tabela 5 – Distribuição percentual média dos sintomas apresentados por mudas sintomáticas de noqueira-pecan, após inoculação com dezesseis isolados de <i>Fusarium</i> spp., em substrato.	67
Tabela 6 - Plantas sintomáticas, plantas sadias e sementes não germinadas (SNG) de noqueira-pecan após inoculação com <i>Fusarium</i> spp., em substrato.	69
Tabela 7- Crescimento micelial diário (mm) até sete dias de incubação e taxa de crescimento micelial diário (mm.dia^{-1}) de 12 isolados patogênicos de <i>Fusarium</i> spp. em meio batata-dextrose-ágar (BDA).	71
Tabela 8 - Características das colônias e dos macroconídios de <i>Fusarium</i> spp. crescidos em meio batata-dextrose-ágar (BDA) e presença ou ausência de clamidósporos em meio folha-de-cravo-ágar (CLA).	73
Tabela 9 - Estimativas da distância Euclidiana entre 9 dos 12 isolados patogênicos de <i>Fusarium</i> spp., após agrupamento pela técnica UPGMA.	79
Tabela 10 - Estimativas da distância Euclidiana entre os 12 isolados patogênicos de <i>Fusarium</i> spp., após agrupamento pela técnica UPGMA.	82
Tabela 11 - Cobertura (C) e similaridade (S) dos isolados de <i>Fusarium</i> spp. patogênicos à noqueira-pecan com acessos do GenBank, através de sequenciamento da região ITS.	83
Tabela 12 - Cobertura (C) e similaridade (S) dos isolados de <i>Fusarium</i> spp. patogênicos à noqueira-pecan, com acessos do GenBank, através do sequenciamento da região TEF - 1 α	85
Tabela 13 - Severidade (%) da mancha foliar causada por <i>Pestalotiopsis</i> spp.	105
Tabela 14 - Resultados médios (%) do teste de patogenicidade em frutos noqueira-pecan, após inoculação com <i>Pestalotiopsis</i> spp.....	107
Tabela 15 - Crescimento micelial diário de isolados patogênicos de <i>Pestalotiopsis</i> spp. em meio batata-dextrose-ágar (BDA).	108
Tabela 16 - Esporulação e características dos conídios de isolados patogênicos de <i>Pestalotiopsis</i> spp. crescidos em meio BDA.....	109
Tabela 17 - Estimativas da distância Euclidiana entre os 11 isolados patogênicos de <i>Pestalotiopsis</i> spp., após agrupamento pela técnica UPGMA.	114

Tabela 18 - Cobertura (C) e similaridade (S) dos isolados de <i>Pestalotiopsis</i> spp. patogênicos à noqueira-pecan com acessos do GenBank, através do sequenciamento da região ITS.....	116
Tabela 19 - Cobertura (C) e similaridade (S) dos isolados de <i>Pestalotiopsis</i> spp. patogênicos à noqueira-pecan com acessos do GenBank, através do sequenciamento da região β -tubulina.	118

LISTA DE APÊNDICES

- Apêndice 1 – Super-brotamento observado a campo em plantas de noqueira-pecan com raízes colonizadas por *Fusarium* spp. em Mata (A, C) e em Santa Maria (B, D, E)..... 149
- Apêndice 2 – Resultados do programa Genes para a construção do dendrograma de dissimilaridade entre 9 isolados patogênicos de *Fusarium* spp. obtido pela técnica UPGMA a partir da análise da matriz de distância Euclidiana com os 4 caracteres morfofisiológicos avaliados (diâmetro de colônias, esporulação, largura e comprimento de conídios). 150
- Apêndice 3 – Resultados do programa Genes para a construção do dendrograma de dissimilaridade entre 12 isolados patogênicos de *Fusarium* spp. obtido pela técnica UPGMA a partir da análise da matriz de distância Euclidiana com apenas o caracter diâmetro de colônias. 151
- Apêndice 4 – Resultados do programa Genes para a construção do dendrograma de dissimilaridade entre 9 isolados patogênicos de *Pestalotiopsis* spp. obtido pela técnica UPGMA a partir da análise da matriz de distância Euclidiana com os 4 caracteres morfofisiológicos avaliados (diâmetro de colônias, esporulação, largura e comprimento de conídios). 152

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1 - Descrição dos meios de cultura utilizados no trabalho	154
---	-----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	29
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	33
2.1 <i>Carya illinoensis</i>	33
2.2 Características edáficas X incidência de patógenos	34
2.3 Variabilidade de agentes fitopatogênicos.....	36
2.4 Identificação morfológica de fungos.....	38
2.5 Identificação molecular de fungos.....	39
2.6 <i>Fusarium</i> spp.	42
2.7 <i>Pestalotiopsis</i> spp.	44
3 MATERIAL E MÉTODOS	47
3.1 Obtenção e purificação dos isolados de <i>Fusarium</i> spp. e <i>Pestalotiopsis</i> spp. .	47
3.2 Caracterização química do solo das áreas de coleta.....	49
3.3 Patogenicidade dos isolados de <i>Fusarium</i> spp.	49
3.4 Patogenicidade dos isolados de <i>Pestalotiopsis</i> spp.....	51
3.4.1 Preparo da suspensão de esporos	51
3.4.2 Inoculação	51
3.4.3 Avaliações	52
3.4.4 Construção da escala	53
3.4.5 Inoculação em frutos.....	53
3.5 Caracterização morfofisiológica dos isolados patogênicos de <i>Fusarium</i> spp. e <i>Pestalotiopsis</i> spp.	55
3.6 Caracterização molecular dos isolados patogênicos de <i>Fusarium</i> spp. e de <i>Pestalotiopsis</i> spp.	56
3.7 Análise dos dados.....	57
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
4.1 Isolados coletados	59
4.2 Caracterização química do solo das áreas de coleta.....	61
4.3 Patogenicidade dos isolados de <i>Fusarium</i> spp.	65
4.4 Caracterização morfofisiológica dos isolados patogênicos de <i>Fusarium</i> spp. .	71
4.5 Caracterização molecular dos isolados patogênicos de <i>Fusarium</i> spp. e relação com características morfológicas das espécies identificadas.....	83

4.6 Patogenicidade de isolados de <i>Pestalotiopsis</i> spp.	102
4.7 Caracterização morfofisiológica dos isolados patogênicos de <i>Pestalotiopsis</i> spp.	107
4.8 Caracterização molecular dos isolados patogênicos de <i>Pestalotiopsis</i> spp. e relação com características morfológicas das espécies identificadas.	116
5 CONCLUSÕES	131
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	133

1 INTRODUÇÃO

A noqueira-pecan ou pecan (*Carya illinoensis* [Wangenh.] K. Koch) pertence à família Juglandaceae, com distribuição predominante nas regiões temperadas do Hemisfério Norte. Existem mais de mil cultivares da espécie, que apresentam variação na forma dos frutos, qualidade da noz, arquitetura da árvore e características reprodutivas. Esse fato deve-se ao alto índice de segregação gênica, em função da reprodução sexual através de sementes, que se constitui no principal método de propagação (ALMEIDA et al., 2002). As mais importantes cultivares comerciais de noqueira-pecan existentes no Brasil são oriundas dos Estados Unidos, sendo que, das 41 cultivares registradas, somente duas foram desenvolvidas no Brasil (MAPA, 2011). As cultivares mais plantadas também são norte-americanas. Dentre elas, destacam-se Barton, Shawnee, Cape Fear, Caddo, Choctaw e Money Maker. Além destas, alguns produtores optam por produção através de mudas oriundas de pés-francos, as quais não são enxertadas e exigem um período mais longo para entrar em fase de plena produção. Apesar da grande variedade de cultivares, é importante ressaltar que a escolha da cultivar deve se basear na adaptação às condições ambientais e na resistência a organismos patogênicos, parâmetros essenciais que, muitas vezes, não são respeitados, sendo enfatizada apenas a máxima produção em seu local de origem, que pode não se manifestar nas condições brasileiras.

A pecanicultura no estado do Rio Grande do Sul recebeu forte incentivo nas décadas de 1960 e 1970, porém, em razão do pouco conhecimento sobre o comportamento da espécie e do ataque de patógenos, muitos pomares foram abandonados e a produção de noz-pecan foi desestimulada. Atualmente, embora haja preocupação do setor privado em fornecer mudas de qualidade e prestar assistência aos produtores, ainda se percebe uma grande carência de informações sobre procedimentos de implantação, condução e, especialmente, os cuidados fitossanitários requeridos pela espécie que assegurem uma adequada produtividade.

Algumas doenças da noqueira-pecan no país foram descritas por Ortiz e Camargo (2005), sendo as principais: sarna, causada pelo fungo *Cladosporium caryegenum*, que constitui a principal doença que ataca tecidos jovens, tais como

folhas, pecíolo, epicarpo e amentos; antracnose, causada por *Glomerella cingulata*, fase sexual de *Colletotrichum gloesporioides*, manifestando-se na forma de lesões deprimidas, circulares e escuras no fruto, resultando em diminuição do tamanho da amêndoa, abscisão do fruto, que acaba soltando o epicarpo da casca da noz; além de outras doenças de menor importância como o mofo-róseo (*Cephalotecium roseum*), o oídio (*Microsphaera penicilata*), a podridão-de-phytophthora (*Phytophthora cactorum*) e a queima das folhas, de etiologia ainda não esclarecida. Recentemente foram detectadas doenças até então desconhecidas em pomares do Rio Grande do Sul, cujos agentes patogênicos ainda não foram identificados e caracterizados.

Para iniciar o estudo de novos agentes patogênicos, a planta hospedeira, o patógeno e o ambiente devem ser considerados, pois representam os três elementos essenciais na determinação da ocorrência de doença, sua incidência e severidade, relacionando-se mutuamente (MENEZES, 2002). O conhecimento dessas interações é imprescindível não só para a doença em si, mas, principalmente, para estratégias de controle, visando interferir em seu ciclo (BERGAMIN FILHO; AMORIM, 1996).

As condições do solo que favorecem/desfavorecem a ocorrência de doenças são específicas para o patógeno e para o hospedeiro. Elas fazem parte das condições ambientais que regulam a ocorrência da doença, considerando os três componentes envolvidos em um patossistema: patógeno – hospedeiro - ambiente. Entretanto, de maneira geral, para Menezes (2002), a predisposição das plantas ao ataque de patógenos pode ser influenciada pela umidade, temperatura e fertilidade do solo, tidos como principais fatores do ambiente. Para o mesmo autor, a nutrição da planta, principalmente em relação aos macronutrientes nitrogênio (N), fósforo (P), potássio (K), e a disponibilidade desses nutrientes no solo são de fundamental importância na predisposição da planta a doenças, dependendo do balanço entre os teores de nutrientes. A resistência das plantas pode ser aumentada por modificações na anatomia (células da epiderme mais grossas, lignificadas e/ou silicificadas) e nas propriedades fisiológicas e bioquímicas (produção de substâncias inibidoras ou repelentes), modificações que são reguladas pelos nutrientes disponíveis (ZAMBOLIM et al., 2005).

No estudo do patógeno, a identificação correta e a descrição minuciosa são fundamentais para reconhecimento do agente e para o futuro estabelecimento de

estratégias para seu controle. Inicialmente, a identificação é realizada através de observação e mensuração de caracteres morfológicos, tais como tamanho de conídios, forma de conídios, número de células e demais estruturas típicas do patógeno, além de características de crescimento de colônias (definidas como características fisiológicas). No entanto, somente com descrições morfofisiológicas, não é possível uma identificação confiável de espécie para a maioria dos gêneros fúngicos, sendo necessária a aplicação de técnicas moleculares. Essas técnicas baseiam-se, especialmente, na Reação em Cadeia da Polimerase (*PCR - Polymerase Chain Reaction*), pois, devido à sua especificidade e sensibilidade, a PCR é um método importante para o diagnóstico de fungos (FUNGARO, 2000) e para o sequenciamento de regiões conservadas do genoma.

Diante disto, o objetivo geral do presente trabalho foi identificar e caracterizar o(s) agente(s) causal(is) de novas doenças que atacam a noqueira-pecan (*Carya illinoensis*). Como objetivos específicos estabeleceram-se os seguintes: a) coletar e identificar agentes patogênicos em pomares de noqueira-pecan procedentes de diferentes locais do Rio Grande do Sul; b) avaliar a patogenicidade de isolados coletados em plantios de noqueira-pecan; c) caracterizar morfofisiologicamente os isolados coletados em plantas doentes de noqueira-pecan; d) selecionar caracteres morfofisiológicos eficientes na separação dos isolados patogênicos em grupos segundo a espécie a que pertencem; e) avaliar regiões do genoma eficientes na identificação dos isolados patogênicos em nível de espécie.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Carya illinoensis*

A noqueira-pecan ou pecan (*Carya illinoensis* [Wangenh.] K. Koch) é uma espécie da família Juglandaceae, com distribuição predominante nas regiões temperadas do Hemisfério Norte. A família botânica inclui apenas seis gêneros e cerca de 100 espécies arbóreas de porte médio a grande, sendo os gêneros *Carya* e *Junglans* os mais conhecidos no sul do Brasil, pela produção de nozes comestíveis e de madeira valiosa (MARCHIORI, 1997). Segundo Sparks (1991), *C. illinoensis* é nativa dos Estados Unidos e se estende por uma vasta região que vai do sul do Texas ao norte de Iowa. Segundo o mesmo autor, devido à vasta área de ocorrência da espécie, há também uma grande diferença entre a maturação das nozes nas diferentes regiões do país.

No Brasil, a noqueira-pecan foi introduzida em 1900 por norte-americanos, nos municípios de Santa Bárbara e Americana, no estado de São Paulo. A madeira é de boa qualidade, com 720 kg.m³ de peso específico, podendo ser usada em pisos e móveis. A planta é caducifólia e atinge até 50 m de altura e 150 cm de diâmetro. Sua propagação é feita por sementes, e as cultivares são enxertadas, sendo que a produção de nozes inicia-se entre 6 e 10 anos de idade (BACKES; IRGANG, 2004).

Segundo descrição de Rieger (2006), a espécie é monóica com inflorescências masculinas pendentes em grupos laterais de 2-3 inflorescências, possuindo apenas anteras protegidas por brácteas esverdeadas. Marchiori (1997) classifica as inflorescências masculinas como amentilhos pendentes. As inflorescências femininas são bem pouco evidentes e também aparecem em ramos laterais terminais. A parede do ovário é fundida à bráctea ou involúcro de tecido e a parede externa do ovário, juntamente com o involúcro, torna-se a parte carnosa do fruto. As flores são incompletas, em ambos os sexos, pois não possuem pétalas e sépalas. Ocorre dicogamia na espécie, isto é, a maturação das flores femininas e masculinas ocorrem em períodos diferentes na mesma planta, por isso há necessidade de plantio de linhas de outra cultivar polinizadora para que ocorra a fecundação em pomares.

Os principais plantios comerciais no Brasil, especialmente na região Sul, foram implantados a partir de incentivos governamentais nas décadas de 60 e 70. Porém, por um longo período, a pecanicultura teve um desestímulo em decorrência das poucas pesquisas contemplando a forma de implantação e condução da cultura frente às condições climáticas ocorrentes na maior parte das regiões brasileiras, fatores que predispõem as plantas ao ataque de patógenos, principalmente de fungos (ORTIZ; CAMARGO, 2005).

Contudo, nos últimos anos, o plantio de noqueira-pecan foi intensificado, principalmente no Rio Grande do Sul, onde a Empresa Pecanita Agroindustrial, situada no município de Cachoeira do Sul, está incentivando o cultivo de novos pomares com o acordo de compra da produção de noz-pecan para beneficiamento em sua indústria. Atualmente, a empresa possui um pomar de 40 mil noqueiras, sendo que uma árvore pode render, anualmente, 30 Kg da fruta.

Conforme Rieger (2006), a propagação de noqueira-pecan nos Estados Unidos é feita, principalmente, através da enxertia, sendo o porta-enxerto enxertado nas mudas produzidas por sementes que já se encontram estabelecidas no pomar de dois a três anos. Esse procedimento é realizado para evitar danos por transplante de mudas do viveiro para o campo. No Rio Grande do Sul, as mudas são comercializadas já enxertadas e o tempo transcorrido entre a enxertia e a venda é variável entre os fornecedores.

Além de sua importância como produtora de noz-pecan, a espécie *C. illinoensis* possui madeira considerada de grande valor e resistência. Conforme Gatto et al. (2008), apesar da pouca literatura encontrada no Brasil sobre a madeira desta, acredita-se que, por suas características macroscópicas e pela aceitação da madeira em seu país de origem, poderia ter uma utilização mais nobre que seu simples uso para energia e, no mesmo estudo, a espécie, em comparação com as demais do estudo (*Luehea divaricata* e *Platanus x acerifolia*), apresentou os melhores resultados para os raios de vergamento utilizados, sendo, portanto uma espécie potencial para este fim.

2.2 Características edáficas X incidência de patógenos

O ambiente é visto como o conjunto de fatores climáticos e edáficos que envolvem o sistema patógeno-hospedeiro, exercendo importante papel sobre as

doenças. Segundo Bressan (2004), em condições naturais ou agricultáveis, as plantas são frequentemente expostas a algum estresse ambiental, que é definido por um fator externo que exerce uma influência desvantajosa sobre a planta. Poletto (2010) relata que alguns determinantes dessa natureza, como a temperatura do ar, por exemplo, podem se tornar estressantes em poucos minutos, enquanto outros como o conteúdo de água no solo, podem levar dias ou até semanas. Já fatores como as deficiências minerais do solo necessitam de maior tempo para se manifestar.

Para Zambolim et al. (2001), dentro do triângulo que determina a doença (ambiente-patógeno-hospedeiro), os nutrientes podem afetar direta ou indiretamente o hospedeiro, o patógeno e o meio ambiente, predispondo as plantas ao ataque dos patógenos, atuando direta ou indiretamente, de diversos modos: induzindo resistência ou tolerância à planta hospedeira; reduzindo ou aumentando a severidade das doenças; afetando o ambiente que tanto pode favorecer como desfavorecer os patógenos. A nutrição mineral do hospedeiro pode afetar a sua susceptibilidade a doenças de diversas maneiras, influenciando nas reservas de alimentos disponíveis ao patógeno e causando variações nos seus mecanismos bioquímicos de defesa (KRUGNER, 1978).

Variadas propriedades edáficas podem influenciar a ocorrência de uma doença, tanto de maneira indireta, afetando a resistência do hospedeiro, quanto de maneira direta, beneficiando/prejudicando o desenvolvimento do patógeno. De acordo com Stamford et al. (2005), as propriedades físicas e químicas dos solos influenciam direta e indiretamente processos críticos para os micro-organismos fitopatogênicos e seus hospedeiros, as plantas. A sobrevivência e a dispersão de propágulos, a infecção do hospedeiro e a reprodução dos micro-organismos, bem como o crescimento e a reprodução das plantas, são afetados pelas propriedades físico-químicas do solo, as quais determinam a sua disponibilidade de água, oxigênio, nutrientes e calor no ambiente edáfico. Mizubuti e Maffia (2009) afirmaram que o efeito do pH e dos nutrientes do solo se dá sobre o crescimento e a susceptibilidade do hospedeiro, na multiplicação e atividade de patógenos ou na interação entre hospedeiro e patógeno. Segundo Agrios (2005), um enfraquecimento do hospedeiro através de nutrição alterada induzida por solos mais ácidos, agravaria a severidade da doença. No entanto, pH superior a 7,5 e altas concentrações de carbonato de cálcio, ferro, zinco e outros microelementos essenciais, tornam muitos

elementos essenciais, indisponíveis para as plantas ou quaisquer micro-organismos do solo.

Cada patógeno possui suas especificidades quanto às propriedades edáficas que mais afetam seu desenvolvimento, assim como essas propriedades também podem afetar a resistência/suscetibilidade de um hospedeiro específico. Segundo Rodrigues et al. (2002), torna-se necessário conhecer o efeito de cada nutriente e de suas interações no desenvolvimento das doenças. Os mesmos autores relatam, por exemplo, que a calagem e a adubação nitrogenada têm sido utilizadas em excesso para a obtenção de um ganho maior na produtividade agrícola. Entretanto, embora essas práticas agrícolas sejam indispensáveis, elas podem aumentar a ocorrência ou a severidade de danos causados por um determinado patógeno na área. Um estudo mais específico dessas relações entre propriedades químicas do solo e incidência de patógenos foi desenvolvido por Lopes et al. (2008), os quais registraram alta incidência do mal-do-panamá em bananais (doença causada por *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*), em cultivares implantadas em áreas de solo ácido e com baixos níveis de Ca, Mg e Zn. Já Zambolim et al. (2005) relacionaram a influência de nutrientes minerais na ocorrência de diversas doenças causadas por espécies diferentes do gênero *Fusarium*, sendo que as respostas são específicas para cada espécie do gênero, bem como para a cultura hospedeira.

2.3 Variabilidade de agentes fitopatogênicos

Uma espécie, de acordo com o conceito biológico é definida como um grupo de indivíduos que se reproduzem entre si e originam descendentes férteis. Para Grosopo (2005), na maioria dos conceitos utilizados atualmente, está implícita a ideia de que duas espécies devem ser geneticamente distintas uma da outra e reprodutivamente isoladas, seja por barreiras reprodutivas intrínsecas (por exemplo, a incompatibilidade genética), seja por fatores extrínsecos, tais como ecologia ou separação geográfica. Porém, para o mesmo autor citado anteriormente, como cada grupo de organismos possui características especiais, o conceito para um grupo pode ser não aplicável para outro.

O Reino Fungi é um dos que apresentam maiores problemas na definição de espécie, pois pouco se sabe sobre a amplitude das variações entre as populações, sobre os ciclos de vida, que são variados e complexos, e sobre a reprodução (sexual

ou assexual), que, além de extremamente complexa, pode afetar os padrões evolutivos de forma ainda pouco compreendida Petersen e Hughes (1999 apud GROSOPO, 2005). Atualmente, há um grande esforço para inferir o limite de uma espécie fúngica através de sequências de DNA. Entretanto, a maior parte das destas continua sendo delimitada por caracteres morfológicos diagnósticos e pela comparação com espécimes de herbários (WIENS; SERVEDIO, 2000). De acordo com Grosopo (2005), o conceito de espécie difere entre fungos e vegetais superiores ou animais, porque a falta de conhecimento sobre a diversidade fúngica faz com que o conceito morfológico de espécie ainda seja adotado, ou seja, grupos de organismos diferem de outros grupos morfológicamente. Contudo, a diferenciação de espécies através apenas de caracteres morfológicos apresenta muitas falhas, já comprovadas quando se verificaram caracteres genéticos distintos entre grupos antes considerados componentes de uma única espécie.

Estudos sobre a variabilidade de fungos são importantes para o entendimento da dinâmica populacional e definição de estratégias que auxiliem na compreensão da patogenicidade, bem como para o melhoramento genético das espécies que são atacadas, visando à resistência ao fitopatógeno. 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 diferentes isolados de um patógeno podem diferir na severidade da doença induzida no hospedeiro e na velocidade de aparecimento dos sintomas (PARLEVLIE, 1979), componentes da doença (período de incubação, severidade, sintomas produzidos, entre outros) podem ser considerados na caracterização da variabilidade de isolados de um patógeno.

Os fungos apresentam grande variabilidade, que ocorre, muitas vezes, até dentro de uma mesma espécie. Este aspecto é demonstrado com as formas especiais (*formae specialis* - abreviatura f.sp.) que ocorrem quando os patógenos variam intraespecificamente quanto à preferência pelo hospedeiro. Camargo (1995) relatou que, no caso de fungos, pode ocorrer, ainda, de um grupo de organismos atacar apenas determinadas cultivares de uma espécie vegetal ou apresentar diferenças nos sintomas entre diferentes cultivares. Neste caso, pode se tratar de uma raça do patógeno que poderá se desenvolver apenas sob determinadas condições ambientais. O mesmo autor relatou que, dentre os mecanismos geradores

de variabilidade entre fungos, os mais comuns são a mutação e a hibridação. Todavia, outros mecanismos podem estar envolvidos como a heterocariose (anastomose de hifas), a parassexualidade (consequência da heterocariose) e a herança citoplasmática, a qual se manifestará, principalmente quando ocorrer reprodução sexuada. Para Ridley (2006), as variações intraespecíficas podem ser entre populações em um mesmo local ou geográficas, sendo que esta última existe em todas as espécies e pode ser causada por adaptações às condições locais pela seleção natural.

2.4 Identificação morfológica de fungos

Para o desenvolvimento de estudos sobre um determinado patógeno é fundamental o conhecimento de características morfológicas de colônias, micélio e conídios, bem como fisiológicas, como a composição química dos meios de cultura, que determina a eficiência da esporulação e o crescimento micelial dos fitopatógenos (DHINGRA; SINCLAIR, 1995).

Até alguns anos atrás, a identificação por caracteres morfológicos (chaves taxonômicas) era aceita como válida e confiável. Auer e Santos (2007) identificaram a espécie *Fusarium subglutinans* em sementes de *Pinus* spp. utilizando métodos que se baseiam em crescimento em meio seletivo e características de presença de determinadas estruturas do fungo (macroconídios, microconídios e clamidósporos). Poletto et al. (2006) identificaram espécies de *Fusarium* causadores de podridão de raízes em plantios de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.), baseando-se apenas em características morfológicas e fisiológicas, conforme metodologia descrita por Ventura (2000).

Alguns trabalhos mais recentes, em que somente características morfológicas e fisiológicas foram utilizadas para a caracterização dos isolados, utilizaram essas variáveis apenas para verificar a diversidade dos fungos em uma determinada área ou para identificar os fungos que afetam um determinado hospedeiro, porém, não tiveram como objetivo, a identificação das espécies. Pereira et al. (2009), por exemplo, avaliaram a diversidade morfológica dos fungos micorrízicos rizoctonioides isolados de quatro populações de *Epidendrum secundum* (orquídea) através de características culturais e morfológicas (micélio aéreo, margem, aspecto, cor da colônia e número de núcleo por célula, diâmetro da colônia, taxa de crescimento,

largura e comprimento das células monilíoides e diâmetro de hifa), a fim de agrupar os isolados por características semelhantes através de análise multivariada.

Atualmente, há uma tendência de se ignorar a caracterização morfológica dos fungos, o que pode inviabilizar a identificação correta de espécies, visto que a ausência de identificação de colônias pré-identificadas por caracteres morfológicos impede a subsequente construção de bases de dados moleculares desses organismos. Exemplo disso é o que ocorre com o gênero *Pestalotiopsis*. Em artigo recente sobre a descrição de espécies desse gênero, produzido por Maharachchikumbura et al. (2011), os autores relataram que a taxonomia de *Pestalotiopsis* é confusa e que até mesmo o uso de sequências do “GenBank” para identificação de espécies não é totalmente confiável. Os autores ainda comentaram que nem mesmo se sabe se *Pestalotia* e *Pestalotiopsis* são gêneros distintos ou não, já que ambos são morfológicamente muito semelhantes. Isso decorre da falta de caracterização morfológica prévia de culturas do gênero para, na sequência, realizar sua caracterização molecular. Os mesmos autores afirmaram que caracteres morfológicos, especialmente de conídios, podem ser úteis na diferenciação de espécies do gênero. E, ainda, de acordo com Leslie e Summerell (2006), embora as sequências de DNA sejam os caracteres mais utilizados, atualmente, para identificar e delimitar espécies filogenéticas, na prática, qualquer marcador que seja suficientemente informativo, incluindo-se caracteres morfológicos, poderia ser utilizado na delimitação de espécies filogenéticas.

2.5 Identificação molecular de fungos

A taxonomia e a identificação de espécies de fungos fitopatogênicos são, usualmente, baseadas em caracteres morfológicos, porém, em muitos gêneros, tais caracteres são de difícil observação em populações naturais, além de, muitas vezes, serem afetados pelo ambiente (FALEIRO et al., 2003).

Uma forma considerada precisa para a identificação de variabilidade em 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 extensa utilização deve-se, principalmente, à sua simplicidade de uso, rapidez, segurança e amplitude dos resultados obtidos

(TEIXEIRA et al. 2004). O uso do conceito filogenético de espécie por meio da análise filogenética de caracteres variáveis de ácidos nucleicos seria a melhor opção em fungos, porque, uma vez que as espécies descendentes tenham se formado a partir de um ancestral comum, mudanças nas sequências gênicas ocorreriam e poderiam ser reconhecidas antes mesmo de que mudanças na morfologia e reprodução fossem visíveis (TAYLOR et al., 2000).

De acordo com Lima et al. (2008), a classificação ideal deve estar baseada na filogenia dos microrganismos. A interação de classificação e de filogenia é de grande importância, pois permite prever similaridades genéticas entre os microrganismos, fornecendo informações necessárias para a descoberta e avaliação de similaridades genéticas entre linhagens e espécies, resultando em maior compreensão da evolução das espécies de fungos utilizadas.

Uma das técnicas moleculares amplamente utilizadas para a identificação de fungos é a da Reação da Polimerase em Cadeia (PCR), que permite a amplificação de fragmentos específicos de DNA de células fúngicas, vivas ou mortas, mesmo que estejam misturados a outros DNA's (PINHEIRO, 2004). Do ponto de vista evolutivo, a variabilidade genética das populações é importante por determinar o potencial de adaptação do organismo às condições adversas. Já do ponto de vista epidemiológico, a variabilidade patogênica tem implicações diretas no manejo da doença (MICHEREFF et al., 2003), já que, quanto maior a agressividade do patógeno, maior deverá ser o uso de fungicidas ou, mesmo, os cuidados na escolha de material genético resistente.

A região mais utilizada para a identificação molecular de fungos é a denominada "Internal Transcribed Spacer" (ITS), que faz parte da estrutura do gene do RNA ribossômico, o qual é dividido nas regiões 18S, 5.8S e 28S, além dos espaçadores ITS1 e ITS2. Os genes do RNA ribossômico (RNAr) de procariontes e eucariotes foram selecionados para serem sequenciados e utilizados na construção da árvore filogenética de todos os seres vivos. Esses genes possuem sequências mais conservadas filogeneticamente e, portanto, são mais adequados para estudos de biodiversidade (REIS JUNIOR, et al., 2006). Uma das vantagens de se usar sequências de RNAr é sua disponibilidade em bases de dados, o que permite a comparação com outras sequências depositadas (COUTINHO et al., 1999).

A razão da escolha da região ITS para identificação de fungos está no fato desta ser menos suscetível à pressão de seleção e, por isso, ter acumulado maior

porcentagem de mutação que as outras regiões do gene (TYRREL et al., 1997). A região ITS é muito variável em tamanho e sequência, mesmo entre grupos taxonômicos muito próximos (BOTELHO et al., 2005). Fungaro (2000) também afirma que as regiões ITS evoluem rapidamente e, dessa forma, são mais apropriadas para discriminar espécies relacionadas. Como consequência disso, observa-se o grande número de sequências ITS atualmente disponíveis em bancos de dados. Ainda segundo este último autor, o fato de as regiões ITS flanqueadas por segmentos conservados serem relativamente curtas (500 a 800 pb) e aparecerem em grande número de cópias no genoma, permite que sejam amplificadas e sequenciadas com facilidade.

Entretanto, muitas vezes, o sequenciamento de apenas uma região não é suficiente para identificação em nível de espécie, ou uma determinada região é mais eficiente na identificação de alguns organismos que outras. Waalwijk et al. (1996) ressaltaram que a codificação da região ITS não tem sido eficaz para a determinação de algumas espécies de *Fusarium* sp., devido à presença de duas cópias não homólogas dentro da região ITS2, causando divergência nos resultados. Por isso, para esse gênero, existem regiões mais apropriadas e específicas.

De acordo com Geiser et al. (2004), o gene que codifica o fator de alongação 1-alpha tornou-se o marcador mais usual, visto que é um gene de cópia única, altamente informativo entre espécies relacionadas. A região do fator de alongação – 1 – alpha ou TEF -1 α é altamente conservada e está envolvida na tradução, sendo recentemente muito utilizada para estudar a variação intra e interespecífica, bem como para análises de filogenia de uma grande variedade de grupos de eucariotos (O'DONNELL et al., 1998). Os genes que codificam para fator de alongação-1- α são constitutivamente expressos e estão presentes em todas as fases do desenvolvimento, como o relatado para o fungo *Phytophthora infestans* (VAN'T KLOOSTER et al., 2000). Para os mesmos autores, devido à conservação nucleotídica, esses genes tem sido utilizados em análises filogenéticas devido à baixa taxa de mutação dos nucleotídeos nas sequências.

Outra região que pode ser sequenciada e que é muito utilizada para identificação de espécies do gênero *Pestalotiopsis* é a da β -tubulina. Hu et al. (2007) utilizaram as regiões ITS e β -tubulina para a identificação de espécies endofíticas de *Pestalotiopsis* e concluíram que a região ITS é menos informativa quando comparada com a da β -tubulina. Porém, os autores recomendam a incorporação de,

ao menos, dois genes a serem sequenciados para que a filogenia seja mais eficientemente resolvida. As tubulinas estão entre os principais componentes dos microtúbulos, estruturas responsáveis pela formação do citoesqueleto, que exercem importantes funções celulares e estão entre as proteínas mais altamente conservadas em organismos eucarióticos (WADE, 2007). Apesar do elevado grau de conservação ao nível das proteínas, os genes da β -Tubulina são ricos em íntrons e são, portanto potencialmente úteis na filogeografia fúngica (O'DONNELL et al., 2000).

2.6 *Fusarium* spp.

O gênero *Fusarium*, conforme Index Fungorum (2012), pertence ao Reino Fungi, Divisão Ascomycota, Subdivisão Pezizomycotina, Classe Sordariomycetes, Sub-classe Hypocreomycetidae, Ordem Hypocreales e Família Nectriaceae.

Esse gênero exibe alto grau de diversidade em relação a atributos morfológicos, fisiológicos e ecológicos, e não é surpreendente que representantes desse gênero ocorram, na maioria dos nichos ecológicos, nas mais diversas regiões geográficas do mundo (BURGESS et al., 1997). Pode ocorrer, especialmente, em locais de climas tropicais e subtropicais e é capaz de sobreviver por longos períodos no solo pela formação de estruturas chamadas clamidósporos (MILANESI, 2009). Ainda, segundo o último autor, pode colonizar ramos, folhas, inflorescências e frutos através de seus conídios, que são disseminados pelo ar ou pela água, pela complexidade do sistema solo e pela diversidade de espécies existentes nesse ambiente. A variabilidade genética dentro do gênero *Fusarium* é bastante ampla.

Certas espécies de *Fusarium* foram encontradas em todos os solos examinados em áreas da América Central, sendo classificadas como habitantes do solo, enquanto outras foram verificadas somente em localidades específicas e classificadas como invasoras do solo, dentre as quais *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*, agente causal do mal-do-panamá (MICHEREFF et al., 2005). Ainda, segundo os mesmos autores, espécies do gênero podem atacar sementes, sendo que a ocorrência de tempo úmido durante a maturação dos grãos, colheita ou armazenamento pode levar à podridão de sementes por esses fungos ou aumentar a podridão após o plantio.

Espécies de *Fusarium* são associadas a doenças de grande importância como: *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*, causador do mal-do-panamá em bananeira; *Fusarium solani* causador da podridão do caule em café, da podridão de fusário em *Citrus* sp. e da podridão-radicular-vermelha em soja; *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* causador da murcha-do-fusário em feijão, *Fusarium oxysporum* f.sp. *glycines* causador da murcha-do-fusário em soja, *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* causador da murcha-do-fusário em tomateiro (MICHEREFF et al., 2005). A espécie *F. oxysporum* apresenta inúmeras *formae specialis*, que se especializaram em atacar diversos hospedeiros. Além de doenças associadas às raízes e colo, esse gênero também pode causar sintomas na parte aérea: Bastos e Santos (2001) observaram sintomas de desenvolvimento anormal de superbrotamento das inflorescências a partir do eixo floral, com inchamento dos talos florais, queda prematura de flores e frutos jovens, bem como a total seca dos talos em plantas de limão-de-caiena (*Averrhoa bilimbi*) atacadas por *Fusarium decemcellulare*. Esta é a mesma espécie causadora da galha-de-pontos-verdes em plantas de cacau (*Theobroma cacao*), caracterizada por intumescimento anormal das almofadas florais e excessiva produção de botões florais, resultando na não formação de frutos (DALLA PRIA; CAMARGO, 1997). Em noqueira-pecan, Alvidrez-Villareal (2012) isolaram alguns fungos a partir de uma praga (*Euplatypus segnis*) da espécie e testaram sua patogenicidade, sendo que, dentre os organismos testados, foram identificados *Fusarium solani* e *F. oxysporum* como patogênicos para a espécie causando murcha de ramos.

As espécies do gênero *Fusarium* são classificadas com base nas suas características morfológicas, como morfologia da colônia, pigmentação e taxa de crescimento, especificidade de hospedeiros, dentre outras. Devido à plasticidade e às variações de características fenotípicas desse gênero, os marcadores morfológicos não são suficientes, o que tem levado a uma série de discordâncias na especiação desses fungos (OLIVEIRA; COSTA, 2002). Sendo assim, a sistemática molecular, que tem por base as relações filogenéticas, é uma ferramenta que oferece considerável segurança no estabelecimento de um sistema complementar de classificação para fungos, auxiliando na definição de alguns grupos taxonômicos e na designação mais precisa da posição desses micro-organismos (ONO et al., 2010).

2.7 *Pestalotiopsis* spp.

Fungos do gênero *Pestalotiopsis* (sinonímia: *Pestalotia*) pertencem à subdivisão Deuteromycotina, Classe Coelomycetes e ordem Melanconiales, pois seus conídios ou esporos de reprodução são formados por picnídios ou acérvulos. Seus conídios apresentam quatro septos transversais com três secções intermediárias pigmentadas e as duas células das extremidades são hialinas. Na extremidade apical do conídio estão presentes dois ou três apêndices filiformes. Já os conidióforos são curtos e simples em acérvulos circulares superepidermais e escuros. Esse fungo costuma causar manchas em folhas e grãos de várias plantas (CARDOSO, 1978).

O gênero *Pestalotiopsis* necessita de intenso estudo a respeito de sua morfologia, pois ainda há contradições quanto à existência de separação ou unidade com o gênero *Pestalotia*. Morfologicamente, existem descrições que indicam algumas diferenças entre os dois, sugerindo serem gêneros distintos (STEYAERT, 1949 apud MAHARACHCHIKUMBURA et al., 2011), sendo que conídios de espécies de *Pestalotia* teriam seis células, enquanto aqueles de *Pestalotiopsis* teriam cinco células. Contudo, o número de células não pode ser considerado o único parâmetro para diferenciação, já que Guba (1961 apud MAHARACHCHIKUMBURA et al., 2011) separaram o gênero *Pestalotia* em seções, as quais se baseiam no número de células do conídio, que pode conter quatro, cinco ou seis células.

