

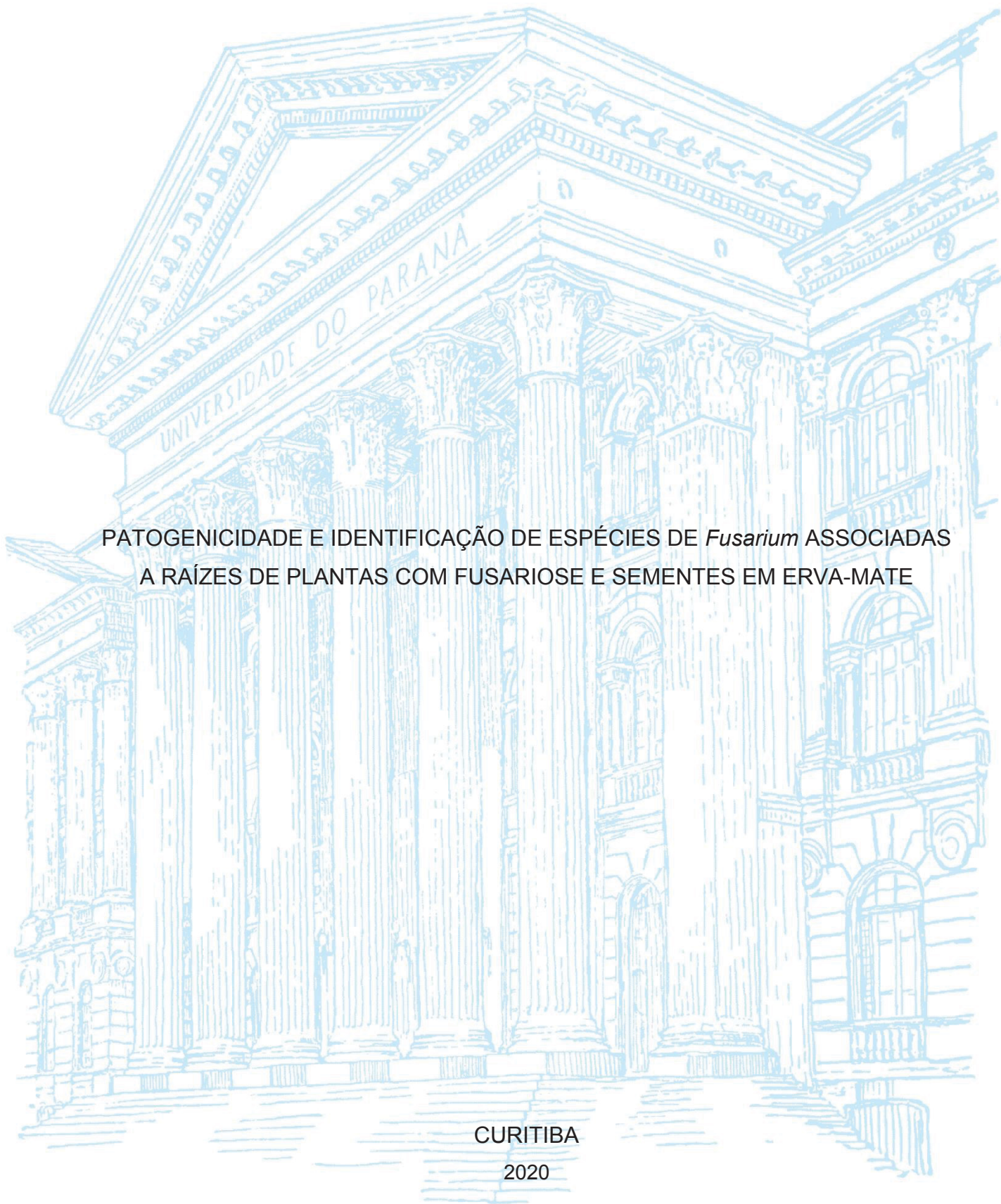
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LARA CARRARO VARGAS

PATOGENICIDADE E IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DE *Fusarium* ASSOCIADAS  
A RAÍZES DE PLANTAS COM FUSARIOSE E SEMENTES EM ERVA-MATE

CURITIBA

2020



LARA CARRARO VARGAS

PATOGENICIDADE E IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DE *Fusarium* ASSOCIADAS  
A RAÍZES DE PLANTAS COM FUSARIOSE E SEMENTES EM ERVA-MATE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Agronomia, Área de Concentração Produção Vegetal, Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Álvaro Figueredo dos Santos  
Coorientador: Prof. Dr. Tiago Miguel Jarek

CURITIBA

2020

Vargas, Lara Carraro

Patogenicidade e identificação de espécies de *Fusarium* associadas a raízes de plantas com fusariose e sementes em erva-mate. / Lara Carraro Vargas. - Curitiba, 2020.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia.

Orientador: Álvaro Figueredo dos Santos.

Coorientador: Tiago Miguel Jarek.

1. Erva-mate (*Ilex paraguariensis*). 2. Raízes - Doenças e pragas.  
3. Solos – Microbiologia. 4. *Fusarium*. I. Santos, Álvaro Figueredo dos. II. Jarek, Tiago Miguel. III. Título. IV. Universidade Federal do Paraná.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO AGRONOMIA  
(PRODUÇÃO VEGETAL) - 40001016031P6

## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em AGRONOMIA (PRODUÇÃO VEGETAL) da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **LARA CARRARO VARGAS** intitulada: **PATOGENICIDADE E IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DE *Fusarium* ASSOCIADAS A RAÍZES DE PLANTAS COM FUSARIOSE E EM SEMENTES DE ERVA-MATE**, sob orientação do Prof. Dr. **ÁLVARO FIGUEREDO DOS SANTOS**, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 27 de Fevereiro de 2020.

ÁLVARO FIGUEREDO DOS SANTOS

Presidente da Banca Examinadora (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA)

TIAGO MIGUEL JAREK

Coorientador - Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

DAURI JOSE TESSMANN

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ)

## AGRADECIMENTOS

A Deus.

A minha família por todo apoio e suporte durante o período em que me dediquei ao mestrado e em especial ao Rodrigo por toda ajuda, paciência e compreensão durante todo o processo de estudo e aplicação do Projeto.

Ao Programa de Pós-graduação em Agronomia e Produção Vegetal da Universidade Federal do Paraná pela oportunidade de realizar o Mestrado.

Ao meu Orientador Professor Doutor Álvaro Figueredo dos Santos por entrar comigo nesse desafio, que foi trabalhar com erva-mate e por todos os conselhos e ensinamentos.

Ao Ricardo Mezzomo por ceder isolados de *Fusarium* para o meu trabalho.

A Maria Cecília Mireski por disponibilizar prontamente suas sequências de DNA.

Ao meu coorientador Dr. Tiago Jarek, toda a orientação e paciência por não medir esforços para me ajudar, também pelos seus ensinamentos e observações para a construção deste trabalho.

A analista Caroline e ao assistente Davi do Laboratório de Patologia Florestal da Embrapa Florestas por não medirem esforços para ajudar, pelo conhecimento, alegria e companheirismo em todos os dias no laboratório.

À Dra Elisa Serra Negra Vieira pela ajuda e ensinamentos compartilhados na execução de análises moleculares.

A Embrapa Florestas pelo apoio, fornecimento de materiais, base para que esse trabalho fosse realizado com sucesso.

À CAPES, pelo investimento nas pesquisas e auxílio financeiro.

## RESUMO

A erva-mate (*Ilex paraguariensis*) é uma espécie nativa do Brasil cultivada nos estados do Sul e no Mato Grosso do Sul. Esta cultura tem grande importância socioeconômica para pequenos e médios produtores. A fusariose, causada por *Fusarium* spp., é considerada a principal doença do cultivo podendo atacar plântulas e mudas em viveiros como também árvores adultas causando a morte da planta. Este trabalho teve por objetivo: identificar as espécies de *Fusarium* associadas a raízes de plantas com fusariose e sementes de erva-mate, avaliar o potencial patogênico de espécies provenientes de sementes de erva-mate, assim como, avaliar agressividade de isolados. A patogenicidade foi avaliada através do método de substrato infestado com grãos de trigo colonizados por *Fusarium*. As mudas foram transplantadas para o substrato infestado com *Fusarium* e procedeu-se a avaliação dos sintomas reflexos na parte aérea, a cada sete dias até os 180 dias. Ao final do experimento foram avaliados os componentes relacionados à doença e à planta, sendo a avaliação da doença composta por nota das raízes, mortalidade das mudas e reisolamento do patógeno das raízes. As avaliações da planta foram: massa seca e massa verde da parte aérea e raízes, incremento de altura de planta, incremento de diâmetro de caule e comprimento de raízes. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 12 repetições, sendo que cada repetição consiste em uma muda de erva-mate. Os dados foram submetidos a análise estatística através dos Modelos Lineares Generalizados e comparação de médias por teste de Tukey. A identificação morfológica foi realizada através de marcadores morfológicos como clamidósporos em meio de cultura solo-ágar, esporodóquio em meio de cultura folha de cravo-ágar, cadeia de microconídios no meio de cultura cloreto de potássio e SNA, falsas cabeças e fiálides, macro e microconídios quanto a forma e número de septos em meio folha de cravo-ágar e SNA, crescimento micelial em 72 horas tubos inclinados com meio BDA e pigmentação de colônias em meio BDA. Para a caracterização molecular o DNA foi extraído a partir de micélio dos isolados, as amostras foram submetidas à PCR e sequenciada a região gênica do fator de alongação 1- $\alpha$  e as sequências comparadas no banco de dados Genbank. Todos os isolados de *Fusarium* spp. foram patogênicos à erva-mate, havendo diferentes níveis de agressividade. Os isolados foram identificados morfológica e molecularmente como complexo de espécies *F. solani*, *F. decemcellulare*, *F. sterilihyphosum*, e complexo de espécies *F. graminearum*.

Palavras-chave: *Ilex paraguariensis*. Podridão de raízes. Patógeno de solo.

## ABSTRACT

The yerba mate (*Ilex paraguariensis*) is a native species from Brazil, cultivated in the Southern states and in Mato Grosso do Sul. This culture has high socioeconomic significance to small and medium-sized producers. The fusariosis, caused by *Fusarium spp.*, is considered the main disease of its cultivation, attacking not only seedlings in nurseries but also grown trees, causing root rot and in severe cases, plant death. This essay intended to: identify the *Fusarium* species related to plant roots with fusariosis and yerba mate seeds, and to value the pathogenic potential of species from yerba mate seeds as well as to evaluate strain aggressiveness. The pathogenicity was evaluated through the method of infested substrate with wheat grains colonized by *Fusarium*. The seedlings were transplanted to *Fusarium*-infested substrate and the evaluation of the symptoms shown on its aerial portion was proceeded every 7 days until the 180<sup>th</sup> day. At the end of the experimentation, components related to the disease and to the plant were evaluated by root grade, seedling mortality and root pathogen reisolation. The plant evaluations were: fresh and dry mass from the aerial and root portions, height growth, stem and root length growth. The experimental delimitation was completely randomized with 12 repetitions, each one consisting of a yerba mate seedling. The data were submitted to statistical analysis through the Generalized Linear Models and average comparison using the Tukey's method. The morphological identification was realized through morphological markers with chlamydospores in soil agar culture medium, sporodochium in carnation-leaf-agar medium, microconidia chain in potassium chloride medium and SNA medium, false heads and phialides, macro and microconidia were evaluated in terms of shape and number of septa in carnation-leaf-agar medium and SNA medium, mycelial growth in 72 hours and colony pigmentation on PDA medium. For molecular characterization, the DNA was extracted from the mycelia of the strains, the samples were submitted to PCR and sequenced the genic region of the elongation factor 1- $\alpha$ , and the sequences compared to the Genbank database. All the *Fusarium spp.* strands were pathogenic to yerba mate, having different levels of aggressiveness. The strands were identified morphological and molecularly as *F. solani*, *F. decemcellulare* and *F. sterilihyphosum* species complex and *F. graminearum* species complex.

Key-words: *Ilex paraguariensis*. Root rot. Soil pathogen.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Notas atribuídas as raízes de erva-mate aos 180 dias após a inoculação. 1- Ausência de sintomas; 2- menos da metade das raízes comprometidas; 3- mais da metade das raízes comprometidas e 4- todas as raízes comprometidas.....28

FIGURA 2 – Etapas do teste de patogenicidade de *Fusarium* em mudas de erva-mate: (A) grãos de trigo colonizados com *Fusarium* spp. no frasco de vidro; (B) incorporação dos grãos de trigo colonizados com *Fusarium* spp. ao substrato; (C) mudas recém retiradas dos tubetes; (D) cova em substrato infestado; (E) plantio das mudas em substrato infestado com *Fusarium* spp.; (F) disposição das mudas inoculadas com *Fusarium* spp. em casa de vegetação.....29

FIGURA 3 – Estruturas morfológicas dos isolados de *Fusarium* spp: (A) Clamidósporo do isolado EM 10; (B) Macroconídio com 3 septos do isolado EM 01, (C) Monofiálides longas com falsas cabeças do isolado EM 10.....31

FIGURA 4 – Estruturas morfológicas dos isolados de *Fusarium* spp: (A-B) Macroconídios com 7 – 9 septos dos isolados EM 24 e EM 25 respectivamente, (C) Polifiálide com microconídios do isolado EM 24.....31

FIGURA 5 - FIGURA 5 – Estrutura morfológica dos isolados de *Fusarium* spp: Hifa espiralada estéril do isolado EM 16..... 32

FIGURA 6 – Estruturas morfológicas dos isolados de *Fusarium* spp;(A) Polifiálides com microconídios do isolado EM 22, (B) macroconídios do isolado EM 22.....33

FIGURA 7 – Pigmentação de colônia e pigmentação de meio de cultura de isolados de *Fusarium* (EM 01, 08, 09, 10, 12, 12A, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 20A, 22, 24, 25, 26, 28) patogênicos a erva-mate em meio BDA inclinado de

acordo com Nelson et al. (1983) agrupados em seis grupos conforme a pigmentação.....35

FIGURA 8 – Árvore filogenética dos isolados de *Fusarium* spp. de erva-mate obtidos a partir do fator de alongação 1- $\alpha$ , utilizando o método Neighbor-Joining com bootstrap de 1000 repetições .....37

FIGURA 9 – Sintomas observados na parte aérea de mudas de erva-mate inoculadas com fusariose spp.: (A-B) escurecimento da parte apical das mudas; queda de folhas (C); (D-E) escurecimento das folhas, murcha e morte da planta; (F) morte da planta.....40

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Isolados de <i>Fusarium</i> spp de erva-mate oriundos dos estados do Paraná e Rio Grande do Sul.....	20
TABELA 2 – Espécies de referência de <i>Fusarium</i> utilizadas na árvore filogenética, identificação do strain e número de depósito no GenBank.....	25
TABELA 3 – Caracterização morfológica e crescimento micelial de isolados de <i>Fusarium</i> spp. da erva-mate.....	34
TABELA 4 – Caracterização molecular da região fator de alongação 1- $\alpha$ para isolados de <i>Fusarium</i> patogênicos á erva-mate.....	36
TABELA 5 – Incidência de fusariose em mudas de erva-mate, reisolamento (%) de <i>Fusarium</i> spp., mortalidade (%) de muda e nota de raízes .....	39
TABELA 6 – Comprimento de raiz, incremento de diâmetro de caule e de altura da planta de mudas de erva-mate inoculadas com <i>Fusarium</i> spp.....	41
TABELA 7 – Massa verde e massa seca de parte aérea e raízes de mudas de erva-mate inoculadas com <i>Fusarium</i> spp.....	42

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>9</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>11</b>
2.1 Erva-Mate .....	11
2.2 Fusariose da Erva-Mate .....	12
2.3 Identificação de <i>Fusarium</i> .....	13
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>19</b>
3.1 Origem dos isolados .....	19
3.2 Identificação das espécies de <i>Fusarium</i> .....	19
3.2.1 Obtenção de culturas monospóricas .....	19
3.2.2 Caracterização Morfológica .....	20
3.2.3. Caracterização molecular .....	23
3.3 TESTE DE PATOGENICIDADE .....	26
3.4.4 Delineamento experimental e análise estatística .....	29
<b>4 RESULTADOS</b> .....	<b>30</b>
4.1 Identificação de <i>Fusarium</i> .....	30
4.1.1. Caracterização Morfológica .....	30
4.1.2 Caracterização Molecular .....	36
4.2 TESTE DE PATOGENICIDADE .....	38
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	<b>42</b>
<b>6 CONCLUSÕES</b> .....	<b>47</b>
<b>7 REFERÊNCIAS</b> .....	<b>48</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil) é originária da América do Sul, compreendendo os territórios do Brasil, Argentina e Paraguai (ESMELINDRO, 2002; VIEIRA et al., 2010). A cultura da erva-mate é de grande importância econômica para pequenos e médios produtores, sendo uma das maiores fontes de renda e emprego na cadeia produtiva (BERGER, 2006).

O cultivo da erva-mate ocorre nos estados da região Sul do Brasil e em Mato Grosso do Sul, numa área de 78.190 hectares, englobando mais de 180 mil propriedades rurais, gerando mais de 700 mil empregos em toda sua cadeia produtiva, tendo grande impacto socioeconômico nas regiões produtoras (ANTONIAZZI et al., 2018). A produtividade média brasileira é de 8.181 kg ha. Os países que são maiores importadores de erva-mate do Brasil são: Uruguai, Síria, Chile, Estados Unidos, Espanha, Líbano e Alemanha (FAOSTAT, 2017).

O cultivo da erva-mate vem se expandindo nos estados do Sul do Brasil, entretanto com aumento da área plantada e uso de práticas de manejo inadequadas, os problemas fitossanitários têm se agravado, sendo comum a ocorrência de doenças em viveiros e plantios (POLETTTO et al., 2010). Poucos são os incentivos em estudar espécies nativas, especialmente a erva-mate, havendo poucas informações sobre fertilização, colheita, propagação, pragas e doenças (PENTEADO JR e GOULART, 2019; MEDRADO et al, 2000). Segundo Paula et al. (2018) os problemas fitossanitários provocam perdas significativas à cultura e faltam informações sobre o controle das doenças encontradas na erva-mate. Poletto (2015) relata perdas em povoamentos de erva-mate e na baixa qualidade e mortalidade de mudas causadas pela podridão de raízes por *Fusarium* spp., *Rhizoctonia* sp. e *Pythium* sp. De acordo com Poletto et al (2006), as perdas podem ultrapassar 30% em ervais plantados. Patógenos causadores de podridão de raízes como *Fusarium* spp. são de difícil controle devido ao fato de sobreviverem no solo por longos períodos (BEDENDO, 1995) com estruturas de resistência como os clamidósporos (BUENO et al., 2007).

*Fusarium* spp. podem ser encontradas em flores, frutos e sementes de erva-mate. As técnicas utilizadas para obtenção de sementes como a estratificação favorecem o desenvolvimento de *Fusarium*, um patógeno que

pode ser transmitido por estas, nas quais sua contaminação pode chegar a 100% das mesmas causando perdas por mortalidade e qualidade de mudas. (POLETTO et al., 2015). Souza et al. (2019), constatou a presença do gênero *Fusarium* em sementes de erva-mate durante a estratificação utilizando blotter test.

A erva-mate tem sido um dos principais produtos florestais da região Sul do Brasil e, atualmente, é o principal produto não madeireiro desta região (PENTEADO JR e GOULART, 2019). No entanto, há poucos estudos com a fusariose e nos últimos cinco anos, esta doença vem ganhando importância pelas perdas causadas aos ervais e ainda há dúvidas sobre a sua etiologia.

O objetivo deste estudo foi identificar espécies de *Fusarium* associadas a raízes de plantas com fusariose e sementes de erva-mate, avaliar o potencial patogênico de espécies provenientes de sementes, assim como avaliar agressividade de isolados.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Erva-Mate

A erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.) é uma árvore com folhas perenes, que pode atingir de quatro a oito metros de altura quando adulta, mas pode atingir um tamanho maior se as condições forem favoráveis. A erva-mate é uma planta alógama dioica críptica não possibilitando a autopolinização, mas mesmo sendo dióica, em todas as flores encontram-se estames e pistilos, sendo que em flores femininas os estames não são funcionais e nas flores masculinas o pistilo é abortado (CARVALHO, 2006). Atualmente, a erva-mate integra a família Aquifoliaceae, divisão Magnoliophyta (Angiospermae) e ordem Celastrales. A área de ocorrência natural da erva-mate abrange em torno de 540.000 km<sup>2</sup> do Brasil, Argentina e Paraguai. (ESMELINDRO et al., 2002; MURAKAMI et al., 2013). No Brasil encontram-se 450 mil km<sup>2</sup> do total, incluindo os estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná e Mato Grosso do Sul, com manchas em São Paulo, Rio de Janeiro e Minas Gerais (PERALTA; BOURLEGAT, 2012).

As folhas de erva-mate vêm sendo utilizadas pelos povos indígenas como estimulante antes mesmo da descoberta do Brasil (EVANS, 1998; CARELLI et al, 2011). Atualmente, tem expressiva importância cultural e econômica na região Sul da América do Sul. As principais utilizações da erva-mate são: consumo do chimarrão, (infusão de erva moída com água quente), tererê (infusão de erva moída com água fria) e também no preparo de chá. Ultimamente também têm sido elaboradas bebidas industrializadas, suplementos alimentares, fármacos e até mesmo cosméticos com as folhas de erva-mate (CARDOZO JUNIOR; MORAND, 2016).

Os principais produtores mundiais de erva-mate são: Brasil (619 mil toneladas), Argentina (290 mil toneladas) e Paraguai (105 mil toneladas). A área total brasileira é de 78 mil hectares com produtividade média de folhas verdes de 8.181 kg ha<sup>-1</sup>. Os principais importadores de erva-mate do Brasil são Uruguai, Síria, Chile, Estados Unidos, Espanha, Líbano e Alemanha (FAOSTAT, 2017). A erva-mate contribui para as exportações brasileiras, sendo que em 2011 alcançou um valor de aproximadamente US\$ 61 milhões de dólares (VIEIRA, 2012).

No Brasil, principalmente na região Sul, a exploração da erva-mate compõe uma importante atividade econômica, principalmente para pequenos produtores rurais que utilizam a mão de obra familiar (MEDRADO; VILCAHUAMAN, 2014). O cultivo de erva-mate é diretamente ligado a permanência de famílias no meio rural, se trata de uma cultura bem adaptada não apresentando grandes problemas com intempéries climáticas, sofrendo pouco com suas variações, diferente da maioria das espécies agrícolas (LUZ; DAL SOGLIO; KUBO, 2017).

## 2.2 Fusariose da Erva-Mate

Assim como as demais culturas, a erva-mate é alvo de patógenos de parte aérea e de solo, uma vez que o ataque destes é frequente e causa interferência direta na produção e, conseqüentemente, na renda do produtor rural, o que pode levar ao desestímulo do desenvolvimento da atividade na propriedade rural (POLETTTO et al., 2015). De acordo com Grigoletti Júnior et al. (1996) existem vários patógenos que podem ocasionar doenças em erva-mate podendo atingir níveis significativos e ocasionar redução de produção. Auer e Santos (2016) citam que as principais doenças da cultura são o tombamento de mudas (*Fusarium* sp., *Colletotrichum* sp., *Rhizoctonia* sp. e *Pythium* sp.), pinta preta (*Cylindrocladium spathulatum* Alfieri & Schoult), antracnose (*Colletotrichum* spp.) e podridão de raízes (*Fusarium* spp.). Omar (2009) afirma que poucas informações sobre essas doenças estão disponíveis e que algumas não possuem tratamentos químicos específicos.