Em estudo realizado por Dude e Bilgrami (1966), 57 isolados de *Pestalotia/Pestalotiopsis* foram obtidos de vários hospedeiros com sintomas de mancha foliar, para que fosse realizada a descrição das suas características morfológicas, de utilidade para a diferenciação dos gêneros. Os autores encontraram variações no número de células e na forma de conídios em isolados coletados a partir do mesmo hospedeiro, portanto, concluíram que seria preferível manter todos os isolados no gênero originalmente descrito (*Pestalotia*) do que dividir organismos tão semelhantes. Em pesquisas recentes, os autores se referem aos dois gêneros como sinonímia, ao invés de se posicionarem a respeito de que gênero exatamente se trataria, tendo em vista que essa resposta ainda parece incerta. Elliott (2006) descreveu as doenças encontradas em palmeiras como causadas por *Pestalotiopsis* (*Pestalotia*); Cardoso et al. (2003) realizaram estudo sobre etiologia

e progresso da mancha de *Pestalotia* do coqueiro, se referindo ao agente causal como sendo do gênero *Pestalotia* (*Pestalotiopsis*).

Independente disso existem alguns relatos desse patógeno causando manchas foliares, em várias espécies florestais e frutíferas. Ueno (2008) relatou que o fungo *Pestalotia* sp. ataca amoreira-preta causando uma mancha foliar caracterizada pelo aparecimento de pequenas manchas necróticas. Os frutos também são afetados e apresentam lesões necróticas escuras e deprimidas. Sua disseminação é feita, principalmente, pelo vento, insetos e respingos de chuva. Keith et al. (2006) encontraram várias espécies de *Pestalotia*, tais como *P. clavispora*, *P. microspora* e *P. disseminata*, associadas a manchas foliares e verrugoses em frutos de goiabeira (*Psidium guajava*) no Hawaii. Espinoza e Briceño (2008) encontraram *Pestalotiopsis clavispora*, *P. neglecta* e *Truncatella* (=Pestalotia) *angustata* associadas a sintomas de cancos e morte de plantas de mirtilo (*Vaccinium* spp.) no Chile, sendo comprovada a patogenicidade dos isolados das espécies citadas. Akrofi e Amoah (2009) relataram que *Pestalotia* spp. foi o agente patogênico responsável pelos sintomas de manchas foliares em carité (*Vitellaria paradoxa*) em Ghana, no continente africano. Alfenas et al. (2009) associaram *Pestalotiopsis* sp. a lesões necróticas em folhas e haste de estacas e miniestacas de *Eucalyptus* spp. Embora não seja conhecida a espécie que ataca o eucalipto no Brasil, *P. disseminata*, *P. funerea*, *P. mangiferae* e *P. neglecta* foram encontradas em outros países.

Espécies patogênicas de *Pestalotiopsis* entram em contato com o hospedeiro, primeiramente (inóculo primário), por meio de conídios (ESPINOZA; BRICEÑO, 2008). Esse inóculo pode sobreviver durante condições climáticas adversas e pode causar infecções primárias. A fonte do inóculo primário pode ser plantas nativas ou voluntárias (KEITH et al. 2006), flores, restos culturais, solo, ferramentas contaminadas e água da irrigação (ELLIOTT et al. 2004). Espécies de *Pestalotiopsis* têm sido constantemente isoladas como endofíticas de tecidos vegetais (TEJESVI et al. 2009).

A fase sexuada é pouco conhecida para a maior parte das espécies do fungo, no entanto, sabe-se que algumas já reconhecidas são Ascomicetos. Porém, alguns gêneros foram relacionados como sendo a fase sexual de *Pestalotiopsis*, tais como *Pestalosphaeria* (BARR, 1975 apud MAHARACHCHIKUMBURA et al., 2011) e *Neobroomela* (KIRK et al., 2008).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção e purificação dos isolados de *Fusarium* spp. e *Pestalotiopsis* spp.

As coletas de amostras foram realizadas em plantios de noqueira-pecan em diversos pomares de municípios do estado do Rio Grande do Sul ou em árvores isoladas encontradas na arborização urbana no município de Santa Maria. Todos os pontos de coleta foram georreferenciados com auxílio de um equipamento Global Positioning System (GPS). Os municípios de onde os isolados foram coletados são os seguintes: Cachoeira do Sul, Santa Maria, Mata, Santa Rosa, Anta Gorda, Sentinela do Sul e Santana do Livramento (Figura 1). Em Cachoeira do Sul, foram três pontos de coleta, referentes a três empresas produtoras de noz-pecan e, em Santana do Livramento, foram dois pontos de coleta, referentes a duas propriedades com diferença na idade dos pomares. Porém, em alguns pontos não houve incidência de plantas sintomáticas. As coordenadas geográficas e datas de coleta dos isolados são apresentadas na Tabela 1.

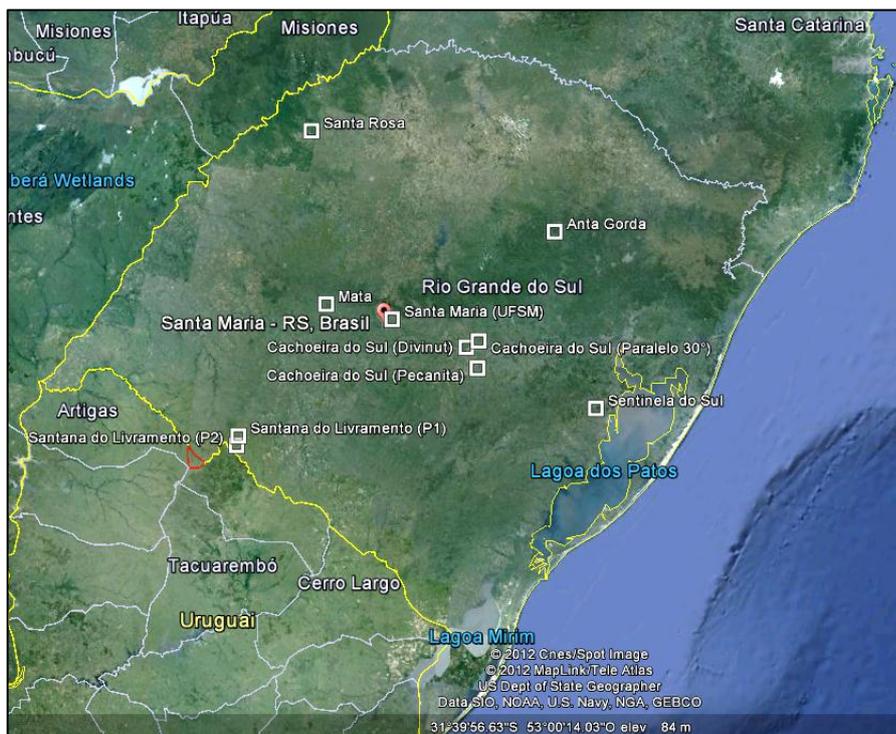


Figura 1 - Pontos de coleta de isolados de *Fusarium* spp. e de *Pestalotiopsis* spp. em plantios de noqueira-pecan, no Rio Grande do Sul (Fonte: Google Earth), 2012.

Tabela 1 – Coordenadas dos pontos de coleta de isolados fúngicos provenientes de pomares de noqueira-pecan no RS.

Município*	Data	Coordenadas (GMS)	Elevação (m)
Cachoeira do Sul	Nov/10	29°59'45" – 52°55'22"	114
Mata	Dez/10	29°31'3" – 48°27'39"	208
Sentinela do Sul	Março/11	30°34' 35,6"-51°31'44,8"	101
Santana do Livramento (P1)	Março/11	30°46'53,2" -55°26'2,4"	191
Santana do Livramento (P2)	Março/11	30°52'9,3"-55°27'28,0"	212
Santa Rosa	Junho/11	27°55'12,9" - 54°32'50,7"	268
Anta Gorda	Janeiro/11	28°53'54,7" – 52°01'59,9"	514
Santa Maria (P1)	Março/11	29°43'13,5"- 53°44'1,9"	90
Santa Maria (P2)	Nov/2010	29°43'13,0"- 53°43'1,9"	88

* Santana do Livramento (P1): pomar com cinco anos de implantação, Santana do Livramento (P2): pomar com mais de 30 anos de implantação; Santa Maria (P1): área na localidade de Pains; Santa Maria (P2): área pertencente à UFSM.

O material vegetal coletado a campo (flores, folhas, frutos e raízes) foi devidamente identificado e, logo após, levado para o Laboratório de Fitopatologia Elocy Minussi do Departamento de Defesa Fitossanitária do Centro de Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Maria, 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° C, com 12 h de fotoperíodo por, aproximadamente, quatro dias, para que a identificação dos fungos fosse facilitada. Em seguida, o material foi observado em microscópios estereoscópico e óptico para verificação da presença do patógeno. Em caso positivo, com a ajuda de uma agulha histológica, estruturas do patógeno foram transferidas para placas de Petri contendo meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA), conforme recomendado por Alfenas et al. (2007). Após dez dias de crescimento, os isolados crescidos em BDA foram purificados conforme a técnica de cultura monospórica, descrita por Fernandes (1993), e armazenados em BDA para posterior utilização.

3.2 Caracterização química do solo das áreas de coleta

Nas áreas de coleta onde se observaram plantas sintomáticas, foram coletadas, também, amostras de solo para verificar a possível relação entre algumas propriedades químicas do solo e a incidência dos patógenos. A coleta de solo foi feita nas entrelinhas, fazendo-se a gradagem com pá de corte na profundidade de até 40 cm, retirando-se a camada superior composta de restos vegetais. Em cada ponto, foram coletadas cinco subamostras, as quais foram, posteriormente, homogeneizadas formando uma amostra composta (Figura 2).

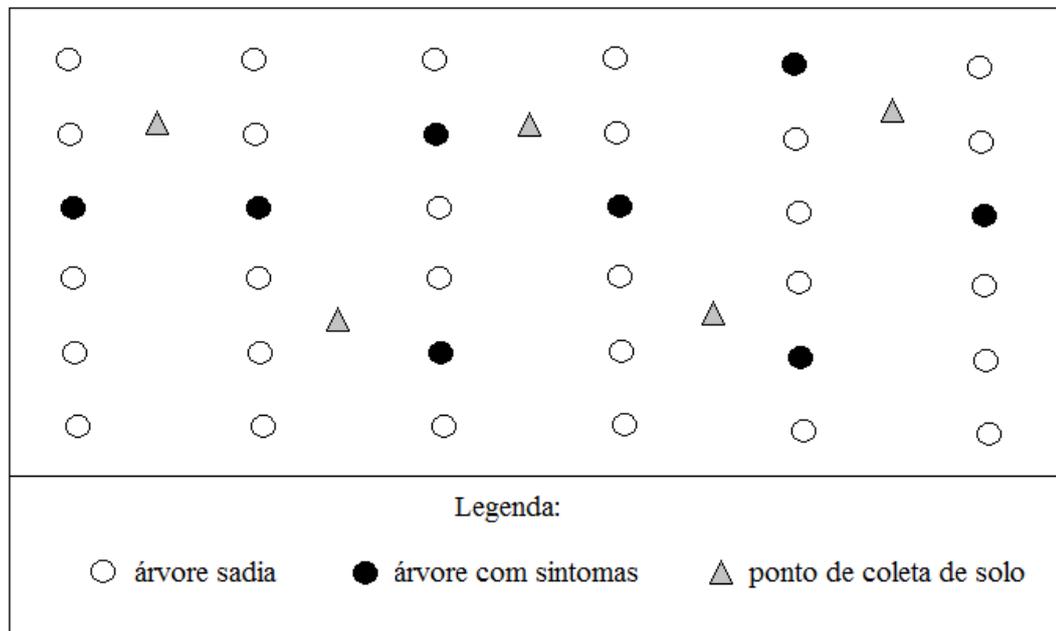


Figura 2 - Esquema de amostragem de solo em plantios de noqueira-pecan no Rio Grande do Sul.

3.3 Patogenicidade dos isolados de *Fusarium* spp.

a) Produção do inóculo: a partir de 16 isolados de *Fusarium* spp. (F₁, F₃, F₅, F₆, F₇, F₈, F₉, F₁₁, F₁₄, F₁₅, F₁₇, F₁₈, F₁₉, F₂₀, F₂₁ e F₂₃), obtidos de raízes e flores de noqueira-pecan que foram isolados e purificados conforme descrito no item 3.1, procedeu-se a multiplicação por meio de grãos de milho inoculados que seriam incorporados no substrato, seguindo-se os procedimentos descritos na sequência.

b) Inoculação de *Fusarium* spp. em grãos de milho: grãos de milho foram embebidos em água à temperatura ambiente por, cerca de oito horas sendo, após, o

excesso de água descartado. Aproximadamente 80 g desses grãos foram colocados em frascos de vidro de 100 mL para serem autoclavados por 40 min, duas vezes, em um intervalo de 24 h. Após o resfriamento, foram transferidos para cada frasco cinco discos de meio de cultura, de 5 mm de diâmetro, contendo o micélio do patógeno. Os frascos foram incubados a 24°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 sem o patógeno nos frascos, sendo os demais procedimentos realizados conforme descrito anteriormente;

c) Inoculação nas mudas: bandejas plásticas (capacidade aproximada de 7 L) com orifícios na parte inferior foram preenchidas com substrato comercial (composição: turfa de Sphagno, vermiculita expandida, calcário dolomítico, gesso agrícola e fertilizante NPK, densidade de 101 kgm⁻³), em, aproximadamente, metade de sua capacidade. Em seguida, o inóculo produzido em grãos de milho de um frasco foram misturados ao substrato, sendo este, então, umedecido com água destilada estéril. Posteriormente, fez-se a semeadura de 20 sementes de noqueira-pecan, divididas em quatro repetições de cinco sementes, as quais foram cobertas com uma camada de substrato, o qual foi umedecido novamente (Figura 3 – A). As sementes foram previamente lixadas manualmente na extremidade oposta ao embrião para superação de dormência. As bandejas foram mantidas em sala climatizada, com temperatura em torno de 25°C±2°C e fotoperíodo de 12 h por até 90 dias (Figura 3 – B);

d) Avaliações: as mudas foram observadas diariamente, até os 90 dias, para possível manifestação de sintomas e determinando-se ao final do período a incidência da doença em percentagem. Depois de confirmada a patogenicidade, foi feito o reisolamento, em meio BDA, do patógeno responsável pelos sintomas para posterior identificação da espécie. Para cada muda sintomática, foi especificado o tipo de sintoma observado. Além das observações nas mudas, as sementes também foram analisadas com o objetivo de verificar eventuais tombamentos de pré-emergência.

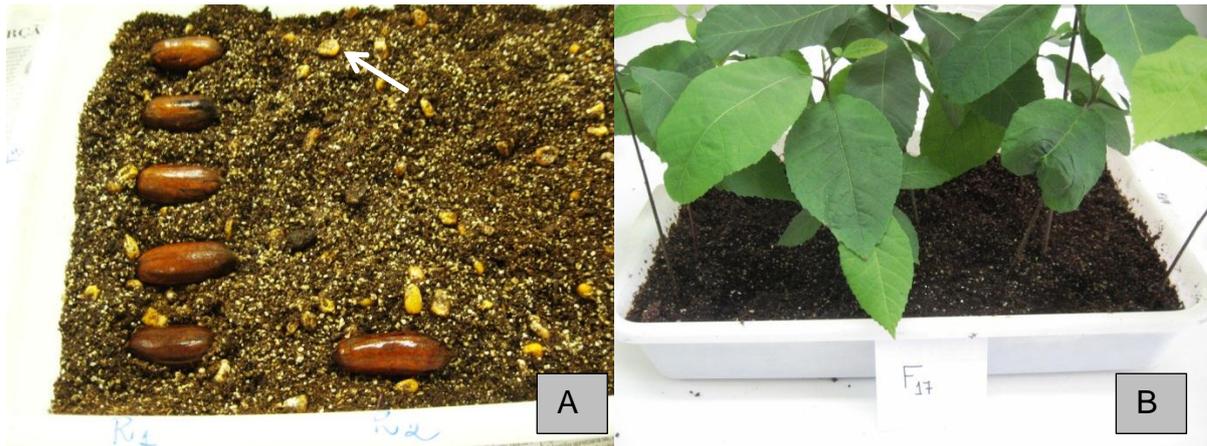


Figura 3 - Patogenicidade de isolados de *Fusarium* spp. inoculados em substrato. Semeadura após a incorporação do inóculo (A); mudas desenvolvidas após 90 dias da inoculação (B).

3.4 Patogenicidade dos isolados de *Pestalotiopsis* spp.

3.4.1 Preparo da suspensão de esporos

Para a obtenção de suspensão de esporos, colônias dos fungos foram cultivadas em meio BDA a 25°C e com fotoperíodo de 12 h. Após 15 dias de crescimento, foram adicionados 20 mL de água destilada em cada placa e, com o auxílio de um bastão de vidro. Para tanto, foi realizada uma raspagem na superfície do meio, sendo a suspensão escorrida para um béquer. A contagem da concentração de esporos foi efetuada com o auxílio da câmara de Neubauer. Para a inoculação, a suspensão deveria ter, no mínimo, 1×10^6 esporos.mL⁻¹, segundo Alfenas e Ferreira (2007). Assim, adotou-se a concentração de 2×10^6 esporos/ml. O ajuste da concentração de esporos foi realizado através da expressão: $V_f = V_i \times C_i / C_f$, onde V_f = volume final da suspensão; V_i = volume inicial da suspensão; C_i = concentração inicial de esporos.mL⁻¹ contada na câmara de Neubauer; e C_f = concentração de esporos.mL⁻¹ desejada.

3.4.2 Inoculação

A inoculação da suspensão de esporos foi realizada com todos os isolados de *Pestalotiopsis* spp. coletados, totalizando 14 isolados (P₁, P₂, P₃, P₄, P₅, P₆, P₇, P₉, P₁₀, P₁₁, P₁₂, P₁₃, P₁₄ e P₁₆). Para tanto, foram utilizadas oito mudas provenientes de

sementes (pés-francos), divididas em quatro repetições de duas mudas para cada isolado. Também foi incluído um tratamento controle, em que não houve inoculação do patógeno. A inoculação foi realizada com a atomização da suspensão sobre as folhas de noqueira-pecan e, a seguir, a planta permaneceu por 72 h em condições de câmara úmida (Figura 4), a fim de que o inóculo permanecesse em condições ambientais favoráveis para dar início aos processos de germinação e penetração nos tecidos do hospedeiro. Alfenas e Ferreira (2007) esclareceram que esse tempo é variável de acordo com o patógeno e o hospedeiro, sendo que, em geral, para folhas, este tempo varia entre 12 e 96 h. As mudas permaneceram em casa de sombra, sem controle de temperatura, cobertas com sombrite a 50%, com irrigação diária até as avaliações.



Figura 4 – Modelo de câmara úmida utilizada para inoculação de fungos em vasos [Adaptado de Alfenas e Ferreira (2007)].

3.4.3 Avaliações

Aos 45 dias da inoculação das plantas, observaram-se os sintomas provocados por cada um dos isolados, para que se identificassem aqueles patogênicos, a incidência e a severidade da doença, conforme escala construída. Depois de confirmada a patogenicidade, foi feito o reisolamento do patógeno em meio batata-dextrose-ágar (BDA) responsável pelos sintomas para posterior identificação da espécie.

3.4.4 Construção da escala

Inicialmente, uma escala nominal foi elaborada para o gênero, considerando a severidade identificada visualmente. Essa escala foi utilizada para a avaliação da severidade de cada isolado inoculado, considerando que não havia identificação da espécie nesse momento.

Conjuntamente, uma escala diagramática foi construída para classificar os níveis de severidade de cada isolado e para que pudesse ser utilizada em estudos futuros de avaliação de suscetibilidade/resistência de cultivares de noqueira-pecan. Para a elaboração da escala diagramática, folhas atacadas a campo foram identificadas quanto ao gênero fúngico e, em seguida, escaneadas aleatoriamente. Foram selecionadas 20 fotos, as quais foram digitalizadas em *scanner* com resolução de 200 dpi. Em seguida, determinou-se a porcentagem de área lesionada, por meio do Software ImageJ versão 1.32j (Wayne Rasband National Institute of Health, USA), fazendo-se a medida da área total da folha e da área afetada e calculando-se, posteriormente, a área lesionada em porcentagem. Os valores mínimo e máximo de severidade foram considerados como, respectivamente, o limite inferior e o limite superior de doença, sendo representados nos níveis iniciais e finais da escala. Os níveis intermediários da escala foram determinados de acordo com a acuidade da visão humana definida pela “lei do estímulo-resposta de Weber-Fechner” (HORSFALL; COWLING, 1978).

Após a construção de ambas as escalas, as duas foram unidas, formando uma escala única, nominal e diagramática, com o mesmo número de classes ou níveis de severidade.

3.4.5 Inoculação em frutos

Esse experimento foi realizado após os resultados da caracterização morfológica e identificação molecular dos isolados e, por isso, selecionaram-se cinco isolados de *Pestalotiopsis* spp., que difeririam geneticamente entre si (P₄, P₇, P₁₀, P₁₁, e P₁₆) – item 4.8.

Foi realizada uma coleta de frutos verdes no mês de março de 2012, em árvores de noqueira-pecan em frutificação, na área da Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS. Os frutos passaram por assepsia prévia, anterior à

inoculação, da seguinte forma: imersão em etanol a 70% (v/v) por 30 s, seguida de imersão em hipoclorito de sódio a 1% (v/v) por 2 min. e, após, imersão em água destilada por 2 min. Posteriormente, os frutos ficaram sobre papel-filtro por, aproximadamente, 20 min para a perda do excesso de umidade. Foram testados cinco isolados de *Pestalotiopsis* spp., além da testemunha. Para cada isolado, foram utilizados 20 frutos divididos em quatro repetições.

O preparo da suspensão foi realizado conforme descrito no item 3.4.1, mantendo-se a concentração de $2,0 \times 10^6$ esporos.mL⁻¹. Os frutos foram colocados em caixas plásticas previamente desinfetadas com etanol a 70% e forradas com duas folhas de papel-filtro umedecido com água esterilizada. A inoculação foi feita aplicando-se três gotículas de 0,1 mL em cada fruto (Figura 5), de forma que a lesão ficasse localizada, evitando que sintomas causados pela inoculação fossem confundidos com danos mecânicos pré-existentes nos frutos. Na testemunha, foram colocadas apenas três gotículas de água destilada estéril.



Figura 5 – Inoculação de *Pestalotiopsis* spp. em frutos verdes de noqueira-pecan, através de gotículas de suspensão de esporos.

Após a inoculação, os frutos permaneceram em sala climatizada sob temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12 h por 14 dias, quando foi realizada a avaliação da incidência em percentagem.

3.5 Caracterização morfofisiológica dos isolados patogênicos de *Fusarium* spp. e *Pestalotiopsis* spp.

A caracterização morfofisiológica foi realizada somente com os isolados patogênicos, totalizando 12 isolados de *Fusarium* spp. e 11 isolados de *Pestalotiopsis* spp. As avaliações morfofisiológicas foram baseadas em metodologia descrita por Michereff et al. (2003), na qual cada isolado foi avaliado pelos parâmetros apresentados na sequência.

- Taxa de crescimento micelial: 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. Para isso, utilizaram-se quatro repetições, sendo cada uma constituída por uma placa. O crescimento micelial de cada isolado foi avaliado diariamente, até sete dias de incubação, pela mensuração da média do diâmetro da colônia em dois sentidos diametralmente opostos.
- Esporulação: foi avaliada aos dez dias de incubação, pela adição de 20 mL de água destilada estéril em cada placa utilizada para avaliação do crescimento micelial, raspagem das colônias e peneiramento em camada dupla de gaze, para a posterior estimativa da concentração de conídios (conídios.mL⁻¹), com o auxílio da câmara de Neubauer.
- Pigmentação das colônias: observação e anotação da pigmentação das colônias e do micélio aéreo, no caso de este estar presente.
- Caracterização de conídios: a partir de suspensão de conídios do fungo em água destilada esterilizada (2 mL), foi pipetada uma amostra sobre uma lâmina de microscopia para observação dos conídios. A largura e o comprimento foram medidos em microscópio ótico, com micrômetro acoplado, na magnitude de 40 x. Para cada isolado, foram medidos 30 conídios. Também foi contado o número de septos do macroconídio (*Fusarium* spp.), número de células do conídio e número de apêndices filiformes (*Pestalotiopsis* spp.).

Para *Fusarium* spp., foi realizada, também, a repicagem dos isolados para meio folha-de-cravo-ágar - CLA (NELSON, 1983), a fim de se verificar a forma de macroconídios, formação de microconídios e presença ou ausência de clamidósporos (LESLIE; SUMMERELL, 2006). Na ausência de formação de

macroconídios nos meios BDA e CLA, os isolados foram, também, repicados para meio batata-sacarose-ágar (BSA), que, segundo Alfenas et al. (2007), é um meio específico para a indução de esporulação em fungos desse gênero.

3.6 Caracterização molecular dos isolados patogênicos de *Fusarium* spp. e de *Pestalotiopsis* spp.

Com os isolados de *Fusarium* spp. e *Pestalotiopsis* spp. já selecionados como patogênicos e identificados com os códigos de cada isolado, foi realizada a extração de DNA do patógeno, 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), como, também, para sequenciamento do fator de alongação -1 - alpha (para *Fusarium* spp.) , com o par de primers EF1-T (ATGGGTAAGGARGACAAGAC) e EF1-1567R (ACHGTRCCRATACCACCRATCTT) (REHNER; BUCKLEY, 2005); beta-tubulina (para *Pestalotiopsis* spp.), amplificado com o par de primers Btub-F (AAGGGHCAYTAYACYGARGG) e Btub-R (CATGTTGGACTCDGCCTC).

A reação foi realizada com 30 ng de DNA, tampão 10X, 2,5 µM de cada dNTP, 20 nM de MgCl₂, 25 pmoles da 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 utilizando-se o 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 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 (<http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/findmodel/findmodel.html>), o qual 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 Análise dos dados

Para avaliação dos resultados da patogenicidade, para a qual se compararam apenas os isolados de *Fusarium* spp. e *Pestalotiopsis* spp. (patogenicidade de frutos), realizou-se análise de variância, tendo como fontes de variação os diferentes isolados. As variáveis médias foram comparadas pelo Teste de Scott-Knott (para *Fusarium* spp.) e pelo teste de Tukey (para *Pestalotiopsis* spp.), ambos ao nível de 5% de probabilidade de erro, através do programa estatístico Sisvar versão 5.3 (FERREIRA, 2008).

Os dados quantitativos de caracterização morfofisiológica foram submetidos a uma técnica de análise multivariada para agrupamento dos isolados de *Fusarium* spp. e *Pestalotiopsis* spp., executada no programa GENES (versão 2009.7.0). A matriz de distância Euclidiana padronizada (D^2) foi calculada como medida de dissimilaridade e utilizada para agrupamento dos isolados pelo método “Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean” - UPGMA (CRUZ, 2008).

A sequência obtida de cada isolado foi alinhada com sequências disponíveis no banco de dados através do Basic Local Alignment Search Tool – BLAST, sendo que, para cada isolado, foram escolhidas de 10 a 15 sequências com maior

cobertura e similaridade. Após, as sequências escolhidas através do programa, juntamente com a sequência do isolado, foram alinhadas utilizando-se o programa BioEdit (HALL, 1999). A construção do dendrograma filogenético foi realizada utilizando o melhor método estabelecido segundo *software* online FindModel, o qual utiliza as sequências alinhadas para estabelecimento do melhor modelo para construção dos dendrogramas, sempre com 1000 replicatas (*bootstrap*), através do programa MEGA versão 4 (TAMURA et al, 2007). No caso de isolados diferentes terem se alinhado com as mesmas sequências no BLAST, estes foram unidos na construção do dendrograma filogenético por apresentaram grande semelhança genética.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Isolados coletados

Os isolados fúngicos identificados, bem como as descrições de partes das plantas afetadas, procedência e data de coleta encontram-se na Tabela 2. Detectou-se a presença de *Fusarium* spp. isolado em flores e raízes de noqueira-pecan. A ocorrência de *Fusarium* spp. em raízes se deu em mudas em viveiro que apresentaram sintomas reflexos, tais como murcha ou anelamento do colo (procedência – Cachoeira do Sul), e em plantas a campo com crescimento reduzido ou superbrotamento.

Tabela 2 - Gêneros fúngicos, procedência e data de coleta dos isolados obtidos de flores, raízes e folhas de noqueira-pecan.

Flores					
Código	Gênero	Cultivar	Sexo flor	Procedência	Coleta
F ₁	<i>Fusarium</i>	Pé-franco	Andróica	Santa Maria	Outubro/10
F ₃	<i>Fusarium</i>	Pitol 2	Andróica	Anta Gorda	Outubro/10
F ₆	<i>Fusarium</i>	Pé-franco	Andróica	Santa Maria	Outubro/10
F ₇	<i>Fusarium</i>	Pé-franco	Andróica	Santa Maria	Outubro/10
F ₈	<i>Fusarium</i>	Pé-franco	Andróica	Santa Maria	Outubro/10
F ₁₄	<i>Fusarium</i>	Pitol 2	Ginóica	Anta Gorda	Janeiro/11
F ₁₅	<i>Fusarium</i>	Pé-franco	Ginóica	Santa Maria	Novembro/10

Raízes					
Código	Gênero	Cultivar	Procedência	Coleta	
F ₅	<i>Fusarium</i>	Barton	Cachoeira do Sul	Novembro/10	
F ₉	<i>Fusarium</i>	Barton	Mata	Dezembro/10	
F ₁₁	<i>Fusarium</i>	Barton	Mata	Dezembro/10	
F ₁₇	<i>Fusarium</i>	Barton	Santa Maria (P1)	Março/11	

Sementes					
Código	Gênero	Cultivar	Procedência	Coleta	
F ₁₈	<i>Fusarium</i>	Pitol 2	Anta Gorda	Agosto/11	
F ₁₉	<i>Fusarium</i>	Pitol 2	Anta Gorda	Agosto/11	

F ₂₀	<i>Fusarium</i>	Pitol 2	Anta Gorda	Agosto/11
F ₂₁	<i>Fusarium</i>	Pitol 2	Anta Gorda	Agosto/11
F ₂₃	<i>Fusarium</i>	Pitol 2	Anta Gorda	Agosto/11
Folhas				
Código	Gênero	Cultivar	Procedência	Coleta
P ₁	<i>Pestalotiopsis</i>	Amam	Anta Gorda	Maio/10
P ₂	<i>Pestalotiopsis</i>	Sucess	Anta Gorda	Maio/10
P ₃	<i>Pestalotiopsis</i>	Melhorada	Anta Gorda	Maio/10
P ₄	<i>Pestalotiopsis</i>	Barton	Anta Gorda	Maio/10
P ₅	<i>Pestalotiopsis</i>	Pé-franco	Santa Maria (P2)	Outubro/10
P ₆	<i>Pestalotiopsis</i>	Barton	Santa Rosa	Junho/11
P ₇	<i>Pestalotiopsis</i>	Pé-franco	Sentinela do Sul	Março/11
P ₉	<i>Pestalotiopsis</i>	Sucess	Anta Gorda	Janeiro/11
P ₁₀	<i>Pestalotiopsis</i>	Sucess	Anta Gorda	Janeiro/11
P ₁₁	<i>Pestalotiopsis</i>	Barton	Santa Rosa	Junho/11
P ₁₂	<i>Pestalotiopsis</i>	Barton	Santa Rosa	Junho/11
P ₁₃	<i>Pestalotiopsis</i>	Barton	Santa Rosa	Junho/11
P ₁₄	<i>Pestalotiopsis</i>	Pitol 2	Anta Gorda	Março/11
P ₁₆	<i>Pestalotiopsis</i>	Pé-franco	S. Livramento (P2)*	Março/11

* Santana do Livramento (P1): pomar com cinco anos de implantação, Santana do Livramento (P2): pomar com mais de 30 anos de implantação; Santa Maria (P1): área na localidade de Pains; Santa Maria (P2): área pertencente à UFSM.

O gênero *Fusarium* também foi encontrado em inflorescências ginóicas e andróicas da espécie, no presente estudo. A colonização das flores pode gerar transmissão desse fungo para o fruto no momento de sua formação e, conseqüentemente, para a semente, servindo, desta forma, como inóculo inicial no solo, em áreas isentas. A transmissão de fungos via semente para a plântula em espécies florestais já foi verificada em sementes de ipê-amarelo (*Tabebuia serratifolia*) e ipê-roxo (*Tabebuia impetiginosa*), em estudo desenvolvido por Botelho et al. (2008). Pesquisas com o objetivo de verificar a transmissão de *Fusarium* spp. da semente para a plântula são bastante desenvolvidas em espécies agrícolas. Entre elas, está a de Sartori et al. (2004), realizada com sementes de milho, na qual foi confirmada a transmissão de *Fusarium moniliforme*. Balardin et al. (2005) constataram a transmissão de *Fusarium solani* f.sp. *glycines*, agente causal da

podridão vermelha da raiz de soja, através das sementes dessa cultura. Em culturas frutíferas e agrícolas, existem algumas doenças de grande importância, causadas pela associação de *Fusarium* spp. com os órgãos reprodutivos, como nos trabalhos desenvolvidos por Bastos e Santos (2001) e Costa et al. (2003).

Fusarium spp. também foi encontrado associado às sementes de noqueira-pecan, a qual pode ter sido contaminada através da flor infectada ou, até mesmo, por esporos disseminados por agentes diversos (vento, água, insetos, ferramentas), chegando ao fruto e, posteriormente, à semente. A contaminação da semente poderá ocasionar graves problemas, levando o inóculo para áreas isentas e infectando o solo ou o substrato. É importante que se verifique se esses isolados são apenas saprófitas, o que acarretaria a deterioração e o apodrecimento das sementes, resultando na baixa germinação, ou se eles poderiam apresentar patogenicidade para as mudas (item 4.3).

Pestalotiopsis spp. foi encontrado associado às folhas de noqueira-pecan em diferentes localidades e cultivares. No momento da coleta, verificou-se que o fungo causa manchas foliares que iniciam com pequenos pontos que coalescem, muitas vezes, com aspecto de queima. As lesões, quando evoluem, podem causar desfolha parcial de árvores adultas, como foi observado a campo, acarretando perda de área fotossinteticamente ativa e conseqüente perda na produção. Esse organismo poderá ainda ser patogênico para os frutos, pois seus esporos podem ser facilmente disseminados no momento da formação do fruto, especialmente quando ainda estão verdes, já que, nesse momento, folhas e frutos coexistem na mesma planta.

4.2 Caracterização química do solo das áreas de coleta

A composição química do solo foi analisada com a finalidade de descrever o ambiente em que os isolados foram coletados. Seus resultados estão apresentados nas Tabelas 3 e 4. Valores de pH mais baixos foram encontrados em solo com plantios de idade mais avançada (Tabela 3). Em Sentinela do Sul, o pomar ficou abandonado por muitos anos e, atualmente, foi reiniciado o tratamento do solo com correção de pH e fertilização e tratamento das plantas com fungicidas de amplo espectro. Este pomar é formado por árvores com mais de 20 anos. O segundo ponto de coleta em Santana do Livramento (P2) também consiste em um pomar que não recebe mais tratamentos culturais e que possui, aproximadamente, 30 anos. Esses dois

locais apresentaram pH inferior a 4,8, contrariando a recomendação de Reid (2000), que sugere que o pH ótimo para a espécie deva situar-se entre 6,0 e 7,5. O autor ainda alerta que plantas cultivadas em solos arenosos ou com pH acima de 7,0 devem ser fertilizadas periodicamente com zinco para evitar sua deficiência. No Brasil, estudos científicos a respeito das necessidades nutricionais e demais características do solo exigidas pela cultura da noqueira-pecan não são facilmente encontrados. As informações são baseadas no cultivo na América do Norte, onde a noqueira-pecan é considerada exigente de um bom suprimento de água, de solos profundos e bem drenados (REID, 2000). Entretanto, de acordo com Comissão de Química e Fertilidade do Solo (2004), o pH ideal para a Nogueira-pecan é 6,0.

Para Agrios (2005), em algumas doenças, um enfraquecimento do hospedeiro, através de nutrição alterada, induzida por solos mais ácidos, agravaria a severidade da doença. Em contrapartida, solos com pH superiores a 7,5 e altas concentrações de carbonato de cálcio, ferro, zinco e outros microelementos essenciais tornaria esses elementos frequentemente indisponíveis para as plantas ou quaisquer microrganismos do solo. Plantas cultivadas nesses solos são mais suscetíveis à infecção por patógenos radiculares (STAMFORD et al., 2005).

Um parâmetro importante a ser observado, também, é a Capacidade de Troca de Cátions do Solo (CTC), a qual indica a quantidade de íons positivos (cátions) que o solo é capaz de reter em determinadas condições e permutar por quantidades estequiométricas equivalentes de outros cátions (LOPES; GUILHERME, 1992). Segundo os autores citados anteriormente, valores inferiores a $6 \text{ cmol}_c.\text{dm}^{-3}$ favorecem a lixiviação de nitrogênio e potássio, afetando o desenvolvimento das plantas, o que poderia ser um fator que favoreceu a ocorrência de doenças em três pontos de coleta onde estes valores são reduzidos: Mata, Santana do Livramento (P1) e Santana do Livramento (P2).

Ainda na Tabela 3, observam-se que os teores de cálcio variaram de 0,4 a $18,0 \text{ cmol}_c.\text{dm}^{-3}$ para Mata e Anta Gorda, respectivamente. Valores inferiores a $2,0 \text{ cmol}_c.\text{dm}^{-3}$ são considerados baixos; entre 2,1 e $4,0 \text{ cmol}_c.\text{dm}^{-3}$ médios, sendo que estes seriam os valores mais adequados para quase todas as culturas; valores superiores a $4,0 \text{ cmol}_c.\text{dm}^{-3}$ são considerados altos (COMISSÃO DE QUÍMICA E FERTILIDADE DO SOLO, 2004). Já em relação ao magnésio, a referida comissão citada anteriormente, assegura que teores inferiores a 0,5 são considerados baixos; de 0,6 a $1,0 \text{ cmol}_c.\text{dm}^{-3}$, médios; e superiores a $1,0 \text{ cmol}_c.\text{dm}^{-3}$ são considerados

altos. Verifica-se que os mesmos pontos de coleta que apresentaram teores baixos de cálcio, simultaneamente, tiveram baixos teores de magnésio, como é o caso de Mata e Santana do Livramento (P1 e P2).

Tabela 3 – Propriedades químicas do solo nos pontos de coleta de plantas sintomáticas de noqueira-pecan no Rio Grande do Sul.

Pontos	pH (H ₂ O)	Ca	Mg	Al	H+ Al	CTC efet.	Saturação (%)	
							Al	Bases
						cmol _c /dm ³		
Cachoeira do Sul	5,1	4,4	2,6	0,6	4,4	7,9	7,6	62,2
Mata	5,3	0,4	0,3	0,3	1,7	1,1	27,0	32,0
Santa Maria (P1)	6,3	5,1	2,6	0,0	2,2	7,8	0,0	77,8
Sentinela do Sul	4,4	15,4	3,0	2,4	9,7	20,8	11,5	65,6
Santana do Livramento (P1)*	6,3	2,0	0,5	0,0	1,2	2,7	0,0	69,1
Santana do Livramento (P2)*	4,8	1,1	0,4	0,4	2,8	2,0	20,0	37,4
Santa Rosa	6,4	6,5	3,0	0,0	2,5	13,0	0,0	81,0
Anta Gorda	5,8	18,0	4,2	0,0	3,5	22,8	0,0	86,8
Pontos	% MO	% Argila	P	K	S	Cu	Zn	Bo
	m/v		mg/dm ³					
Cachoeira do Sul	2,3	17,0	4,5	108,0	15,0	2,2	1,5	0,1
Mata	0,6	19,0	2,2	40,0	6,2	0,7	0,4	0,3
Santa Maria (P1)	1,2	17,0	10,1	60,0	4,0	0,8	0,3	0,4
Sentinela do Sul	1,2	23,0	2,2	32,0	9,8	0,7	0,2	0,5
Santana do Livramento (P1)	0,6	8,0	9,3	72,0	6,0	0,5	2,3	0,5
Santana do Livramento (P2)	0,8	10,0	2,2	56,0	7,8	0,7	0,4	0,2
Santa Rosa	2,4	57,9	9,1	423,0	10,0	9,6	3,5	0,3
Anta Gorda	1,9	25,0	3,7	268,0	4,4	10,8	7,4	0,2

* Santana do Livramento (P1): pomar com cinco anos de implantação, Santana do Livramento (P2): pomar com mais de 30 anos de implantação; Santa Maria (P1): área na localidade de Pains; Santa Maria (P2): área pertencente à UFSM.