A fusariose ou podridão de raízes é a principal doença da erva-mate (GRIGOLETTI JÚNIOR & AUER, 2001; AUER & SANTOS, 2016). O patossistema *Fusarium* x erva-mate se comporta diferente das outras doenças causadas por *Fusarium*, uma vez que este possui várias espécies fúngicas que podem atuar de forma conjunta ou isolada. As espécies *Fusarium oxysporum* (Schlecht.) e *F. solani* (Mart.) Sacc. são constantemente encontrados com maior virulência, conjuntamente com *F. tricinctum* (Cordda) Sacc., sendo este menos frequente. Também podem ocorrer as espécies *F. decemcellulare* (Brick), *F. tabacinum* (Beyma) W. Gams., *Pythium* sp. e *Rhizoctonia* sp. A doença é constantemente observada em reboleiras no meio do erval com tamanho

variável e, em alguns relatos, podem ocorrer erveiras mortas ou com sintomas espalhados por todo campo (POLETTTO et al., 2006; POLETTTO, et al., 2007).

Os sintomas reflexos da fusariose observados na parte aérea das plantas são amarelecimento das folhas, apresentando-se de forma ascendente na copa, com estagnação do crescimento e queda excessiva de folhas, morte de alguns galhos da planta e, em casos avançados, a doença pode ocasionar em morte total da planta (AUER; SANTOS, 2016). O patógeno causa lesões necróticas na superfície das raízes e estrias escuras no xilema, com a evolução da doença ocorre necrose do sistema radicular (POLETTTO et al., 2006; POLETTTO, et al., 2007).

Apesar da podridão de raízes ocasionar danos nos campos de erva-mate, faltam informações sobre esta doença. Recentemente, Mezzomo et al. (2019) verificaram que a produção de enzimas extracelulares desempenha importante papel na patogênese e concluíram que as enzimas extracelulares, como catalase, lacase, celulase, caseinase, amilase, protease, lipase e pectinases, produzidas pelos isolados de *F. oxysporum* e *F. solani* patogênicos à erva-mate desempenham importante papel na agressividade e também foram responsáveis pelo maior percentual de morte de plântula.

A contaminação das flores pode ser uma porta de entrada dos patógenos no patossistema erva-mate x *Fusarium*, além de que os fungos *Fusarium* spp. e *Rhizoctonia* sp. são os principais patógenos contaminantes encontrados em sementes de erva-mate (POLETTTO et al., 2015).

### 2.3 Identificação de *Fusarium*

O gênero *Fusarium* pertence ao Reino Fungi, Divisão Ascomycota, subdivisão Pezizomycotina, classe Sordariomycetes, sub-classe Hypocreomycetidae, ordem *Hypocreales* e família *Nectriaceae*. (INDEX FUNGORUM, 2019). Esse gênero possui alto grau de diversidade em relação aos atributos morfológicos, fisiológicos e ecológicos e ocorre nas mais diversas regiões geográficas e nichos ecológicos do mundo (LOGRIECO et al., 1997). Pode ocorrer principalmente em localidades com clima tropical e subtropical, sendo capaz de sobreviver por períodos longos no solo pela formação de estruturas de resistência denominadas de clamidósporos (MILANESI, 2009; TAPIA; AMARO, 2014).

Os fungos deste gênero têm várias características ecológicas, podendo ser saprofíticos, produtores de micotoxinas, patógenos de animais, humanos e plantas, e até mesmo agentes de biocontrole. Além disso, são habitantes naturais do solo e estão largamente distribuídos no mundo, sendo frequentemente encontrados em associações com plantas (SUMMERELL et al., 2010).

Espécies do gênero *Fusarium* podem colonizar diferentes órgãos das plantas, como ramos, folhas, flores e/ou inflorescências e frutos por seus conídios, que são disseminados pelo ar ou água, pelo solo e pela diversidade de espécies existentes, pois a variabilidade genética dentro do gênero é muito ampla (MILANESI, 2009).

As espécies de *Fusarium* são mais comuns em locais de clima tropical e temperado, porém algumas delas podem ser encontradas em regiões desérticas, no Ártico e nos Alpes. Esta distribuição geográfica ampla pode ser atribuída a habilidade do fungo de sobreviver em diversos substratos orgânicos e também a facilidade de disseminação de seus esporos (NELSON et al., 1994). Temperatura e umidade relativa do ar altas, solos ácidos e argilosos com deficiência de drenagem são fatores favoráveis à sobrevivência das espécies de *Fusarium* (SILVA et al, 2017).

A sobrevivência no solo desses microrganismos ocorre via produção de clamidósporos, os quais são estruturas formadas pelo espessamento e desenvolvimento de uma parede secundária nas células da hifa. Além do mais, espécies de *Fusarium* têm como características típicas a formação de macro e microconídios, esporos assexuados, geralmente hialinos e septados que possuem células basal e apical distintas que são bastante utilizadas na taxonomia destes microrganismos (MASSOLA JÚNIOR, 2018).

Características como presença de microconídios, tamanho de macroconídios, tipos de células microconidiogênicas e presença ou ausência de clamidósporos são importantes critérios que auxiliam na identificação de espécies do fungo (NELSON, 1994).

A dispersão de esporos de *Fusarium* spp. pode acontecer de várias maneiras, como materiais de propagação vegetativa e sementes infectadas, e também máquinas e ferramentas contaminadas. Os propágulos do patógenos podem estar em restos culturais e presentes na água de irrigação, ocasionando

risco de infecção em áreas não contaminadas. Algumas espécies podem sobreviver por períodos longos de tempo em restos culturais de forma saprofítica ou ainda de forma endofítica em raízes e tecidos vasculares de plantas não-hospedeiras (PLOETZ, 2015).

A alta plasticidade genética das espécies de *Fusarium* é uma característica relevante de isolados do gênero, o que faz necessário o uso de técnicas e ferramentas que auxiliam na distinção destas populações. Dentro do gênero são encontradas diferenças entre as características morfológicas, de virulência e patogenicidade, o que resulta na classificação dos microrganismos em “*formae speciales*” (f. sp.) e raças, de acordo com a capacidade de um fungo em atacar um determinado hospedeiro ou cultivares específicas das plantas, respectivamente (OLIVEIRA; COSTA, 2002). A espécie *F. oxysporum* é considerado, por exemplo, um organismo muito amplo com mais de 120 “*formae speciales*” (SILVA et al., 2014). As “*formae speciales*” são subdivididas em raças, as quais são classificadas de acordo com um conjunto de cultivares diferenciadas que possuem genes específicos de resistência (HENRIQUE et al., 2015).

Várias espécies de *Fusarium* são populares pela produção de micotoxinas nocivas à humanos e animais, além da produção de metabólitos secundários que alteram a produção de hormônios nas plantas (ALEXANDER et al., 2011). Assim, *F. graminearum* (Schwabe) e *F. oxysporum* foram listados dentre os 10 patógenos mais importantes na área econômica e científica (DEAN et al. 2012).

*Fusarium* é um dos gêneros fúngicos produtores de metabólitos secundários os tricotecenos que formam um grupo de micotoxinas relacionadas a citotoxicidade. As características toxicológicas mais frequentes são inibição da síntese proteica, irritação da pele, hemorragia, diarreia, náuseas, refluxo alimentar e vômito. Os tricotecenos mais frequentes em *F. graminearum* são desoxinivalenol, fusarenon-X, diacetoxyscirpenol, neosolaniol e nivalenol. (SMITH; MOSS, 1985, GERALDO et al., 2006)

Algumas espécies de *Fusarium* foram descobertas em todos os solos avaliados em áreas da América Central, sendo classificadas como habitantes naturais do solo, enquanto outras espécies foram verificadas apenas em localidades específicas e classificadas como invasoras do solo, dentre elas

*Fusarium oxysporum f. sp. cubense*, agente causal do mal do Panamá. Algumas espécies podem atacar sementes, uma vez que a alta umidade durante a maturação dos grãos, colheita ou armazenamento pode ocasionar em podridão das sementes e aumentar a incidência de podridão após o plantio (MICHEREFF et al. 2005).

A identificação por caracteres morfológicos pode ser feita com o uso de chaves taxonômicas como a de Nelson et al., (1983) e a chave de Nirenberg; O'Donell (1998), Ventura (2000). A classificação das espécies do gênero *Fusarium* são classificadas com base em suas características morfológicas, como: morfologia da colônia, pigmentação, velocidade do crescimento micelial, especificidade dos hospedeiros, entre outras. Devido à plasticidade e variações das características fenotípicas desse gênero, os marcadores morfológicos não são suficientes, os quais estão acarretando em várias discordâncias na especificação desses fungos (OLIVEIRA; COSTA, 2002).

Por comparar evolutivamente sequências parciais de DNA (ácido desoxirribonucleico) de um ou mais genes, as análises moleculares contribuem significativamente na identificação de novas espécies, como por exemplo no gênero *Fusarium* e no complexo de espécies *F. oxysporum*, *F. solani*, *F. tricinctum* e *F. decemcellulare*, que foram identificadas pelo uso de estudos filogenéticos. Porém, devido às limitações encontradas, tanto em estudos morfológicos quanto em moleculares, tem se utilizado uma abordagem mais ampla para a caracterização e identificação de novas espécies de *Fusarium*, a qual leva em conta informações biológicas, morfológicas, bioquímicas e moleculares (BROWN; PROCTOR, 2013).

Neste sentido, o uso da biologia molecular, que tem como base as relações filogenéticas, é uma ferramenta que oferece considerável segurança no estabelecimento de um sistema que seja complementar para a classificação dos fungos, auxiliando na definição de alguns grupos taxonômicos e designação mais precisa destes microrganismos (ONO et al., 2010).

A identificação, taxonomia e classificação de espécies de fungos fitopatogênicos geralmente são baseadas nas características morfológicas, porém em muitos gêneros estas características são de difícil observação em populações naturais, além de que em muitas vezes podem ser afetadas pelo ambiente em que se encontram (FALEIRO et al., 2003).

Em muitos estudos, a variabilidade de alguns isolados fúngicos pode ser avaliada através de análises experimentais que proporcionam o estabelecimento das variações morfológicas. Esta se torna uma abordagem bem conhecida e corrobora com diversos estudos científicos, vem sendo utilizada a cerca de 200 anos, empregada por profissionais que trabalham com taxonomia de fungos (SUMMERELL et al., 2010).

Por muito tempo a identificação de *Fusarium* era feita com base apenas em características morfológicas, o que em muitas vezes originavam dados conflitantes devido, principalmente, à quantidade insuficiente de caracteres morfológicos comparado ao grande número de espécies dentro do gênero. Devido a isso, o emprego de técnicas moleculares surgiu como ferramenta para identificação das espécies de maneira mais precisa (O'DONNEL, 1997).

Os resultados obtidos com a análise dos critérios fenotípicos necessitam de confirmação e por isso são utilizadas técnicas mais específicas e aprimoradas. De tal modo, o uso de técnicas moleculares para caracterização e identificação de patógenos se mostra extremamente importante, uma vez que fornece informações indispensáveis nesse âmbito. As ferramentas moleculares possuem alta confiabilidade e grande utilização na identificação de espécies fúngicas por terem acesso diretamente ao DNA de tais microrganismos (LOMBARDI, 2002; ZACCARO et al., 2007). Além do mais, os métodos que envolvem a análise do DNA são muito úteis em pesquisas que visam a filogenia de fungos, diferenciação entre espécies, "*formae speciales*", raças e isolados (KURAMAE; SOUZA, 2002).

O número crescente de relatos de doenças em plantas que tem como agente causal espécies de *Fusarium* e a necessidade de caracterização correta das mesmas, é uma preocupação eminente aos profissionais que estudam o gênero. A descrição de espécies morfológicas é fundamentada na ideia de que um indivíduo morfológico pode representar grandes alterações dentro da espécie, o que se torna de extrema importância para a identificação inicial de fungos. As características morfofisiológicas são muito úteis e bastante utilizadas para a diferenciação de espécies de *Fusarium*. No entanto, a quantidade de caracteres utilizadas para tal análise é relativamente pequena quando comparada com a infinidade de espécies existentes no gênero e a expressão de tais características pode ser grandemente influenciada pelo ambiente, o que,

consequentemente, pode resultar em erros de identificação (LESLIE; SUMMERELL, 2006).

O uso de técnicas moleculares ganhou destaque em pesquisas focadas na identificação de fungos, fornecendo resultados mais precisos. Uma das técnicas mais utilizadas para a identificação de espécies de *Fusarium* é a amplificação do DNA através da reação de cadeia da polimerase (PCR), pois proporciona amplificação de fragmentos específicos e também há possibilidade de detecção destes em células vivas ou mortas (PINHEIRO, 2004).

As técnicas que utilizam a análise de DNA estão sendo muito úteis nas pesquisas que envolvem filogenia de microrganismos, como os fungos, diferenciação entre as espécies, raças e isolados (KURAMAE; SOUZA, 2002). A espécie *Fusarium decemcellulare* (Brick) que causa super brotamento em inflorescências e necrose vascular em ráquis em cajueiro (*Anacardium occidentale*) foi identificada no Brasil com emprego de técnicas moleculares (MATOS et al., 2016). Na Espanha, o uso em conjunto de técnicas de análises fisiológicas, morfológicas e moleculares fez com que fosse identificada a espécie *Fusarium proliferatum* (Matsush) como agente causal da murcha em plantas de morango (*Fragaria* spp.) (BORRERO et al., 2018). Outro exemplo é a identificação da raça 4 de *F. oxysporum* agente causal da murcha do algodoeiro (*Gossypium* spp.) nos Estados Unidos (HALPERN et al., 2018).

Várias regiões do DNA já foram constatadas e podem ser amplificadas para a identificação de espécies de *Fusarium*, entre eles o ITS (internal transcribed spacer), beta-tubulina, fator de alongação 1-alfa (TEF-1 $\alpha$ ), entre outros (MACIEL et al., 2017). Porém, tais regiões possuem vantagens e desvantagens quanto ao seu uso, tanto pela facilidade de amplificação, tamanho dos fragmentos amplificados ou pela variação no nível das sequências, intra e inter espécies (OLIVEIRA; COSTA, 2002).

O gene que codifica a região TEF-1 $\alpha$  é tido como um dos marcadores mais usuais para diferenciação de espécies de *Fusarium*. Este fator possui alto valor filogenético e é responsável por codificar um fragmento essencial do mecanismo de tradução de proteínas. Este gene é considerado de cópia única em *Fusarium* e manifesta um alto nível de polimorfismo de sequências entre espécies, mesmo quando em comparação com as porções ricas em íntrons de genes que codificam proteínas (CHANDRA et al., 2011).

A utilização da região TEF-1 $\alpha$  pode ser associada ao alto grau de informação ao nível de espécies que ela possui e ao fato de não haver relatos sobre o aparecimento de cópias não ortólogas, e também pela disponibilidade de 'primers' universais baseados neste gene (GEISER et al., 2004). A região do TEF-1 $\alpha$  em eucariotos é altamente conservada e faz parte das enzimas que se ligam e hidrolisam o GTP (guanosina trifosfato – GTPases), que possuem fatores proteicos que estão envolvidos no início, alongamento e fim da tradução (KEELING; INAGAKI, 2004).

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Origem dos isolados**

Neste estudo foram analisados 20 isolados de *Fusarium* spp. pertencentes à coleção de Fungos e Oomicetos Florestais da Embrapa Florestas, Colombo, PR. O isolado EM 01 foi fornecido por Ricardo Mezzomo (Santa Maria – RS). Os isolados foram obtidos de amostras sintomáticas de raízes de plantas adultas, raízes de mudas e sementes de erva-mate sendo oriundos de quatro regiões, conforme segue: Ilópolis (Rio Grande do Sul), Ivaí , Colombo e São Matheus do Sul (Paraná). (Tabela 1)

#### **3.2 Identificação das espécies de *Fusarium***

##### **3.2.1 Obtenção de culturas monospóricas**

Os isolados de *Fusarium* foram crescidos em placas de Petri contendo meio de cultura Syntetic Nutrient Agar (SNA), por 10 dias, a temperatura de 25 °C, no escuro. A obtenção das culturas monospóricas dos 20 isolados foi de acordo com Jarek et al. (2018), conforme segue: um disco (5 mm de diâmetro) de meio de cultura SNA com micélio fúngico esporulante foi transferido para um tubo de ensaio contendo 9 mL de água ultrapura autoclavada, para uma posterior diluição seriada. O tubo de ensaio foi agitado manualmente. Com o auxílio de uma micropipeta de 1000  $\mu$ l foi retirada uma amostra de 1 mL da suspensão de esporos e transferido para outro tubo contendo 9 mL de água ultrapura esterilizada. O mesmo procedimento foi realizado sucessivamente até a diluição de 10<sup>-3</sup>. Em seguida com o auxílio de uma micropipeta, depositou-se em uma

placa de Petri descartável 20 gotas de 5 µl com a suspensão oriunda da diluição de 10<sup>-3</sup>. Então as placas foram invertidas e deixadas por 60 minutos em repouso. Após, com o auxílio de um microscópio de luz objetiva de 10X observou-se a presença ou não de um único esporo em cada gota. Em caso positivo a gota era transferida para placa de Petri contendo meio SNA e incubada por 24 horas. Depois disso as placas de Petri contendo o esporo era visualizada em microscópio de luz com objetiva de 10X, para confirmação da germinação do conídio. Quando confirmada a germinação de apenas um esporo por gota e esta foi transferida para outra placa de Petri com meio de cultura BDA e incubadas em BOD por sete dias a 24 °C no escuro.

TABELA 1 – Origem dos isolados de *Fusarium* spp de erva-mate analisados no estudo.

<b>Espécie - Isolado*</b>	<b>Local de coleta</b>	<b>Parte da planta</b>
<i>Fusarium solani</i> (EM 01**)	Ilópolis – RS	Raiz
EM 08	São Matheus do Sul – PR	Raiz - muda
EM 09	São Matheus do Sul – PR	Raiz - muda
EM 10	São Matheus do Sul – PR	Raiz - muda
EM 12	Ivaí – PR	Semente
EM 12 A	Ivaí – PR	Semente
EM 13	Colombo – PR	Semente
EM 14	Colombo – PR	Semente
EM 15	Colombo – PR	Semente
EM 16	Ivaí – PR	Semente
EM 17	Ivaí – PR	Semente
EM 18	Ivaí – PR	Semente
EM 19	Ivaí – PR	Semente
EM 20	São Matheus do Sul – PR	Raiz - muda
EM 20 A	São Matheus do Sul – PR	Raiz - muda
EM 22	São Matheus do Sul – PR	Raiz - muda
EM 24	São Matheus do Sul – PR	Raiz - muda
EM 25	São Matheus do Sul – PR	Raiz - muda
EM 26	São Matheus do Sul – PR	Raiz - muda
EM 28	São Matheus do Sul – PR	Raiz - muda

\* Isolados da Coleção de Fungos e Oomicetos da Embrapa Florestas, Colombo-PR;

\*\* Isolado I1AR1 cedido por Ricardo Mezzomo (Santa Maria-RS).

### 3.2.2 Caracterização Morfológica

A caracterização morfológica foi baseada em “The *Fusarium* Laboratory Manual” (LESLIE; SUMMERELL, 2006).

**Células conidiogênicas:** Os isolados de *Fusarium* spp. foram crescidos em meio de cultura SNA e meio Solo-Ágar (150 g.L<sup>-1</sup> de solo, 20 g.L<sup>-1</sup> de ágar) para

a caracterização de mono e polifíalides. Os isolados foram incubados em BOD a 24°C e escuro por 7 dias em meio SNA e 10 dias em meio Solo-Ágar. Lâminas dos isolados foram feitas a partir dos cultivos e as estruturas observadas em microscópio de luz com objetiva de 10X (LESLIE & SUMMERELL, 2006).

**Microconídios:** Os isolados foram crescidos em meio de cultura SNA, a 24°C, no escuro, por sete dias. Em seguida, com auxílio de uma alça fragmentos do micélio foram colocados em lâminas para visualização em microscópio de luz com objetiva de 10X e 40X. Os microconídios foram classificados quanto a presença ou não, formato e também quanto a formação de falsas cabeças.

**Cadeias de microconídios:** Os isolados cultivados em meio BDA com sete dias foram repicados para meio Cloreto de Potássio - Ágar (KCI) onde estes foram incubados a 24°C e escuro por 10 dias. Após o período de incubação, as placas foram abertas e as estruturas observadas diretamente em microscopia de luz e objetiva de 10X para visualização da disposição dos microconídios sobre a célula conidiogênica sendo em cadeia ou em falsas cabeças. As cadeias foram caracterizadas conforme o tamanho podendo ser curtas, médias ou longas.

**Esporodóquio:** A formação de esporodóquio foi avaliada em meio Folha de Cravo- Ágar (CLA). Para a produção de meio CLA foram utilizadas 20 g.L<sup>-1</sup> de ágar e 5 secções transversais de 5 mm de folha de cravo (*Dianthus caryophyllus*) distribuídos por placa de Petri. As folhas de cravo foram retiradas do terço superior da planta.

**Macroconídios:** O meio utilizado para a caracterização foi Folha de Cravo-Ágar. Quando o esporodóquio era presente, eram feitas lâminas do esporodóquio para visualização dos macroconídios em microscópio de luz, também foram montadas lâminas com o micélio para visualização de macroconídios. Em meio SNA lâminas foram montadas, para avaliação da presença ou ausência desta célula reprodutiva. Os macroconídios foram avaliados segundo as características: número de septos onde foram contados os septos de 50 macroconídios, curvatura, formato da célula apical e da célula basal conforme Leslie & Summerell (2006).

**Clamidósporos:** O meio utilizado para caracterização foi Solo-Ágar (SA). Os isolados de *Fusarium* spp. foram repicados para o centro de placas de Petri contendo o meio SA, e incubados a temperatura de 24°C e escuro por até 30 dias. A presença de clamidósporos foi avaliada a partir de 10 dias da incubação, sendo feitas lâminas com o micélio e observadas em microscópio de luz com objetiva de 10X.

Culturas de *Fusarium* spp. crescidas em meio SNA por sete dias, 24°C e escuro em BOD foram repicadas para placas de Petri contendo o meio CLA. As placas foram incubadas em BOD em temperatura de 24°C e escuro. Após 10 dias de incubação começou a ser avaliada a presença ou não de esporodóquio e a coloração visualmente com auxílio de microscópio estereoscópio. Também foi avaliada a formação e a coloração da estrutura em meio SNA, a partir dos sete dias de incubação.

**Pigmentação das colônias:** Para a observação da pigmentação das colônias adotou-se a metodologia de Nelson et al. (1983). Os isolados foram crescidos em meio SNA por sete dias em BOD no escuro a 24°C. Em tubos de ensaio foram adicionadas 10 ml de meio de cultura BDA e então vedados com algodão. O meio de cultura foi feito com 200 gramas de batata descascada e fatiada, cozida em 500 ml de água ultrapurificada, o caldo do cozimento foi filtrado, adicionou-se a dextrose (20 g) e ágar (20 g) e o volume foi completado para um litro adicionando-se água ultrapurificada e então o meio foi autoclavado por 20 minutos a 1 ATM e 121°C. Os tubos de ensaio foram inclinados, após isso os isolados foram repicados para os tubos e incubados em BOD a 24°C no escuro. Após o crescimento dos isolados de *Fusarium* a pigmentação das colônias e a cor difundida no meio de cultura foi observada visualmente e comparada com as pigmentações propostas por Nelson et al. (1983).

**Crescimento micelial em meio BDA por 72 horas:** A avaliação de crescimento micelial foi realizada a partir da repicagem de culturas crescidas em meio BDA por 7 dias dos isolados para o centro de placas de Petri contendo meio BDA. Estas placas foram fechadas, lacradas com filme plástico e mantidas em BOD a 24°C no escuro por 72 horas. O crescimento micelial foi determinado com a

medição do diâmetro das colônias com o auxílio de paquímetro digital (marca: Starrett, modelo 799A).