Por exigir solos bem drenados, a alta percentagem de argila é outro fator que pode reduzir o crescimento da noqueira-pecan, o que foi observado, por exemplo, em solo coletado em Santa Rosa, região de solos naturalmente argilosos (Tabela 3). Os teores de matéria orgânica foram todos considerados baixos, segundo Comissão de Química e Fertilidade do Solo (2004), pois se situaram abaixo de 2,5 m/v.

Conforme Poletto (2010), a matéria orgânica melhora a estrutura do solo, reduz a plasticidade e a coesão, aumenta a capacidade de retenção de água e a aeração, permitindo maior penetração e distribuição das raízes. A matéria orgânica atua diretamente sobre a fertilidade do solo por constituir a principal fonte de macro e micronutrientes essenciais às plantas, além de atuar indiretamente, através da disponibilidade dos nutrientes e do aumento da capacidade de retenção dos nutrientes, evitando suas perdas. Além disso, exerce influência direta sobre a biota do solo, pois, segundo Bailey e Lazarovits (2003), a matéria orgânica é capaz de aumentar e diminuir a população de fungos do solo, dependendo do tipo de sistema. Quanto ao teor de argila, solos com teor de argila inferior a 20% pertencem à classe 4 (sendo o caso de Cachoeira do Sul, Mata, Santa Maria – P1, Santana do Livramento – P1 e P2), entre 21 e 40% pertencem à classe 3 (como em Sentinela do Sul e Anta Gorda) e entre 41 e 60%, à classe 2 (em Santa Rosa), sendo esta última a classe de solos mais argilosa encontrada neste estudo e a classe 4, por sua vez, a menos argilosa (COMISSÃO DE QUÍMICA E FERTILIDADE DO SOLO, 2004).

A interpretação dos teores de P é realizada conforme a classe do teor de argila no solo, de maneira que solos mais argilosos suportam teores de P menores que solos menos argilosos (COMISSÃO DE QUÍMICA E FERTILIDADE DO SOLO, 2004). No presente estudo não ocorreu desta maneira e, por exemplo, os teores de P nos pontos Cachoeira do Sul, Mata, Sentinela do Sul, Santana do Livramento (P1) e Anta Gorda são considerados muito baixos; nos pontos Santa Maria-P1 e Santana do Livramento (P2) são considerados baixos e somente no ponto Santa Rosa é considerado alto (Tabela 3). De acordo com Zambolim et al. (2005), o fósforo aumenta a resistência vegetal por aumentar o balanço de nutrientes na planta ou por acelerar a sua maturação, reduzindo, assim, a infecção por patógenos que tenham preferência por tecidos jovens. Essa resistência também é conferida pelo potássio, entretanto, para este elemento, a suscetibilidade das plantas só é registrada na deficiência desse macronutriente. Os menores teores de K foram encontrados nos

solos de Mata e Sentinela do Sul, portanto, nesses locais, em teoria, poderia ocorrer uma maior suscetibilidade ao ataque de patógenos.

Com relação ao enxofre, os valores situaram-se entre médios (2,1-5,0 mg.dm⁻³) a altos (> 5,0 mg/dm³). Dentre os micronutrientes, para cobre (Cu), todos os valores são considerados altos (> 0,4 mg.dm⁻³). O mesmo ocorre para zinco, exceto em Mata, Santa Maria-P1, Sentinela do Sul e Santana do Livramento (P2), pontos onde se observaram valores médios (0,2-0,5 mg.dm⁻³). E, para Boro, os valores ficaram entre médios (0,1-0,3 mg.dm⁻³) a altos (0,3 mg.dm⁻³). Todas essas classificações são aquelas preconizadas pela Comissão de Química e Fertilidade do Solo (2004), que estabelece os limites desses elementos para solos nos estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina.

Fazendo uma análise prática, *Fusarium* spp. foi encontrado associado à raízes em apenas três pontos de coleta (Cachoeira do Sul, Mata e Santa Maria – P1). Isso não significa que, em outros locais, o fungo não estaria presente no solo, mas que apenas nesses locais a doença se manifestou, demonstrando que as plantas estão mais suscetíveis ao patógeno, o que pode ser relacionado a fatores edáficos. Assim, verifica-se que, principalmente, o solo de Mata possui os menores valores para alguns minerais como Ca e Mg, como também valores muito baixos para P, K, %MO e CTC efetiva, quando comparado a outros locais de coleta.

4.3 Patogenicidade dos isolados de *Fusarium* spp.

Os sintomas iniciaram, aproximadamente, após 60 dias da emergência, os quais foram enquadrados em quatro classes, uma vez que diferiram entre as mudas e entre os isolados (Tabela 4).

O sintoma A foi caracterizado apenas como um estrangulamento na região do colo, não evoluindo para outro sintoma ou para a morte da planta, sendo o único não associado à podridão de raízes. O sintoma B caracterizou-se pela podridão de raízes, resultando em necrose foliar, como consequência da deficiência de nutrientes transportados até a parte aérea. A murcha na parte aérea, a qual caracterizou o sintoma C, também foi reflexo da podridão de raízes causada pela inoculação de *Fusarium* spp. *Fusarium solani* e *F. oxysporum* já foram relatados causando necrose de folhas, murcha de parte aérea e murcha de ramos, ou “dieback” em noqueira-pecan após inoculação destes organismos obtidos a partir de

uma praga (*Euplatypus segnis*) que ataca pomares de noqueira-pecan no México (ALVIDREZ-VILLAREAL et al., 2012), sendo, portanto, sintomas semelhantes com aos observados no presente estudo. O sintoma D pode ser considerado como o mais sério, pois levou à morte da planta, em consequência do comprometimento do sistema radicular causado pelo patógeno.

Tabela 4 - Descrição dos sintomas observados em mudas de noqueira-pecan em substrato inoculado com doze isolados de *Fusarium* spp.

Identificação	Descrição
Sintoma A	Estrangulamento do colo
Sintoma B	Necrose foliar + Podridão de raízes
Sintoma C	Murcha na parte aérea + Podridão de raízes
Sintoma D	Murcha na na parte aérea + Podridão de raízes + Morte

O sintoma D foi observado apenas pela inoculação do isolado F₁₁, o qual se destacou dos demais, pois foi o único a causar a morte de mudas, sintoma, até então, não observado após a inoculação dos demais, até o último dia de avaliação, revelando maior agressividade na patogenicidade (Tabela 5). Este isolado também provocou a maior percentagem de plantas sintomáticas (40%), juntamente com F₁₈. Alguns isolados apresentaram apenas um sintoma, como foi o caso de F₆, que revelou necrose foliar como consequência da podridão de raízes (sintoma B), e de F₁₇, que provocou estrangulamento do colo (sintoma A). a inoculação dos isolados F₁₄, F₁₅, F₂₁ e F₂₃ não acarretou em mudas sintomáticas e, portanto, foram considerados como não patogênicos à espécie.

Além dos sintomas observados nas mudas, a inoculação de alguns isolados (F₇, F₉ e F₁₈), ocasionou também, tombamento de pré-emergência, com constatação de estruturas (sinais) do patógeno nos tecidos lesionados. O tombamento de pré-emergência atingiu os percentuais de 5, 5 e 10 % para os isolados F₇, F₁₈ e F₉, respectivamente.

Tabela 5 – Distribuição percentual média dos sintomas apresentados por mudas sintomáticas de noqueira-pecan, após inoculação com dezesseis isolados de *Fusarium* spp., em substrato.

Isolados	Plantas sintomáticas	Variáveis			
		Sintoma A*	Sintoma B	Sintoma C	Sintoma D
		%			
F ₁	25 a	20	40	40	0
F ₃	20 a	35	65	0	0
F ₅	25 a	50	0	50	0
F ₆	20 a	0	100	0	0
F ₇	25 a	35	65	0	0
F ₈	25 a	50	0	50	0
F ₉	30 a	65	0	35	0
F ₁₁	40 a	0	50	0	50
F ₁₄	0 b	-	-	-	-
F ₁₅	0 b	-	-	-	-
F ₁₇	35 a	100	0	0	0
F ₁₈	40 a	0	65	35	0
F ₁₉	30 a	8	92	0	0
F ₂₀	30 a	12.5	87.5	0	0
F ₂₁	0 b	-	-	-	-
F ₂₃	0 b	-	-	-	-

* Médias seguidas por mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de significância. Sintoma A: estrangulamento do colo; Sintoma B: Necrose foliar + Podridão de raízes; Sintoma C: Murcha na parte aérea + Podridão de raízes; Sintoma D: Murcha na na parte aérea + Podridão de raízes + Morte.

Os sintomas podem ser visualizados na Figura 6. O problema de tombamento de pré-emergência ocorre, frequentemente, em sementes de espécies florestais que, ao entrarem em contato com solo contaminado por patógenos desse ambiente, são infectadas, como já esclarecido por Ferreira (1989). O autor relatou que a contaminação das sementes e frutos de essências florestais ocorre, predominantemente, nos solos que são colonizados por diversos fungos, incluindo saprófitas e parasitas facultativos, que têm vida saprofítica no solo ou na matéria

orgânica, tais como: *Alternaria* sp., *Cylindrocladium* sp., *Fusarium* sp., *Phoma* sp., *Phomopsis* sp.



Figura 6 - Sintomas observados após inoculação de *Fusarium* spp. Necrose foliar associada à inoculação do isolado F18 (A); murcha seguida de morte associada à inoculação do isolado F11 (B); estrangulamento do colo associada à inoculação do isolado F7 (C); necrose

Adicionalmente, algumas espécies de *Fusarium* já foram relatadas causando tombamento em pré ou pós-emergência de plântulas de espécies florestais, sendo problema comum em sementes. Lazarotto et al. (2010), testando a patogenicidade de *Fusarium* sp. isolado de sementes de paineira (*Ceiba speciosa*) e inoculado em

sementes da mesma espécie, verificaram a ocorrência de tombamento e podridão de raízes em plântulas. Além disso, Homechin et al. (1986) relataram que *Fusarium oxysporum* é encontrado em sementes de *Pinus elliotti* e pode ser transmitido para as plântulas, ocasionando o tombamento, também denominado *damping-off*.

Na inoculação de isolados de *Fusarium* spp., além dos sintomas observados nas mudas, também houve alta porcentagem de sementes não germinadas, possivelmente devido à atividade saprofítica dos isolados ou a tombamentos de pré-emergência, como discutido anteriormente (Tabela 6).

Tabela 6 - Plantas sintomáticas, plantas sadias e sementes não germinadas (SNG) de noqueira-pecan após inoculação com *Fusarium* spp., em substrato.

Isolados	Variáveis		
	Plantas Sintomáticas	Plantas Sadias	SNG
	(%)		
F ₁	25 a	40 b	35 a
F ₃	20 a	30 b	50 a
F ₅	25 a	40 b	35 a
F ₆	20 a	40 b	40 a
F ₇	25 a	25 b	50 a
F ₈	25 a	40 b	35 a
F ₉	30 a	35 b	35 a
F ₁₁	40 a	30 b	30 a
F ₁₄	0 b	75 a	25 a
F ₁₅	0 b	85 a	15 a
F ₁₇	35 a	25 b	40 a
F ₁₈	40 a	40 b	20 a
F ₁₉	30 a	40 b	30 a
F ₂₀	30 a	45 b	25 a
F ₂₁	0 b	70 a	30 a
F ₂₃	0 b	65 a	35 a
Testemunha	0 b	85 a	15 a
CV (%)	18.5	21.4	30.1

* Médias seguidas por mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de significância.

Com exceção do sintoma de estrangulamento do colo, todos os demais sintomas estariam associados à podridão de raiz, comum em ataque de patógenos do solo, como é o caso de *Fusarium* spp. Os sintomas de podridão do sistema radicular têm início com o escurecimento das raízes mais novas, que progride para as mais velhas, sendo que, no final do processo, as raízes atacadas apresentam-se na coloração marrom escura ou totalmente negra (BEDENDO, 2011). Ainda, segundo o mesmo autor, o escurecimento das raízes é acompanhado por sua decomposição, sendo as primeiras evidências do ataque nas raízes, na parte aérea como sintomas reflexos: flacidez de ramos e folhas, amarelecimento de folhas, queda prematura de folhas, flores e frutos e morte da planta.

A podridão de raízes pode ocorrer com características diversas dependendo do patógeno. A mais comum é a podridão negra, a qual, conforme Hodges (1975), é bastante frequente em viveiros de *Pinus* spp., em que o primeiro sintoma se caracteriza como um espessamento muito leve das extremidades das raízes pivotantes, assim como das laterais, acompanhado de um enegrecimento generalizado, sendo que, ao final da evolução da infecção, quase todas as raízes estão escuras e mortas. Em espécies florestais, têm-se alguns casos mais conhecidos, como ataques em espécies de *Pinus* e erva-mate (*Ilex paraguariensis*). Auer et al. (2001) ressaltaram que espécies de *Fusarium* podem estar associadas à podridão de raízes em mudas de *Pinus* spp., em viveiros, especialmente naqueles em que a produção se dá no sistema de raiz nua, já que o substrato permanece no viveiro e é reutilizado. Para erva-mate, Grigoletti Júnior e Auer (2001), descreveram pela primeira vez, no estado do Paraná, a doença da podridão de raízes em plantas adultas. Os sintomas descritos caracterizaram-se pelo amarelecimento e perda das folhas, apodrecimento das raízes, estagnação do crescimento e, em estados mais avançados, a morte da planta. Poletto et al. (2006) também detectaram espécies de *Fusarium* patogênicas a plantas de erva-mate, sendo a sintomatologia descrita com amarelecimento das folhas, estagnação do crescimento e queda excessiva das folhas mais velhas, morte parcial (de alguns galhos da planta) e, em casos mais adiantados da doença, morte total da planta. No caso do presente estudo, em noqueira-pecan, alguns sintomas foram semelhantes aos descritos pelos autores citados, com o comprometimento da área foliar, murcha e, em baixa incidência, a morte de mudas.

4.4 Caracterização morfofisiológica dos isolados patogênicos de *Fusarium* spp.

Na Tabela 7, são apresentados os dados de crescimento de colônias de isolados de *Fusarium* sp., medidos diariamente, por sete dias.

Tabela 7- Crescimento micelial diário (mm) até sete dias de incubação e taxa de crescimento micelial diário (mm.dia^{-1}) de 12 isolados patogênicos de *Fusarium* spp. em meio batata-dextrose-ágar (BDA).

Isolados	Dias							TCM
	1	2	3	4	5	6	7	
F1	8.98	21.73	42.94	61.13	72.96	84.41	91.91	13.13
F3	9.19	27.51	48.51	79.06	92.83	-	-	18.57
F5	8.89	21.60	42.93	60.90	73.20	84.93	91.56	13.08
F6	6.64	14.85	33.66	48.00	59.51	73.65	87.70	12.53
F7	9.24	21.77	42.90	60.89	73.71	84.19	91.80	13.11
F8	6.88	11.25	21.04	28.52	36.26	45.83	56.79	8.11
F9	6.70	14.78	27.18	37.51	45.70	54.10	60.15	8.59
F11	6.47	14.45	27.63	37.39	45.75	53.64	60.66	8.67
F17	2.11	7.90	16.60	24.41	39.83	41.91	50.12	7.16
F18	16.06	25.83	31.58	51.01	59.13	62.84	76.50	10.93
F19	9.04	28.04	48.61	78.77	93.52	-	-	18.70
F20	9.04	28.04	48.61	78.77	88.85	93.52	-	15.59

- Crescimento da colônia atingiu a dimensão máxima da placa. TCM: Taxa de Crescimento Micelial Diário obtido com o diâmetro da colônia no dia da avaliação final/nº de dias da avaliação final.

No caso do presente estudo, notaram-se diferenças entre isolados, sendo que F₃, F₁₉ e F₂₀ foram os isolados de crescimento mais rápido, visto que, em menos de sete dias, atingiram toda a dimensão da placa (Tabela 7). Esses mesmos isolados apresentaram as maiores Taxas de Crescimento Micelial Diário (TCM), com valores de 18,57, 18,70 e 15,59, para F₃, F₁₉ e F₂₀, respectivamente. Já o isolado F₁₇ foi o que apresentou menor taxa de crescimento micelial diário (7,16). Alguns isolados parecem se agrupar em relação a valores de crescimento micelial, é o caso de F₈, F₉

e F₁₁, que apresentam TCM muito próximas, o mesmo ocorrendo para F₁, F₅ e F₇. Esses resultados indicam que esta é, potencialmente, uma variável de diferenciação e agrupamento de isolados, como será discutido posteriormente.

A pigmentação das colônias e do micélio aéreo, bem como o tamanho e a forma dos macroconídios são bastante utilizados na caracterização morfológica de *Fusarium* spp., e, em função disso, algumas dessas características estão apresentadas na Tabela 8. Novamente, alguns isolados se assemelharam entre si, formando grupos diferenciados, de acordo com algumas características. A mais notável foi a coloração das colônias, parâmetro muito fácil de ser visualizado. Com relação à essa característica, pode-se visualizar cinco diferentes combinações de pigmentação que foram definidas de acordo com descrições de Nelson et al. (1983).

A caracterização morfológica é tradicionalmente empregada para a identificação de fungos fitopatogênicos e envolve análise de pigmentação das colônias, textura, forma marginal e velocidade de crescimento micelial, processo de formação, forma e tamanho de esporos (BURGESS et al., 1995). Esses caracteres são bastante utilizados para descrição e diferenciação de isolados de *Fusarium* spp. Angelotti et al. (2006) realizaram a caracterização morfológica de isolados de *Fusarium graminearum* associados à giberela do trigo e triticales na região Sul do Brasil, através de algumas características também utilizadas neste trabalho, como pigmentação da cultura em meio batata-dextrose-ágar, dimensões dos macroconídios em meio folha-de-cravo-ágar, número de septos do macroconídio e presença de clamidósporos. Os autores utilizaram essas características, bem como de Reação de Polimerase em Cadeia (PCR), e identificaram os 20 isolados coletados como sendo de *F. graminearum*.

Tabela 8 - Características das colônias e dos macroconídios de *Fusarium* spp. crescidos em meio batata-dextrose-ágar (BDA) e presença ou ausência de clamidósporos em meio folha-de-cravo-ágar (CLA).

Isolados	Esporulação (x10 ⁶ esporos/ml) ¹	Macroconídio ¹			Pigmentação da colônia em BDA ¹		Clami- dósporo ^{2,3}
		Comprimento (µm)	Largura (µm)	Nº septos	Colônia	Micélio aéreo	
F1	2.87	46.25	3.26	5	Violeta	Rosa claro	+
F3	-	-	-	-	Violeta	Amarelo-queimado	-
F5	2.64	47.00	3.20	5	Violeta	Rosa claro	+
F6	1.46	45.25	3.18	4	Violeta	Rosa claro	+
F7	2.94	46.50	3.21	5	Violeta	Rosa claro	+
F8	2.60	27.13	2.88	3 ou 5	Violeta	Rosa claro	-
F9	2.63	27.32	2.75	3 ou 5	Violeta	Rosa claro	-
F11	2.70	28.90	2.62	3 ou 5	Violeta	Rosa claro	-
F17	1.20	30.88	3.38	3-4	Rosa claro	Branco	+
F18	3.35	31.75	4.02	5	Marrom	Branco a marrom	-
F19	-	-	-	-	Violeta	Amarelo-queimado	-
F20	-	-	-	-	Violeta	Amarelo-queimado	-

¹ Meio de cultura batata-dextrose-ágar, ² Meio de folha de cravo-ágar, ³ Presença (+) e ausência (-).

Em chaves taxonômicas, essas mesmas características são utilizadas para identificação de espécies desse gênero, tais como na de Gerlach e Nirenberg (1982); na de Ventura (2000) e na de Nelson et al. (1983). Kristensen et al. (2005) sugeriram que as análises filogenéticas de *Fusarium* spp. deveriam sempre ser construídas a partir de isolados bem caracterizados morfológicamente, de preferência, acompanhados de descrições específicas como hospedeiro, origem geográfica, metabólitos secundários produzidos e patogenicidade. Portanto, mesmo com a identificação molecular, a caracterização morfológica jamais deverá ser abandonada, em função de sua capacidade discriminatória complementar.

Na Figura 7, é possível verificar a forma e o número de septos dos macroconídios de *Fusarium* spp., bem como outras estruturas desenvolvidas pelo fungo, como a formação de clamidósporos nos isolados F₅, F₆ e F₇. Nas imagens correspondentes aos isolados F₇, F₈, F₉, F₁₁ e F₁₇, além da formação de macroconídios, também podem ser observados microconídios.

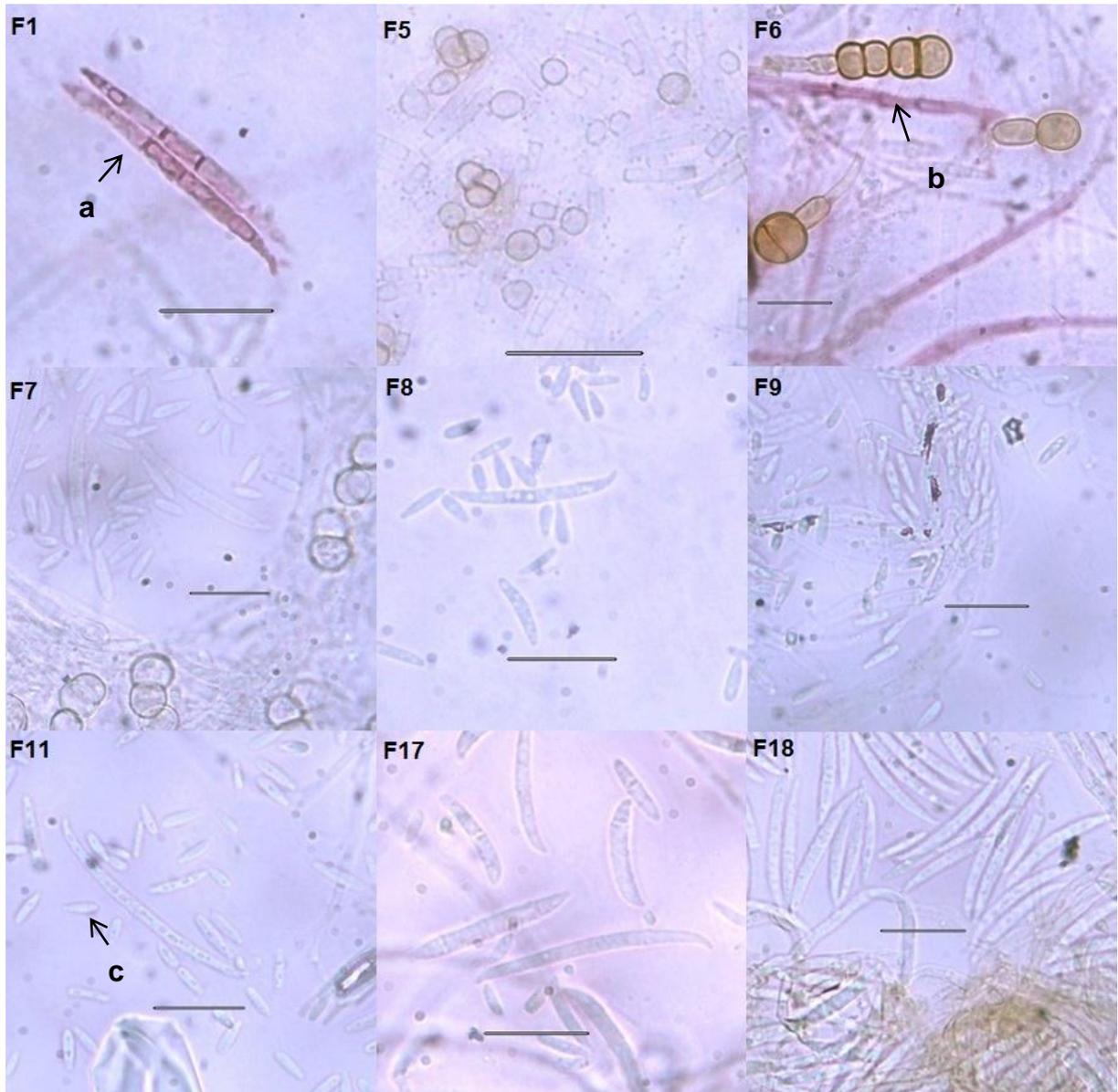


Figura 7 – Estruturas reprodutivas (macroconídios e microconídios) e de sobrevivência (clamidósporos) dos 9 isolados patogênicos de *Fusarium* spp. formados em meio folha-de-cravo-ágar (CLA). Macroconídio (a); Clamidósporo (b); Microconídio (c). A barra presente em cada imagem corresponde à medida de 20 μ m.

A Figura 8 também apresenta imagens de macroconídios, microconídios, formação de clamidósporos e das chamadas “falsas cabeças”, constituídas por isolados patogênicos de *Fusarium* spp. Entretanto, essas imagens foram realizadas em equipamento no qual não era possível inserir a barra de 20 μ m. Pode ser observada a formação de clamidósporos nos isolados F₅, F₆, F₇ e F₁₇, a constituição de microconídios em F₆, F₇, F₈, F₉, F₁₁ e F₁₇ e a o desenvolvimento de falsas cabeças em F₈.

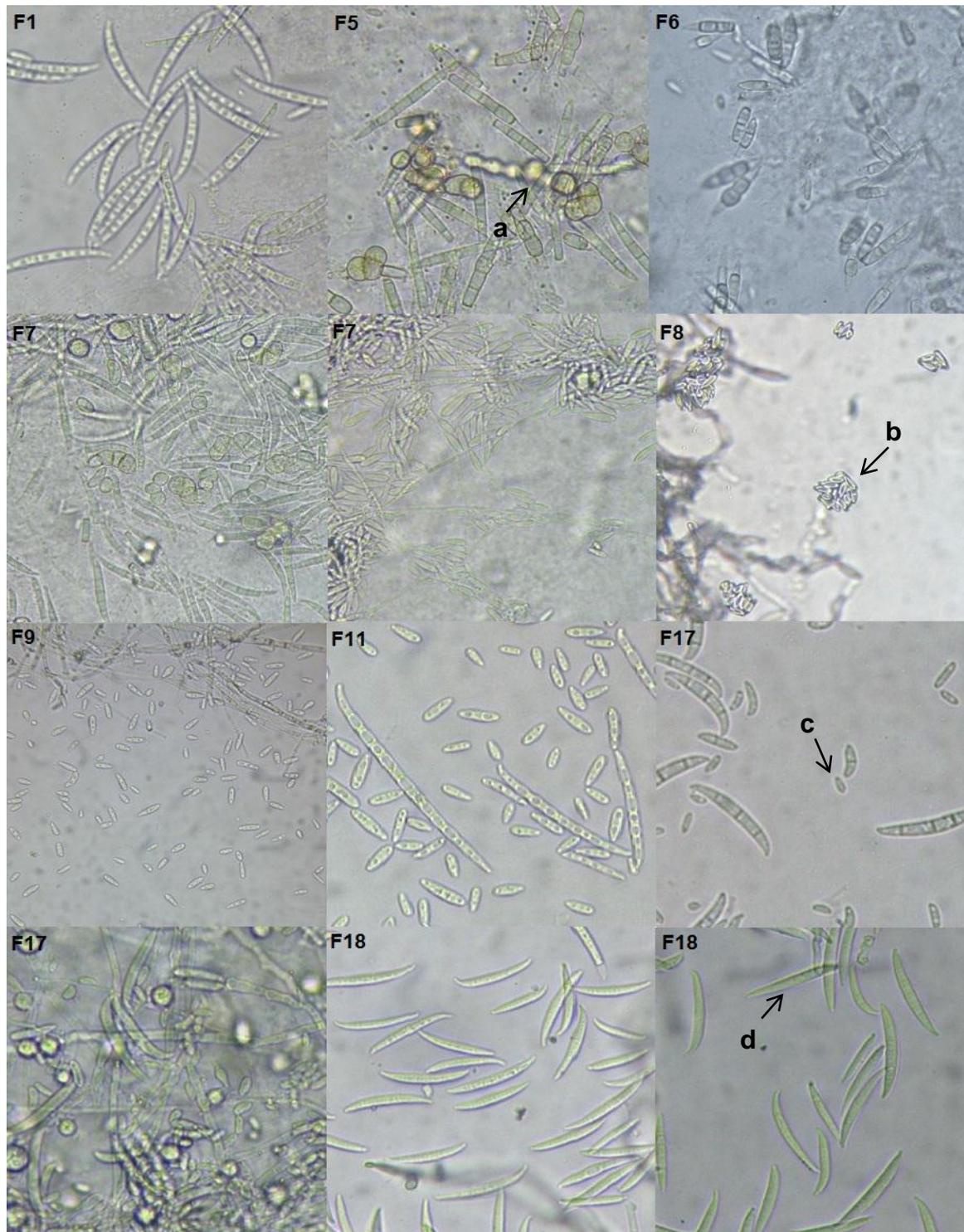


Figura 8 - Conídios dos 9 isolados patogênicos de *Fusarium* spp. , formados em meio folha-de-cravo-ágar (CLA). Clamidósporo (a); “Falsas-cabeças” (b); Microconídio (c); Macroconídio (d).

A coloração das colônias de isolados de *Fusarium* spp. pode ser visualizada na Figura 9.

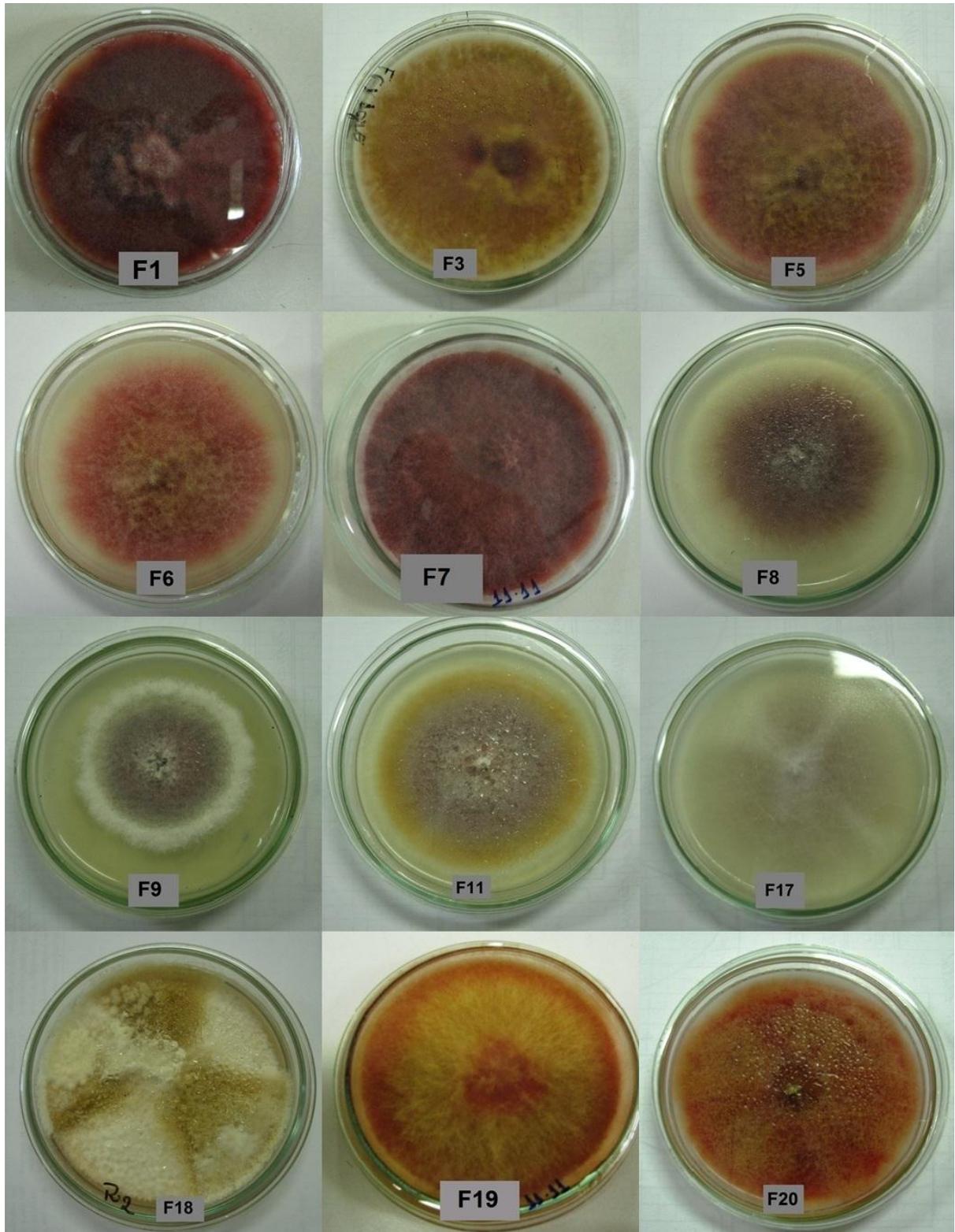


Figura 9 - Colônias puras dos 12 isolados patogênicos de *Fusarium* spp. crescidas em meio BDA.

A partir da constatação visual de que caracteres morfofisiológicos, relacionados às colônias e conídios formados pelos isolados de *Fusarium* spp., poderiam ser de utilidade para separá-los em grupos, de acordo com características similares, foi possível estabelecer se essas diferenças realmente representam caracteres válidos para o agrupamento de isolados. Através da elaboração de um dendrograma gerado com a utilização do método de agrupamento por UPGMA (“Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean”), foi possível separar os isolados de *Fusarium* spp. em grupos distintos através do uso das seguintes variáveis: diâmetro das colônias, esporulação, largura e comprimento de macroconídios (Figura 10).

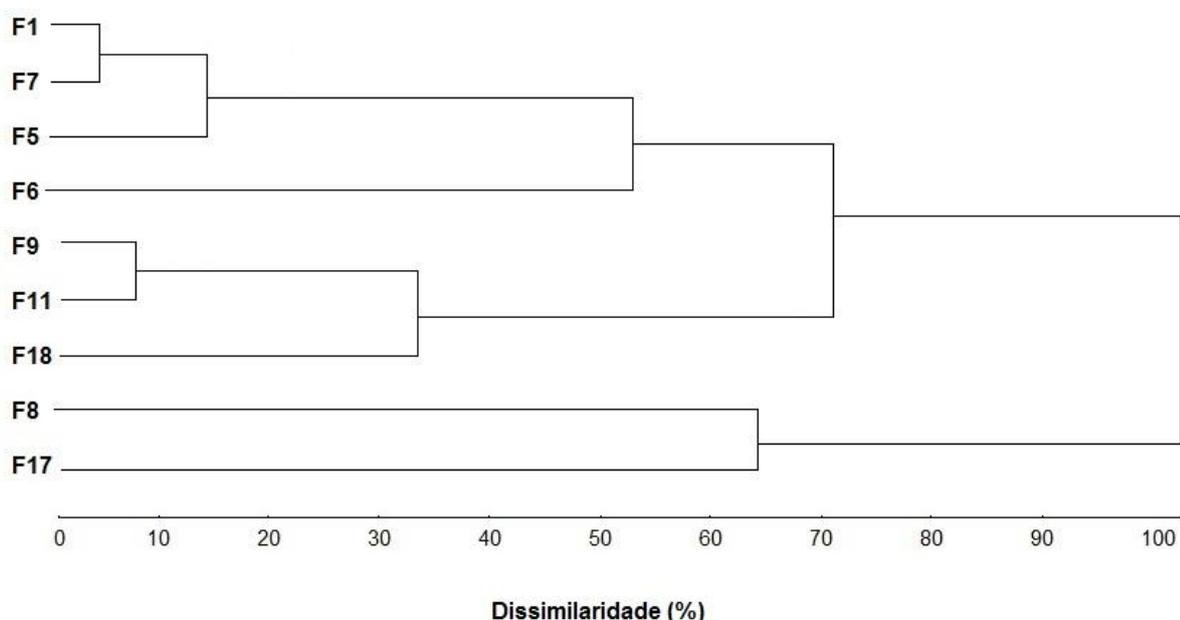


Figura 10 - Dendrograma mostrando a percentagem de dissimilaridade entre 9 dos 12 isolados patogênicos de *Fusarium* spp. O dendrograma foi obtido pela técnica UPGMA, a partir da análise da matriz de distância Euclidiana, com os 4 caracteres morfofisiológicos (diâmetro de colônias, esporulação, largura e comprimento de conídios).

Analisando o dendrograma (Figura 10), observa-se a formação de três grandes grupos: o primeiro, constituído pelos isolados F₁, F₇, F₅ e F₆; o segundo, por F₉, F₁₁ e F₁₈; e o terceiro, por F₈ e F₁₇. Apesar de esse último grupo ter relacionado dois isolados, estes apresentaram uma dissimilaridade superior a 60%, o que significa que são bastante diferentes em relação aos caracteres utilizados na análise. A menor dissimilaridade foi observada entre os isolados F₁ e F₇, seguida de

F₉ e F₁₁, sendo que o agrupamento entre esses isolados apresenta dissimilaridade inferior a 10%. Após a realização da identificação em nível molecular, será possível verificar se esses isolados que são enquadradas no mesmo grupo pertencem, também, à mesma espécie ou apresentam características de parentesco (genéticas) (item 4.5).

O procedimento de agrupamento, igualmente, forneceu as maiores e menores distâncias (Euclidiana) entre os isolados, como mostra a Tabela 9, as quais são utilizadas para a formação dos *clados* (ramos) no dendrograma. Observa-se como os isolados foram agrupados no dendrograma (Figura 10). Por exemplo, o isolado F₁ possui o maior valor de distância Euclidiana para F₁₇ e a menor para F₇ por isso, este é agrupado no mesmo *clado* (ramo) deste último. A mesma análise pode ser feita para todos os isolados. O que pode ser verificado nesses valores é que o isolado F₁₇ é o mais distante da maior parte dos isolados de *Fusarium* spp. deste estudo, considerando os caracteres morfofisiológicos utilizados na construção do dendrograma.

Tabela 9 - Estimativas da distância Euclidiana entre 9 dos 12 isolados patogênicos de *Fusarium* spp., após agrupamento pela técnica UPGMA.