### 3.2.3. Caracterização molecular

Para extração de DNA os isolados foram crescidos em meio extrato de malte 2% e incubados a 24°C e escuro. Após o crescimento o micélio foi filtrado em gaze estéril não aderente e lavado com água ultrapura. O micélio foi pesado e foi utilizado de 60 mg à 100 mg por isolado. O DNA foi extraído com o Kit Wizard® Genomic DNA Purification (Promega), após o micélio ser macerado com nitrogênio líquido. Após a extração as amostras foram limpas com álcool 70% e então as mesmas foram secas no Speed Vac (10 minutos a 60 °C), após isso foi adicionado 100 µl de solução de reidratação de DNA (Promega) para reidratar a amostra. Em gel de agarose 0,8% foi visualizado o resultado da extração, após a eletroforese que foi realizada com 80 mV por uma hora aproximadamente.

A reação de PCR consistiu em 34 ciclos de amplificação, desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 58°C por 45 segundos, extensão a 72 °C e 1 minuto. Em gel de agarose 1,2 % foi visualizado os produtos da PCR. Os fragmentos amplificados foram comparados com o marcador de peso molecular de 100 pb, para comprimentos de 680 pb. Os produtos da PCR foram visualizados em gel de agarose 1,2% com o tampão SB 0,5x (BRODY & KERN, 2004) e eletroforese 200 mV.

A identificação foi realizada amplificando a região genica do fator de alongação, utilizando os primers TEF1 (5'ATGGGTAAGGARGACAAGAC 3') e TEF2 (5' GGARGTACCAGTSATCATGTT 3'). Os fragmentos foram sequenciados pela empresa GoGenetic (Curitiba- PR). As sequências de DNA obtidas (aproximadamente 630 pares de bases) foram comparadas com sequências do banco de dados GenBank, utilizando o programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), o qual permite múltiplas comparações par a par das sequências. O resultado do BLAST se arché expresso em percentual de identidade com linhagens de espécies de *Fusarium* depositadas no GenBank.

As análises filogenéticas foram realizadas utilizando o programa Mega 6. Para isso, as sequências dos isolados deste estudo foram previamente alinhadas com sequencias parciais do gene TEF1 de outras espécies de

*Fusarium* cujos níveis de identidade foram maiores que 90 %. Assim foram acrescentadas sequências parciais do gene TEF1 de referência das espécies de *F. sterilihyphosum*, *F. decemcellulare*, *F.tucumaniae*, *F. cortaderiae*, *F. graminearum*, *F. striatum*, *F. ambrosium*, *F. virguliniforme*, *F. brasiliense*, *F. cuneirostrum*, *F. phaseoli*, *F. falciforme*, *Nectria plagianthi*, *F. asiaticum*, *F. boothii*, *F. austroamericanum*, *F. meridionale*, *F.acaciae-mearnsii*, *F. brasilicum*, *F. mesoamericanum*, *F. staphyleae*, *F. solani*, *F. proliferatum*, *F. verticillioides*, *F. anthophilum*, *F. chlamyosporum*, *F. globosum*, *Giberella fujikuroi*, *F. fujikuroi*, *F. subglutinans*, *F. circinatum*, *F. nygamai*, *F. guttiforme*, *F. bulbicoa*, *F. udum*, *F. acutatum*, *F. pseudocircinatum*, *F. nisikadoi*, *F. thapsinum* e *F. sacchari* previamente depositadas no GenBank. Com a ferramenta Muscle foram gerados alinhamentos. A análise filogenética foi realizada através do método de Neighbor-Joining número de replicações de Bootstrap de 1000. O outgroup utilizado foi *Lasiodiplodia subglobosa* (número de acesso: KT895370.1).

Tabela 2 -Espécies de referência de *Fusarium* utilizadas na árvore filogenética, identificação do strain e número de depósito no GenBank. (continuação)

<b>Espécie</b>	<b>Identificação do Strain</b>	<b>Nº de depósito</b>
<i>F. sterilihyphosum</i>	CN130	LS423131.1
<i>F. decemcellulare</i>	F47	MK482327.1
<i>F. decemcellulare</i>	ICMP 10382	MG857314.1
<i>F. decemcellulare</i>	CBS 315.73	KM231938.1
<i>F. decemcellulare</i>	F15	MK482295.1
<i>F. guttiforme</i>	CMM 3698	KF005295.1
<i>F. bulbicola</i>	NRRL13618	AF160294.1
<i>F. tucumaniae</i>	NRRL 31096	EF408418.1
<i>F. cortaderiae</i>	ICMP 15501	MG857529.1
<i>F. cortaderiae</i>	NRRL 31173	EF428599.1
<i>F. graminearum</i>	NRRL 31084	HM744693.1
<i>F. striatum</i>	CML 2358	MH984773.1
<i>F. ambrosium</i>	NRRL 22346	FJ240350.1
<i>F. virguliforme</i>	F. virg. 001NY17	MG470654.1
<i>F. brasiliense</i>	F-15-174	MG967561.1
<i>F. cuneirostrum</i>	Fsp3	MG967565.1
<i>F. phaseoli</i>	NRRL31156	AY220187.1
<i>F. falciforme</i>	FFB50SINCUL	MH463545.1
<i>Nectria plagianthi</i>	NRRL 22632	AF178354.1
<i>F. asiaticum</i>	15BhJb14-f1	MH329881.1
<i>F. boothii</i>	PPRI19297	KU325482.1
<i>F. austroamericanum</i>	NRRL 52762	JF740836.1
<i>F. meridionale</i>	CMW25500	FJ904869.1
<i>F. acaciae-mearnsii</i>	NRRL 26755	AF212449.1
<i>F. mesoamericanum</i>	NRRL 29148	AF212442.1
<i>F. staphyleae</i>	NRRL 22120	DQ247563.1
<i>F. solani</i>	NRRL 52798	JF740866.1
<i>FSSC</i>	NRRL 52773	JF740841.1
<i>F. proliferatum</i>	NRRL 31914	MH398174.1
<i>F. verticillioides</i>	CBS 135545	KX584417.1
<i>F. udum</i>	NRRL 52712	JF740794.1
<i>F. acutatum</i>	NRRL 25119	JF740745.1
<i>F. anthophilum</i>	E102231	KX452379.1
<i>F. chlamydosporum</i>	F-2	KY211036.1
<i>F. globosum</i>	NRRL 26131	KF466417.
<i>F. circinatum</i>	CBS 405.97	KM231943.1
<i>F. pseudocircinatum</i>	NRRL 25034	MG838031.1

Continuação da tabela da página anterior

Espécie	Identificação do Strain	Nº de depósito
<i>F. nygamai</i> ,	NRRL 52708	JF740790.1
<i>Giberella fujikuroi</i>	GLB1	JQ029738.1
<i>F. fujikuroi</i> ,	NRRL 66440	MH398220.1
<i>F. subglutinans</i>	NRRL 22016	HM057336.1
<i>F. thapsinum</i>	CBS 733.97	KU604463.1
<i>F. nisikadoi</i>	NRRL 25183	AF324330.1
<i>F. sacchari</i>	NRRL 52795	JF740863.1

FONTE: o autor (2019).

### 3.3 TESTE DE PATOGENICIDADE

Para o teste de patogenicidade utilizou-se o método de substrato infestado com grãos de trigo colonizados por *Fusarium* com ligeiras alterações, conforme Jarek et al. (2018) e Mezzomo (2017).

#### Produção do inóculo

Para o preparo, 100 gramas de grãos de trigo (*Triticum aestivum* L.) foram colocados em frascos de vidro com capacidade de 200 mL e adicionou-se 25 mL de água ultrapura por frasco. Este material foi autoclavado por 20 minutos (121°C, 1 atm), sendo repetida a autoclavagem após um intervalo de 24 horas. Em seguida, deixou-se o material em repouso até atingir a temperatura ambiente.

Os isolados de *Fusarium* spp. foram crescidos em placas de Petri com meio BDA, a 24°C, no escuro, por sete dias. Após, foram adicionados aos frascos de vidro com grãos de trigo sete discos (5 mm de diâmetro) de BDA com micélio por frasco. Os frascos foram fechados, a tampa continha um orifício preenchido com uma mecha de algodão, então incubados em BOD por 14 dias a 24°C e escuro. A concentração de conídios foi contada com o auxílio de uma câmara de Newbauer obtendo-se a concentração de  $10^7$  conídios por grama de trigo colonizado. Para a testemunha foram adicionados aos frascos de vidro com trigo apenas sete discos de meio BDA sem o patógeno.

## **Inoculação e Incubação**

Após a colonização dos grãos de trigo pelo fungo, 384 gramas de grãos de trigo colonizados foram misturados a 9,6 litros de substrato comercial previamente autoclavado (Figura 2A, B). O substrato infestado com *Fusarium* spp. foi colocado em vasos de plástico (capacidade 0,8 litros). Os vasos tinham orifícios na parte inferior. A testemunha consistiu do mesmo procedimento, sendo que os grãos de trigo não tinham a presença do patógeno.

Em seguida, as mudas de erva-mate foram transplantadas para os vasos contendo substrato infestado e, após o transplante, as mudas foram irrigadas, (Figura 2 C, D e E). As mudas permaneceram em casa de vegetação por 210 dias, sendo realizada a irrigação quando necessário.

## **Avaliação**

A avaliação da fusariose foi realizada semanalmente até os 180 dias após a inoculação. Os sintomas observados foram: escurecimento da folha, murcha, queda das folhas e morte da planta. Os dados foram expressos em incidência (porcentagem de mudas sintomáticas ou mortas).

Ao final do experimento as mudas foram retiradas do substrato e as raízes lavadas em água corrente. Após a lavagem foi medido o comprimento das raízes com uma régua. Também avaliou-se a presença de sintomas nas raízes, de acordo com a Figura 1, conforme segue: A nota 1 corresponde a ausência de sintomas nas raízes; - nota 2 presença de lesões necróticas nas raízes com comprometimento de até 40 % das raízes; - nota 3 redução das raízes secundárias e presença de lesões necróticas entre 40 e 80% das raízes; e 4 – ausência de raízes secundárias e presença de lesões necróticas acima de 80% das raízes.

O reisolamento do patógeno foi realizado a partir das raízes. Fragmentos das raízes foram retirados e desinfestados com álcool 70 % por 1 minuto e, em seguida, em hipoclorito de sódio a 1% por 1 minuto e lavadas com água destilada esterilizada. Os fragmentos foram colocados em meio de cultura BDA suplementado com antibióticos (ampicilina 80 ppm e cloranfenicol 40 ppm) e incubados em BOD a 24°C e escuro por 4 dias. Para avaliação foram montadas

lâminas e observadas as estruturas do patógeno em microscópio de luz em objetiva 10 X para confirmação do gênero *Fusarium*.

A Figura 1 –1 corresponde a ausência de sintomas nas raízes; 2 presença de lesões necróticas nas raízes com comprometimento de até 40 % do sistema radicular; 3 redução das raízes secundárias e presença de lesões necróticas entre 40 e 80% do sistema radicular; 4 ausência de raízes secundárias e presença de leões necróticas acima de 80% do sistema radicular.

FIGURA 1 –1



FONTE: O autor (2019).

Previamente foi determinado a altura e diâmetro do caule na região do colo da planta sadia. Ao final do experimento foram realizadas novamente estas medições. Para análise da altura e diâmetro foi calculada a diferença entre a primeira e a segunda medição.

Ao final do experimento foi determinado também a massa verde e massa seca de parte aérea e raízes, a massa seca foi mensurada através de secagem em estufa de circulação de ar a 60°C até atingir peso constante.

FIGURA 2 - Etapas do teste de patogenicidade de *Fusarium* em mudas de erva-mate: (A) grãos de trigo colonizados com *Fusarium* spp. no frasco de vidro; (B) incorporação dos grãos de trigo colonizados com *Fusarium* spp. ao substrato; (C) mudas recém retiradas dos tubetes; (D) cova em substrato infestado; (E)

plantio das mudas em substrato infestado com *Fusarium* spp.; (F) disposição das mudas inoculadas com *Fusarium* spp. em casa de vegetação.

FIGURA 2



FONTE: O autor (2019).

#### 3.4.4 Delineamento experimental e análise estatística

Para o experimento foram utilizados 20 isolados de *Fusarium* spp. e mais o tratamento testemunha, totalizando 21 tratamentos. Foram utilizadas 252 mudas de erva-mate, sendo que para cada tratamento foram realizadas 12 repetições. Cada repetição era uma muda de erva-mate. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado (Figura 1 F).

A análise estatística do trabalho baseou-se na utilização dos Modelos Lineares Generalizados (MLG), em que os dados referentes à nota de raiz, massa seca e verde de parte aérea e raízes, assim como comprimento e raiz, diâmetro e altura de planta foram analisados pela distribuição gamma, com função inversa de ligação.

$$f(y; \mu, \nu) = \frac{\left(\frac{y}{\mu}\right)^\nu}{\Gamma(\nu)} y^{\nu-1} \exp\left\{-\frac{y\nu}{\mu}\right\}$$

Em que  $y$ : representa a variável resposta,  $\mu$ : média da variável resposta,  $\nu$ : função de variância.

As respostas referentes a incidência, mortalidade, reisolamento de *Fusarium* foram analisadas utilizando a Distribuição Binomial com função logística de ligação:

$$f(y; p; n) = \binom{n}{y} p^y (1-p)^{(n-y)}$$

Em que  $y$ : número de plantas com a presença do fungo,  $n$ : número de plantas por repetição e  $p$ : proporção de plantas que continham o fungo.

## 4 RESULTADOS

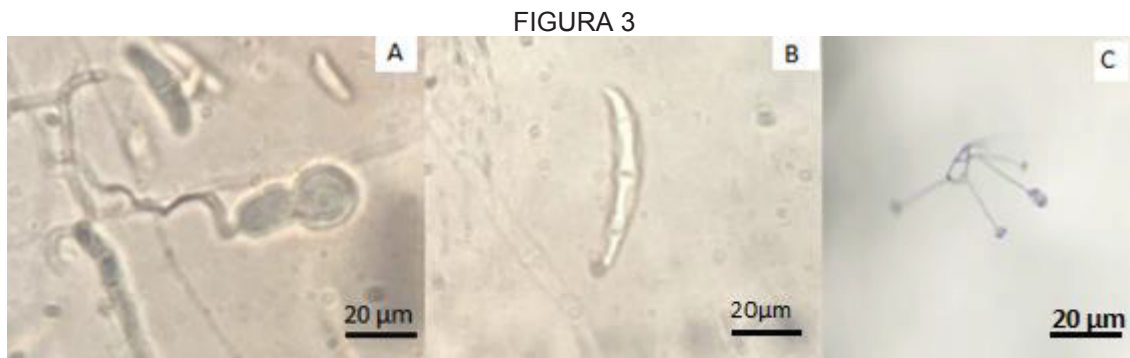
### 4.1 Identificação de *Fusarium*

#### 4.1.1. Caracterização Morfológica

Observou-se a formação de clamidósporos nos isolados EM 01 de *F. solani* e EM 10, os quais eram solitários ou em pares, intercalar ou terminal, de parede lisa e sem pigmentação (Figura 3 e Tabela 3). Verificou-se também que estes isolados apresentaram monofiálides longas, macroconídios com 3 a 5 septos célula apical curta e célula basal pedicelada e ligeiramente curvos (Figura 3).

Os isolados EM 09, EM 13 e EM 15 apresentaram clamidósporos em cadeia e aos pares, intercalar ou terminal e de parede lisa e sem pigmentação (Tabela 3). Nestes isolados não foram observados microconídios e nem a formação de esporodóquio. Estes isolados formaram macroconídios com 5 septos, curvatura média, célula apical curvada e alongada e célula basal em formato de pé. Além disso, apresentaram hifa espiralada estéril, hifas com pigmentação e mono e polifiálides.

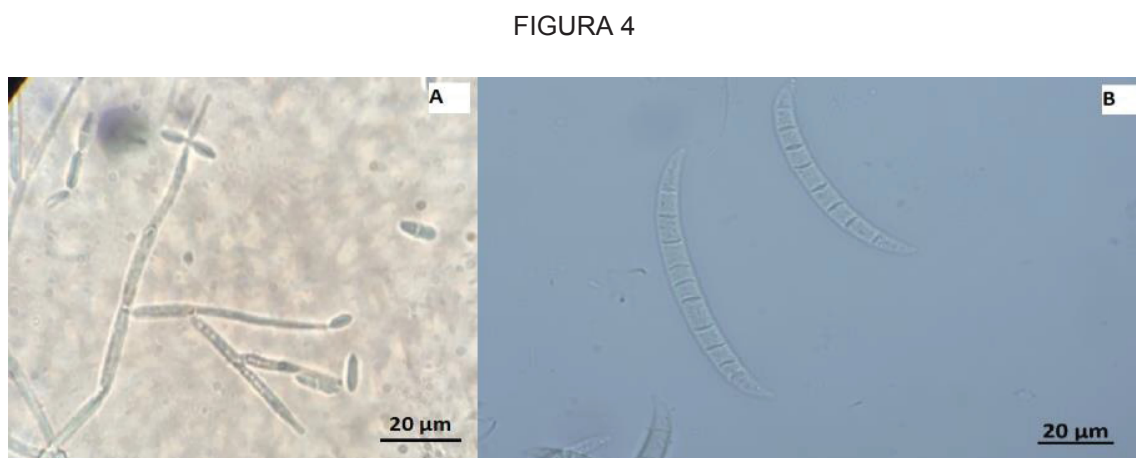
FIGURA 3 - Estruturas morfológicas dos isolados de *Fusarium* spp: (A) Clamidósporo do isolado EM 10; (B) Macroconídio com 3 septos do isolado EM 01, (C) Monofiálides longas com falsas cabeças do isolado EM 10.



Fonte: O autor (2019)

Os isolados EM 24, EM 25, EM 26 e EM 28 formaram esporodóquios abundantes de coloração amarela em meio de cultura SNA e BDA. Esses isolados apresentaram macroconídios com de 7 a 10 septos (Figura 4 A e B), tamanho grande. Cadeias de microconídios, mono e polifiálides e falsas cabeças também estão presentes.

FIGURA 4 – Estruturas morfológicas dos isolados de *Fusarium* spp: (A) Polifialíde e microconídios; (B) Macroconídios com 7 – 9 septos dos isolados EM 25 respectivamente.



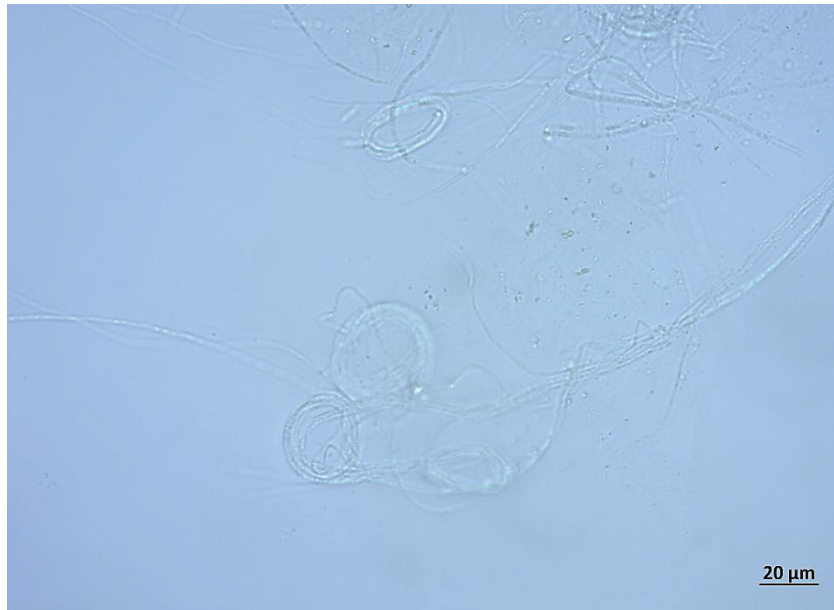
Fonte: O Autor (2019).

Os isolados EM12A, EM14, EM 16, EM 17, EM 18, EM 19 apresentaram espessamento de hifas. Macroconídios com 3 a 5 septos, células conidiogênicas em mono e polifiálides curtas, falsas cabeças com microconídios, presença de

hifa espiralada estéril (Figura 5). EM 18 e EM 19 formaram esporodóquio branco em meio CLA.

FIGURA 5 – Estrutura morfológica dos isolados de *Fusarium* spp: Hifa espiralada estéril do isolado EM 16.

FIGURA 5

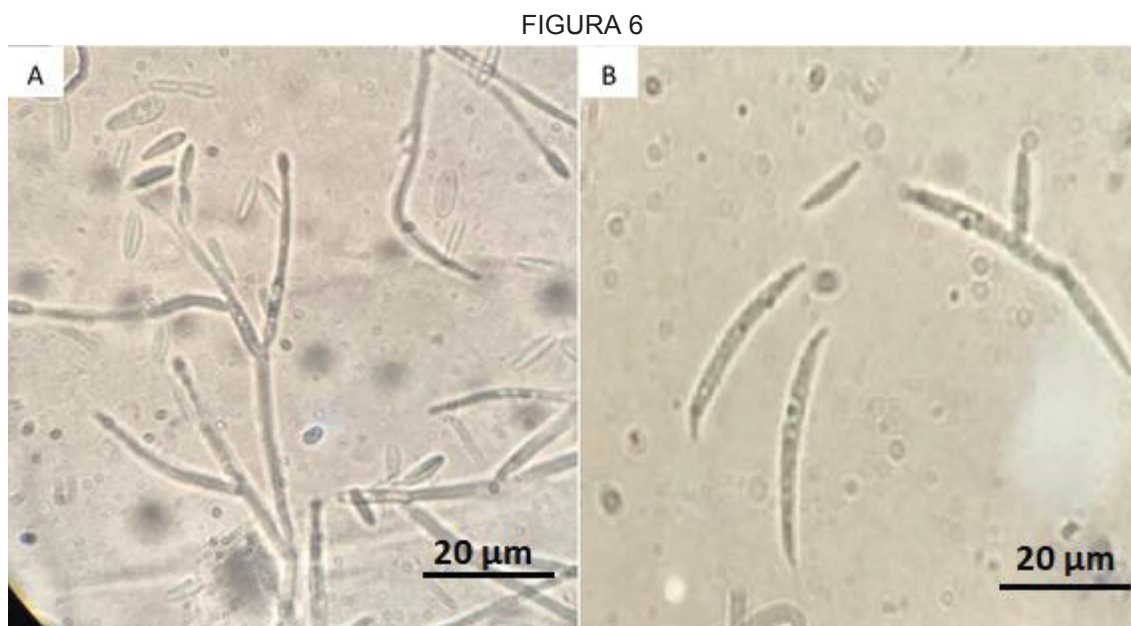


Fonte: O Autor (2019).

O isolado EM12 apresentou mono e polifiálides, espessamento de hifa. Macroconídios com 3-5 septos, célula basal em formato de pé, célula apical levemente curvada. Hifas com pigmentação rosada em meio de cultura BDA. Monofiálides, hifa espiralada estéril, microconídios em falsas cabeças.

Cadeias de microconídios longas foram formadas abundantemente em micélio aéreo nos isolados EM 20, EM 20A, EM 22, microconídios sem septo com formato oval a obovoide. As células conidiogênicas foram caracterizadas em mono e polifiálides como na Figura 6, EM 22 formou esporodóquio de coloração creme em meio CLA. Os isolados EM 20, 20A e 22 formaram macroconídios com 3 a 5 septos com célula apical ligeiramente curvada e célula basal em forma de pé.

FIGURA 6 - Estruturas morfológicas dos isolados de *Fusarium* spp; (A) Polifialide com microconídios do isolado EM 22, (B) macroconídios do isolado EM 22.



Fonte: O Autor (2019).

A taxa de crescimento micelial em meio BDA por 72 horas mostrou semelhança entre os isolados, conforme o agrupamento realizado através das características morfológicas.