Isolado	Maior distância		Menor distância	
	Isolado	Valor	Isolado	Valor
F ₁	F ₁₇	4.51813	F ₇	0.09362
F ₅	F ₁₇	4.38986	F ₁	0.36635
F ₆	F ₈	3.74748	F ₅	1.70887
F ₇	F ₁₇	4.57309	F ₁	0.09362
F ₈	F ₆	3.74748	F ₉	2.08764
F ₉	F ₁₇	3.26560	F ₁₁	0.19935
F ₁₁	F ₁₇	3.31694	F ₉	0.19935
F ₁₇	F ₇	4.57310	F ₈	2.11705
F ₁₈	F ₁₇	4.21788	F ₁₁	1.34319

A análise multivariada forneceu, também, a contribuição relativa dos caracteres para divergência, ou seja, qual a contribuição de cada uma das variáveis utilizadas para o agrupamento. Como resultado, a largura dos conídios foi responsável por 99,98%, o que significa que esta variável, praticamente sozinha, foi capaz de diferenciar os isolados de *Fusarium* spp. nos grupos formados no dendrograma (Figura 10). Os caracteres diâmetro de colônia aos sete dias, esporulação e comprimento de conídios tiveram contribuição praticamente insignificante no agrupamento. Dessa forma, emerge como um dos resultados desta análise o indicativo de que a largura de macroconídios poderia ser utilizada como um marcador morfológico para diferenciação de isolados de *Fusarium* spp., desde que se confirme que esses isolados agrupados em um mesmo *clado* realmente são semelhantes geneticamente.

Os isolados F₃, F₁₉ e F₂₀ não estão presentes no dendrograma (Figura 10), pois eles não apresentaram esporulação em meio de cultura, após os sucessivos cultivos, não sendo, assim, possível medir, além da esporulação, a largura e o comprimento de conídios. Leslie e Summerell (2006) destacaram algumas espécies de *Fusarium* que, raramente, produzem macroconídios, e inclusive uma espécie, *F. musarum*, em que são ausentes. Diante desse fato, procedeu-se a análise de agrupamento apenas com a variável diâmetro de colônias, conforme pode ser visto na Figura 11.

Com a inclusão dos isolados F₃, F₁₉ e F₂₀, pode-se perceber a formação de vários grupos, sendo que esses isolados incluídos foram agrupados em um mesmo *clado*, com dissimilaridade inferior a 10%. F₁₉ e F₂₀ foram totalmente similares, já que a dissimilaridade foi insignificante, sendo considerada nula. Assim, a característica desses isolados de dificuldade de formação de macroconídios nos meios testados (BDA, CLA e BSA) pode ser relacionada às características genéticas, levando a pressupor que poderiam pertencer a uma mesma espécie. F₁ e F₇ foram, assim como no dendrograma anterior (Figura 10), agrupados no mesmo *clado*, com os isolados F₅ e F₆ também pertencendo ao mesmo grupo, porém, com dissimilaridade um pouco maior. F₁₈ permaneceu mais isolado com dissimilaridade próxima a 50% dos grupos com os quais se relacionou. F₉ e F₁₁ se agruparam com dissimilaridade bem abaixo de 10% e F₈ se relacionou a esses dois isolados, com dissimilaridade próxima a 10%. F₁₇ também permaneceu mais isolado dos outros com dissimilaridade próxima a 30%.

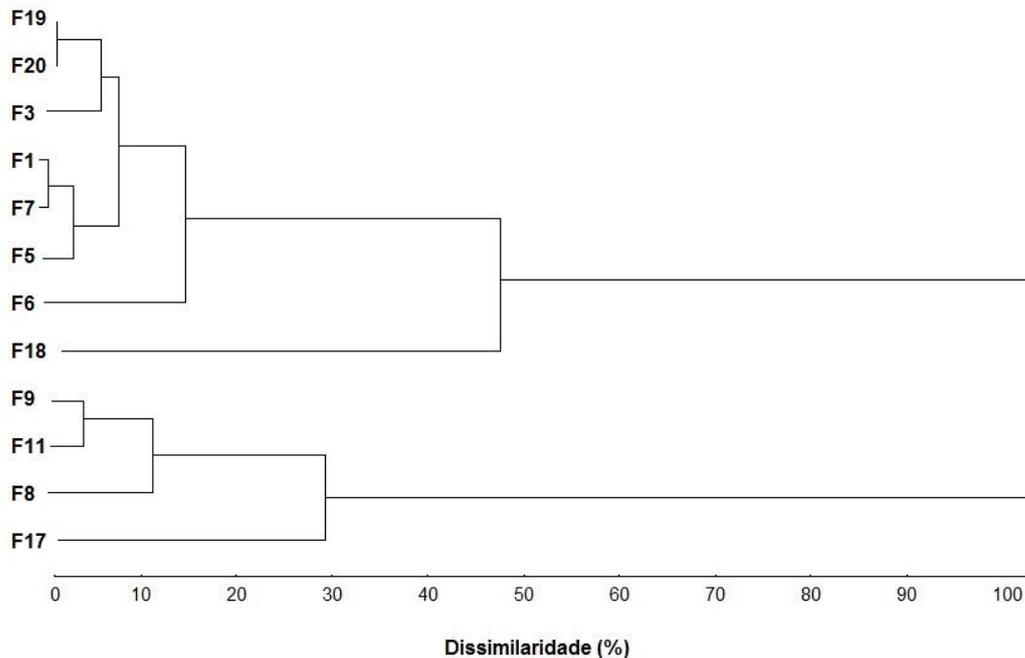


Figura 11 - Dendrograma mostrando a porcentagem de dissimilaridade entre os 12 isolados patogênicos de *Fusarium* spp. O dendrograma foi obtido pela técnica UPGMA, a partir da análise da matriz de distância Euclidiana, com apenas o diâmetro de colônias.

O mais importante a destacar na análise desse dendrograma (Figura 11), em relação ao anterior (Figura 10), foi a inclusão dos isolados F₃, F₁₉ e F₂₀, que foram arranjados em um mesmo *clado*, indicando alta proximidade, bem como a união do isolado F₈ com os isolados F₉ e F₁₁, sugerindo proximidade em relação à variável utilizada (diâmetro de colônias).

O procedimento de agrupamento entre todos os isolados também forneceu as maiores e menores distâncias entre eles, como se visualiza na Tabela 10. O que pode ser analisado, neste caso, é que os isolados F₁₇ e F₁₉ foram os mais distantes dos demais, já que apareceram com maior frequência entre os valores de maior distância Euclidiana. Entretanto, o isolado F₁₉ foi muito próximo de F₃ e F₂₀, indicando que esses três apresentam grande distância entre os demais.

Rahjoo et al. (2008) utilizaram alguns caracteres morfofisiológicos para identificação de 191 isolados de *Fusarium* spp., sendo eles: morfologia das colônias crescidas em BDA, morfologia dos macroconídios, microconídios, células conidiogênicas e dos clamidósporos, avaliados a partir de culturas crescidas em

meio Synthetischer Nährstoffarmer Agar (SNA) e folha-de-cravo-ágar (CLA). Nesse sentido, 187 isolados tiveram sua espécie identificada apenas pela morfologia, ainda que, no estudo supracitado, os autores tenham confirmado a identificação de tais isolados através de técnica de PCR.

Tabela 10 - Estimativas da distância Euclidiana entre os 12 isolados patogênicos de *Fusarium* spp., após agrupamento pela técnica UPGMA.

Isolado	Maior distância		Menor distância	
	Isolado	Valor	Isolado	Valor
F ₁	F ₁₇	2.44933	F ₇	0.00645
F ₃	F ₁₇	2.50325	F ₁₉	0.04015
F ₅	F ₁₇	2.42882	F ₇	0.01407
F ₆	F ₁₇	2.20245	F ₅	0.22637
F ₇	F ₁₇	2.44289	F ₁	0.00645
F ₈	F ₁₉	2.15278	F ₉	0.19721
F ₉	F ₁₉	1.95557	F ₁₁	0.02974
F ₁₁	F ₁₉	1.92583	F ₉	0.02974
F ₁₇	F ₁₉	2.54340	F ₈	0.39062
F ₁₈	F ₁₇	1.545761	F ₆	0.65669
F ₁₉	F ₁₇	2.54340	F ₂₀	0.00000
F ₂₀	F ₁₇	2.54340	F ₁₉	0.00000

O agrupamento de isolados com base em características morfológicas, através da técnica UPGMA, foi realizado por Pereira et al. (2009), para verificar a diversidade de um determinado gênero de fungo micorrízico associado a uma espécie de orquídea (*Epidendrum secundum*), baseando-se em características qualitativas (micélio aéreo, margem, aspecto, cor da colônia e número de núcleo por célula) e quantitativas (diâmetro da colônia, taxa de crescimento, largura e comprimento das células monilioides e diâmetro de hifa) da colônia. Os autores conseguiram agrupar os 26 isolados e verificar a relação entre os isolados coletados na mesma região. Porém, o dendrograma foi obtido a partir da análise da matriz de distância de Mahalanobis, e não da Euclidiana, como no presente estudo.

Michereff et al. (2003) também utilizaram o agrupamento por UPGMA, a partir da análise da matriz de distância Euclidiana (a mesma utilizada no presente estudo), para verificar a variabilidade de 38 isolados de *Alternaria brassicicola* associados a doenças em crucíferas, em Pernambuco. As variáveis utilizadas no agrupamento foram epidemiológicas (período de incubação, severidade, taxa de progresso da doença e área abaixo da curva) e fisiológicas (taxa de crescimento micelial, esporulação e germinação de conídios), além da sensibilidade ao fungicida iprodione. Teixeira et al. (2004) utilizaram a técnica UPGMA para agrupar e diferenciar dez isolados de *Acremonium strictum* obtidos a partir de sementes de milho (*Zea mays*) com medida de distância genética relativa, utilizando nove marcadores morfofisiológicos (crescimento micelial típico, textura do micélio, formação de feixes de hifas, forma marginal da colônia, pigmentação no verso e anverso da colônia, velocidade de crescimento micelial, taxa de crescimento micelial, produção de massa micelial e densidade micelial).

4.5 Caracterização molecular dos isolados patogênicos de *Fusarium* spp. e relação com características morfológicas das espécies identificadas

Os valores de cobertura e similaridade entre os isolados de *Fusarium* spp. deste estudo e os acessos disponíveis no “GenBank”, calculados através do “Basic Local Alignment Search Tool” (BLAST), estão apresentados na Tabela 11. Tais resultados foram encontrados com o sequenciamento das regiões ITS, 5.8S e ITS2. São apresentados somente os três acessos com maior cobertura e similaridade.

Tabela 11 - Cobertura (C) e similaridade (S) dos isolados de *Fusarium* spp. patogênicos à noqueira-pecan com acessos do GenBank, através de sequenciamento da região ITS.

Isolado	Acesso no GenBank	Espécie	C (%)	S (%)	Autores
	EU556725	<i>F. chlamydosporum</i>	99	99	Abdullah et al. (2008)*
F1	GQ505437	<i>Fusarium</i> sp.	99	99	O'Donnell et al. (2009)
	JN851018	<i>F. chlamydosporum</i>	97	98	Zhang e Qi (2011)*

	JF303865	<i>Gibberella zeae</i>	97	99	Crotty (2011)*
F3	JF303858	<i>Gibberella zeae</i>	95	99	Crotty (2011)*
	HM769950	<i>Gibberella zeae</i>	94	99	Lu et al. (2010)
	EU556725	<i>F. chlamydosporum</i>	98	99	Abdullah et al. (2008)*
F5	GQ505436	<i>F. nelsonii</i>	98	99	O'Donnell et al. (2009)
	JN851018	<i>F. chlamydosporum</i>	97	99	Zhang e Qi (2011)*
	EU556725	<i>F. chlamydosporum</i>	95	99	Abdullah et al. (2008)*
F6	JN851018	<i>F. chlamydosporum</i>	97	98	Zhang e Qi (2011)*
	GQ505434	<i>F. nelsonii</i>	95	98	O'Donnell et al. (2009)
	EU556725	<i>F. chlamydosporum</i>	97	99	Abdullah et al. (2008)*
F7	GQ505436	<i>F. nelsonii</i>	98	98	O'Donnell et al. (2009)
	JN851018	<i>F. chlamydosporum</i>	97	98	Zhang e Qi (2011)*
	GQ924898	<i>F. proliferatum</i>	99	99	Theantana (2009)*
F8	JQ363723	<i>Gibberella fujikuroi</i>	99	99	Heidarian et al. (2012)*
	GU723438	<i>F. proliferatum</i>	99	99	Liu e Tian (2010)*
	JQ363725	<i>Gibberella fujikuroi</i>	98	99	Heidarian et al. (2012)*
F9	FJ648201	<i>F. proliferatum</i>	97	99	Liu e Tian (2009)*
	GQ924905	<i>F. proliferatum</i>	95	100	Theantana (2009)*
	JQ363727	<i>Gibberella fujikuroi</i>	97	93	Heidarian et al. (2012)*
F11	HQ380789	<i>F. proliferatum</i>	97	93	Feng et al. (2010)*
	HM769953	<i>F. proliferatum</i>	97	93	Lu et al. (2010)
		<i>F. oxysporum</i> f. sp.	98	99	Saxena et al. (2011)*
	HQ658962	<i>cepae</i>			
F17	HM756257	<i>F. oxysporum</i> f. sp.	98	99	Xue et al. (2010)*
	EU073196	<i>phaseoli</i>			
		<i>F. oxysporum</i>	98	99	Chen et al. (2007)*
	EU520242	<i>F. chlamydosporum</i>	96	100	Yu (2011)
F18	JF773657	<i>F. equiseti</i>	96	99	Martinez-Cardenas et al. (2012)*
	HQ718416	<i>F. equiseti</i>	96	99	Lu et al. (2011)
	JQ905609	<i>Gibberella zeae</i>	99	98	Sha et al. (2012)*
F19	JN391186	<i>Gibberella zeae</i>	98	98	Liu et al. (2012)*
	HQ647340	<i>Gibberella zeae</i>	97	99	Wang et al. (2011)*

	HQ647340	<i>Gibberella zeae</i>	88	98	Wang et al. (2011)*
F20	JQ905609	<i>Gibberella zeae</i>	88	98	Sha et al. (2012)*
	JF303865	<i>Gibberella zeae</i>	88	98	Crotty (2011)*

* Acessos lançados no GenBank, porém, ainda não publicados.

Após o sequenciamento da região ITS, o sequenciamento da região do fator de alongação – 1 – alfa (TEF - 1 α) foi realizado. Valores de cobertura e similaridade entre os isolados de *Fusarium* spp. do presente estudo e os acessos disponíveis no “GenBank” , calculados através do “Basic Local Alignment Search Tool” (BLAST), estão apresentados na Tabela 12.

Tabela 12 - Cobertura (C) e similaridade (S) dos isolados de *Fusarium* spp. patogênicos à noqueira-pecan, com acessos do GenBank, através do sequenciamento da região TEF - 1 α .

Isolado	Acesso no GenBank	Espécie	C (%)	S (%)	Autores
F ₁	JF740722	<i>F. brachygibbosum</i>	94	92	O'Donnell et al. (2012)*
	JF740872	<i>F. sporotrichioides</i>	94	92	O'Donnell et al. (2012)*
	JF740870	<i>F. sporotrichioides</i>	94	92	O'Donnell et al. (2012)*
F ₃	JF27859J	<i>Gibberella zeae</i>	100	100	Vasseur (2011)*
	F278573	<i>Gibberella zeae</i>	96	100	Vasseur (2011)*
	HE80156	<i>Gibberella zeae</i>	95	100	Munaut (2012)*
F ₅	JF740722	<i>F. brachygibbosum</i>	94	92	O'Donnell et al. (2012)*
	JF740872	<i>F. sporotrichioides</i>	94	92	O'Donnell et al. (2012)*
	JF740870	<i>F. sporotrichioides</i>	94	92	O'Donnell et al. (2012)*
F ₆	JF740722	<i>F. brachygibbosum</i>	94	92	O'Donnell et al. (2012)*
	JF740872	<i>F. sporotrichioides</i>	94	92	O'Donnell et al. (2012)*
	JF740870	<i>F. sporotrichioides</i>	94	92	O'Donnell et al. (2012)*
F ₇	JF740810	<i>F. sporotrichioides</i>	94	92	O'Donnell et al. (2012)*
	JF740808	<i>F. sporotrichioides</i>	94	92	O'Donnell et al. (2012)*
	JF740722	<i>F. brachygibbosum</i>	94	92	O'Donnell et al. (2012)*
F ₈	JF699611	<i>Gibberella fujikuroi</i>	100	99	Cruz et al. (2011)*

	JF699613	<i>Gibberella fujikuroi</i>	99	99	Cruz et al. (2011)*
	JN09016	<i>Gibberella fujikuroi</i>	100	99	Choi et al. (2011)*
	JF740717	<i>G. moniliformis</i>	93	97	O'Donnell et al. (2012)*
F ₉	JF740798	<i>G. intermedia</i>	93	97	O'Donnell et al. (2012)*
	JF699611	<i>G. fujikuroi</i>	90	92	Cruz et al. (2011)*
	JF699611	<i>Gibberella fujikuroi</i>	90	99	Cruz et al. (2011)*
F ₁₁	JF699624	<i>Gibberella fujikuroi</i>	89	99	Cruz et al. (2011)*
	FN252398	<i>Gibberella fujikuroi</i>	89	99	Wulff (2010)
	JF740725J	<i>F. oxysporum</i>	93	99	O'Donnell et al. (2011)*
F ₁₇	F740706	<i>Gibberella intermedia</i>	93	94	O'Donnell et al. (2011)*
	JF740853	<i>F. oxysporum</i>	93	97	O'Donnell et al. (2011)*
	DQ465925	<i>F. equiseti</i>	99	98	Athman et al. (2007)*
F ₁₈	HM852056	<i>F. incarnatum</i>	100	99	Scheel et al. (2012)*
	DQ465946	<i>F. equiseti</i>	100	95	Athman et al. (2007)*
	JF740871	<i>Gibberella zeae</i>	93	98	O'Donnell et al. (2012)*
F ₁₉	JF740867	<i>Gibberella zeae</i>	93	98	O'Donnell et al. (2012)*
	JF740835	<i>F. meridionale</i>	93	98	O'Donnell et al. (2012)*
	JF740871	<i>Gibberella zeae</i>	92	98	O'Donnell et al. (2012)*
F ₂₀	JF740867	<i>Gibberella zeae</i>	92	98	O'Donnell et al. (2012)*
	JF740835	<i>F. meridionale</i>	92	98	O'Donnell et al. (2012)*

* Acessos lançados no GenBank, porém, ainda não publicados.

De acordo com os dados moleculares, observam-se variações de espécies entre os isolados patogênicos de *Fusarium* spp. Todavia, alguns isolados são mais semelhantes entre si: F₁, F₅, F₆ e F₇ são muito semelhantes, já que apresentaram alta percentagem de similaridade com praticamente as mesmas espécies (*Fusarium chlamydosporum*, *F. nelsonii*), sendo que ambas as espécies pertencem ao mesmo complexo de *Fusarium* spp. (*Sporotrichiella*); F₃, F₁₉ e F₂₀ foram mais próximos a *Gibberella zeae*, forma sexual de *F. graminearum*; F₈, F₈, F₉ e F₁₁ foram próximos somente a *G. fujikuroi* e *F. proliferatum*, sendo o primeiro a forma sexual do segundo. Os isolados mais distintos em relação aos demais, isto é, que mostraram-se semelhantes a outras espécies, foram F₁₇, que foi altamente similar a *Fusarium oxysporum*, e F₁₈, que, apesar de ter sido similar a *F. chlamydosporum*, foi próximo,

também, a *F. equiseti* com maior frequência, sendo que ambos pertencem a seções diferentes, o primeiro à Sporotrichiella e o segundo à Gibbosun.

Fazendo uma análise das características morfológicas descritas por Gerlach e Nirenberg (1982) para cada isolado, as espécies que foram similares através da caracterização molecular com o sequenciamento da regiões ITS são confirmadas pela morfologia dos macroconídios, coloração da colônia e micélio aéreo e formação de estruturas específicas. Os isolados que foram identificados como *Fusarium chlamydosporum* (F₁, F₅, F₆ e F₇) apresentaram as dimensões dos macroconídios dentro do que foi relatado para a espécie por Gerlach e Nirenberg (1982), variando os valores de comprimento entre 25 e 47 µm e a largura entre 3,2 a 4,5 µm para macroconídios de quatro a cinco septos. Além disso, houve abundante formação de clamidósporos globosos e de cadeias de clamidósporos, o que é próprio da espécie. Os macroconídios também foram bem característicos com as células centrais mais largas que as apicais. A pigmentação da colônia, igualmente, confere com a relatada pelos autores, que poderia variar de rosa, carmim, vermelho-vinho a vermelho-amarronzado.

F₃, F₁₉ e F₂₀ foram identificados como *Giberella zae*, forma sexual de *Fusarium graminearum* que pertence à seção Discolor. Nesse caso, a formação de macroconídios não ocorreu, mesmo com a tentativa de isolar em meio BDA, CLA, SNA e Batata-sacarose-ágar (BSA), este último recomendado por Alfenas e Ferreira (2007), como um meio específico para esporulação de *Fusarium* spp. Porém, algumas características de crescimento e coloração das colônias em BDA, descritas por Gerlach e Nirenberg (1982), foram semelhantes às observadas neste estudo, tais como o crescimento rápido da colônia, sendo os isolados, F₃, F₁₉ e F₂₀, os que alcançaram os maiores valores em diâmetro, micélio aéreo abundante e coloração inicial esbranquiçada passando a amarelo-queimado. Os autores também relatam que a esporulação em micélio é muito escassa, que a irradiação com luz ultravioleta poderia induzir à esporulação e que a formação de clamidósporos é escassa ou completamente ausente.

F₈, F₉ e F₁₁ foram identificados como *Gibberella fujikuroi* ou *Fusarium proliferatum*, sendo que o primeiro é a forma sexual de *F. fujikuroi*, que pertence à mesma seção de *F. proliferatum*, ambos correspondentes à seção Liseola (GERLACH; NIRENBERG, 1982), também chamada de *Gibberella fujikuroi* species complex. As características dos macroconídios e da colônia conferem com as

descritas por Gerlach e Nirenberg (1982) para *F. proliferatum*, sendo os macroconídios de três septos com dimensões dentro do que foi relatado pelos autores: entre 19 e 59 µm de comprimento e entre 2,6 e 5,0 µm de largura. Propriedades da colônia também foram descritas por esses autores, as quais foram semelhantes às observadas no presente estudo, sendo o micélio aéreo abundante de coloração branca a rosada e, em culturas mais velhas, violeta. A esporulação inicia cedo, por volta de dois dias de cultivo, com microconídios em cadeias ou em falsas cabeças, como pode ser visto na Figura 8, para o isolado F₈. Outra característica marcante foi a ausência de clamidósporos descrita pelos autores, a qual também foi verificada nos três isolados identificados como *F. proliferatum*.

F₁₇ foi identificado como *F. oxysporum*, pertencente à seção Elegans, sendo que algumas propriedades da colônia, descritas por Gerlach e Nirenberg (1982), são observadas neste isolado, como a pigmentação que, apesar de poder ser bem variável, pode apresentar-se de salmão a rosa. Outra característica a destacar foi a formação de clamidósporo que, normalmente, é abundante, em hifas ou em conídios, globosos a subglobosos, isolados, em pares, em cadeias ou agrupados (*clusters*) e, no caso deste estudo, clamidósporos globosos puderam ser observados. Além das duas propriedades anteriores, também destacaram-se as dimensões dos macroconídios que, segundo os autores, para macroconídios de três septos, podem ser de 18 a 54 µm de comprimento e variar entre 2,7 e 6,0 µm de largura, ao passo que, para os de quatro septos, podem ser de 25 a 56 µm de comprimento e variar entre 2,7 e 6,0 µm de largura.

Finalmente há F₁₈, que foi identificado como *Fusarium chlamydosporum*, e *F. equiseti*, que, morfológicamente, possui características muito mais próximas ao último, segundo descrições de Gerlach e Nirenberg (1982). Conforme os autores citados anteriormente, este pertence à seção Gibbosum, com crescimento rápido em meio BDA, micélio aéreo abundante, de esbranquiçado a pêssego ou amarronzado, semelhante ao que foi observado no isolado F₁₈. A pigmentação da colônia também conferiu com a descrita pelos autores, sendo marrom-amarelado, avelã ou marrom-café, mas nunca vermelho, violeta, vinho ou azulado. A esporulação pode ser esparsa no micélio aéreo ou faltante, como também pode ser abundante, de coloração inicial pálida passando à amarelada. Clamidósporos não foram observados neste isolado, embora seja descrito pelos autores que eles são frequentemente observados nas hifas.

Os macroconídios de *F. equiseti* são de quatro a cinco septos, sendo os de cinco septos observados no presente estudo, segundo Gerlach e Nirenberg (1982), podem ser de 20 a 87 µm de comprimento e variar entre 2,8 e 6,0 µm de largura. Os macroconídios dessa espécie são mais alongados e mais filiformes, quando comparados com os das outras espécies observadas. Além disso, os macroconídios possuíam uma das células apicais mais afilada, o que o diferenciava dos demais. Portanto, a partir das características morfofisiológicas, principalmente relacionadas à forma dos macroconídios e à pigmentação da colônia, torna-se evidente que o isolado F₁₈ era muito diferente de qualquer outro avaliado no presente estudo. O mesmo pode ser verificado, visualmente, para F₁₇, o que foi confirmado pela análise molecular, já que ambos pertencem a espécies para as quais nenhum outro isolado fora, anteriormente, identificado, como será visto na sequência.

Em seguida, serão apresentados os dendrogramas filogenéticos produzidos após alinhamento das sequências dos isolados do presente estudo com sequências depositadas no “GenBank”. Procuraram-se selecionar entre 10 e 20 sequências com maior cobertura e similaridade. É importante ressaltar que os isolados identificados como sendo da mesma espécie foram agrupados em um mesmo dendrograma, procurando demonstrar sua proximidade genética.

Na Figura 12, é apresentado o dendrograma filogenético resultante do alinhamento dos isolados F₁, F₅, F₆ e F₇ com as sequências do banco de dados da região ITS. Esses isolados foram identificados como *Fusarium chlamydosporum*, já que os quatro isolados foram agrupados em um mesmo *clado*, o que indica maior proximidade genética entre os isolados do estudo e menor proximidade com os de outras espécies, como *F. nelsonii*, *F. brachygibbosum* e *F. acuminatum*, que ficaram arranjados em outros *clados*.

Como ocorrido para a região ITS (Tabela 11), com o sequenciamento do fator de alongação-1-alfa, alguns isolados foram semelhantes geneticamente, pois a maior similaridade foi observada para as mesmas espécies (Tabela 12). Analisando os grupos de isolados de acordo com as espécies às quais foram associados, como foi feito para a região ITS, foi possível verificar que os isolados F₁, F₅, F₆ e F₇ foram, novamente, semelhantes entre si. Porém, pela região ITS, este grupo havia apresentado maior similaridade com isolados de *Fusarium chlamydosporum* (Tabela 11). Entretanto, com o sequenciamento de TEF-1α, apareceram também sequências

de *F. brachygibbosum* (seção Gibbosum) e de *F. sporotrichioides*, pertencentes à mesma seção de *F. chlamydosporum* (seção Sporotrichiella).

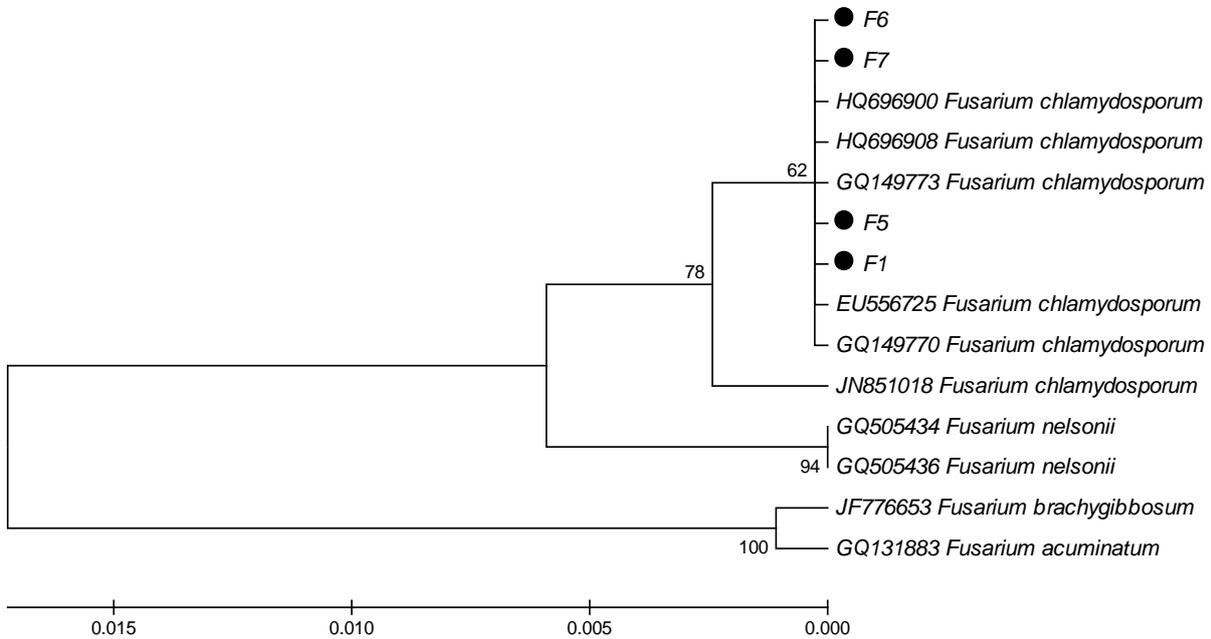


Figura 12 - Dendrograma filogenético construído para os isolados F₁, F₅, F₆ e F₇, baseado no método estatístico “Neighbor-joining”, derivado das sequências das regiões ITSrDNA, com base em 1000 réplicas de “bootstrap”. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o modelo Kimura-2-parameter. O número nas ramificações representa o número de “bootstrap”.

Apesar disso, no dendrograma filogenético construído para esse grupo de quatro isolados, confirmou-se a maior similaridade genética com *F. chlamydosporum*, já que estes se agruparam em um mesmo *clado* de um isolado dessa espécie (Figura 13). Portanto, com o sequenciamento dessa nova região, pôde-se ter mais confiabilidade na identificação da espécie, confirmando, também, a identificação por características morfofisiológicas descritas anteriormente. Cabe ressaltar que a ausência de outros acessos da espécie *F. chlamydosporum* no dendrograma deve-se ao fato de que ainda não existe um grande número de sequências dessa região depositadas no “Genbank”, para essa espécie de *Fusarium*.

Fusarium chlamydosporum pode ser considerado um saprófita, embora já tenha sido verificada patogenicidade moderada em testes de infecção em mudas de ervilha (SEEMÜLLER, 1968 apud GERLACH; NIENBERG, 1982). Siddiquee et al. (2010) isolaram o fungo como endofítico de raízes sadias de *Dendrobium*

crumenatum (Orchidaceae) na Malásia. Já Mathivanan e Murugesan (2000) isolaram *F. chlamydosporum* de pústulas de ferrugem do amendoim (*Puccinia arachidis*) e o testaram como agente de biocontrole em experimentos *in vitro* e *ex vitro*, concluindo que a aplicação de esporos do fungo sobre as pústulas da ferrugem reduziram a infecção em uma faixa de 4 a 48%. Por outro lado, Nahar e Mushtaq (2006) testaram a patogenicidade de seis espécies de *Fusarium* isoladas de sementes de girassol infestadas naturalmente por esses patógenos, dentre elas, *F. chlamydosporum*, detectando que todas foram patogênicas a mudas da cultura, sendo esta espécie, especificamente, responsável pelo sintoma de murcha e podridão do colo. Chehri et al. (2011) identificaram várias espécies de *Fusarium* patogênicas, causadoras da giberela do trigo no Irã, dentre elas *F. chlamydosporum*.

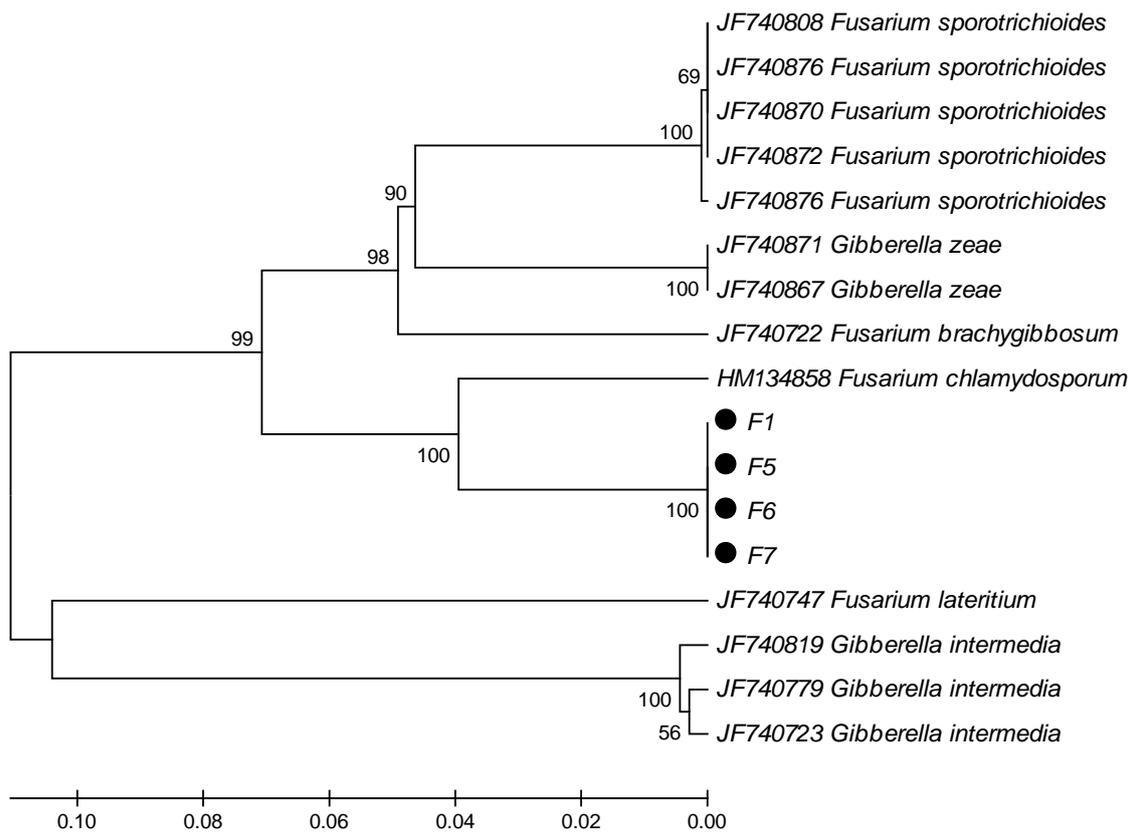


Figura 13 - Dendrograma filogenético construído para os isolados F₁, F₅, F₆, e F₇, baseado no método estatístico “Neighbor-joining”, derivado das sequências da região TEF - 1 α , com base em 1000 réplicas de “bootstrap”. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o modelo Tamura-Nei. O número nas ramificações representa o número de “bootstrap”.

Na Figura 14, é apresentado o dendrograma filogenético resultante do alinhamento dos isolados F₃, F₁₉, F₂₀ com as sequências da região ITS do banco de dados. Observando o dendrograma, verifica-se que os isolados F₁₉ e F₂₀ foram agrupados em um mesmo *clado*, indicando alta proximidade genética entre ambos, o que pode ser explicado pela procedência de coleta (Tabela 2), já que foram coletados no mesmo pomar.

O isolado F₃ ficou um pouco mais distante geneticamente, pois não se estabeleceu no mesmo *clado* dos dois anteriores, porém, os três foram identificados como *Gibberella zeae*, forma sexual de *F. graminearum* (Figura 14). Juntamente com essa espécie, no dendrograma, aparecem ainda espécies como *F. asiaticum* e *F. cerealis*, as quais são muito próximas de *G. zeae* e pertencem à mesma seção (Discolor). No dendrograma (Figura 14) um isolado de *Gibberella pulicaris* foi utilizado como *outgroup*, apenas para aprimorar a visualização da separação dos ramos no dendrograma. Essa espécie foi escolhida por pertencer também à seção Discolor e por não ter tido nenhuma sequência alinhada com os isolados deste estudo.

Gibberella zeae é conhecido como causador da doença chamada giberela do trigo e ataca as estruturas florais da cultura. A doença tem ocorrência generalizada no mundo e é observada causando danos nas regiões tritícolas onde o clima é úmido e quente, com precipitações pluviais elevadas na fase de floração do trigo (REIS, 1990). O fungo sobrevive nas sementes e nos restos culturais de inúmeras gramíneas (REIS; CASA, 1997 apud CASA et al, 2004), e as principais culturas de expressão econômica, suscetíveis ao ataque são: trigo, triticle, cevada, aveia, centeio, azevém, arroz, milho, trevo, alfafa, batata-doce e sorgo (REIS, 1988 apud TELLES NETO, 2004). No caso do presente estudo, é provável que as espécies agrícolas tenham servido de fonte de inóculo para o ataque à noqueira-pecan, já que a região de coleta dos isolados identificados como *G. zeae* é tradicionalmente agrícola. A fase assexuada do fungo, *Fusarium graminearum*, além de ser causadora da giberela do trigo, ainda apresenta o problema de que grãos infectados pelo patógeno contêm micotoxinas prejudiciais à saúde humana e animal (BUSSO et al, 2007). Portanto, pode representar um grande risco para o consumidor da noz-pecan, considerando que dois dos isolados (F₁₉ e F₂₀) foram identificados nas sementes da espécie.

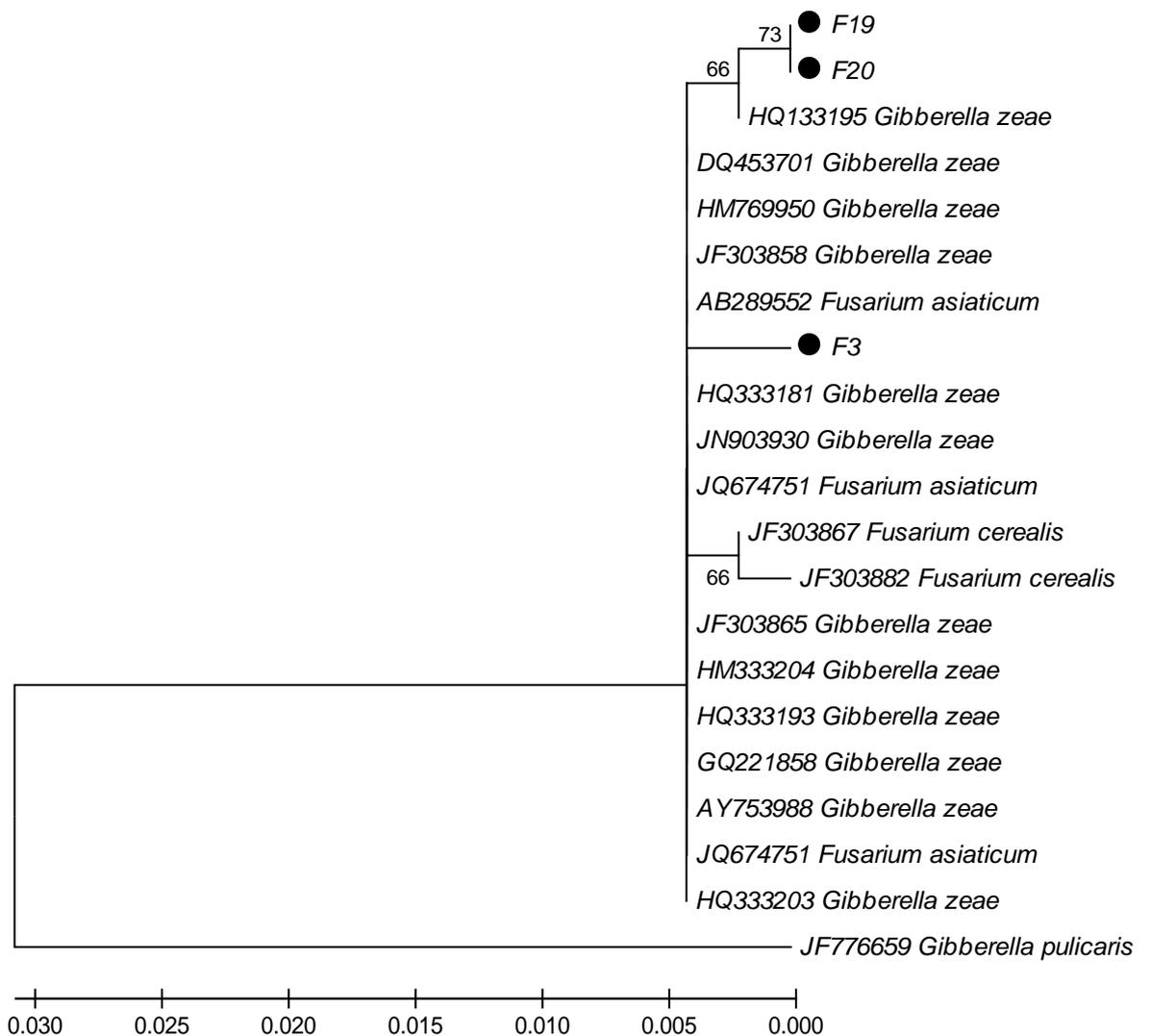


Figura 14 - Dendrograma filogenético construído para os isolados F₃, F₁₉ e F₂₀, baseado no método estatístico “Neighbor-joining”, derivado das sequências das regiões ITSrDNA, com base em 1000 réplicas de “bootstrap”. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o modelo Kimura-2-parameter. O número nas ramificações representa o número de “bootstrap”.

Os isolados F₁₉ e F₂₀, identificados e agrupados no mesmo *clado* de *Gibberella zeae*, através de sequenciamento da região ITS (Figura 14), também foram identificados como tal através do sequenciamento da região TEF - 1 α , com posterior análise filogenética (Figura 15) e o isolado F₃, que também havia sido identificado como *G. zeae* (Figura 14), foi novamente agrupado no mesmo *clado* de *Fusarium austroamericanum*, com sequenciamento de TEF-1 α (Figura 15), mesmo que sua similaridade com isolados de *G. zeae* tenha sido de 100% para vários acessos no GenBank (Tabela 12). Devido a esse fato, o sequenciamento da região TEF - 1 α

gerou uma dúvida na identificação de F₃, fornecendo subsídios para que esse isolado fosse determinado como pertencente ao *Fusarium graminearum* species complex. Esse complexo de espécies contempla *F. austroamericanum* e *F. graminearum*, sendo este último a forma assexuada de *Gibberella zeae*. Nesse caso, uma sequência de *F. culmorum*, a qual pertence à mesma seção dos demais, foi utilizada como *outgroup*, indicando sua distância genética com as sequências do estudo.

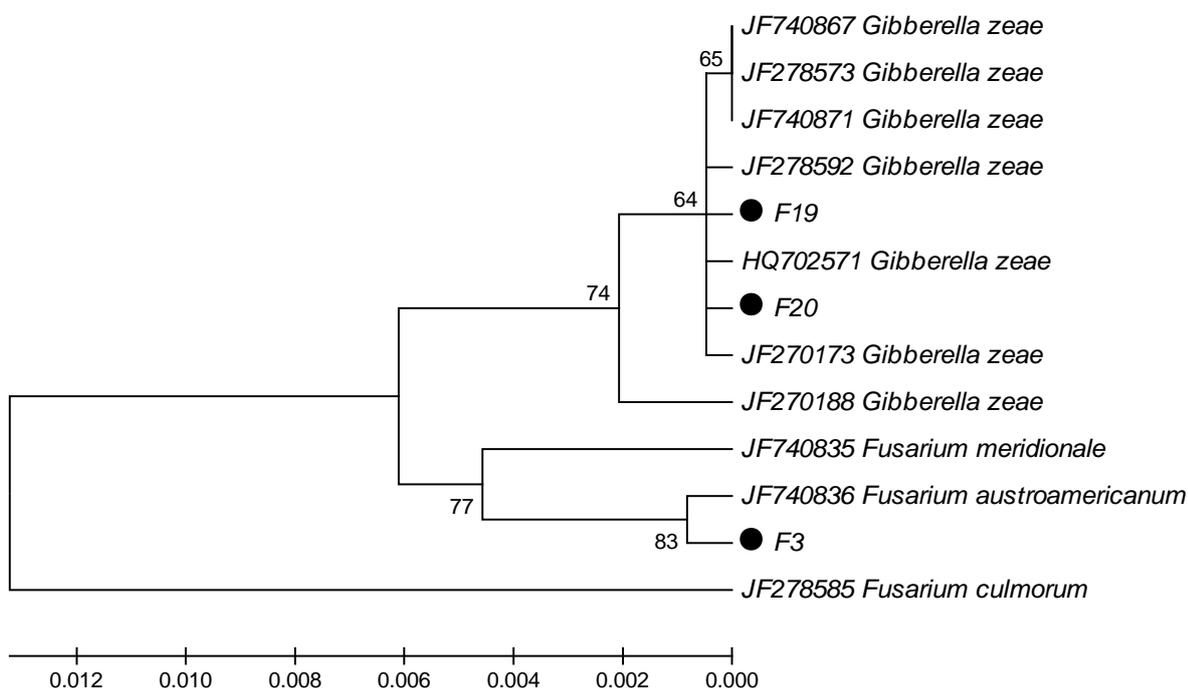


Figura 15 - Dendrograma filogenético construído para os isolados F₃, F₁₉, e F₂₀, baseado no método estatístico “Neighbor-joining”, derivado das sequências da região TEF - 1 α , com base em 1000 réplicas de “bootstrap”. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o modelo Tamura 3-parameter. O número nas ramificações representa o número de “bootstrap”.

O fator de alongação 1–alpha tem sido muito utilizado na identificação de espécies de *Fusarium*. Kristensen et al. (2005). Utiliza-se o sequenciamento do TEF-1 α para determinar relações filogenéticas e para revelar padrões subjacentes, tais como a capacidade de produzir certas micotoxinas, a distribuição geográfica e a preferência por hospedeiros entre as diferentes espécies de *Fusarium*, que ocorrem comumente em cereais e espécies afins na Noruega. Dentre as espécies de *Fusarium* envolvidas no estudo desses autores, incluem-se *F. graminearum* (forma

sexual: *Giberella zeae*) e *F. equiseti*. Knutsen et al. (2004) utilizaram o sequenciamento do TEF-1 α para analisar as relações filogenéticas entre isolados de *F. poae*, *F. sporotrichioides*, *F. langsethiae* e *F. kyushuense*.

O dendrograma filogenético resultante do alinhamento dos isolados F₈, F₉ e F₁₁ com as sequências ITS do banco de dados é apresentado na Figura 16. Como pode ser visto, os isolados F₈, F₉ e F₁₁ foram identificados como *Fusarium proliferatum*, apesar de se relacionarem também a *Gibberella moniliformis* (telemorfo de *Fusarium verticillioides*) e *G. fujikuroi* (telemorfo de *F. fujikuroi*), ambos pertencentes a *Gibberella fujikuroi* species complex. Segundo Kedera (1994), *G. fujikuroi* é considerado telemorfo de *F. moniliforme*, *F. proliferatum* e *F. subglutinans*.

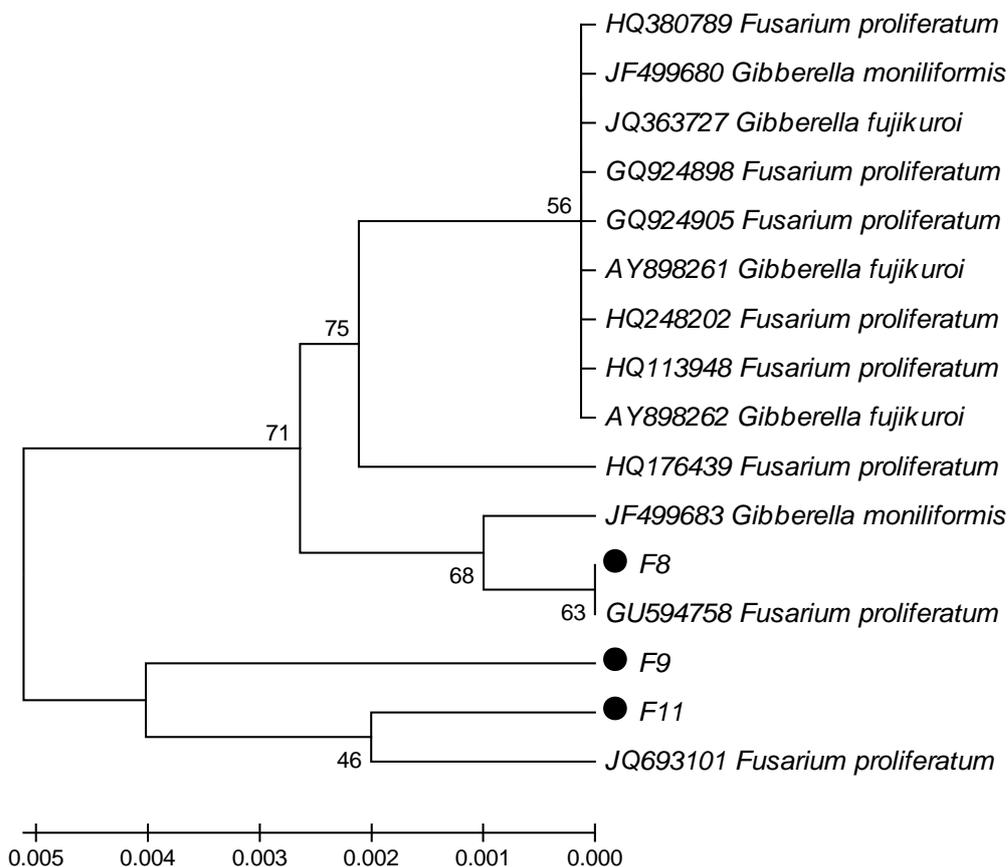


Figura 16 - Dendrograma filogenético construído para os isolados F₈, F₉ e F₁₁, baseado no método estatístico “Neighbor-joining”, derivado das sequências das regiões ITSrDNA, com base em 1000 réplicas de “bootstrap”. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o modelo Tamura-Nei. O número nas ramificações representa o número de “bootstrap”.

Contudo, observando cada isolado, verifica-se que F₈ se agrupou no mesmo *clado* de um acesso de *F. proliferatum*, o que indica uma maior proximidade com esse isolado específico. F₁₁ também se agrupou no mesmo *clado* de um outro acesso de *F. proliferatum*, ao passo que F₉ se agrupou no mesmo *clado*, porém com uma dissimilaridade genética ligeiramente maior (Figura 16).

Os isolados F₈, F₉ e F₁₁ foram agrupados em um mesmo *clado*, demonstrando grande relação filogenética entre si. Foram agrupados, também, em um *clado* maior, conjuntamente com *Giberella fujikuroi* (Figura 17), confirmando identificação realizada com sequenciamento de ITS (Figura 16), no qual estes foram identificados como *Fusarium proliferatum* (forma assexuada de *G. fujikuroi*). As demais espécies que apresentam alta similaridade com os isolados deste estudo permaneceram em *clados* mais distantes. Tef 1- α foi utilizado por Stępień et al. (2011), para análises filogenéticas entre 38 isolados de *Fusarium proliferatum*, oriundos de isolamentos de diferentes hospedeiros em diferentes países.

A seção Liseola é composta por espécies de *Fusarium* difíceis de serem distinguidas pelos métodos tradicionais de caracteres morfológicos (BRITZ et al, 2002). Por este motivo, estudos baseados em identificação molecular são de extrema importância para a identificação correta das espécies do grupo. Essa última afirmação é confirmada por O'Donnel et al. (2000), que relataram que nem todos os telemorfos das espécies de *Fusarium* da seção Liseola são conhecidos, além de algumas espécies serem morfológicamente muito simples. Por isso, há a necessidade do desenvolvimento de um conceito filogenético mais aprofundado das espécies, baseado em dados de sequências de DNA, a fim de investigar aspectos críticos da biologia desses organismos, tais como gama de hospedeiros, potencial de produção de micotoxinas e distribuição geográfica. As espécies de *Fusarium* da seção Liseola, além de serem patogênicas a diversas culturas agrícolas, são, também, altamente toxicogênicas e, conforme Bottalico (1998) podem produzir micotoxinas, tais como fumonisinas, ácido fusárico, beauvericina, fusaproliferin e moniliformina.

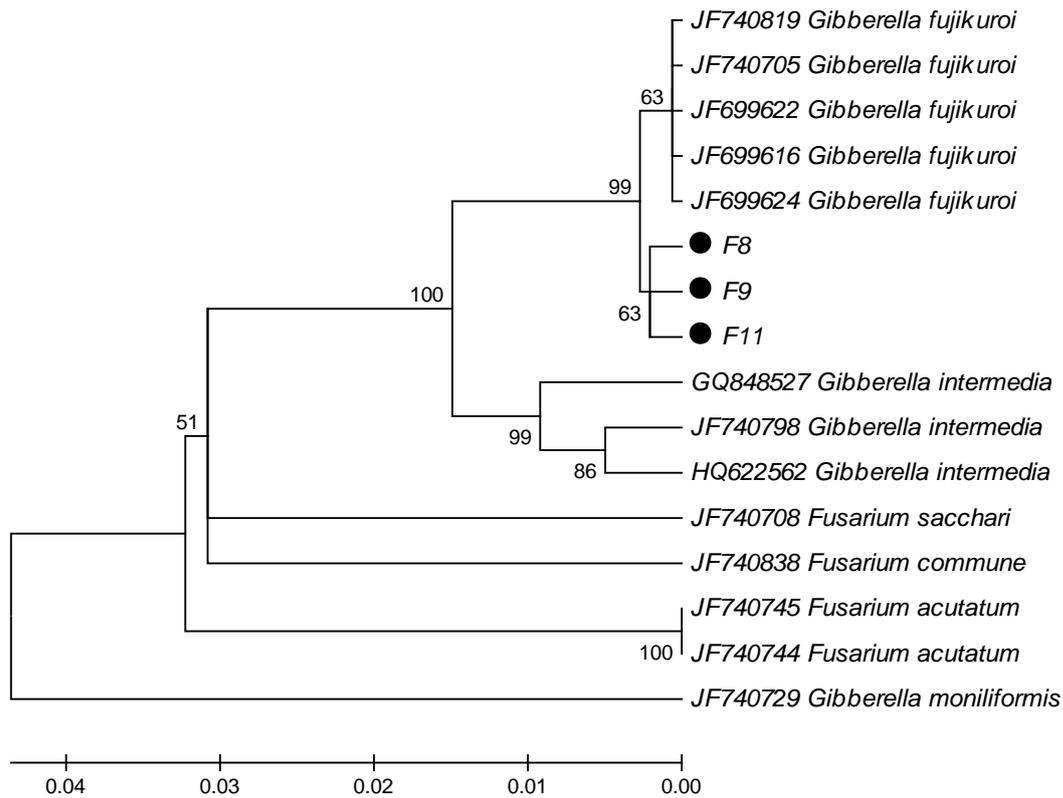


Figura 17 - Dendrograma filogenético construído para os isolados F₈, F₉, e F₁₁, baseado no método estatístico “Neighbor-joining”, derivado das sequências da região TEF - 1 α , com base em 1000 réplicas de “bootstrap”. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o modelo Kimura 2-parameter. O número nas ramificações representa o número de “bootstrap”.

O isolado F₁₇ foi identificado como *Fusarium oxysporum*, como pode ser visto na Figura 18. Mesmo no alinhamento com outras sequências de ITS disponíveis no GenBank, somente essa espécie se alinhou com o isolado do estudo. Segundo Gerlach e Nirenberg (1982), a espécie pertence à seção Elegans e é, economicamente, o membro mais importante do gênero *Fusarium*, distribuído pelo mundo. É, além disso, muito comumente encontrada no solo, sendo agente causal de murchas vasculares, tombamento e podridões de raízes em diferentes hospedeiros.

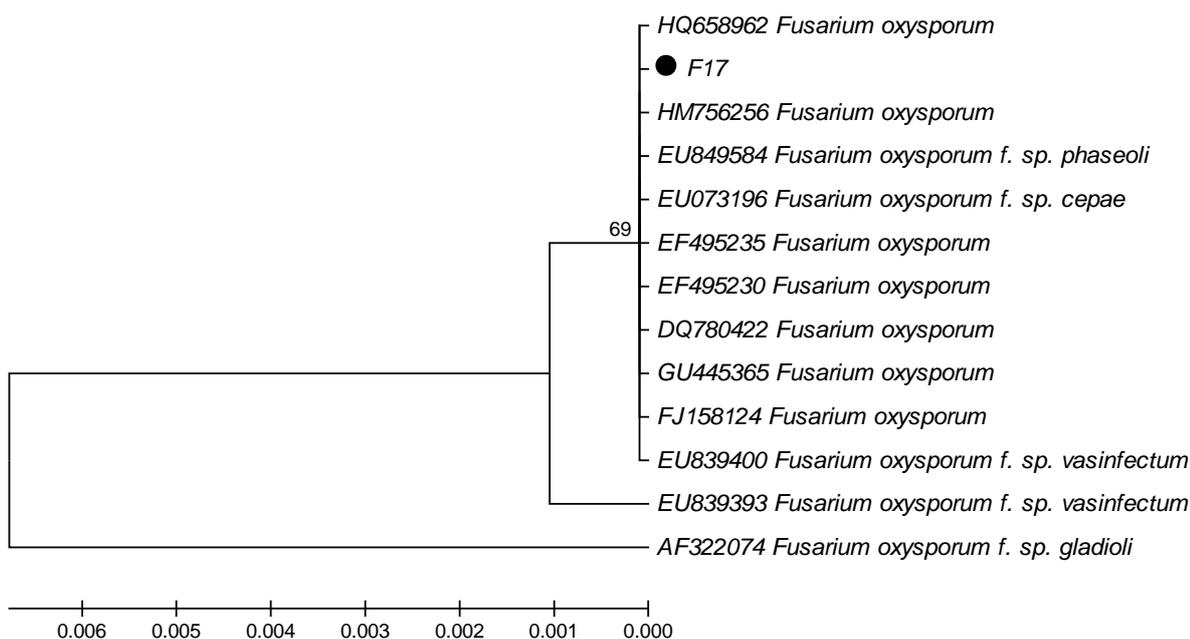


Figura 18 - Dendrograma filogenético construído para o isolado F₁₇, baseado no método estatístico “Neighbor-joining”, derivado das sequências das regiões ITSrDNA, com base em 1000 réplicas de “bootstrap”. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o modelo Tamura-Nei. O número nas ramificações representa o número de “bootstrap”.

Com o sequenciamento da região TEF- 1 α , o isolado F₁₇ foi identificado como *Fusarium oxysporum* (Figura 19), confirmando o reconhecimento inicial morfofisiológico e a identificação através de sequenciamento da região ITS (Figura 18). Outras espécies de *Fusarium* e de *Giberella* não pertencentes à mesma seção *Elegans* (Gerlach e Nirenberg, 1982) também apresentaram alta similaridade com a sequência de F₁₇. Entretanto, o isolado deste estudo foi agrupado em um *clado* onde apenas *F. oxysporum* estava presente.

A espécie *Fusarium oxysporum* é conhecida mundialmente, devido ao intenso ataque que promove em diversas culturas agrícolas, como tomate, feijão, batata, cana-de-açúcar, maracujá. Em espécies florestais, ela já foi detectada por Poletto et al. (2006), causando podridão radicular em erva-mate (*Ilex paraguariensis*). Também foi identificada por Krugner et al. (1970), que associaram os sintomas de murcha e secamento apical, em mudas de *Pinus elliottii* var. *elliottii*, ao ataque da espécie *Fusarium oxysporum*. Grigoletti Júnior e Auer (2006) fizeram uma associação semelhante para *Pinus taeda* e, em noqueira-pecan, já foi relatada como patogênica

quando inoculada em pomares de três anos no México, estando este organismo presente no corpo de um inseto-praga (ALVIDREZ-VILLAREAL et al., 2012).

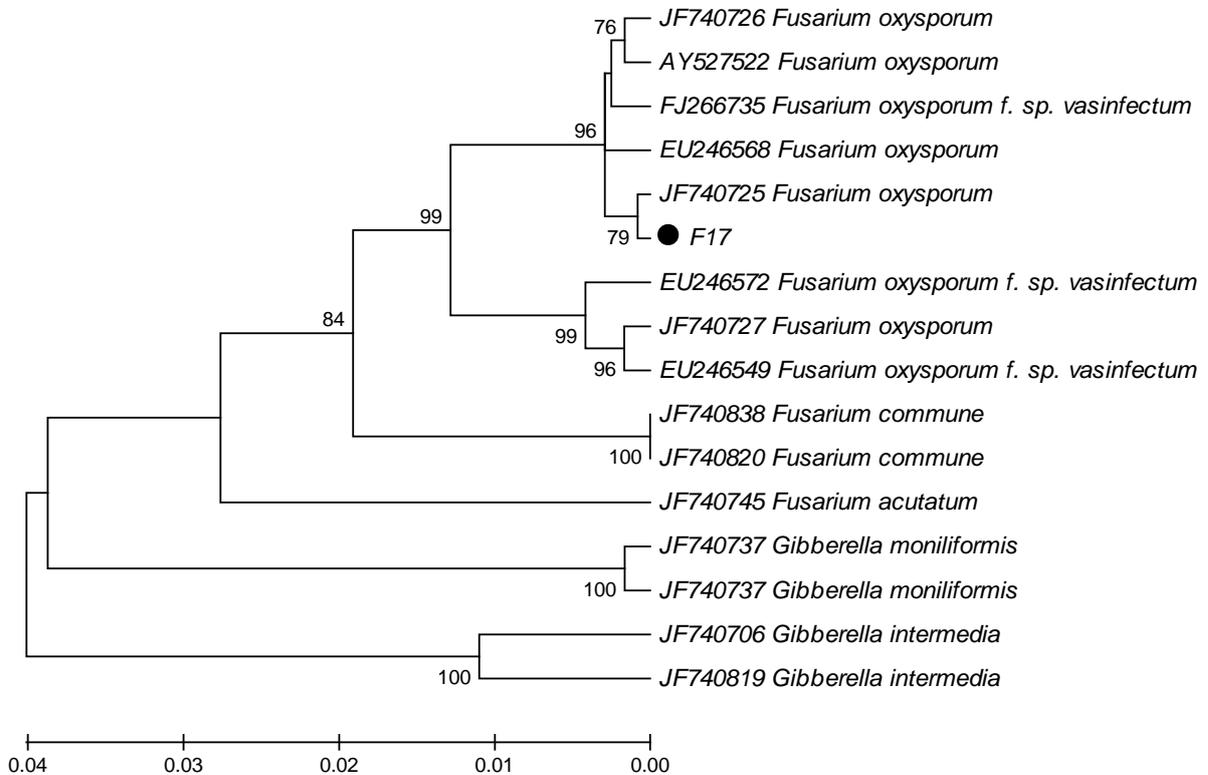


Figura 19 - Dendrograma filogenético construído para o isolado F₁₇, baseado no método estatístico “Neighbor-joining”, derivado das sequências da região TEF - 1 α , com base em 1000 réplicas de “bootstrap”. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o modelo Tamura-Nei. O número nas ramificações representa o número de “bootstrap”.

Estudos de identificação molecular de isolados de *F. oxysporum* associados a doenças mundialmente conhecidas têm sido realizados, recentemente, com o avanço de técnicas de identificação molecular. Santos et al. (2011), por exemplo, avaliaram a variabilidade genética de 36 culturas monospóricas de isolados de *F. oxysporum* f. sp. *cubense*, agente do mal-do-panamá, que ataca bananeiras, por meio de marcadores moleculares do tipo RAPD (Polimorfismo de DNA Amplificados ao Acaso). Silva et al. (2010) também avaliaram a variabilidade genética de 64 isolados de *F. oxysporum* f. sp. *cubense*, porém, utilizando, além de marcadores RAPD, os marcadores microssatélites ou SSR.

Fusarium oxysporum é considerado um complexo de espécies de fitopatógenos presentes no solo, que compreende muitas *formae speciales*

diferentes, cada uma caracterizada por um elevado grau de especificidade quanto ao hospedeiro (LIEVENS et al., 2009). Diante dessa premissa, os autores anteriormente citados estudaram as relações evolutivas entre isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* e *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*, através de sequenciamento da região TEF- 1 α , conseguindo estabelecer relações evolutivas entre essas duas *formae speciales*, demonstrando o êxito do uso dessa região para a identificação de *F. oxysporum*.

O isolado F₁₈ foi identificado morfologicamente e confirmado pela análise molecular através da região ITS como *Fusarium equiseti* (Figura 20), cujo teleomorfo é classificado como *Gibberella intricans* (GERLACH; NIRENBERG, 1982) e incluído na seção Gibbosum. Apesar de outras duas espécies (*F. incarnatum* – seção *Arthrosporiella* e *F. chlamydosporum* – seção *Sporotrichiella*) também terem sido aproximadas com o isolado, este foi agrupado em um *clado* em que os dois acessos são de *F. proliferatum*, embora F₁₈ tenha uma dissimilaridade um pouco maior com os outros dois acessos.

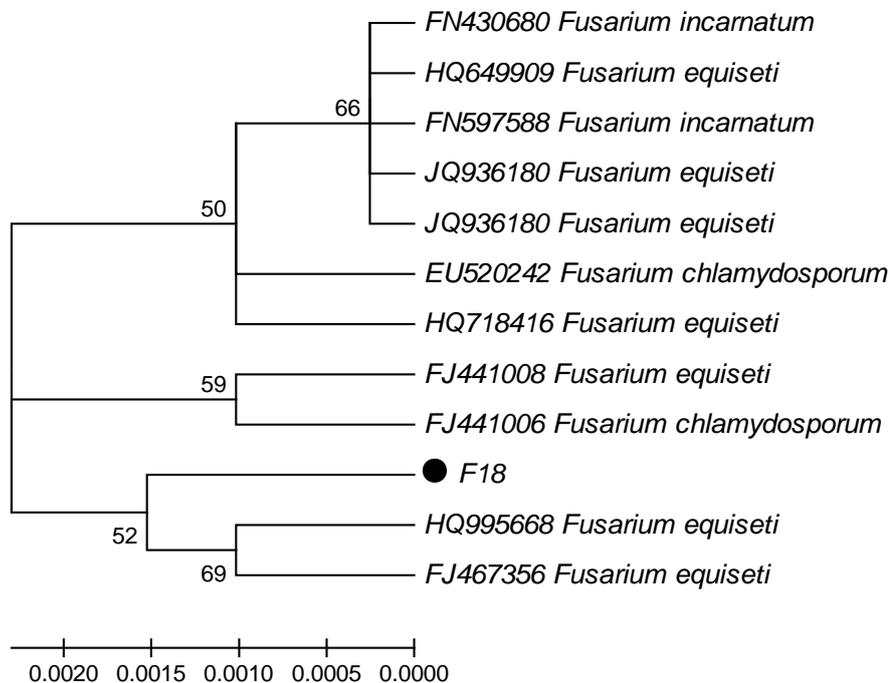


Figura 20 - Dendrograma filogenético construído para o isolados F₁₈, baseado no método estatístico “Neighbor-joining”, derivado das sequências das regiões ITSrDNA, com base em 1000 réplicas de “bootstrap”. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o modelo Jukes-Cantor. O número nas ramificações representa o número de “bootstrap”.

Fusarium equiseti foi encontrado por Pfenning e Martins (2000), associado ao sistema radicular de uma planta de café com sintomas de murcha, porém, relatos do fungo como agente patogênico são raros. Concordando com essa afirmação, Gerach e Nirenberg (1982) relataram que a espécie, em geral, age como um parasita fraco, e seus danos representam menor importância econômica quando comparados aos de outras espécies do gênero. Wing et al (1993) testaram o nível de toxinas de isolados de *Fusarium* spp. da seção Gibbosum coletados de solo na Austrália, sendo que, dentre as várias espécies, *F. equiseti* não se mostrou toxicogênico ou o nível de toxinas da família dos tricotecenos foi encontrada em baixas concentrações. Por outro lado, em estudo de Brian et al. (1960), foi encontrada alta concentração de diacetoxiscirpenol, toxina que, segundo os autores do estudo, provavelmente não seja importante para a planta infectada, mas sim, para casos de toxidez de animais alimentados com cereais infectados por *F. equiseti*.

Com o sequenciamento de TEF – 1- α o isolado F₁₈ foi agrupado no mesmo clado de *Fusarium equiseti*, com alto valor de suporte (bootstrap de 98). Outras espécies pertencentes a seções distintas de Gibbosum, seção à qual *F. equiseti* pertence, também foram similares à sequência do isolado F₁₈, contudo, a distância genética foi maior (Figura 21). O aparecimento de outras espécies distintas também se deve ao fato de haver um número limitado de sequências do TEF - 1 α de *F. equiseti*. No entanto, mesmo que apenas duas sequências dessa espécie tenham sido adicionadas ao dendrograma, uma delas foi a que mais se aproximou do isolado em estudo. *Fusarium incarnatum* e *F. concolor* pertencem à seção *Arthrosporiella*; *F. sporotrichioides*, à *Sporotrichiella* (Gerlach e Nirenberg, 1982); e *Giberella intermedia* pertence ao mesmo complexo de *G. fujikuroi* (seção *Liseola*). Assim, através de TEF - 1 α , confirmou-se a identificação já realizada através de sequenciamento da região ITS (Figura 20).

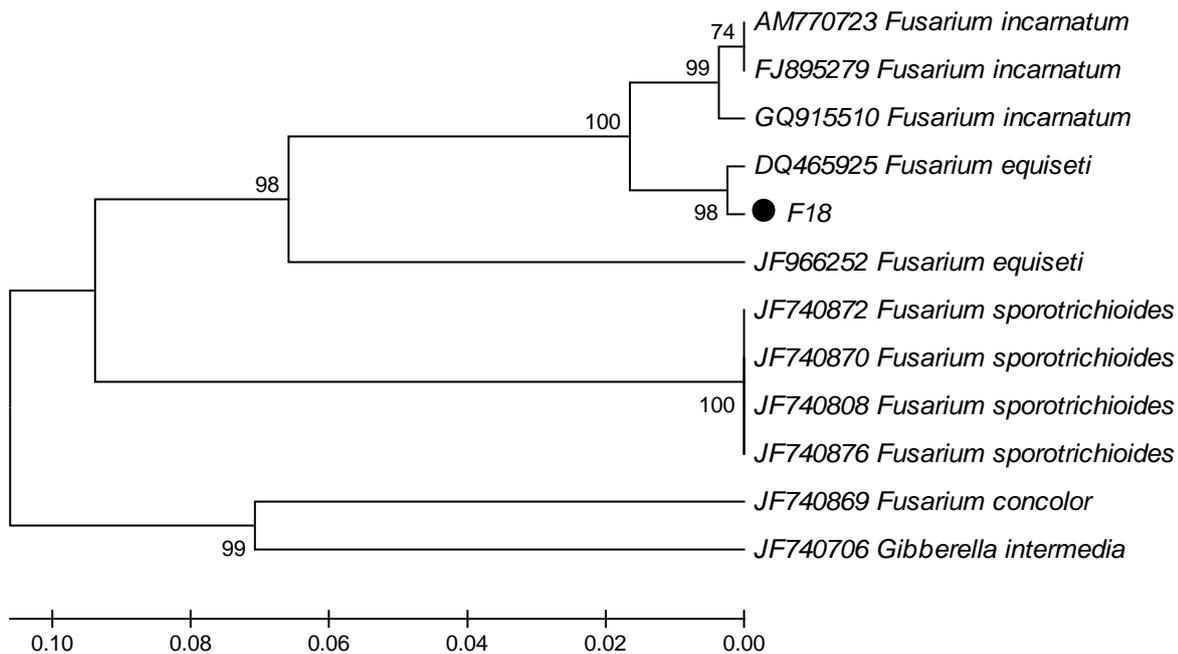


Figura 21 - Dendrograma filogenético construído para o isolado F₁₈, baseado no método estatístico “Neighbor-joining”, derivado das sequências da região TEF - 1 α , com base em 1000 réplicas de “bootstrap”. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o modelo Tamura-Nei. O número nas ramificações representa o número de “bootstrap”.

Após o sequenciamento das duas regiões (ITS e TEF-1 α) e a identificação dos isolados, verificou-se que as primeiras observações morfofisiológicas ajudaram a separar os isolados de *Fusarium* spp. em grupos, de acordo com semelhanças nesses caracteres, o que foi confirmado com a identificação molecular, oferecendo maior segurança na definição das espécies. Dessa forma, constata-se que as metodologias (morfológica e molecular) devem ser empregadas de maneira conjunta, dando mais suporte à caracterização e identificação de *Fusarium* spp.

4.6 Patogenicidade de isolados de *Pestalotiopsis* spp.

Antes do estudo da patogenicidade dos diferentes isolados de *Pestalotiopsis* spp. inoculados, foi construída a escala para sua avaliação, baseando-se em medida de área lesionada de folhas atacadas à campo, isto é, em condições naturais de infecção (Figura 22).

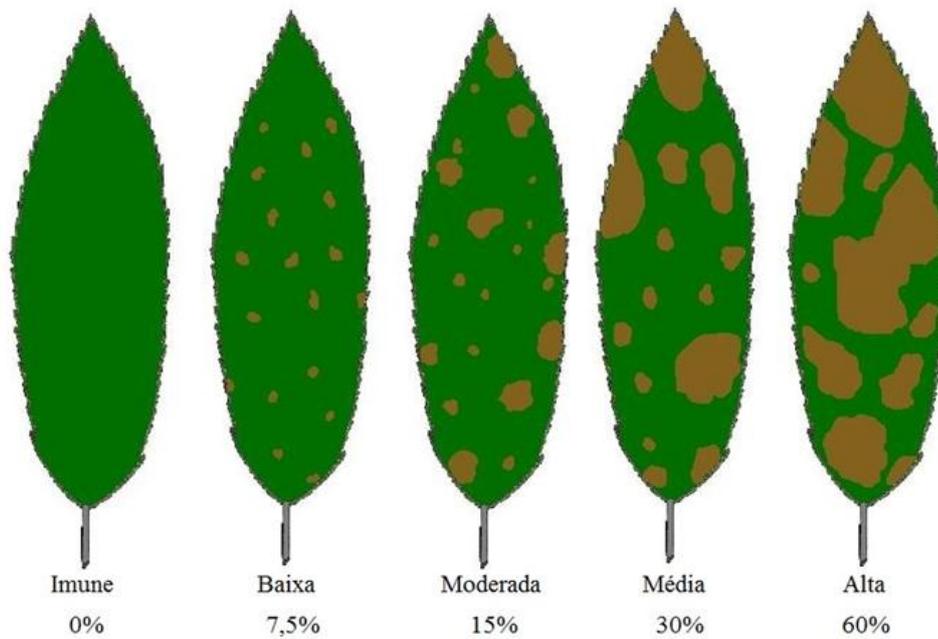


Figura 22 - Escala nominal e diagramática para manchas foliares causadas por *Pestalotiopsis* spp. em *Carya illinoensis*.

Os sintomas iniciaram-se, em média, aos 13 dias após a inoculação, caracterizando-se por manchas de bordas irregulares e marrom-claras no centro, bem como por halo marrom-escuro. No centro da lesão, podiam ser observadas pontuações escuras correspondentes ao desenvolvimento do acérvulo do patógeno com exsudação de cordões de conídios (cirros), saindo do centro da estrutura. Após alguns dias, as manchas coalesceram formando lesões maiores, semelhantes às de uma queima foliar com intensa esporulação do fungo, culminando com a queda das folhas mais atacadas. Alguns dos sintomas descritos podem ser observados na Figura 23.

Sintomas semelhantes a uma queima-foliar já foram observados em noqueira-pecan, sendo estes associados a outros organismos patogênicos como *Xylella fastidiosa* (SANDERLIN; HEYDERICH-ALGER, 2000) e *Glomerella cingulata* (LATHAM et al., 1995).

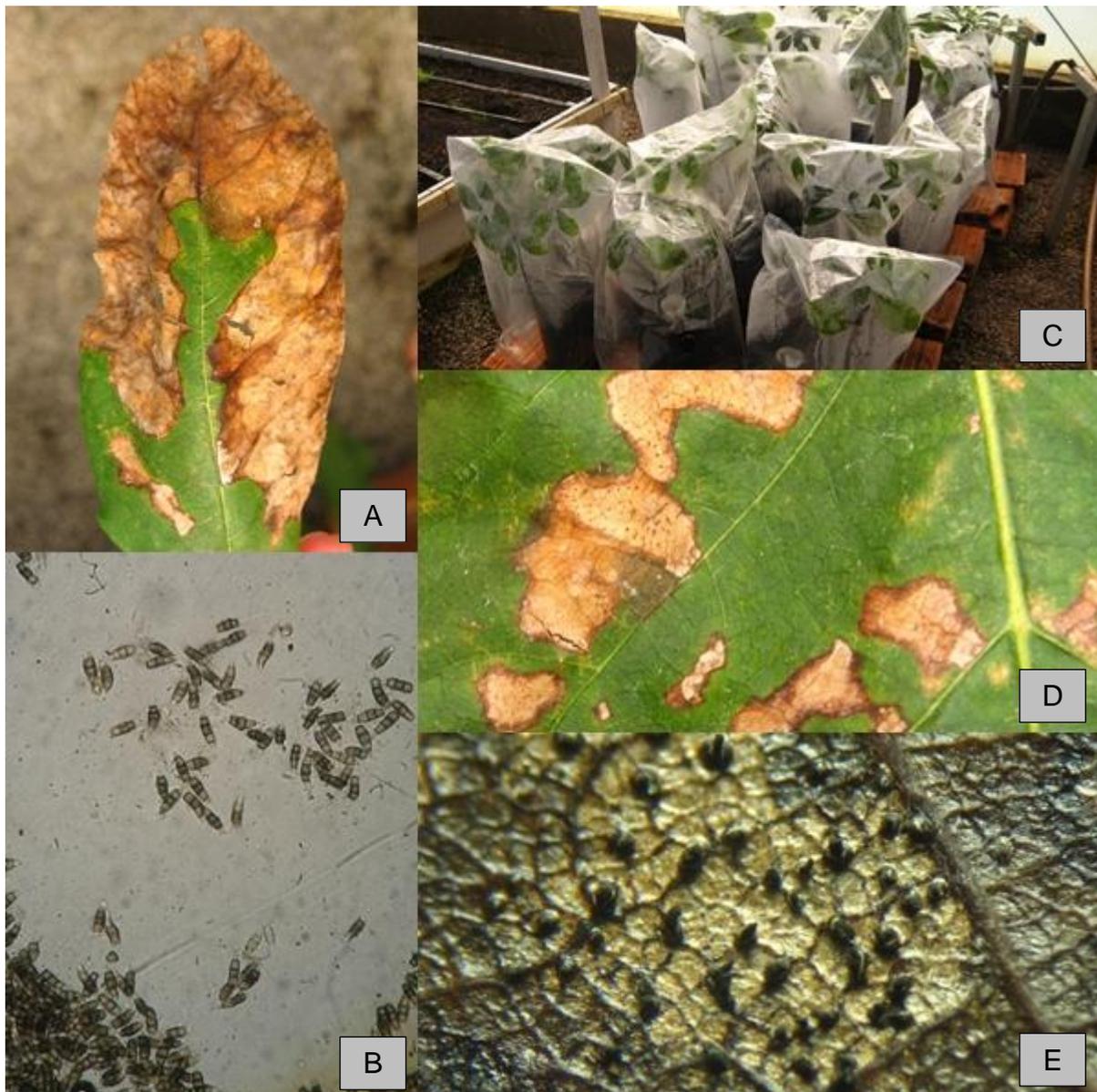


Figura 23 - Teste de patogenicidade de isolados de *Pestalotiopsis* spp. Sintoma classificado como de alta severidade da mancha foliar associada à inoculação do isolado P7 (A); conídios de *Pestalotiopsis* sp. observados em microscópio em aumento 40x (B); mudas em câmara úmida logo após a inoculação foliar (C); detalhe, visto em lupa, de mancha foliar causada pela inoculação de *Pestalotiopsis* sp. (D); detalhe, visto em lupa, dos cirros (cordões de conídios) formados por *Pestalotiopsis* sp. (E).