Os isolados de *Fusarium* foram separados em 6 grupos através da coloração e apenas dois isolados não se enquadraram ao agrupamento (Figura 7), sendo EM 08, EM 14.

Os isolados EM 01 e EM 10 referentes ao agrupamento 1 da Figura 7 tem pigmentação do micélio branca e pigmentação do meio de cultura creme. EM 09, 13 e 15 apresentara pigmentação no meio de cultura vermelho carmim, assim como o EM 12 (grupamento 2, Figura 7). Os isolados EM 14, EM16, EM17, EM 18 e EM 19 possuem pigmentação roxa segundo a carta de cores de Nelson et al (1983) (tanto difundida no meio quanto em micélio como mostra a Figura 7 no agrupamento 3. O isolado EM14 apresentou coloração do micélio bronzeada e coloração do meio marrom avermelhada (grupamento 6).

TABELA 3: Caracterização morfológica e crescimento micelial de isolados de *Fusarium* spp. da erva-mate.

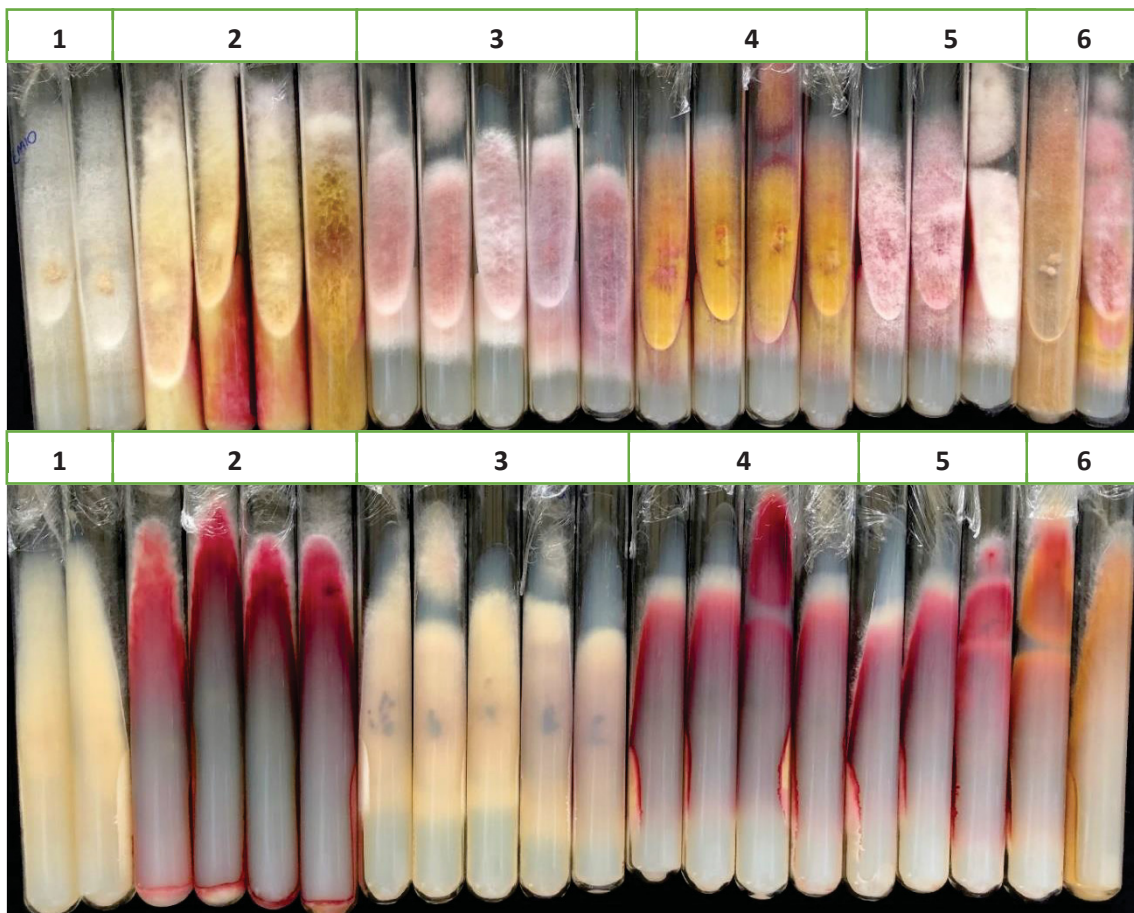
Isolado	Crescimento BDA 72 h (cm)	Clamidósporo	Cadeia de microconídio	Macroconídio	Nº de septos	Microconídio	Polifialíde
EM 01	2,9	+	-	+	3-5	+	-
EM 10	3,1	+	-	+	3-5	+	-
EM 09	5,0	+	-	+	5	-	+
EM 13	5,3	+	-	+	5	-	+
EM 15	5,5	+	-	+	5	-	+
EM 12	5,7	-	-	+	3-5	-	+
EM 12 A	2,2	-	-	+	3-5	+	+
EM 14	4,8	-	-	+	3-5	+	+
EM16	2,9	-	-	+	3-5	+	+
EM 17	2,7	-	-	+	3-5	+	+
EM 18	2,6	-	-	+	3-5	+	+
EM 19	2,6	-	-	+	3-5	+	+
EM 08	2,5	-	+	+	3-5	+	+
EM 20	2,6	-	+	+	3-5	+	+
EM 20 A	2,2	-	+	+	3-5	+	+
EM 22	2,4	-	+	+	3-5	+	+
EM 24	2,3	-	+	+	7-10	+	+
EM 25	2,3	-	+	+	7-10	+	+
EM 26	2,3	-	+	+	7-10	+	+
EM 28	2,7	-	+	+	7-10	+	+

(+) Presente; (-) Não observado

Segundo a escala de Nelson (1983) os isolados EM 24, 25, 26 e 28 do grupamento 4 (Figura 7) apresentam coloração vermelho carmim em meio de cultura. O isolado EM 20A e EM 22 presente no agrupamento 5 (Figura 7) também apresentam pigmentação vermelho carmim e coloração do micélio rosa, já o isolado EM 20 apresentou pigmentação do micélio branca. O isolado EM08 possui pigmentação difundida no meio marrom avermelhada e micélio rosa (grupamento 6) (Figura 7).

FIGURA 7 - Pigmentação de colônia e do meio de cultura de isolados de *Fusarium* spp. patogênicos à erva-mate em meio BDA inclinado de acordo com Nelson et al. (1983) e agrupados em seis grupos: 1 (Isolados EM01 e 10 ); 2 (EM 09, 12,13 e 15); 3 (EM 12A, 16, 17, 18 e 19); 4( EM 24, 25, 26 e 28); 5 ( EM 20, 20A e 22); 6 ( EM08, EM14).

FIGURA 7



FONTE: O autor (2019)

Com base nas características morfológicas dos isolados foram selecionados representantes de cada agrupamento para a caracterização molecular.

#### 4.1.2 Caracterização Molecular

A comparação das sequências do gene TEF1 obtidas dos isolados deste estudo com sequências de linhagens de espécie de *Fusarium* do GenBank e Fusarium-ID, assim como a análise filogenética permitiu classificar os isolados em estudo em dois complexos de espécies e duas espécies (Tabela 4; Figura 8), conforme segue: complexo *Fusarium solani* (FSSC), complexo *Fusarium graminearum* (FGSC), *Fusarium decemcellulare* e *F. sterilihyphosum* pertencente ao complexo *F. fujikuroi* (FFSC). A BLAST Search de sete isolados (EM12,12A, 14,16,17,18,19) apresentou máxima similaridade de 99,06 a 100% com complexo *Gibberella fujikuroi* (Tabela 4), sendo estes isolados identificados como *F. sterilihyphosum* através da árvore filogenética.

TABELA 4 – Caracterização molecular da região fator de alongação 1-  $\alpha$  para isolados de *Fusarium* patogênicos à erva-mate.

Isolado	Espécie	Número de acesso	Identidade
EM10	Complexo <i>Fusarium solani</i>	JF740866.1	99,85%
EM09	Complexo <i>Fusarium graminearum</i>	KJ767647.1	91,59%
EM12	Complexo <i>Gibberella fujikuroi</i>	FD_01154_EF-1a	99,42%
EM13	<i>Fusarium sterilihyphosum</i>	LS423131.1	95,77,%
EM 15	Complexo <i>Fusarium graminearum</i>	EF428599.1	99,80%
EM16	Complexo <i>Gibberella fujikuroi</i>	FD_01154_EF-1a	99,06%
EM17	Complexo <i>Gibberella fujikuroi</i>	FD_01154_EF-1a	100%
EM18	Complexo <i>Gibberella fujikuroi</i>	FD_01154_EF-1a	99,37%
EM19	Complexo <i>Gibberella fujikuroi</i>	FD_01154_EF-1a	99,84%
EM20	<i>Fusarium decemcellulare</i>	MK482327.1	97,00%
EM22	<i>Fusarium decemcellulare</i>	MK482327.1	97,00%
EM24	<i>Fusarium decemcellulare</i>	MK482327.1	100%

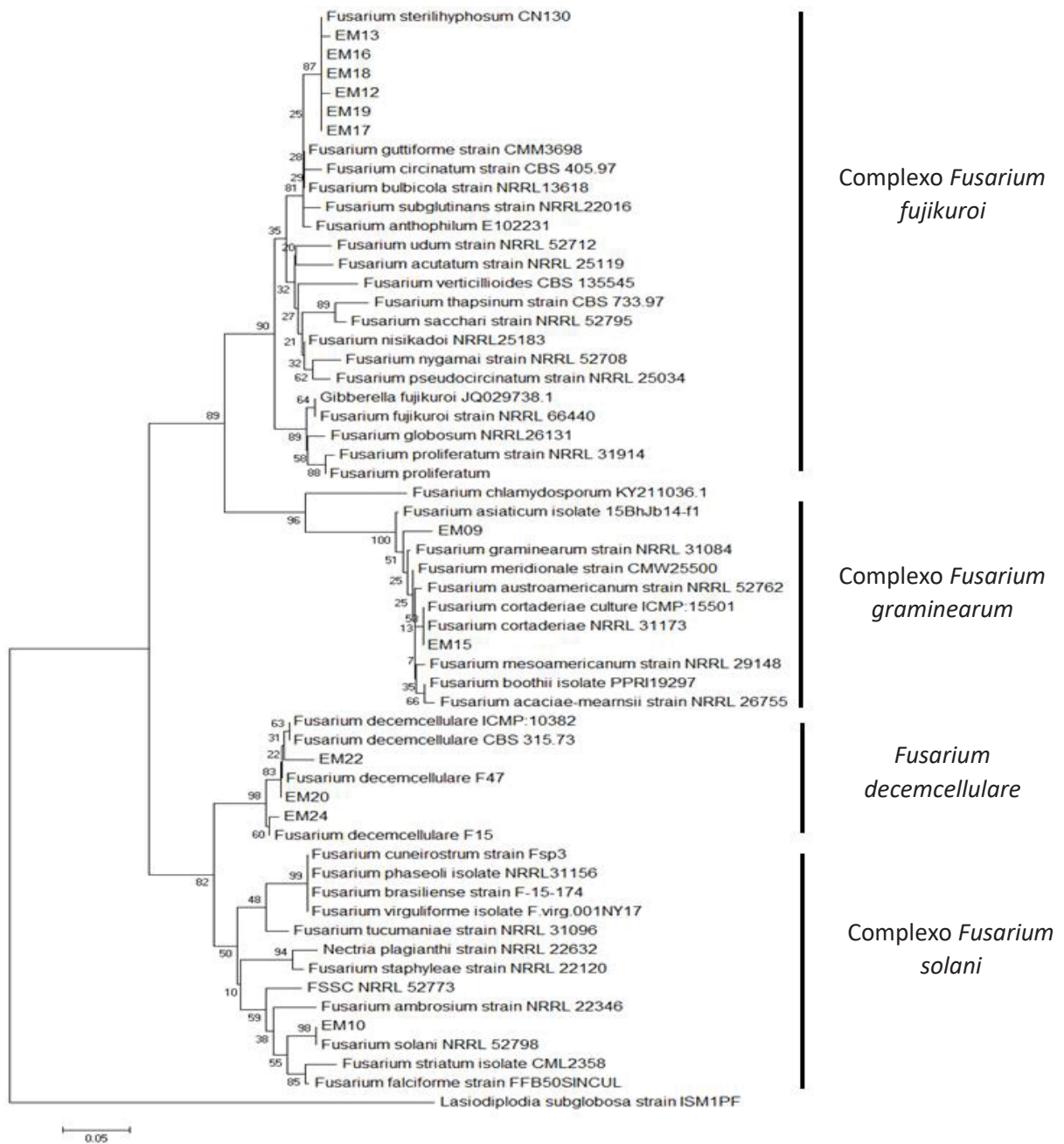
FONTE: o autor (2019)

A árvore filogenética mostrou que os isolados em estudo agruparam com sequências de referência em quatro grandes clados filogeneticamente distintos, os quais compreendem três complexos de espécies, FFSC, FGSC, FSSC e a espécie *F. decemcellulare* (Figura 8). O primeiro grande clado agrupa os isolados EM 16, EM17, EM18, EM19, EM12, EM13 com a espécie *F. sterilihyphosum*. O segundo grande clado agrupa os isolados EM 15 e EM 09 juntamente com os

das linhagens do complexo *F. graminearum*. O terceiro grande clado agrupa os isolados EM24, EM25, EM26 e EM28 com *F. decemcellulare*. O quarto grande clado agrupa o isolado EM10 com linhagens do complexo de espécies *F. solani*.