Na Tabela 13, observa-se a percentagem de mudas sintomáticas após a inoculação com os 14 isolados de *Pestalotiopsis* spp., de acordo com a escala estabelecida para este gênero. Os isolados P₆, P₁₂ e P₁₃, os quais também foram inoculados, não ocasionaram sintomas nas mudas, assim como também não foram observados sinais do patógeno na superfície das folhas, indicando ausência de

patogenicidade. Os isolados P₂, P₃, P₄, P₇ e P₁₄, mostraram-se mais agressivos, já que apresentaram mudas classificadas como de alta severidade de ataque. Já os isolados P₁₀ e P₁₆ apresentaram sintomas nas mudas em baixa severidade, indicando menor agressividade.

Tabela 13 - Severidade (%) da mancha foliar causada por *Pestalotiopsis* spp.

Isolados	Classes de severidade					Início dos sintomas (dias)*
	Imune (0%)	Baixa (7,5%)	Moderada (15%)	Média (30%)	Alta (60%)	
P1	25	50	25	0	0	15
P2	0	0	37,5	37,5	25	15
P3	0	12,5	50	25	12,5	12
P4	0	0	25	50	25	15
P5	0	0	50	50	0	15
P6	100	0	0	0	0	-
P7	0	0	12,5	50	37,5	10
P9	0	12,5	37,5	50	0	10
P10	12,5	50	37,5	0	0	15
P11	0	50	25	25	0	15
P12	100	0	0	0	0	-
P13	100	0	0	0	0	-
P14	0	37,5	25	12,5	25	9
P16	37,5	37,5	25	0	0	17

* Dias após a inoculação.

Fungos do gênero *Pestalotiopsis* já foram relatados causando manchas foliares em espécies florestais, como foi escrito anteriormente por Ueno (2008), para amoreira-preta, espécie em que foram identificadas manchas foliares e lesões em frutos. Keith et al. (2006) encontraram várias espécies do gênero associadas a manchas foliares e verrugoses em frutos de goiabeira (*Psidium guajava*) no Hawaii. Espinoza e Briceño (2008), por sua vez, reconheceram *Pestalotiopsis clavispora*, *P. neglecta* e *Truncatella angustata* (=Pestalotia) associadas a sintomas de cancos e

morte de plantas de mirtilo (*Vaccinium* spp.) no Chile. Akrofi e Amoah (2009) relataram manchas foliares em carité (*Vitellaria paradoxa*) em Ghana, no continente africano.

Serra e Coelho (2007) encontraram a espécie *Pestalotiopsis pauciseta* como agente patogênico da mancha em helicônia (*Heliconia psittacorum* x *H. spathocircinata* cv. *Golden Torch*), com ocorrência de lesões nas brácteas na forma de manchas deprimidas, de ovaladas a elípticas, com centro branco acinzentado e bordas de coloração marrom avermelhada. Pontuações escuras, correspondentes aos acérvulos do fungo, foram observadas no centro das lesões; nas folhas as manchas eram ovaladas, de coloração marrom-palha, bordas regulares, envolvidas por halo amarelado. No centro das lesões formaram-se muitos acérvulos do fungo, nas faces superior e inferior das folhas, caracterizados como pontuações escuras. Segundo os mesmos autores, as manchas frequentemente coalesciam, formando extensas áreas necrosadas, com rompimento do tecido. Bastos et al. (2001) observaram manchas nas folhas e lesões nos frutos de mangostão (*Garcinia mangostana*) em Belém – PA, associados à *Pestalotiopsis cruenta*, sendo que, nas folhas, os sintomas apareceram na forma de manchas necróticas bem pronunciadas, de coloração marrom, bordas bem definidas, demarcadas por uma distinta margem de cor mais escura. Ao coalescerem, as manchas formam extensas áreas de tecidos necrosados, provocando a queda prematura das folhas. Os sintomas descritos por Serra e Coelho (2007) e Bastos et al. (2001) foram muito similares aos do presente estudo.

Na Tabela 14, são apresentados os resultados do teste de patogenicidade realizado com cinco isolados de *Pestalotiopsis* spp., em frutos de noqueira-pecan. Com esses resultados, é possível verificar a existência de patogenicidade a frutos, de isolados coletados como causadores de mancha foliar na espécie. Entretanto, somente os isolados P₇, P₁₀ e P₁₁ causaram sintomas em frutos, caracterizados por necrose dos tecidos na região de inoculação, depreciando a qualidade do fruto. Esse fato demonstra que o patógeno, além de causar perdas por desfolha e diminuição da área fotossinteticamente ativa, ao atacar folhas, também afeta diretamente a produção da noz.

Tabela 14 - Resultados médios (%) do teste de patogenicidade em frutos nogueira-pecan, após inoculação com *Pestalotiopsis* spp.

Variáveis	Isolados					Teste**	CV (%)
	P ₄	P ₇	P ₁₀	P ₁₁	P ₁₆		
Frutos Sintomáticos	0 c*	70 b	50 b	75 a	0 c	0 c	19,11
Futos Sadios	100 a	30 b	50 b	25 c	100 a	100 a	5,49

* Médias seguidas por mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância.** Teste: testemunha.

Já existem relatos de ocorrência de fungos do gênero *Pestalotiopsis* como causadores de danos em frutos, inclusive em espécie arbórea do gênero *Carya*. Zhihong et al. (2010) identificaram *Pestalotiopsis microspora* como agente causal de mancha-preta na noz de *Carya cathayensis* na China, ocasionado perdas na produção desde 2007. Bastos et al. (2001) verificaram lesões nos frutos de mangostão (*Garcinia mangostana*), no estado do Pará, associados a *Pestalotiopsis cruenta*, sendo que, nos frutos verdes, os sintomas se caracterizam por pequenas lesões superficiais, que evoluem posteriormente, ficando com o centro deprimido e, muitas vezes, com rachaduras.

4.7 Caracterização morfofisiológica dos isolados patogênicos de *Pestalotiopsis* spp.

A caracterização morfofisiológica também foi realizada com os isolados patogênicos de *Pestalotiopsis* spp. O crescimento micelial diário, avaliado até os sete dias, bem como a taxa de crescimento, estão apresentados na Tabela 15. Alguns isolados demonstraram crescimento micelial mais rápido, como é o caso de P₁, seguido de P₂, P₁₄ e P₄, respectivamente, com taxas de crescimento micelial diário superiores a 9,0 mm. Entretanto, alguns isolados tiveram taxas de crescimento menores, inferiores a 8,0 mm, como é o caso de P₃, P₅ e P₁₀. Dessa forma, o crescimento micelial pode ser uma variável útil na separação de isolados.

Tabela 15 - Crescimento micelial diário de isolados patogênicos de *Pestalotiopsis* spp. em meio batata-dextrose-ágar (BDA).

Isolados	Dias							TCM
	1	2	3	4	5	6	7	
P1	3.14	14.76	28.58	35.62	45.03	55.16	65.47	9.35
P2	2.87	15.02	28.49	35.59	44.79	54.17	65.07	9.29
P3	2.21	11.32	20.16	28.11	37.54	46.97	54.62	7.80
P4	2.84	15.42	28.29	35.43	44.48	54.25	64.38	9.20
P5	1.84	10.50	19.21	25.16	36.23	45.90	53.43	7.63
P7	1.85	10.94	21.40	31.83	40.68	49.22	56.30	8.04
P9	1.88	10.33	19.73	29.54	38.94	47.62	56.00	8.00
P10	1.92	10.64	19.79	30.23	39.19	48.67	55.61	7.94
P11	2.02	10.74	20.72	31.80	40.61	51.13	57.25	8.18
P14	2.81	15.40	28.12	35.24	44.10	54.60	64.50	9.21
P16	2.01	11.19	22.96	33.55	42.12	53.26	60.09	8.58

Outras variáveis morfofisiológicas foram avaliadas, entre elas, a esporulação e características relacionadas aos conídios (dimensões, número de células e apêndices) de *Pestalotiopsis* spp. (Tabela 16). A esporulação variou entre os isolados, apesar de essa característica ser influenciada pelo meio de cultura e pelas condições a que esses isolados foram incubados. No entanto, neste caso, todos foram repicados para o mesmo meio e submetidos às mesmas condições de incubação, no mesmo período de tempo, indicando que as variações das condições de crescimento foram mínimas entre os isolados. O isolado P₁₆ se destacou pela maior esporulação ($10,0 \times 10^6$ esporos/ml), e P₅ pela esporulação mínima ($2,64 \times 10^6$ esporos/ml).

As características dos conídios talvez sejam mais importantes na diferenciação de isolados, uma vez que já foram citadas em estudos anteriores como importantes, inclusive, na diferenciação de espécies e gêneros. O número de células dos conídios de *Pestalotiopsis* spp. já foi mencionado como variável na diferenciação, inclusive entre gêneros muito semelhantes. Steyaert (1949 apud MAHARACHCHIKUMBURA et al. 2011) relatam que conídios de espécies do gênero

Pestalotia teriam seis células, enquanto *Pestalotiopsis* teriam cinco células, sendo esta, portanto, uma característica-chave para a diferenciação de ambos os gêneros. Entretanto, o número de células ainda não pode ser o único parâmetro para diferenciação, já que Guba (1961 apud MAHARACHCHIKUMBURA et al. 2011) separaram o gênero *Pestalotia* em seções, baseados no número de células do conídio, o qual pode conter quatro, cinco ou seis células. Já em estudo realizado por Dude e Bilgrami (1966), 57 isolados de *Pestalotia/Pestalotiopsis* foram obtidos de vários hospedeiros com sintomas de mancha foliar, para que fosse realizada uma descrição das características morfológicas desses isolados útil para a diferenciação dos gêneros. Os autores encontraram variações no número de células e na forma de conídios em isolados coletados a partir do mesmo hospedeiro, concluindo, portanto, que é preferível manter todos os isolados no gênero originalmente descrito (*Pestalotia*) do que dividir organismos tão semelhantes.

Tabela 16 - Esporulação e características dos conídios de isolados patogênicos de *Pestalotiopsis* spp. crescidos em meio BDA.

Isolados	Esporulação (x10 ⁶ esporos/ml)	Conídio			
		Comprimento (µm)	Largura (µm)	Nº células	Nº apêndices
P1	7.45	29.13	7.88	5	2-3
P2	7.64	28.88	7.5	6	2-3
P3	2.78	32.00	7.37	6	2-3
P4	7.16	32.12	6.87	5	2-4
P5	2.64	31.00	6.88	6	2-3
P7	6.81	27.12	5.60	6	2-3
P9	4.04	28.12	7.12	6	2-3
P10	2.95	30.75	7.45	5	2-3
P11	4.13	26.12	6.35	5	2-3
P14	7.68	29.00	6.87	5	2-4
P16	10.01	25.12	7.00	5-6	2-3

Por outro lado, Wei e Xu (2004) trataram o fungo encontrado como endofítico, em *Podocarpus macrophyllus*, como sendo da espécie *Pestalotiopsis kunmingensis*, pois os autores relatam que, apesar das grandes divergências sobre classificar como *Pestalotia* sp. ou *Pestalotiopsis* sp., este último costuma apresentar algumas características morfológicas específicas: conídios fusiformes relativamente formados dentro acérvulo compacto; conídios possuindo, em geral, cinco células, sendo três células medianas mais escuras, e as outras duas incolores nas extremidades; e dois ou mais apêndices apicais. As características descritas por esses últimos autores se encaixam nas descrições deste estudo, por isso, optou-se pela denominação de *Pestalotiopsis* spp. Além disso, após a identificação molecular, os isolados foram identificados somente por este gênero.

Na Figura 24, observam-se os conídios dos 11 isolados patogênicos de *Pestalotiopsis* spp. Os conídios da maior parte dos isolados são caracterizados por apresentarem uma das células centrais de coloração quase negra, destacada das demais células, exceto os isolados P₇ e P₉, nos quais todas as células centrais eram de coloração uniforme. Os apêndices apicais desses dois últimos isolados citados também se caracterizam por serem os mais curtos, assim como para o conídio do isolado P₁, que também apresenta esta característica como marcante.

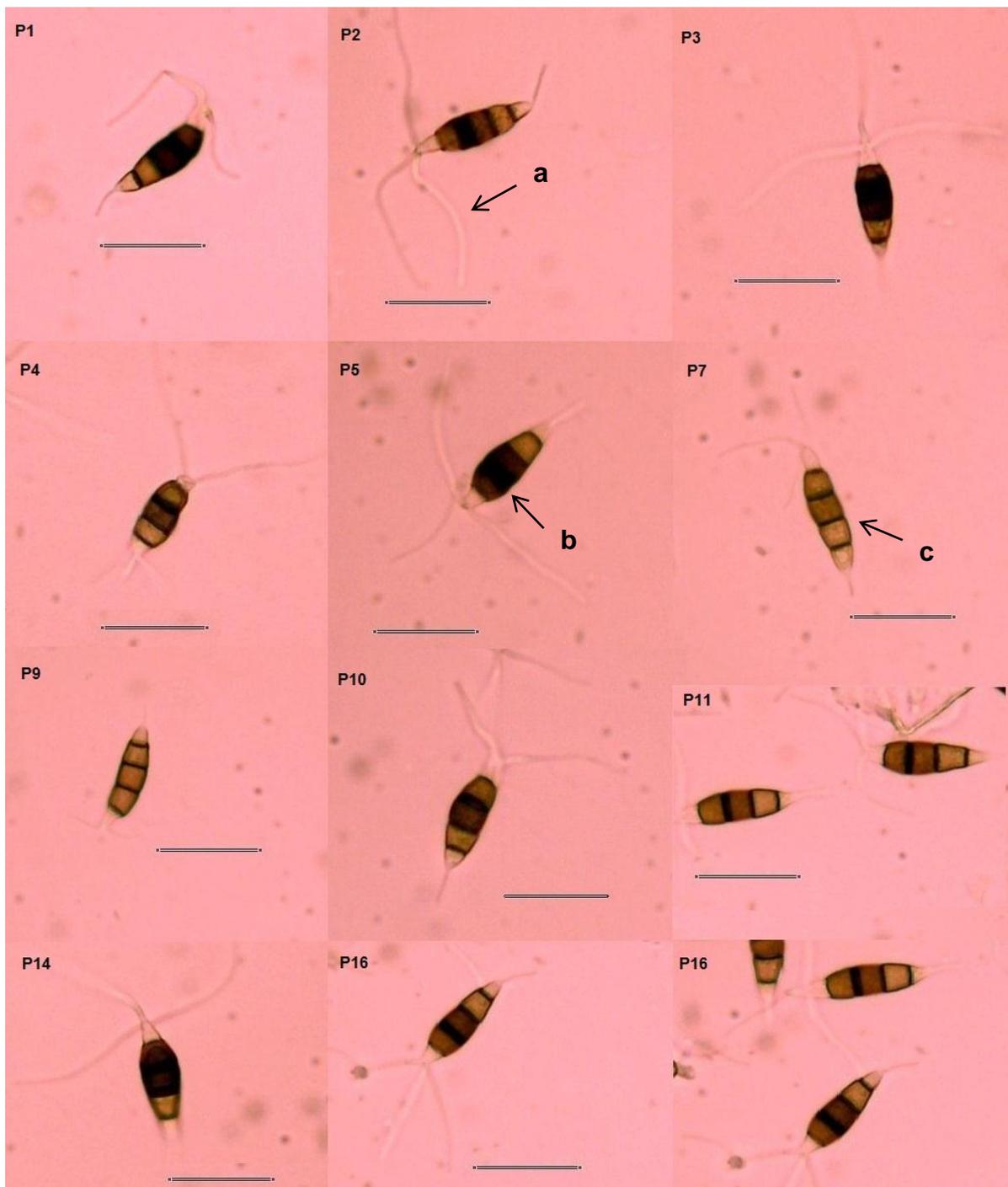


Figura 24 - Conídios dos 11 isolados patogênicos de *Pestalotiopsis* spp. apêndices filiformes (a); Célula central mais escura (b); Conídio com células centrais de coloração uniforme (c). A barra presente em cada imagem corresponde à medida de 20 µm.

As colônias dos isolados patogênicos de *Pestalotiopsis* spp. podem ser visualizadas na Figura 25. Em relação a esse gênero, as colônias são muito

semelhantes, caracterizando-se por um micélio branco, com o centro coberto por pontuações líquidas e negras, que representam a esporulação intensa do fungo.

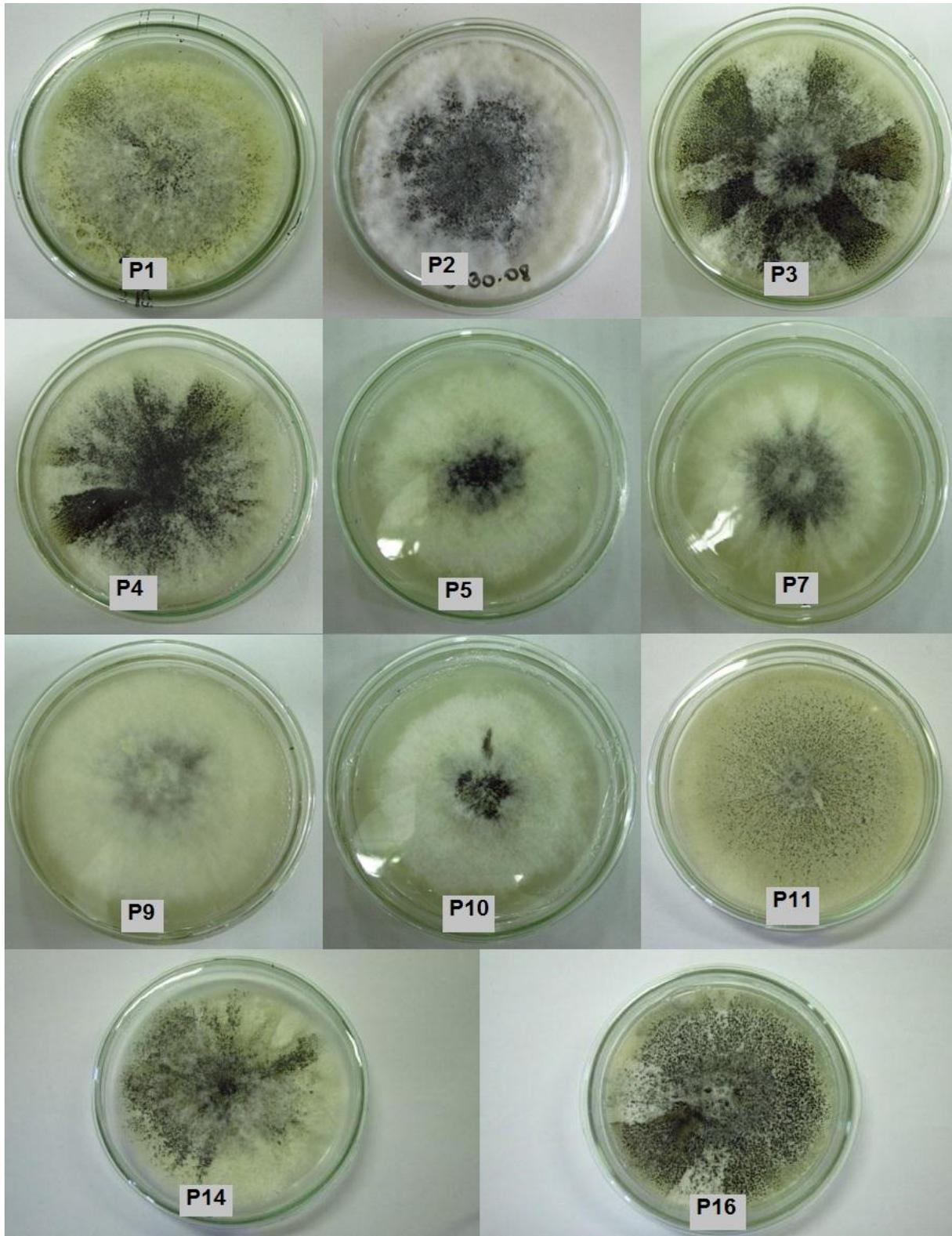


Figura 25 - Colônias puras dos 11 isolados patogênicos de *Pestalotiopsis* spp. crescidas em meio BDA, aos sete dias.

Assim como para os isolados de *Fusarium* spp., algumas características, especialmente relacionadas aos conídios de *Pestalotiopsis* spp., poderiam separar os isolados em grupos (Figura 26). Através de dendrograma gerado com a utilização do método de agrupamento por UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean), foi possível separar os isolados com o uso das variáveis: crescimento micelial, esporulação, largura e comprimento de conídios.

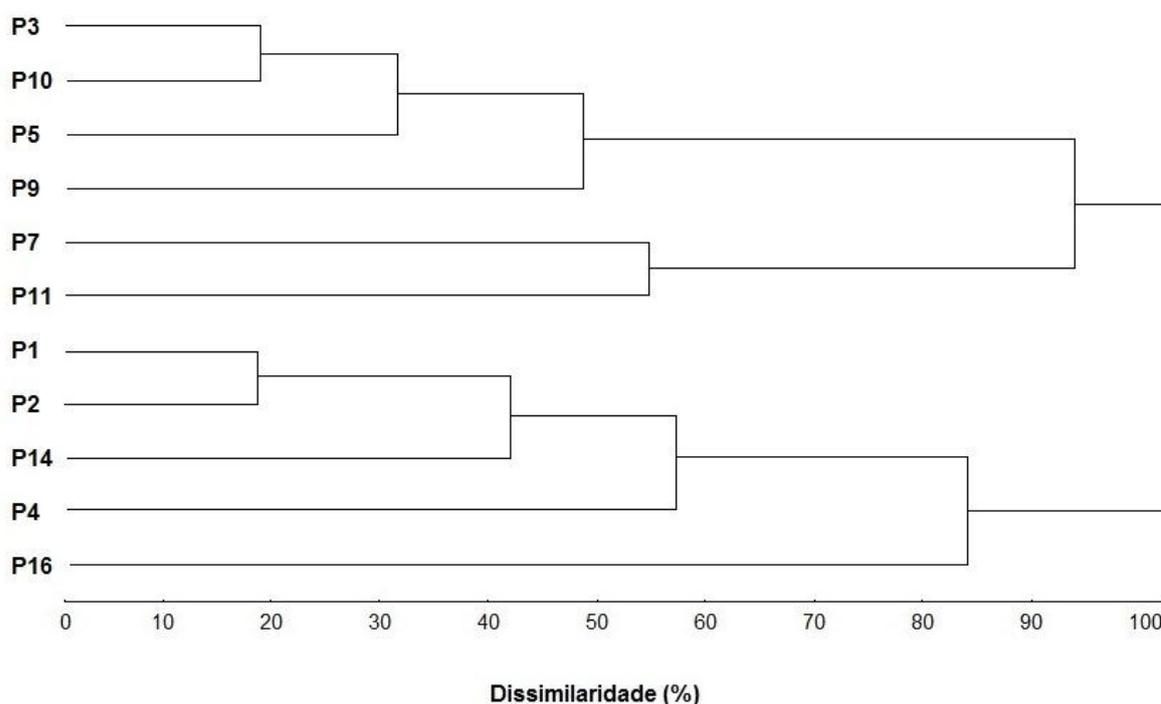


Figura 26 - Dendrograma mostrando a percentagem de dissimilaridade entre 11 isolados patogênicos de *Pestalotiopsis* spp. O dendrograma foi obtido pela técnica UPGMA, a partir da análise da matriz de distância Euclidiana com os quatro caracteres morfofisiológicos avaliados (diâmetro de colônias, esporulação, largura e comprimento de conídios).

Através da análise do dendrograma para os isolados de *Pestalotiopsis* spp. (Figura 26), verifica-se que os isolados mais próximos entre si foram P₃ e P₁₀ e, ainda, P₁ e P₂, sendo entre eles a dissimilaridade inferior a 20%. O isolado P₅ se agrupou a P₃ e P₁₀, com dissimilaridade em torno de 30%, bem como P₁₄ aos isolados P₁ e P₂, com cerca de 40% de dissimilaridade. Os isolados P₇ e P₁₁, apesar de ficarem no mesmo grupo, apresentaram dissimilaridade maior que 50%, o que representa uma grande diferença entre eles. P₁₆ parece ser o isolado mais distinto

dos demais, já que permaneceu mais desconexo e com dissimilaridade superior a, aproximadamente, 80% dos demais.

Considerando que a menor dissimilaridade entre os isolados foi próxima a 20%, pode-se concluir que ou as variáveis utilizadas para diferenciação dos isolados não foram muito eficientes ou estes apresentam menor similaridade, quando comparados aos dendrogramas gerados para isolados de *Fusarium* spp. (Figuras 10 e 11).

O procedimento de agrupamento também forneceu os maiores e menores valores de distância Euclidiana entre os isolados, como exposto na Tabela 17, os quais são utilizados para a formação dos *clados* (ramos) no dendrograma.

Tabela 17 - Estimativas da distância Euclidiana entre os 11 isolados patogênicos de *Pestalotiopsis* spp., após agrupamento pela técnica UPGMA.

Isolado	Maior distância		Menor distância	
	Isolado	Valor	Isolado	Valor
P ₁	P ₇	4.27471	P ₂	0.62650
P ₂	P ₇	3.70159	P ₁	0.62650
P ₃	P ₁₆	4.35745	P ₁₀	0.60138
P ₄	P ₇	3.46739	P ₁₄	1.37783
P ₅	P ₁₆	4.08970	P ₃	1.00548
P ₇	P ₁	4.27471	P ₁₁	1.68649
P ₉	P ₁₆	2.85491	P ₁₀	1.33615
P ₁₀	P ₁₆	3.91697	P ₃	0.60138
P ₁₁	P ₁	3.55703	P ₉	1.55209
P ₁₄	P ₃	3.25754	P ₂	1.02488
P ₁₆	P ₃	4.35745	P ₁₄	2.15570

Através das estimativas da distância entre os isolados (Tabela 17), verifica-se que P₇ e P₁₆ foram os que apareceram com maior frequência entre os mais distantes para muitos isolados. Isso pode ser verificado também no dendrograma (Figura 26), já que esses mesmos isolados permaneceram bem desconexos em relação aos demais ou com alta dissimilaridade. A análise forneceu ainda a contribuição relativa

dos caracteres para divergência, sendo que, para diâmetro das colônias, a contribuição foi de 64,6%; para esporulação foi de 18,7%; comprimento de conídios de 15,5%; e largura de conídios, 1,1%. Dessa forma, o diâmetro de colônias medido aos sete dias, o qual foi utilizado na análise, foi o caractere que mais contribui para a separação dos isolados, dentre os utilizados neste estudo. É importante ressaltar que outros caracteres podem ser mensurados e analisados, porém, para o gênero *Pestalotiopsis* não existem descrições morfológicas suficientes no que diz respeito à separação de isolados. Talvez seja esta a razão para uma menor separação dos isolados, a exemplo do que foi demonstrado para *Fusarium* spp., no presente estudo. Liu et al. (2007) utilizaram os seguintes caracteres para descrição morfológica de isolados de *Pestalotiopsis hainanensis*: tamanho do conídio, comprimento do conídio, largura do conídio, cor da célula mediana, número, posição e comprimento dos apêndices apicais, tipo de apêndice apical (nodoso ou ramificado) e presença/ausência de apêndice basal.

Fungaro (2000) discute que a caracterização morfológica de fungos, embora útil, é bastante limitada por causa do baixo número de caracteres passíveis de serem analisados. Além disso, Peres et al. (2003) ainda ressaltam que essas características são altamente instáveis e dependentes da composição do meio utilizado, das condições de incubação e das variações intrínsecas ao patógeno. Poloni et al. (2008) analisaram características morfológicas (coloração, borda, textura do micélio aéreo, forma e cores dos setores) e fisiológicas (taxa de crescimento) de culturas monoconidiais e policonidiais de isolados de *Bipolaris sorokiniana*, em quatro diferentes meios de cultura, evidenciando que essas características são altamente influenciadas pelo meio de cultivo utilizado. Silva e Teixeira (2012) avaliaram crescimento micelial e taxa de esporulação de *Fusarium solani* em três diferentes meios de cultivo (batata-dextrose-água, batata-sacarose-água e água-água) e distintos regimes de luminosidade, comprovando que tais características estão altamente relacionadas a essas condições de cultivo.

Portanto, a caracterização morfofisiológica é muito útil na identificação e distinção de isolados, entretanto, a caracterização e identificação molecular permite uma maior confiabilidade, quando dados de ambas as metodologias são confrontados. Nos últimos anos, os trabalhos para identificação de isolados fúngicos tentam combinar características morfológicas e moleculares. Em trabalho realizado por Andrade et al. (2007), os autores buscaram caracterizar a variabilidade

morfológica, cultural e patogênica de *Colletotrichum gloeosporioides* isolados do mamoeiro para, posteriormente, efetuar a identificação molecular através de PCR (Polimerase Chain Reaction) com primers taxon-específicos e análise de PCR-RFLP da região ITS.

4.8 Caracterização molecular dos isolados patogênicos de *Pestalotiopsis* spp. e relação com características morfológicas das espécies identificadas.

Para os isolados de *Pestalotiopsis* spp., foi realizado o sequenciamento das regiões ITS e β – tubulina. Os valores de cobertura e similaridade entre os isolados de *Pestalotiopsis* spp. deste estudo e os acessos disponíveis no GenBank para a região ITS, calculados através do Basic Local Alignment Search Tool (BLAST), estão apresentados na Tabela 18. Assim como para *Fusarium* spp., na caracterização molecular, também formaram-se grupos de isolados que já haviam sido unidos através de caracteres morfofisiológicos (Figura 26), de modo que várias espécies de *Pestalotiopsis* spp. foram identificadas (Tabela 18). Dessa forma, os dendrogramas filogenéticos foram construídos separadamente para cada grupo de isolados que fossem mais próximos geneticamente.

Tabela 18 - Cobertura (C) e similaridade (S) dos isolados de *Pestalotiopsis* spp. patogênicos à noqueira-pecan com acessos do GenBank, através do sequenciamento da região ITS.

Isolado	Acesso no GenBank	Espécie	C (%)	S (%)	Autores
P1	JX305701	<i>P. mangiferae</i>	98	99	Chen et al. (2012)*
	FJ233194	<i>P. oxyanthi</i>	98	99	Ma et al. (2008)
	JX305697	<i>P. mangiferae</i>	98	99	Chen et al. (2012)*
P2	JX305701	<i>P. mangiferae</i>	98	99	Chen et al. (2012)*
	AY687880	<i>P. virgatula</i>	98	99	Wei et al. (2004)
	JX305697	<i>P. mangiferae</i>	98	99	Chen et al. (2012)*
P3	HM852072	<i>P. clavispora</i>	100	100	Bascom-Slack et al. (2010)*
	EU342213	<i>P. clavispora</i>	100	100	Espinoza et al. (2008)

	AY682929	<i>P. clavispora</i>	100	100	Wei et al. (2004)
	FJ233194	<i>P. oxyanthi</i>	99	99	Chen et al. (2012)*
P4	AY924281	<i>P. virgatula</i>	99	99	Tejesvi et al. (2008)
	EU520248	<i>P. oxyanthi</i>	99	99	Yu (2011)
	EF119336	<i>P. clavispora</i>	99	99	Luan et al. (2010)
P5	FJ517545	<i>P. clavispora</i>	99	99	Sun e Song (2009)
	JQ008944	<i>P. clavispora</i>	99	99	Gonzalez et al. (2012)
	EF055192	<i>P. cocculi</i>	96	99	Hu et al. (2007)
P7	JF923829	<i>P. uvicola</i>	98	99	Yogeswari et al. (2011)*
	JQ266371	<i>P. cocculi</i>	98	99	Liang (2012)*
	JX305729	<i>P. vismiae</i>	95	98	Chen et al. (2012)*
P9	JX305715	<i>P. vismiae</i>	95	98	Chen et al. (2012)*
	EF055194	<i>P. cocculi</i>	95	98	Hu et al. (2007)
	FJ459948	<i>P. clavispora</i>	97	99	Zhang et al. (2008)
P10	EU342214	<i>P. clavispora</i>	97	99	Espinoza et al. (2008)
	AY924263	<i>P. clavispora</i>	97	99	Tejesvi et al. (2008)
	EF055194	<i>P. cocculi</i>	99	99	Hu et al. (2007)
P11	JX305729	<i>P. vismiae</i>	99	99	Chen et al. (2012)*
	JX305715	<i>P. vismiae</i>	99	99	Chen et al. (2012)*
	JX305703	<i>P. mangiferae</i>	100	100	Chen et al. (2012)*
P14	HM190148	<i>P. oxyanthi</i>	100	100	Gehlot et al. (2010)*
	FJ233194	<i>P. oxyanthi</i>	100	100	Chen et al. (2012)*
	AF377292	<i>P. microspora</i>	98	99	Worapong et al. (2002)
P16	FJ459951	<i>P. microspora</i>	98	99	Zhang et al. (2008)
	FJ459950	<i>P. microspora</i>	98	99	Zhang et al. (2008)

Entretanto, nem todos os isolados de *Pestalotiopsis* spp. foram identificados em nível de espécie, já que muitos permaneceram indefinidos entre duas delas. Por isso, foi realizado também o sequenciamento do gene da β -tubulina, já utilizado em trabalhos com esse gênero (Hu et al. 2007; Liu et al, 2010). Na Tabela 19, são apresentadas as três sequências disponíveis no banco de dados com maior cobertura e similaridade comparadas à sequência de cada isolado de *Pestalotiopsis* spp. deste estudo.

Tabela 19 - Cobertura (C) e similaridade (S) dos isolados de *Pestalotiopsis* spp. patogênicos à noqueira-pecan com acessos do GenBank, através do sequenciamento da região β -tubulina.

Isolado	Acesso no GenBank	Espécie	C (%)	S (%)	Autores
P1	HM573302	<i>P. gracilis</i>	93	98	Wu et al. (2010)*
	HM573280	<i>P. palmarum</i>	93	98	Wu et al. (2010)*
	HM573242	<i>P. gracilis</i>	93	98	Wu et al. (2010)*
P2	HM573302	<i>P. gracilis</i>	93	98	Wu et al. (2010)*
	HM573280	<i>P. palmarum</i>	93	98	Wu et al. (2010)*
	HM573242	<i>P. gracilis</i>	93	98	Wu et al. (2010)*
P3	JX399021	<i>P. chrysea</i>	91	98	Maharachchikumbura et al. (2012)
	JX399020	<i>P. chrysea</i>	91	98	Maharachchikumbura et al. (2012)
	JX399018	<i>P. asiatica</i>	91	98	Maharachchikumbura et al. (2012)
P4	JX399024	<i>P. foedans</i>	91	99	Maharachchikumbura et al. (2012)
	JX399023	<i>P. foedans</i>	91	99	Maharachchikumbura et al. (2012)
	DQ787836	<i>P. palmarum</i>	91	99	Liu et al. (2006)
P5	JX399021	<i>P. chrysea</i>	91	98	Maharachchikumbura et al. (2012)
	JX399020	<i>P. chrysea</i>	91	98	Maharachchikumbura et al. (2012)
	JX399018	<i>P. asiatica</i>	91	98	Maharachchikumbura et al. (2012)
P7	JX399034	<i>P. trachicarpicola</i>	92	99	Maharachchikumbura et al. (2012)
	JN314419	<i>P. microspora</i>	92	99	Ren et al. (2011)*
	HM573239	<i>P. cocculi</i>	92	99	Wu et al. (2010)
P9	JN314419	<i>P. microspora</i>	91	100	Ren et al. (2011)*
	JX399034	<i>P. trachicarpicola</i>	91	100	Maharachchikumbura et al. (2012)
	HM573239	<i>P. cocculi</i>	91	100	Wu et al. (2010)

					Liu et al. (2006)
	DQ787836	<i>P. palmarum</i>	91	99	Maharachchikumbura et al.
P10	JX399024	<i>P. foedans</i>	91	99	(2012)
	JX399023	<i>P. foedans</i>	91	99	Maharachchikumbura et al. (2012)
	JN314419	<i>P. microspora</i>	91	100	Ren et al. (2011)*
P11	JX399034	<i>P. trachicarpicola</i>	91	100	Maharachchikumbura et al. (2012)
	HM573239	<i>P. cocculi</i>	91	100	Wu et al. (2010)
	HM573302	<i>P. gracilis</i>	93	98	Wu et al. (2010)*
P14	HM573280	<i>P. palmarum</i>	93	98	Wu et al. (2010)*
	HM573242	<i>P. gracilis</i>	93	98	Wu et al. (2010)*
	HM573260	<i>P. virgatula</i>	93	99	Wu et al. (2010)*
P16	HM573259	<i>P. palmarum</i>	93	99	Wu et al. (2010)*
	EF152585	<i>P. clavispora</i>	93	99	Shang e Luan (2010)

Os isolados P₁, P₂ e P₁₄ foram agrupados em um mesmo dendrograma filogenético através do sequenciamento de ITS (Figura 27). Já P₄, apesar de estar mais próximo desses isolados do que dos demais no agrupamento por caracteres morfofisiológicos (Figura 26), se mostrou um pouco mais distante, o que se repetiu no dendrograma filogenético. Portanto, ele será apresentado separadamente.

Observou-se que a identificação molecular não foi conclusiva quanto à espécie de *Pestalotiopsis*, aproximando-se tanto de *P. oxyanthi* quanto de *P. mangiferae* (Figura 27). A primeira espécie foi encontrada por Wei et al. (2007), como fungo patogênico e endofítico, em *Podocarpus macrophyllus*, e somente como endofítico, em *Camellia nitidissima*. Chen et al. (2012) descreveram cancrs em ramos de *Myrica rubra*, na China, com sintomas de clorose e queda prematura de folhas, sendo que a lesão, em alguns casos, se estendia para todo o ramo e causava descoloração do xilema. A doença foi associada a *Pestalotiopsis* spp. e, dessa forma, foram identificados 16 isolados como pertencentes à espécie *P. mangiferae* e 27 como pertencentes à *P. vismiae*.

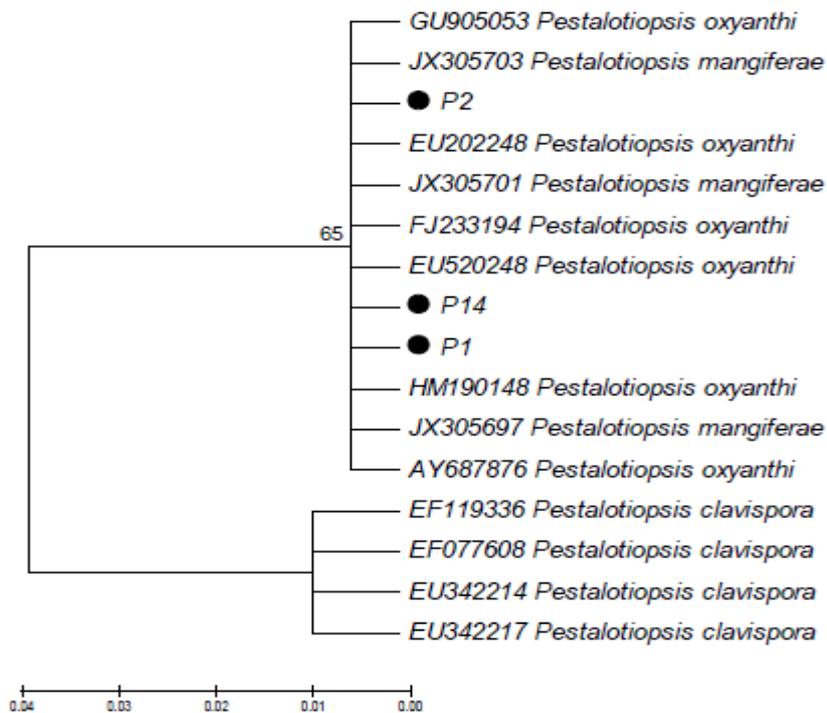


Figura 27 - Dendrograma filogenético construído para os isolados P₁, P₂ e P₁₄, baseado no método estatístico “Neighbor-joining”, derivado das sequências das regiões ITSrDNA, com base em 1000 réplicas de “bootstrap”. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o modelo Tamura-Nei. O número nas ramificações representa o número de “bootstrap”.

No presente estudo, para *Pestalotiopsis* spp., diferentemente de *Fusarium* spp., a caracterização morfofisiológica anterior ao depósito de sequências em bancos de dados não foi realizada intensamente, resultando em inconsistências na identificação de espécies. Em artigo recente sobre a descrição de espécies do gênero *Pestalotiopsis*, realizado por Maharachchikumbura et al. (2011), os autores relataram que a taxonomia do gênero é confusa e que, até mesmo, o uso de sequências do “GenBank” para identificação de espécies não é totalmente confiável, já que caracteres morfológicos, especialmente de conídios, seriam eficientes para diferenciação de espécies. Contudo, muitas sequências depositadas estariam identificadas equivocadamente, pois o processo de reconhecimento morfológico não foi realizado anteriormente ao sequenciamento. Além disso, os mesmos autores relataram que espécies do gênero foram historicamente nomeadas de acordo com o hospedeiro onde foram encontradas, de modo que muitas das espécies depositadas em banco de dados podem ser sinonímias. Como resultado disso, a diversidade de espécies do gênero, na realidade, seria menor.

Os isolados P₁, P₂ e P₁₄ foram agrupados em um mesmo dendrograma, assim como já realizado para a região ITS (Figura 27) e, embora tenham obtido alta cobertura e similaridade com sequências das espécies *P. cruenta*, *P. virgatula*, *P. gracilis* e *P. palmarum*, os três isolados permaneceram em um *clado* diferente do das demais sequências, indicando grande distância genética com essas espécies (Figura 28). Dessa forma, o sequenciamento do gene da β -tubulina não foi informativo para esses isolados, já que, com o sequenciamento de ITS, eles foram identificados entre as espécies *P. oxyanthi* e *P. mangiferae* (Figura 27). Essas espécies, contudo, não apareceram com a comparação de sequências da β -tubulina. Isso provavelmente ocorreu porque, para esse gene, ainda inexitem sequências depositadas no “GenBank” dessas duas espécies de *Pestalotiopsis*, comprovando o que Fungaro (2000) já havia comentado: que o grande número de sequências ITS depositadas em bancos de dados tornam essa região mais útil na identificação de espécies fúngicas.

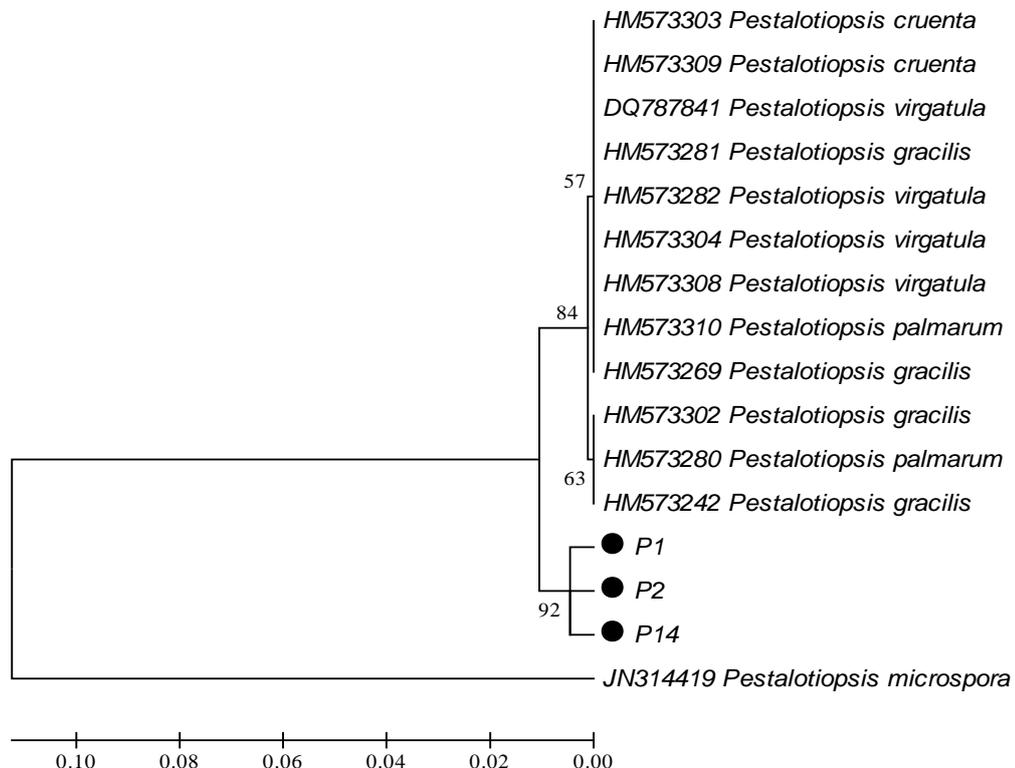


Figura 28 - Dendrograma filogenético construído para os isolados P₁, P₂ e P₁₄, baseado no método estatístico “Neighbor-joining”, derivado das sequências do gene da β -tubulina, com base em 1000 réplicas de “bootstrap”. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o modelo Tamura-Nei. O número nas ramificações representa o número de “bootstrap”.

O isolado P₄, já nos dendrogramas baseados em caracteres morfofisiológicos (Figura 26), mostrava-se mais distante dos isolados P₁, P₂ e P₁₄. Apesar de se alinhar com várias sequências disponíveis no “GenBank” das espécies *P. clavispora* e *P. oxyanthi*, com cobertura e similaridade entre 98 e 100%, P₄ permaneceu em *clado* diferente de todas as sequências similares, mesmo quando uma sequência de *P. vismiae*, que pertence a um grupo distante, foi adicionada ao dendrograma (Figura 29).

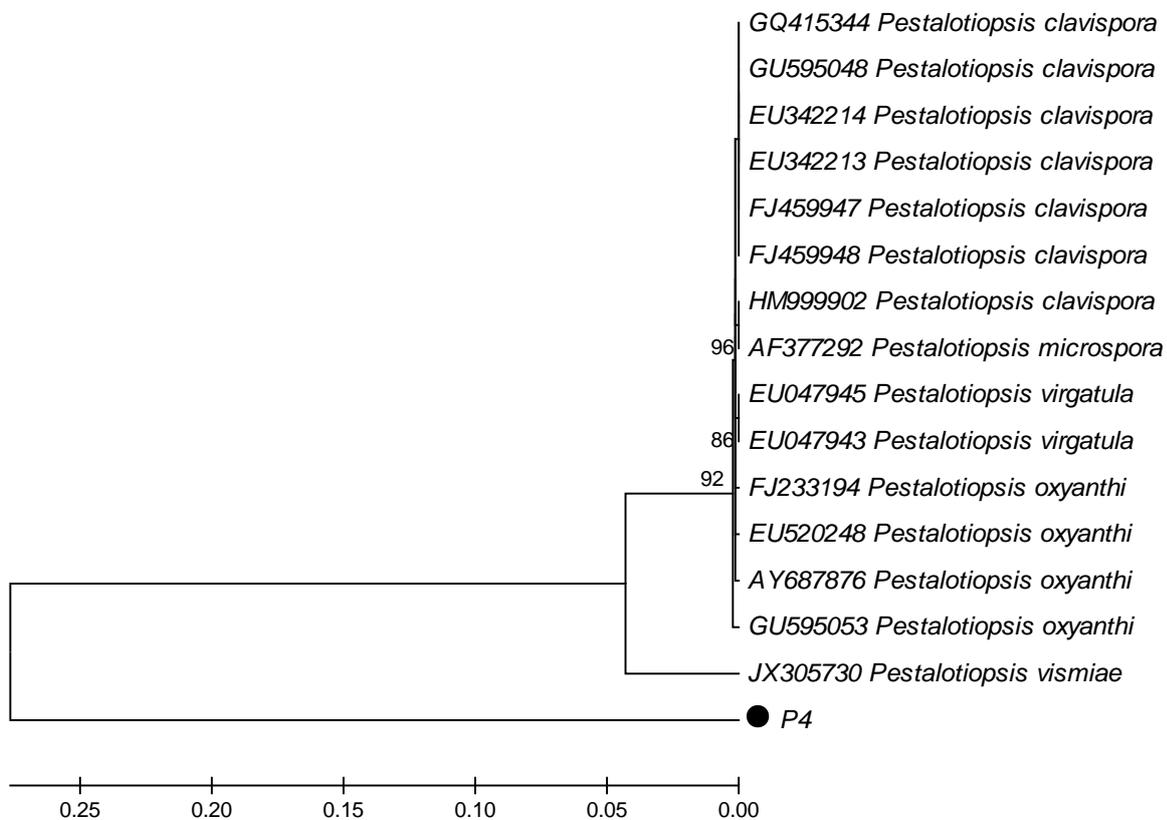


Figura 29 - Dendrograma filogenético construído para o isolado P₄, baseado no método estatístico “Neighbor-joining”, derivado das sequências das regiões ITSrDNA, com base em 1000 réplicas de “bootstrap”. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o modelo Kimura-2-parameter. O número nas ramificações representa o número de “bootstrap”.

Dessa forma, para P₄, somente com o sequenciamento da região ITS não foi possível estabelecer a definição de uma única espécie. Além disso, esse isolado é muito diferente, mesmo das espécies com as quais apresenta similaridade. Observando-se o dendrograma (Figura 29), verifica-se que P₄ aparece como um *outgroup*, o que indica forte divergência genética com as demais sequências. Isto

pode ter ocorrido porque esse isolado apresentaria características muito peculiares, podendo pertencer a uma nova espécie ou, mesmo, ter alguma variância intraespecífica. Para maior investigação desse fato, se faz necessário o sequenciamento de, ao menos, um outro gene.

Os isolados P₃, P₅ e P₁₀ ficaram mais próximos no dendrograma baseado em caracteres morfofisiológicos (Figura 26) e foram identificados molecularmente, através de sequenciamento da região ITS, como *Pestalotiopsis clavispora*, embora P₅ apareça com uma distância filogenética um pouco maior dos outros dois isolados (Figura 30), repetindo o que havia ocorrido na Figura 26. Assim, é provável que esse último isolado possua algumas características que o distinguem de ambos os isolados que foram agrupados no mesmo dendrograma. Uma sequência de *P. cocculi* foi utilizada como *outgroup*, para melhor separação das demais.

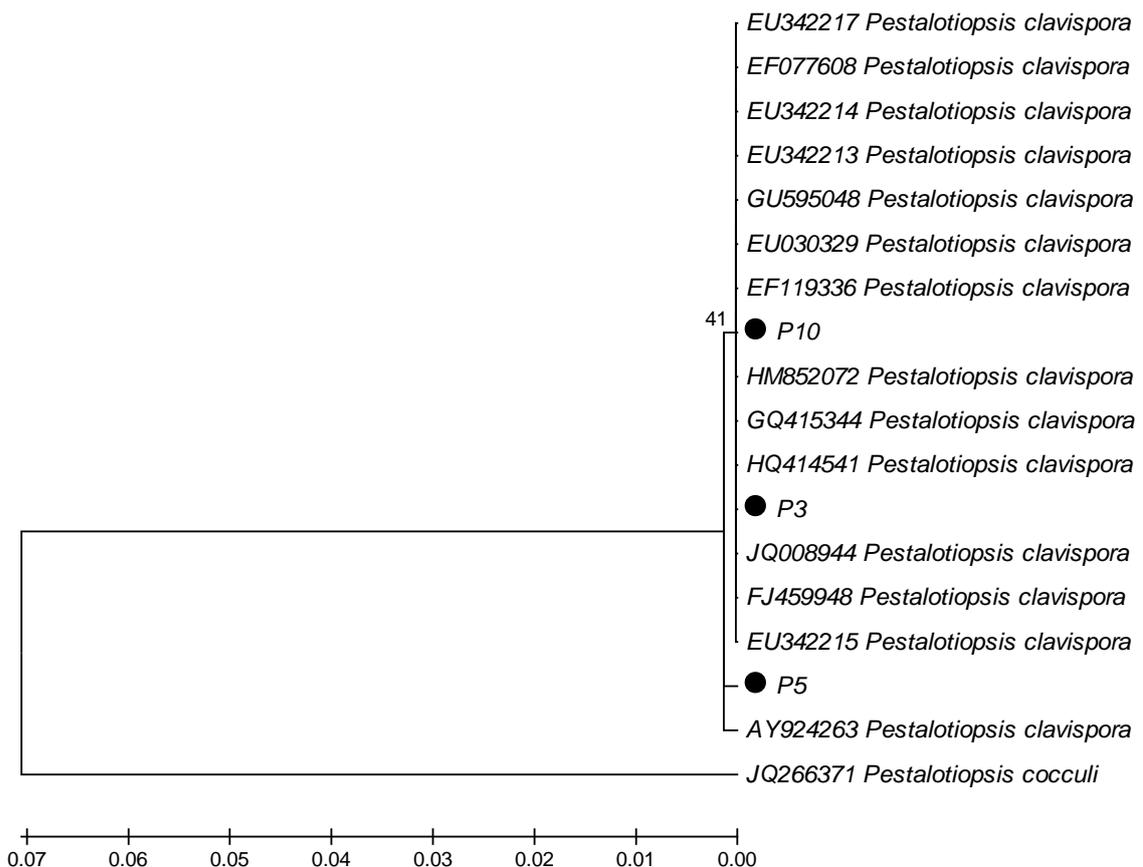


Figura 30 - Dendrograma filogenético construído para os isolados P₃, P₅ e P₁₀, baseado no método estatístico “Neighbor-joining”, derivado das sequências das regiões ITSrDNA, com base em 1000 réplicas de “bootstrap”. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o modelo Tamura-Nei. O número nas ramificações representa o número de “bootstrap”.

Como já citado anteriormente, Keith et al. (2006) encontraram *P. clavispora* como uma das espécies causadoras da sarna da goiabeira (*Psidium guajava*) no Hawaii. Esta também foi uma das espécies causadoras do cancro de mirtilo (*Vaccinium* spp.) no Chile, identificada por Espinoza e Briceño (2008). Já foi encontrada como endofítica em vários hospedeiros, como em *Podocarpus macrophyllus*, *Camellia sinensis* e *C. oleifera* por Wei et al. (2007). Além disso, Maharachchikumbura et al. (2011) consideraram a espécie como uma das de maior importância econômica, pois é patogênica a vários hospedeiros.

Os isolados P₃, P₅ e P₁₀ tiveram sua espécie definida como *P. clavispora*, através de sequenciamento da região ITS (Figura 30), e ficaram agrupados no mesmo *clado* de várias espécies de *Pestalotiopsis*, tais como *P. virgatula*, *P. palmarum* e *P. crassiuscula* quando o gene da β -tubulina foi sequenciado. Embora também tenham apresentado alta similaridade e cobertura com algumas sequências de *P. clavispora*, estas ficaram agrupadas em um *clado* mais distante geneticamente, demonstrando mais uma vez, a imprecisão do sequenciamento da β -tubulina na identificação da espécie desses isolados (Figura 31). Esse fato também pode ter ocorrido devido ao pequeno número de sequências, apenas cinco, desse gene para a espécie *P. clavispora*, depositadas no banco de dados.

Além disso, o isolado P₄ foi incluído no mesmo dendrograma pela alta similaridade com os demais isolados, especialmente com P₁₀, diferentemente do que havia ocorrido com a região ITS, onde esse isolado permaneceu com espécie totalmente indefinida e diferente de todos os demais isolados do estudo (Figura 31). É provável que ele pertença ao grupo Versicolor, pois as espécies *P. clavispora* e *P. virgatula* se repetem com o sequenciamento de ambos os genes.

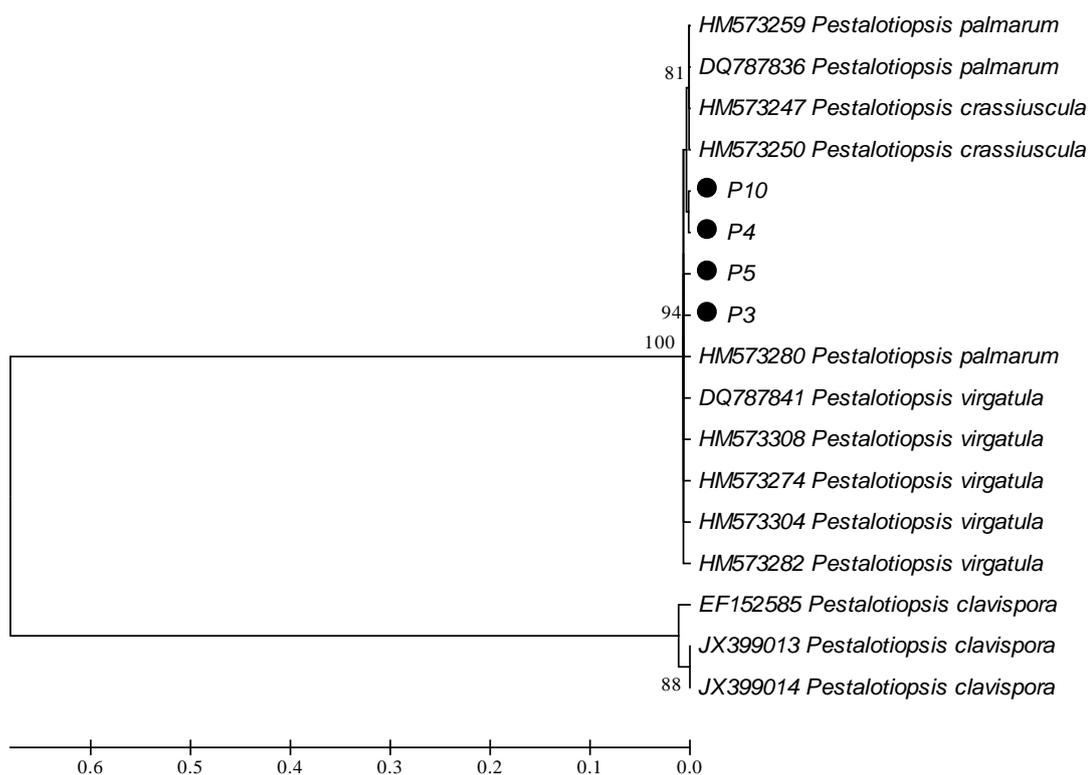


Figura 31 - Dendrograma filogenético construído para os isolados P₃, P₅ e P₁₀, baseado no método estatístico “Neighbor-joining”, derivado das sequências do gene da β -tubulina, com base em 1000 réplicas de “bootstrap”. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o modelo Kimura-2-parameter. O número nas ramificações representa o número de “bootstrap”.

Os isolados P₇ e P₁₁ ficaram mais próximos de uma sequência de *Pestalotiopsis cocculi*, especialmente P₁₁, que ficou em um sub-ramo com valor de *bootstrap* de 86. P₇ obteve uma distância genética um pouco maior, mas também ficou mais próximo dessa sequência do que das demais apresentadas no dendrograma. E, finalmente, P₉ permaneceu indefinido, pois se agrupou, mesmo que de forma isolada, tanto com *P. cocculi* quanto com *P. vismiae* (Figura 32). Estes dois isolados também ficaram próximos na análise dos caracteres morfofisiológicos (Figura 16).

Maharachchikumbura et al. (2011) dividiram algumas espécies de *Pestalotiopsis*, com sequências depositadas no GenBank, em grupos, através de análises filogenéticas, e verificaram que essa divisão confere com a divisão através de caracteres morfológicos, especialmente de conídios. Dessa forma, os autores verificaram que, dentre as espécies *P. clavispora*, *P. disseminata*, *P. microspora*, *P. neglecta*, *P. photinae*, *P. theae*, *P. virgatula* e *P. vismiae*, dois grupos seriam

definidos: o primeiro (versicolor) composto por *P. clavispora*, *P. photinae*, *P. virgatula* e *P. theae*; e o segundo (concolor) composto por *P. disseminata*, *P. microspora*, *P. neglecta* e *P. vismiae*. Portanto, todos os isolados puderam ser definidos dentro do grupo concolor, mesmo que P₉ tenha permanecido mais afastado filogeneticamente. Além disso, a sequência utilizada como *outgroup* de *P. virgatula* foi escolhida por pertencer ao grupo versicolor, o que auxiliou na melhor separação dos isolados.

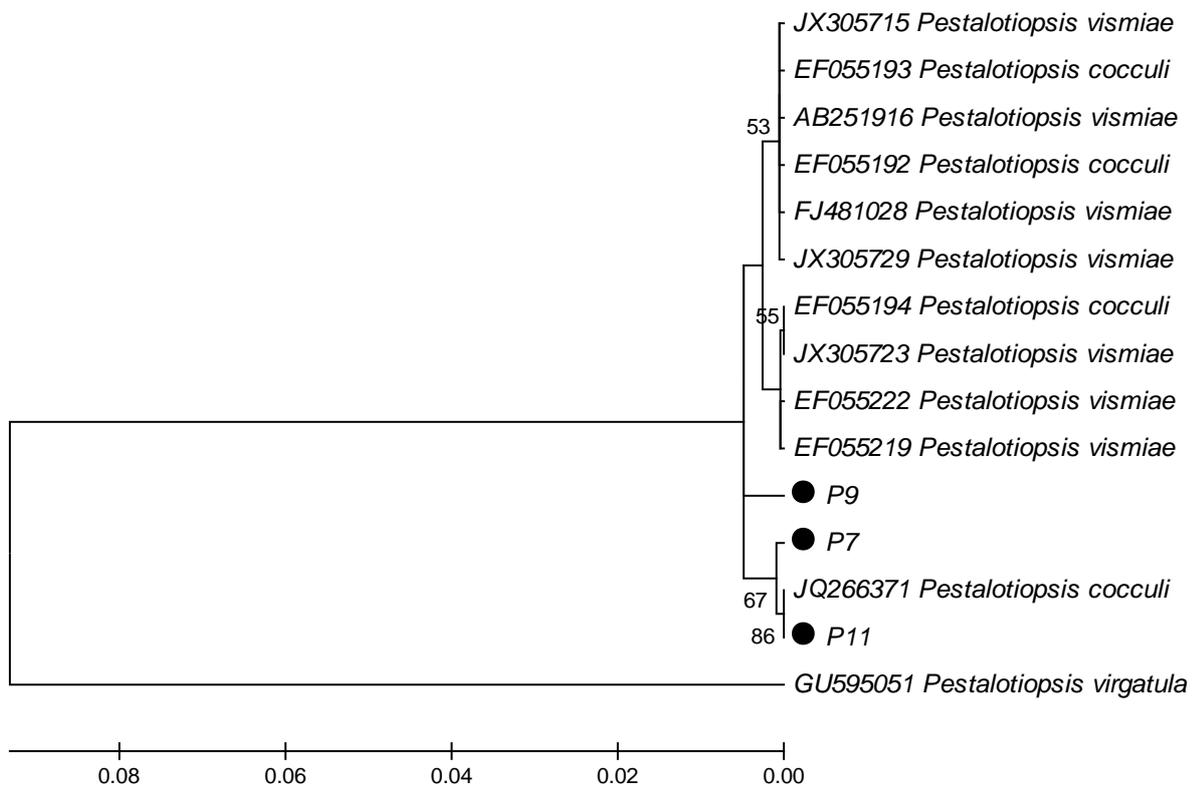


Figura 32 - Dendrograma filogenético construído para os isolados P₇, P₉ e P₁₁, baseado no método estatístico “Neighbor-joining”, derivado das sequências das regiões ITSrDNA, com base em 1000 réplicas de “bootstrap”. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o modelo Tamura-Nei. O número nas ramificações representa o número de “bootstrap”.

Hu et al. (2007) encontraram *Pestalotiopsis cocculi* como organismo endofítico em casca e acículas de *Pinus armandii*, bem como em folhas de *Ribes* spp. Também identificaram *P. vismiae* em casca de *Pinus armandii*, na China. Chen et al. (2012) descreveram cancrios em ramos de *Myrica rubra* associados a *P. mangiferae* e *P. vismiae*. Jeewon et al. (2004), por sua vez, isolaram *P. vismiae* de manchas foliares em *Leucospermum* sp. no Hawaii.

Os isolados P₇ e P₁₁ haviam sido identificados como *P. cocculi*, pelo sequenciamento de ITS, enquanto P₉, como *P. cocculi* ou *P. vismiae* (Figura 32), sendo que o último permaneceu com espécie indefinida. Com o sequenciamento do gene da β - tubulina, os mesmos isolados foram agrupados juntamente com as espécies *P. cocculi*, *P. vismiae*, *P. neglecta* e *P. microspora* (Figura 33), o que comprova a identificação por ITS, já que algumas espécies se repetiram. Além disso, quase todas as espécies citadas, exceto *P. cocculi* que não foi agrupada em nenhum grupo, pertencem ao grupo Concolor, segundo classificação de Maharachchikumbura et al. (2011), o que sugere proximidade entre elas. Dessa forma, para os isolados P₇ e P₁₁, a identificação por ITS como *P. cocculi* poderia ser utilizada com mais segurança, já que essa espécie se repetiu com o sequenciamento de β - tubulina.

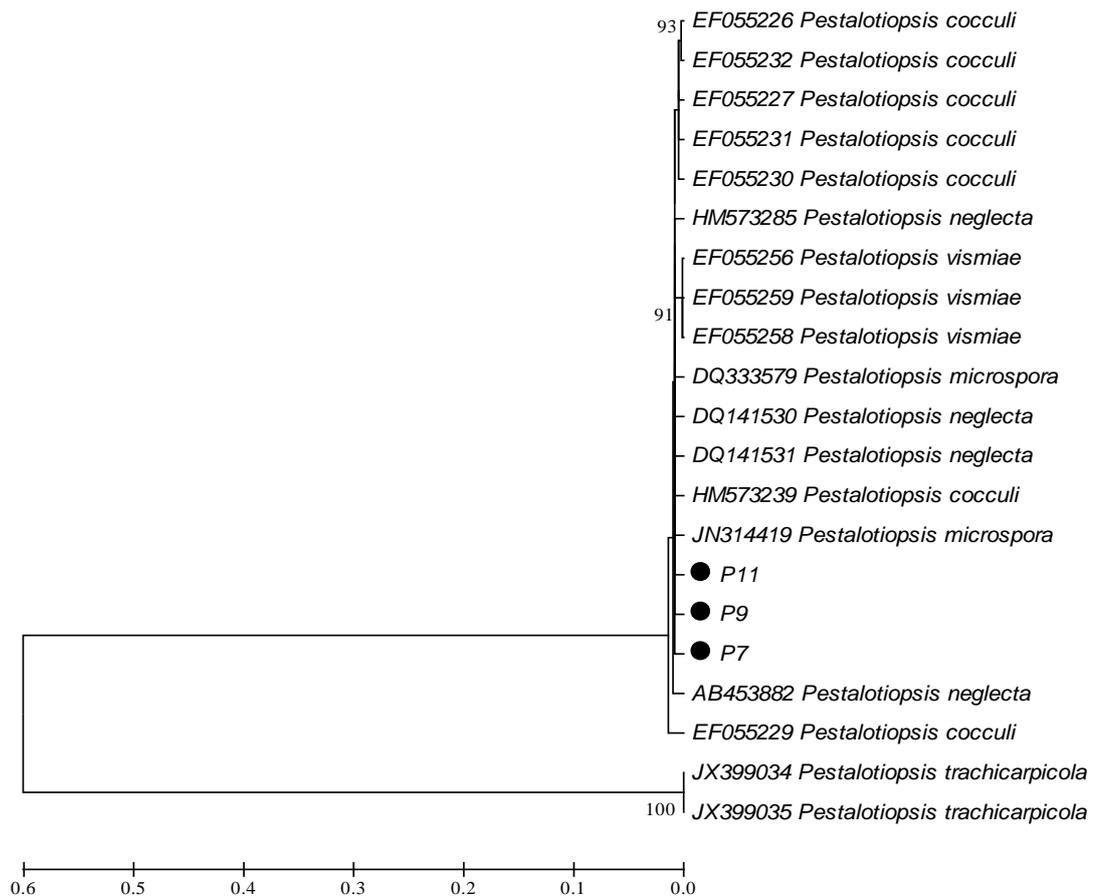


Figura 33 - Dendrograma filogenético construído para os isolados P₇, P₉ e P₁₁, baseado no método estatístico “Neighbor-joining”, derivado das sequências do gene da β -tubulina, com base em 1000 réplicas de “bootstrap”. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o modelo Kimura-2-parameter. O número nas ramificações representa o número de “bootstrap”.

O isolado P₁₆ não pode ser identificado como uma única espécie, já que foi agrupado juntamente com *P. clavispora* e *P. microspora*, espécies que, segundo Maharachchikumbura et al. (2011), pertenceriam a grupos diferentes, versicolor e concolor, respectivamente, demonstrando incongruência na identificação desse isolado, com o sequenciamento da região ITS (Figura 34).

No caso de P₁₆, observa-se que esse isolado foi muito próximo de sequências de ambas as espécies, *P. clavispora* e *P. microspora*. Todavia, essas duas espécies possuem caracteres morfológicos distintos e alguns marcadores que as diferenciam, sendo consideradas mais distantes por pertencerem a grupos distintos dentro do gênero. Esse fato indica falta de precisão do sequenciamento da região ITS para o gênero e, talvez, equívocos em depósitos de sequências. Assim sendo, esta também é uma situação em que o sequenciamento de outra região, como a β -tubulina, já testada em outros estudos para gênero, se faz necessário, conforme será discutido posteriormente.

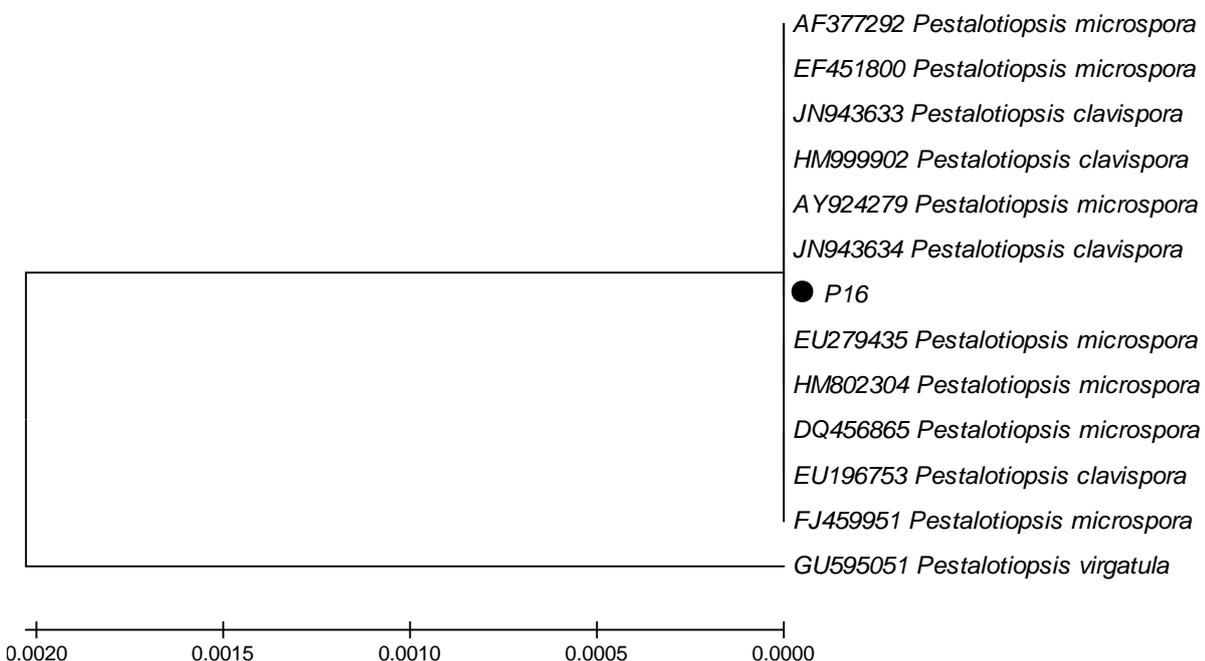


Figura 34 - Dendrograma filogenético construído para o isolado P₁₆, baseado no método estatístico “Neighbor-joining,” derivado das sequências das regiões ITSrDNA, com base em 1000 réplicas de “bootstrap”. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o modelo Tamura-Nei. O número nas ramificações representa o número de “bootstrap”.

O isolado P₁₆ não pôde ser identificado com precisão, mesmo com o sequenciamento dos genes (ITS e β -tubulina), pois permaneceu em *clado* do dendrograma com várias espécies diferentes. Para ITS, ele havia sido identificado entre *P. clavispora* e *P. microspora* (Figura 34), e no sequenciamento de β -tubulina, somente a espécie *P. clavispora* se repetiu, apresentando alta similaridade com o isolado, porém, em *clado* mais distante (Figura 35).

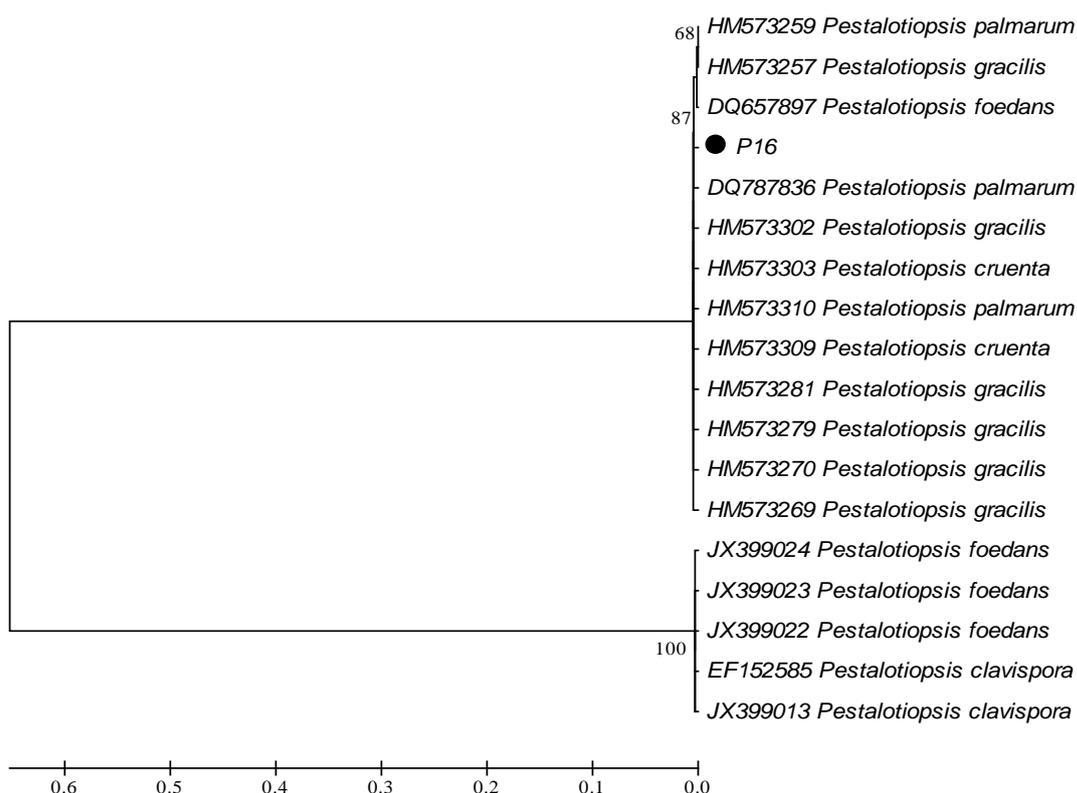


Figura 35 - Dendrograma filogenético construído para o isolado P₁₆, baseado no método estatístico “Neighbor-joining”, derivado das sequências do gene da β -tubulina, com base em 1000 réplicas de “bootstrap”. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o modelo Kimura-2-parameter. O número nas ramificações representa o número de “bootstrap”.

Assim sendo, exceto para os isolados P₇, P₉ e P₁₁, em que o sequenciamento do gene da β -tubulina confirmou a identificação de ITS, esse gene não foi muito informativo na identificação de espécies de *Pestalotiopsis* deste estudo, muito provavelmente devido ao reduzido número de sequências desse gene, depositadas para esse gênero, em bancos de dados. Tal fato não sugere que o sequenciamento desse gene deva ser descartado, mas sim, incentivado para a construção de um banco de dados consistente, que auxiliará na identificação de espécies do gênero.

5 CONCLUSÕES

Os resultados deste estudo permitiram chegar às seguintes conclusões:

- Dois novos gêneros fúngicos são causadores de doenças em noqueira-pecan: *Fusarium* spp., agente causal da podridão de raízes, e *Pestalotiopsis* spp., agente causal de mancha foliar;

- As seguintes espécies de *Fusarium* são causadoras da podridão de raízes em noqueira-pecan: *Fusarium chlamydosporum*, *F. graminearum* species complex, *G. fujikuroi* species complex, *F. oxysporum* e *F. equiseti*;

- Dentre as espécies de *Pestalotiopsis* causadoras de mancha foliar em noqueira-pecan, foram identificadas *Pestalotiopsis clavispora* e *P. cocculi*, sendo que alguns isolados permanecem com espécies indefinidas;

- O carácter morfológico largura de macroconídios é suficiente na diferenciação de espécies de *Fusarium* spp.;

- O diâmetro de colônias é um carácter morfofisiológico suficiente na diferenciação de espécies de *Pestalotiopsis* spp.;

- As regiões ITS e TEF-1 α sequenciadas são eficientes e dão maior confiabilidade na identificação das espécies de *Fusarium* spp., quando utilizadas de forma combinada;

- O sequenciamento da região ITS é mais informativo e conclusivo na identificação de *Pestalotiopsis* spp., quando comparado ao sequenciamento do gene da β - tubulina, uma vez que, para este último, ainda são escassos os depósitos de sequências em bancos de dados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRIOS, G.N. **Plant Pathology**. 5. ed. San Diego: Elsevier Academic Press, 2005. 952 p.

AKROFI, A.Y.; AMOAH, F.M. *Pestalotia* spp. causes leaf spot of *Vitellaria paradoxa* in Ghana. **African Journal of Agricultural Research**, Nairobi, v. 4, n. 4, p. 330-333, abril 2009.

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.

ALFENAS, A.C.; FERREIRA, F.A. Inoculação de fungos fitopatogênicos. In :ALFENAS, A.C.; MAFIA, R.G. (eds.). **Métodos em fitopatologia**. Editora: UFV, Viçosa, 2007. p. 117-138.

ALFENAS, A.C. et al. **Clonagem e doenças do eucalipto**. 2 ed. Viçosa: Ed. UFV, 2009. 509 p.

ALMEIDA, W.A.B. de. et al. Anatomia e ultra estrutura de embriões somáticos de pecan (*Carya illinoensis*). **Magistra**, Cruz das Almas, v. 14, n. 1, jan./jun., 2002.

ALTSCHUL, S. F. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein data base search programs. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 25, p. 3389-3402, 1997.

ALVIDREZ-VILLAREAL, R. et al. Isolation and pathogenicity of fungi associated to ambrosia borer (*Euplatypus segnis*) found injuring pecan (*Carya illinoensis*) wood. **Agricultural Sciences**, v. 3, n.3, p. 405-416, 2012.

ANDRADE, E.M. et al. Caracterização morfocultural e molecular de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* patogênicos ao mamoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v., n. 1, 2007.

ANGELOTTI, F. et al. Caracterização morfológica e identificação molecular de isolados de *Fusarium graminearum* associados à giberela do trigo e triticales no sul do Brasil. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 32, n. 2, p. 177-179, 2006.

AUER, C.G.; SANTOS, A.F. **Detecção de *Fusarium subglutinans* em sementes de pinus**. Colombo: Embrapa Florestas, 2007. 4 p. (Comunicado Técnico, 182).

AUER, C.G.; GRIGOLETTI JÚNIOR, A.; SANTOS, A.F. **Doenças em pinus: identificação e controle**. Colombo: Embrapa Florestas, 2001. 28 p. (Circular técnica, 48).

BACKES, P.; IRGANG, B. **Árvores cultivadas no sul do Brasil: guia de identificação e interesse paisagístico das principais espécies exóticas**. v.1. Porto Alegre: Paisagem do Sul. 2004. 204 p.

BAILEY, K. L.; LAZAROVITS, G. Suppressing soil-borne diseases with residue management and organic amendments. **Soil & Tillage Research**, v. 72, p. 169-180, 2003.

BALARDIN, C.R. et al. Possibilidade de transmissão de *Fusarium solani* f.sp. *glycines*, agente causal da podridão vermelha da raiz da soja, através da semente. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 6, p. 574-581, 2005.

BASTOS, C.N.; SANTOS, A.O. Superbrotamento de inflorescências do limão-de-caieira causado por *Fusarium decemcellulare*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 26, p.232, 2001.

BASTOS, C.N.; BEZERRA, J.L.; SANTOS, A.O. Ocorrência de *Pestalotiopsis cruenta* em mangostão. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.26, n.4, dezembro 2001. p. 779.

BEDENDO, I.P. Podridões de raiz e colo. In: AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de Fitopatologia**. 4 ed. Piracicaba: Agronômica Ceres. 2011. p.443-451.

BERGAMIN FILHO, A.; AMORIM, L. **Doenças de plantas tropicais: epidemiologia e controle econômico**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1996. 299p.

BOTTALICO, A. *Fusarium* diseases of cereals: species complex and related mycotoxin profiles in Europe. **Journal of Plant Pathology**, Pisa, v. 80, n. 2, p. 85–103, 1998.

BOTELHO, L.S.; MORAES, M.H.D.; MENTEN, J.O.M. Fungos associados às sementes de ipê-amarelo (*Tabebuia serratifolia*) e ipê-roxo (*Tabebuia impetiginosa*): incidência, efeito na germinação e transmissão para as plântulas. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 34, n. 4, p. 343-348, 2008.

BOTELHO, G.R. et al. **Uso de ITS (“Intergenic Transcribed Spacer”) para caracterização genotípica de isolados de Pseudomonas do grupo fluorescente**. Seropédica: EMBRAPA, 2005. 4 p. (Comunicado técnico, 80)

BRESSAN, R. A. Fisiologia do estresse. In: TAIZ, L.; ZEIGER, E. (Eds.). **Fisiologia Vegetal**, 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. p. 613-643.

BRIAN, P.W. et al. Phytotoxic Compounds produced by *Fusarium equiseti*. **Journal of Experimental Botany's**, Lancaster, v. 12, n. 1, p. 1-12, 1960.

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

BURGESS, L. W.; SUMMERELL, B. A.; BACKHOUSE, D. et al. Biodiversity and population studies on *Fusarium*. In: LOGRIECO, A.; SEIFERT, K. A.; LESLIE, J. F. A. et al. Biodiversity of toxigenic *Fusarium* species. **Sydowia**, Horn, v. 30, p. 1-11. 1997.

BURGESS, T.; MALAJCZUK, N.; DELL, B. 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.

BUSSO, C. et al. Vegetative compatibility and molecular characterization of *Fusarium graminearum* isolates from the State of Paraná, Brazil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.37, n.6, p. 1813-1816, nov-dez, 2007.

CARDOSO, C.O.N. Fungos. In: GALLI, F. (Coord.). **Manual de fitopatologia**. 2 ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1978. v. 1, p. 58-123.

CARDOSO, G.D. et al. Etiologia e progresso da mancha de *Pestalotia* do coqueiro (*Cocos nucifera* L.), em São Gonçalo, Paraíba. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 25, n. 2, p. 335-336, 2003.

CASA, R.T. et al. Danos causados pela infecção de *Gibberella zeae* em trigo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n.3, maio - jun 2004.

CAMARGO, L.E.A. Mecanismos de variabilidade genética de agentes fitopatogênicos. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Eds.). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v.1, p.455-469.

CHEHRI, K. et al. Identification and pathogenicity of *Fusarium* species associated with head blight of wheat in Iran. **Pakistan Journal of Botany**, Karachi , v. 43, n. 5, p. 2607-2611, 2011.

CHEN, F.Y. et al. First report of *Pestalotiopsis mangiferae* and *P. vismiae* causing twig dieback of *Myrica rubra* in China. **Plant Disease**, St. Paul, v. 96, n. 4, p. 588, 2012.

COMISSÃO DE QUÍMICA E FERTILIDADE DO SOLO - RS/SC. **Manual de adubação e calagem para os Estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina**. 10. Ed. Porto Alegre, 2004. 404 p.

COSTA, R.S. et al. Relação entre características morfológicas da cariopse e fusariose em milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, n. 1, p. 27-33, jan. 2003.

COUTINHO, H.L.C. et al. Evaluating the microbial diversity of soil samples: methodological innovations. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 71, p. 491-503, 1999.

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

DALLA PRIA, M.; CAMARGO, L.E.A. Doenças do Cacaueiro (*Theobroma cacao*) In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A. et al. **Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 3. ed. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, 1997. p.176-183.

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

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

DUDE, H.C.; BILGRAMI, K.S. Pestalotia or Pestalotiopsis? **Mycopathologia**, Suny-Albany, v. 29, n.1-2, 1966.

ELLIOTT, M.L. ***Pestalotiopsis (Pestalotia) diseases of palm***. Gainesville: University of Florida. 2006. 3 p.

ELLIOTT, M.L. et al. **Diseases and disorders of ornamental palms**. St. Paul: AMERICAN PHYTOPATHOLOGICAL SOCIETY, 2004.

ESPINOZA, J.G.; BRACEÑO, E.X. Canker and twig dieback of blueberry caused by *Pestalotiopsis* spp. and a *Truncatella* sp. in Chile. **Plant Disease**, St. Paul, v. 92, n. 10, p. 1407-1414, out. 2008.

FALEIRO, F.G. et al. Uso de marcadores RAPD na classificação de isolados de *Phytophthora* spp. causadores da podridão parda do cacauero no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 3, maio - jun 2003.

FERNANDES, 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, F.A. **Patologia florestal**: principais doenças florestais no Brasil. Viçosa: Sociedade de Investigações Florestais, 1989. 570 p.

FUNGARO, M.H.P. PCR na micologia. **Revista Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, Uberlândia, v. 3, n. 14, p. 12-16, maio/jun. 2000.

GATTO, D.A. et al. Características tecnológicas das madeiras de *Luehea divaricata*, *Carya illinoensis* e *Platanus x acerifolia* quando submetidas ao vergamento. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 18, n. 1, p. 121-131, 2008.

GEISER, D. M. et al. FUSARIUM-ID v.1.0: A DNA sequence database for identifying *Fusarium*. **European Journal of Plant Pathology**, [S.I.], v. 110, n. 5-6, p. 473-479, 2004.

GERLACH, W.; NIRENBERG, H. **The Genus Fusarium – a Pictorial Atlas**. Biologische Bundesanstalt für Landund. Institut für Mikrobiologie, Berlin-Dahlem. 1982. 406p.

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

GRIGOLETTI JUNIOR, A.; AUER, C. G. **Fusariose em mudas de *Pinus taeda***. Colombo: Embrapa Florestas, 2006. 3 p. (Comunicado técnico 166).

GROSOPO, J.G.S. **Phellinus quélet (Hymenochaetaceae, Basidiomycota) no sul do Brasil: uma abordagem filogenética**. 159 f. 2005. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

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, 1999. p. 95 – 98.

HODGES, C.S. **Black root rot of Pine**. Agriculture Handbook, Washington, D.C.: USDA, For. Serv., p.14-16, 1975.

HOMECHIN, M; PIZZINATTO, M.A; MENTEN, J.O.M. Sanidade de sementes de *Pinus elliottii* var. *elliottii* e *Pinus taeda* e patogenicidade de *Fusarium oxysporum* em plântulas de *Pinus elliottii* var. *elliottii*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.12, p.102-112.1986.

HORSFALL, J.G.; COWLING, E.B. Pathometry: The measurement of plant disease. In: HORSFALL, J.G.; COWLING, E.B. (Eds.) **Plant Disease: An Advanced Treatise - How Disease Develops in Populations**. New York NY. Academic Press. pp. 119-136. 1978.

HU, H.L. et al. Phylogenetic diversity of endophytic *Pestalotiopsis* species in *Pinus armandii* and *Ribes* spp.: evidence from rDNA and β - tubulin gene phylogenies. **Fungal Diversity**, Chiang Mai, v. 24, p.1–22, 2007.

INDEX FUNGORUM. Disponível em <http://www.indexfungorum.org>. Acesso em 17 de março de 2012.

KEDERA, C.J.; LESLIE, J.F.; CLAFLIN. L.E. Genetic diversity of *Fusarium* section Liseola (*Gibberella fujikuroi*) in individual maize stalks. **Phytopathology**, East Lansing, v. 84, n. 6, p. 603-607, 1994.

KEITH, L.M.; VELASQUEZ, M.E.; ZEE, F.T. Identification and characterization of *Pestalotiopsis* spp. causing scab disease of guava, *Psidium guajava*, in Hawaii. **Plant Disease**, St. Paul, v. 90, n. 1, p. 16-23, jan. 2006.

KIRK P.M. et al. **Dictionary of the fungi**. 10 ed. Wallingford: CABI. 2008.

KLINGELFUSS, L.H.; YORINORI, J.T.; DESTRO, D. Métodos de inoculação para quantificação de resistência em soja a *Fusarium solani* f. sp. *glycines*, em casa-de-vegetação. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 1, jan./fev. 2007.

KNUTSEN, A.K.; TORP, M.; HOLST-JENSEN, A. Phylogenetic analyses of the *Fusarium poae*, *Fusarium sporotrichioides* and *Fusarium langsethiae* species complex based on partial sequences of the translation elongation factor-1 alpha gene. **International Journal of Food Microbiology**, Grugliasco, v. 95, p. 287– 295, 2004.

KRISTENSEN, R. et al. Phylogeny and toxigenic potential is correlated in *Fusarium* species as revealed by partial translation elongation factor 1 alpha gene sequences. **Mycology Research**, Manchester, v. 109, n. 2, p. 173–186. 2005

KRUGNER, T. L. Ação do ambiente sobre doenças de plantas. In: GALLI, F. (Coord.). **Manual de fitopatologia**. 2. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1978. v. 1, p. 215-225.

KRUGNER, T. L.; CARVALHO, P. G. T.; GALLI, F. Nota prévia sobre a ocorrência de *Fusarium* sp. em *Pinus elliottii* Engelm. **O Solo**, Piracicaba, v. 62, n. 1. p. 45-48, 1970.

JEEWON, R; LIEW, E.C.Y.; HYDE, K.D. Phylogenetic evaluation of species nomenclature of *Pestalotiopsis* in relation to host association. **Fungal Diversity**, Chiang Mai, v. 17, p. 39–55, 2004.

LAZAROTTO, M.; MUNIZ, M.F.B.; SANTOS, A.F. Detecção, transmissão, patogenicidade e controle químico de fungos em sementes de paineira (*Ceiba speciosa*). **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 36, n. 2, p. 134-139, 2010.

LATHAM, A.J.; BOWEN, K.L.; CAMPBELL, H.L. Occurrence of *Glomerella cingulata* in pecan nut shucks and its association with fungal leaf scorch. **Plant disease**, St. Paul, v. 79, n. 2, p. 182-185, 1995.

LEIVENS, B. et al. Evolutionary relationships between *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* and *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* isolates inferred from mating type, elongation factor-1a and exopolygalacturonase sequences. **Mycological Research**, Edinburg, v. 113, n.10, p. 1181-1191, 2009.

LESLIE, J.F.; SUMMERELL, B.A. **The Fusarium Laboratory Manual**. Ames: Blackwell Publishing, 2006. 388 p.

LIMA, A.A. et al. **Identificação molecular de linhagens de fungos pertencentes aos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* utilizando marcadores RAPD**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 218). 2008.

LIU, A.R.; XU, T.; GUO, L. Molecular and morphological description of *Pestalotiopsis hainanensis* sp. nov., a new endophyte from a tropical region of China. **Fungal Diversity**, Chiang Mai, v. 27, n. 2, janeiro 2007. p. 23-36.

LIU, A.R. et al. Cultural studies coupled with DNA based sequence analyses and its implication on pigmentation as a phylogenetic marker in *Pestalotiopsis* taxonomy. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Detroit, v. 57, n.2, p. 528–535, 2010.

LOPES, E.B. et al. Influência de fatores químicos do solo sobre incidência do mal-do-Panamá na bananeira cv. Pacovan na Paraíba. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, Monteiro, v. 8, n.1, p.100-109. 2008.

LOPES, A.S.; GUILHERME, L.R.G. **Interpretação de análise de solo: Conceitos e Aplicações**. Anda: Associação Nacional para Difusão de Adubos. (Boletim Técnico, 2), 1992. 50 p.

MAHARACHCHIKUMBURA, S.S.N. et al. *Pestalotiopsis* - morphology, phylogeny, biochemistry and diversity. **Fungal Diversity**, Chiang Mai, v. 50, p.167–187, 2011.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Registro Nacional de Cultivares**. Disponível em http://extranet.agricultura.gov.br/php/proton/cultivarweb/cultivares_registradas.php
Acesso em 14 de outubro de 2011.

MARCHIORI, J.N.C. **Dendrologia das angiospermas: das magnoliáceas às flacourtiáceas**. Santa Maria: Ed. da UFSM, 1997. 271 p.

MATHIVANAN, N.; MURUGESAN, K. *Fusarium chlamydosporum*, a potent biocontrol agent to groundnut rust, *Puccinia arachidis*. **Journal of Plant Diseases and Protection**, Stuttgart, v. 107, n.3, p. 225-234, 2000.

MENEZES, M. Considerações epidemiológicas de doenças fúngicas da cultura do inhame. In: II SIMPÓSIO NACIONAL SOBRE AS CULTURAS DO INHAME E DO TARO. **Anais...** João Pessoa, PB, 2002.

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.

MICHEREFF, S.J. et al. Importância dos patógenos e das doenças radiculares em solos tropicais. In: MICHEREFF, S.J.; ANDRADE, D.E.G.T.; MENEZES, M. (Eds.). **Ecologia e manejo de patógenos radiculares em solos tropicais**. Recife: UFRPE, Imprensa Universitária, 2005. p.1 – 18.

MILANESI, P.M. **Caracterização, toxicidade e patogenicidade de *Fusarium* spp. em genótipos de soja em sistema plantio direto**. 2009. 91 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2009.

MIZUBUTI, E.S.G.; MAFFIA, L.A. Epidemiologia: estudo de doenças em populações. In: MIZUBUTI, E.S.G.; MAFFIA, L.A. **Introdução à fitopatologia**. Viosa: Ed. UFV, 2009. p. 48- 80.

NAHAR, S.; MUSHTAQ, M. Pathogenicity and transmission studies of seedborne *Fusarium* species (sec. *Liseola* and *Sporotrichiella*) in sunflower. **Pakistan Journal of Botany**, Karachi ,v. 38, n.2, p. 487-492, 2006.

NELSON, P. E.; TOUSSON, T. A.; MARASAS, W. F. O. **Fusarium Species: an Illustrated Manual for Identification**. Philadelphia: Pennsylvania State University Press, 1983. 193 p.

O'DONNELL K. et al. Gene genealogies reveal global phylogeographic structure and reproductive isolation among lineages of *Fusarium graminearum*, the fungus causing wheat scab. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington. v. 97, n.14, p.7905-7910, 2000.

O'DONNELL, K. et al. A Multigene phylogeny of the *Gibberella fujikuroi* species complex: Detection of additional phylogenetically distinct species. **Mycoscience**, v. 41, p.61–78, 2000.

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 of Sciences**, Washington, v.95, n. s/n, p. 2044– 2049. 1998.

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

ONO, E.Y.S., et al. *Fusarium verticillioides* strains isolated from corn feed: characterization by fumonisin production and RAPD fingerprinting. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v.53, n.4 2010.

ORTIZ, E. R. N.; CAMARGO, L. E. A. Doenças da Nogueira Pecan. In: KIMATI, H. et al. (Eds.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. p. 501–505.

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.

PEREIRA, M.C. et al. Diversidade de fungos micorrízicos Epulorhiza spp. isolados de *Epidendrum secundum* (Orchidaceae). **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, n. 33, p.1187- 1197, 2009.

PERES, A.P. et al. Variabilidade morfo-cultural e genética de fungos associados à podridão peduncular do mamão. **Ciência & Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n.5, p.1053-1062, set./out., 2003.

PFENNING, L.H.; MARTINS, M.F. Espécies de *Fusarium* associados ao cafeeiro na região sul de Minas Gerais. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL. **Anais...Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil**, Poços de Caldas, 2000.

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.

POLETTI, I. **Caracterização e manejo do patossistema erva-mate / podridão-de-raízes**. 2010. 97 f. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2010.

POLETTI, I. et al. Zoneamento e identificação de *Fusarium* spp. causadores de podridão de raízes em plantios de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.) na região do vale do Taquarí, RS. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 16, n. 1, 2006. p. 1-10.

POLONI, A. et al. Análise da variabilidade morfológica e taxa de crescimento de culturas policonidiais e monoconidiais de *Bipolaris sorokiniana*. **Biociências**, Porto Alegre, v. 16, n. 1, p. 52-63, jan. 2008.

RÁDIO MERIDIONAL LTDA. Disponível em <http://www.radiocachoeira.com.br/default/valor.php?noticia=8170>. acesso em 17 de abril de 2010.

RAHJOO, V., et al. Morphological and molecular identification of *Fusarium* isolated from maize ears in Iran. **Journal of Plant Pathology**, Pisa, v. 90, n.3, p. 463-468, 2008.

REID, W. Growing pecans in Missouri. **Agroforestry in Action**, December, 2000.

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.

REIS, E.M. Effects of rain and relative humidity on the release of ascospores and on the infection of wheat heads by *Gibberella zeae*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. p. 339-343. 1990.

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.

RIDLEY, M. Evolução e diversidade. In: RIDLEY, M. **Evolução**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2006. p.373-542.

RIEGER, M. **Introduction to Fruit Crops**. New York: food products press. 2006.

RODRIGUES, F.A.; CARVALHO, E.M.; VALE, F.X.R. Severidade da podridão-radicular de *Rhizoctonia* do feijoeiro influenciada pela calagem, e pelas fontes e doses de nitrogênio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, n. 9, p. 1247-1252, 2002.

SANDERLIN R.S.; HEYDERICH-ALGER, K.I. Evidence that *Xylella fastidiosa* can cause leaf scorch disease of pecan. **Plant disease**, St. Paul, v.84, n. 12, p. 1282-1286, 2000.

SANTOS, T.M. et al. Variabilidade genética de isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* obtidos de bananais do norte de Minas Gerais. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 33, n. 2, p. 437-445, jun. 2011.

SARTORI, A.F.; REIS, E.M.; CASA, R.T. Quantificação da transmissão de *Fusarium moniliforme* de sementes para plântulas de milho. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 4, p. 456-458, 2004.

SERRA, I.M.R.S.; COELHO, R.S.B. Mancha de *Pestalotiopsis* em Helicônia: caracterização da doença e potenciais fontes de resistência. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, n.1, jan - fev 2007.

SIDDIQUEE, S.; YUSUF, u.k.; ZAINUDIN, N.A.I.M. Morphological and molecular detection of *Fusarium chlamydosporum* from root endophytes of *Dendrobium crumenatum*. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 9, n. 26, p. 4081-4090, 2010.

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

SILVA, C.M. Diversidade genética por marcadores moleculares em *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* no Estado de Santa Catarina. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.40, n.12, p.2480-2485, dez 2010.

SPARKS, D. Geographical origin of pecan cultivars influences time required for fruit development and nut size. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 116, n.4, p. 627-631. 1991.

STAMFORD, N.P. et al. Propriedades físicas e químicas dos solos. In: MICHEREFF, S.J.; ANDRADE, D.E.G.T.; MENEZES, M. (Eds.). **Ecologia e manejo de patógenos**

radiculares em solos tropicais. Recife: UFRPE, Imprensa Universitária, 2005. p.41 – 60.

STĘPIEŃ, L.; KOCZYK, G.; WAŚKIEWICZ, A. Genetic and phenotypic variation of *Fusarium proliferatum* isolates from different host species. **Journal of Applied Genetics**, Poznan, v.52, n.1, p. 487–496, 2011.

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**, n. 31, p. 21–32. 2000.

TEIXEIRA, H.; VIEIRA, M.G.G.C.; MACHADO, J.C. Marcadores morfofisiológicos e isoenzimáticos na análise da diversidade genética de isolados de *Acremonium strictum*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.29 n.4 July/Aug. 2004.

TEJESVI, M.V. et al. Phylogenetic analysis of endophytic Pestalotiopsis species from ethnopharmacologically important medicinal trees. **Fungal Diversity**, Chiang Mai, v. 38, p.167–183. 2009.

TELLES NETO, F.X.B. **Transmissão e controle de *Fusarium graminearum* em sementes e danos causados pela giberela em trigo.** 113 f. 2004. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2004.

TYRREL, G.I. et al. Species identification of enterococci via intergenic ribosomal PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.33. p. 1108-1113. 1997.

UENO, B. Doenças fúngicas. In: ANTUNES, L.E.C. (Ed. Tec.). **Sistema de produção da amoreira-preta.** Embrapa Clima Temperado (Sistemas de Produção, 12). Setembro 2008.

VAN'T KLOOSTER, J.W. et al. Tef1, a Phytophthora infestans gene encoding translation elongation factor 1 alpha. **Gene**, v. 249, n.1-2, p. 145-151, 2000.

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.

WAALWIJK, C. et al. Discordant groupings of *Fusarium* spp. from Sections Elegans, Liseola and Dlamina based on ribosomal ITS1 and ITS2 sequences. **Mycologia**, [S.l.], v. 88, n.3 p. 361-368, 1996.

WADE, R.H. Microtubules: An overview. **Methods in Molecular Medicine**, New York, v. 137, p. 1-16, 2007.

WEI, J.G.; XU, T. *Pestalotiopsis kunmingensis*, sp. nov., an endophyte from *Podocarpus macrophyllus*. **Fungal Diversity**, Chiang Mai, v. 15, p.247–254, 2004.

WEI, J.G. et al. Endophytic *Pestalotiopsis* species associated with plants of Podocarpaceae, Theaceae and Taxaceae in southern China. **Fungal Diversity**, Chiang Mai, v. 24, p.55–74, 2007.

WHITE, T. et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M. A. et al. Comparative evolutionary analysis of rDNA ITS regions in *Drosophila*. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v. 11, n. 3, p. 513- 522, 1990.

WING, N. et al. Toxigenicity of *Fusarium* species and subspecies in section Gibbosum from different regions of Australia. **Mycological Research**, Edinburg, v.97, n. 12, p. 1441–1446, 1993.

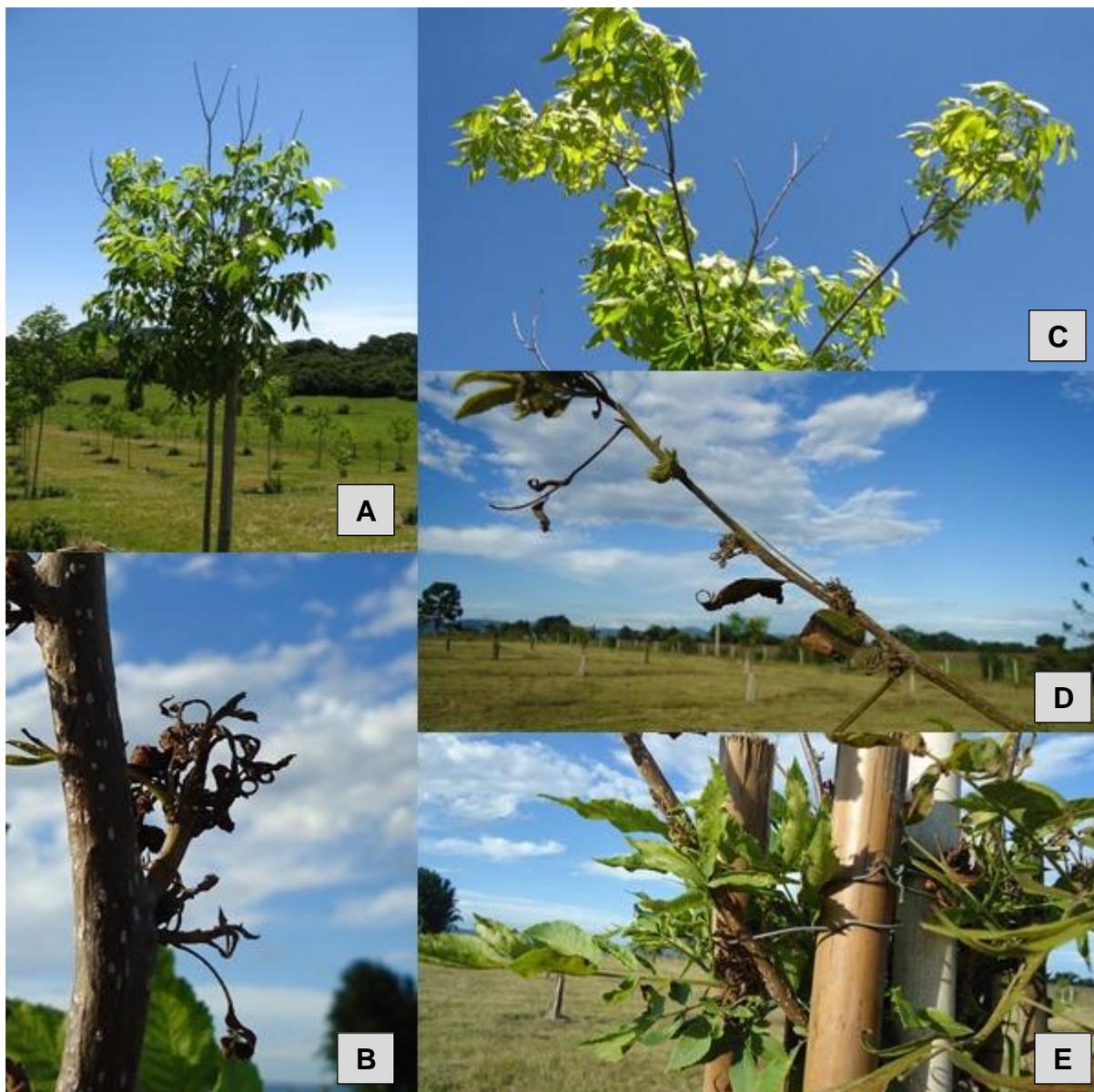
WIENS, J.J.; SERVEDIO, M.R. Species delimitation in systematics; inferring diagnostic differences between species. **Proceedings of the Royal Society**, London, n. 267, 2000.

ZAMBOLIM, L.; COSTA, H.; VALE, F. X. R. do. Efeito da nutrição mineral sobre doenças de plantas causadas por patógenos de solo. In: ZAMBOLIM, L. (Ed.). **Manejo integrado fitossanidade: cultivo protegido, pivô central e plantio direto**. Viçosa: UFV, 2001. p. 347- 403.

ZAMBOLIM, L.; COSTA, H.; VALE, F.X.R. Nutrição mineral e patógenos radiculares. In: MICHEREFF, S.J.; ANDRADE, D.E.G.T.; MENEZES, M. (Eds.). **Ecologia e manejo de patógenos radiculares em solos tropicais**. Recife: UFRPE, Imprensa Universitária, 2005. p.153-182.

ZHIHONG, Z.C.X. et al. Identification of the pathogen causing a new disease-nut black spot on *Carya cathayensis*. **Plant Protection**, Beijing, n.4, 2010.

APÊNDICES



Apêndice 1 – Super-brotamento observado a campo em plantas de nogueira-pecan com raízes colonizadas por *Fusarium* spp. em Mata (A, C) e em Santa Maria (B, D, E).

```

=====
Programa GENES           Análise de Agrupamento
Arquivo de dados         C:\dados\mediasfusarium.dat
Número de variáveis     4
Matriz dispersão         XXXXX
Número de genótipos     9
Padronização dos dados  Sim
Arquivo de Saída         Temp
Número de simulações    100
Método de agrupamento  Ligação Média Entre Grupo(UPGMA)
Arquivo com rótulos     C:\dados\ROTULOFUSARIUM.txt
Data                     06-03-2012
=====
Informações Preliminares

```

Estágio	Acesso x	Acesso y	Distância	Distância (%)
1	1	4	0.0936	2.654
2	6	7	0.1994	5.651
3	1	2	0.4045	11.4674
4	6	9	1.4105	39.9842
5	1	3	1.9551	55.4229
6	5	8	2.1171	60.0124
7	1	6	2.6328	74.633
8	1	5	3.5277	100.0

Ponto de Corte = média + kDP k = 1,25 - Mojema(1977)

Consistência das bifurcações

Estágio	Acesso x	Acesso y	Consistência (%)
1	1	4	100.0
2	6	7	76.0
3	1	2	100.0
4	6	9	51.0
5	1	3	100.0
6	5	8	78.0
7	1	6	43.0
8	1	5	100.0

CONTRIBUIÇÃO RELATIVA DOS CARACTERES PARA DIVERGÊNCIA – SINGH (1981)
Cálculo feito com médias não padronizadas

VARIÁVEL	S.j	VALOR (%)	Diâmetro
de colônias	21387.9826	0.0155	
Esporulação	35.2243	0.0000	
Comprimento conídios	6080.5304	0.0044	
Largura conídios	137574831.2109	99.98	

Apêndice 2 – Resultados do programa Genes para a construção do dendrograma de dissimilaridade entre 9 isolados patogênicos de *Fusarium* spp. obtido pela técnica UPGMA a partir da análise da matriz de distância Euclidiana com os 4 caracteres morfofisiológicos avaliados (diâmetro de colônias, esporulação, largura e comprimento de conídios).

```

=====
Programa GENES                Análise de Agrupamento
Arquivo de dados              C:\dados\mediasfusariumcolonias.dat
Número de variáveis          1
Matriz dispersão              XXXXX
Número de genótipos          12
Padronização dos dados       Sim
Arquivo de Saída              Temp
Número de simulações         100
Método de agrupamento       Ligação Média Entre Grupo(UPGMA)
Arquivo com rótulos          C:\dados\ROTULOFUSARIUMCOLONIAS.txt
Data                          06-03-2012
=====

```

Informações Preliminares

Estágio	Acesso x	Acesso y	Distância	Distância (%)	
1	11	12	-	-	
2	1	5	0.0064	0.3335	0.0089
3	1	3	0.0173	0.8942	0.0188
4	7	8	0.0297	1.5384	0.0297 *
5	2	11	0.0401	2.0764	0.0393 *
6	1	2	0.0897	4.6379	0.0712 *
7	6	7	0.2121	0.9695	0.1499 *
8	1	4	0.2827	14.6234	0.217 *
9	6	9	0.532	27.5164	0.3581 *
10	1	10	0.899	46.4998	0.5794 *
11	1	6	1.9334	100.0	1.1048 *

Ponto de Corte = média + kDP k = 1,25 - Mojema(1977)

Consistência das bifurcações

Estágio	Acesso x	Acesso y	Consistência (%)
1	11	12	100.0
2	1	5	100.0
3	1	3	100.0
4	7	8	100.0
5	2	11	100.0
6	1	2	100.0
7	6	7	100.0
8	1	4	100.0
9	6	9	100.0
10	1	10	100.0
11	1	6	100.0

Apêndice 3 – Resultados do programa Genes para a construção do dendrograma de dissimilaridade entre 12 isolados patogênicos de *Fusarium* spp. obtido pela técnica UPGMA a partir da análise da matriz de distância Euclidiana com apenas o caracter diâmetro de colônias.

```

=====
Programa GENES           Análise de Agrupamento
Arquivo de dados        C:\dados\mediaspestalotiopsis.dat
Número de variáveis     4
Matriz dispersão       XXXXX
Número de genótipos    11
Padronização dos dados Sim
Arquivo de Saída       Temp
Número de simulações   100
Método de agrupamento Ligação Média Entre Grupo(UPGMA)
Arquivo com rótulos    C:\dados\ROTULOPESTALOTIOPSIS.txt
Data                   06-21-2012
=====

```

Informações Preliminares

Estágio	Acesso x	Acesso y	Distância	Distância (%)	
1	3	8	0.6014	18.8704	-
2	1	2	0.6265	19.6587	0.6361
3	3	5	1.0285	32.2741	1.0518
4	1	10	1.3319	41.7937	1.3343
5	3	7	1.5408	48.3485	1.5482
6	6	9	1.6865	52.9195	1.7121
7	1	4	1.7461	54.7912	1.8229
8	1	11	2.6453	83.0048	2.2396 *
9	3	6	2.9289	91.9045	2.5810 *
10	1	3	3.1869	100.0	2.8793 *

Ponto de Corte = média + kDP k = 1,25 - Mojema(1977)

Consistência das bifurcações

Estágio	Acesso x	Acesso y	Consistência (%)
1	3	8	78.0
2	1	2	100.0
3	3	5	94.0
4	1	10	43.0
5	3	7	54.0
6	6	9	64.0
7	1	4	82.0
8	1	11	47.0
9	3	6	44.0
10	1	3	100.0

CONTRIBUIÇÃO RELATIVA DOS CARACTERES PARA DIVERGÊNCIA – SINGH (1981)
Cálculo feito com médias não padronizadas

VARIÁVEL	S.j	VALOR (%)
Diâmetro de colônias	2408.5463	64.636
Esporulação	697.5209	18.7187
Comprimento conídios	578.452906	15.5234
Largura conídios	41.802297	1.1218

Apêndice 4 – Resultados do programa Genes para a construção do dendrograma de dissimilaridade entre 9 isolados patogênicos de *Pestalotiopsis* spp. obtido pela técnica UPGMA a partir da análise da matriz de distância Euclidiana com os 4 caracteres morfofisiológicos avaliados (diâmetro de colônias, esporulação, largura e comprimento de conídios).

ANEXOS

Anexo 1 - Descrição dos meios de cultura utilizados no trabalho

Meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar (BDA)

- 200 g de batatas descascadas e fatiadas;
- 20 g de dextrose;
- 15 g de ágar;
- 1 L de água destilada;
- 0,05 mg de estreptomicina/100 mL de meio de cultura.

DHINGRA, O. D.; SINCLAIR, J. B. Basic Plant Pathology Methods. 2. ed. Boca Raton: CRC Press, 1995. 434 p.

Meio de cultura Folha de Cravo – Agar (CLA)

- 15 g de ágar;
- 1 L de água destilada;
- folhas de cravo (distribuídas na placa de Petri antes de verter o meio).

NELSON, P. E.; TOUSSON, T. A.; MARASAS, W. F. O. Fusarium Species: an Illustrated Manual for Identification. Philadelphia: Pennsylvania State University Press, 1983. 193 p.

Meio de cultura Ágar-água (AA)

- 17 g de Ágar;
- 1 L de água destilada.

DHINGRA, O. D.; SINCLAIR, J. B. Basic Plant Pathology Methods. 2. ed. Boca Raton: CRC Press, 1995. 434 p.

Meio de cultura Batata-Sacarose-Ágar (BSA)

- 200 g de batata descascada
- 20 g de sacarose
- 20 g de ágar
- 1 L de água destilada.

Alfenas, A.C.; Mafia, R.G. (Eds.). **Métodos em Fitopatologia**. Viçosa: Ed. UFV. 382 p. 2007.

Meio de cultura Spezieller-Nährstoffarmer-Ágar (SNA)

- 1 g de KH_2PO_4
- 1 g de KNO_3
- 0,5 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- 0,5 g de KCl
- 0,2 g de glucose
- 0,2 g de sucrose
- 20 g de ágar

Nirenberg, H.I. Untersuchungen über die morphologische und biologische Differenzierung in der Fusarium-Section Liseola. Berlin-Dahlem: **Mitt Biol Bundesanst für Land- und Forstwert**, n. 169, p. 1–117. 1976.