FIGURA 8 – Árvore filogenética dos isolados de *Fusarium* spp. de erva-mate obtidos a partir do fator de alongação 1-, utilizando o método Neighbor-Joining com bootstrap de 1000 repetições.

FIGURA 8



## 4.2 Teste de patogenicidade

Aos 14 dias após a inoculação de *Fusarium* spp. iniciaram os primeiros sintomas que se caracterizaram por escurecimento do ápice foliar evoluindo para murcha e morte da planta. O reisolamento dos isolados de *Fusarium* spp. das raízes das plantas inoculadas tanto sintomáticas quanto assintomáticas foram elevados e variaram de 75 a 100%. A testemunha não apresentou sintomas de fusariose e também no reisolamento não apresentou a presença do patógeno.

Os dados apresentados na Tabela 5 mostram que os 20 isolados de *Fusarium* spp. foram patogênicos à erva-mate. A incidência da fusariose apresentou variação entre os isolados chegando a 100% no EM 20 e EM 25. Apresentando diferença estatística quando comparados aos isolados EM 09 (33%), EM10 (42%) e EM 12 (42%) nos quais observa-se a menor incidência de fusariose nas mudas de erva-mate. A testemunha não apresentou sintomas da doença.

A maior mortalidade de mudas foi causada pelo isolado EM18 (67% de mudas mortas), seguido pelos isolados EM 25, 28 e 16 (58%). O isolado EM19 foi o menos agressivo (8%) de mudas mortas. A testemunha não apresentou mudas mortas (0)

Os sintomas observados na parte aérea das mudas relacionados a incidência da fusariose foram: escurecimento das folhas (Figura 9 – A, B) queda das folhas (Figura 9 –B,C), necrose do caule e da haste (Figura 9 – C), murcha (Figura 9 – D), seca e morte (Figura 9 F).

Além dos sintomas reflexos na parte aérea as mudas com fusariose quando retiradas do substrato apresentavam raízes lesionadas, pouco desenvolvidas e com coloração escura. As mudas apresentaram grande diferença em relação as suas raízes (Figura 1), apresentando escurecimento e apodrecimento chegando ao comprometimento do sistema radicular até mesmo a ausência total de raízes laterais em algumas mudas. A testemunha não apresentou sintomas de fusariose (Tabela 5).

TABELA 5 - Incidência de fusariose em mudas de erva-mate, reisolamento (%) de *Fusarium* spp., mortalidade (%) de muda e lesões necróticas nas raízes.

Isolado de <i>Fusarium</i> spp.	Incidência de fusariose (%)	Reisolamento de <i>Fusarium</i> spp. (%)	Mortalidade de muda (%)	Lesão necrótica na raiz**
Testemunha	0 d*	0 b	0 c	1 d
EM 01	58 abc	83 a	17 abc	2,08 c
EM 08	75 abc	92 a	50 abc	2,08 c
EM 09	33 cd	75 a	33 abc	2,42 abc
EM 10	42 bcd	83 a	17 abc	2,17 bc
EM 12	42 bcd	83 a	17 abc	2,25 abc
EM 12 A	67 abc	92 a	42 abc	2,67 abc
EM 13	67 abc	100 a	33 abc	2,58 abc
EM 14	75 abc	100 a	25 abc	2,08 c
EM 15	83 abc	83 a	50 abc	2,67 abc
EM 16	83 abc	100 a	58 ab	2,67 abc
EM 17	75 abc	92 a	42 abc	2,25 abc
EM 18	92 ab	100 a	67 a	2,58 abc
EM 19	67 abc	83 a	8,0 bc	2,08 c
EM 20	100 a	100 a	33 abc	2,92 abc
EM 20 A	67 abc	92 a	25 abc	2,92 abc
EM 22	58 abc	92 a	17 abc	3,00 abc
EM 24	75 abc	100 a	25 abc	2,83 abc
EM 25	100 a	100 a	58 ab	3,08 ab
EM 26	58 abc	100 a	33 abc	2,7 abc
EM 28	83,3 abc	100 a	58 ab	3,25 a

\*Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

\*\* 1 – Ausência de sintomas nas raízes; 2 – presença de lesões necróticas nas raízes com comprometimento de até 40% do sistema radicular; 3- redução das raízes secundárias e presença de lesões necróticas entre 40 e 80% do sistema radicular; 4 – ausência de raízes secundárias e presença de lesões necróticas acima de 80% do sistema radicular.

FIGURA 9 - Sintomas observados na parte aérea de mudas de erva-mate inoculadas com *Fusarium* spp.: (A-B) escurecimento da parte apical das folhas das mudas; queda de folhas (C); (D-E) escurecimento das folhas, murcha e morte da planta; (F) morte da planta.

FIGURA 9



Fonte: O autor (2019)

Houve diferença significativa entre os isolados de *Fusarium* spp. para comprimento da raiz (Tabela 6) apresentou diferença estatística. O isolado EM 25 apresentou menor comprimento de raiz (2,96 cm) quando comparado a testemunha (11,88 cm) e aos isolados EM01, 08, 09, 10, 12, 12 A 14, 15, 17, 19. O maior valor de comprimento foi encontrado na Testemunha (11,88 cm). Os isolados EM 20 (5,06 cm), 24 (4,81 cm), 28 (4,72 cm) e 25 (2,96 cm) diferiram estatisticamente da testemunha. Os demais isolados não apresentaram diferença estatística.

O incremento do diâmetro do caule não apresentou diferença estatística entre os tratamentos, assim como o incremento de altura de planta também não diferiu estatisticamente.

TABELA 6 – Comprimento de raiz, incremento de diâmetro de caule e de altura da planta de mudas de erva-mate inoculadas com *Fusarium* spp.

Isolado de <i>Fusarium</i> spp.	Comprimento de raiz (cm)	Incremento do diâmetro de caule (mm)	Incremento da altura da planta (cm)
TESTEMUNHA	11,88 a*	0,98 <sup>ns</sup>	5,15 <sup>ns</sup>
EM 01	8,95 ab	0,90	2,00
EM 08	8,92 ab	1,00	2,62
EM 09	7,4 abc	0,96	2,45
EM 10	7,98 ab	0,80	2,30
EM 12	9,49 ab	0,69	1,77
EM 12 A	7,46 ab	0,89	3,67
EM 13	5,64 abc	0,62	3,52
EM 14	9,71 ab	0,13	2,95
EM 15	7,42 ab	0,21	3,98
EM 16	6,12 abc	0,82	3,33
EM 17	7,82 ab	0,69	1,12
EM 18	6,06 abc	1,03	3,49
EM 19	8,58 ab	0,07	2,80
EM 20	5,06 bc	0,52	2,85
EM 20 A	5,35 abc	0,98	1,35
EM 22	5,61 abc	0,51	4,25
EM 24	4,81 bc	0,53	1,25
EM 25	2,96 c	0,76	3,67
EM 26	6,03 abc	0,77	1,95
EM 28	4,72 bc	1,34	3,90

\*Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).  
ns – não significativo.

Na Tabela 7 a massa verde de parte aérea apresentou diferença estatística entre os tratamentos, sendo a testemunha com a maior massa verde, diferindo dos demais isolados exceto o EM01,12,14,15 e 19. A massa verde de raízes apresentou diferença estatística, a testemunha apresentou maior massa verde das raízes em relação ao isolados EM 08, 09, 12A, 13, 20, 20A, 22, 24, 25, 26 E 28.

A massa seca de parte aérea da testemunha diferiu estatisticamente dos isolados EM08, 12A, 13, 15, 20, 20A, 22, 24,25,26 e 28. A testemunha não diferiu dos demais tratamentos.

Houve diferença estatística na massa seca de raízes (Tabela 7) entre os isolados. O tratamento EM 25 apresentou a menor massa seca, mas diferiu apenas da testemunha e do EM01 E EM19. A testemunha foi estatisticamente

superior aos isolados EM 22, 24, 25, 26 e 28 os quais apresentaram menor massa seca de raízes (TABELA 7).

Os isolados EM 22,24,25,26 e 28 apresentaram grande comprometimento das raízes devido a necrose severa e apodrecimento (Tabela 7) como pode ser observado pelas notas das raízes (TABELA 5).

TABELA 7 – Massa verde e massa seca de parte aérea e raízes de mudas de erva-mate inoculadas com *Fusarium* spp.

Isolado de <i>Fusarium</i> spp.	Massa verde(g)		Massa Seca (g)	
	Parte aérea	Raízes	Parte aérea	Raízes
TESTEMUNHA	7,56 a*	10,53 a	4,27 a	3,04 a
EM 01	3,7 abc	7,5 ab	2,1 abc	2,2 ab
EM 08	2,44 bcd	3,17 bcdef	1,43 bcd	1,52 abc
EM 09	2,63 bcd	2,37 cdef	2,33 ab	1,23 abc
EM 10	2,91 bcd	3,94 abcdef	1,85 abcd	1,50 abc
EM 12	4,59 ab	8,18 ab	2,02 abcd	1,60 abc
EM 12 A	1,85 cd	2,53 cdef	1,09 bcd	1,25 abc
EM 13	2,15 bcd	1,98 ef	1,75 bcd	1,57 abc
EM 14	3,94 abc	7,74 ab	2,53 ab	1,61 abd
EM 15	3,55 abcd	6,82 abcd	1,79 bcd	1,35 abc
EM 16	3,16 bcs	5,52 abcde	1,80 abcd	1,47 abc
EM 17	3,34 bcd	8,48 ab	1,80 abcd	1,44 abc
EM 18	3,19 bcd	6,27 abcd	2,0 abcd	1,64 abc
EM 19	3,97 abc	7,5 ab	2,33 ab	2,06 ab
EM 20	2,45 bcd	3,16 bcdef	1,16 bcd	1,07 abc
EM 20 A	2,5 bcd	2,92 bcdefg	1,17 bcd	1,25 abc
EM 22	1,7 d	2,23 def	0,94 cd	0,95 bc
EM 24	3,04 bcd	3,4 bcdef	1,28 bcd	1,02 bc
EM 25	2,13 bcd	1,93 ef	1,33 bcd	0,62 c
EM 26	1,89 cd	1,34 f	0,90 d	0,99 bc
EM 28	2,37 bcd	1,95 ef	1,28 bcd	0,83 bc

\*Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem pelo teste de tukey (p<0,05).

## 5 DISCUSSÃO

Este estudo, permite ampliar o conhecimento da etiologia da fusariose e identificou-se duas espécies patogênicas de *Fusarium* e dois complexos associados com a etiologia da fusariose da erva-mate, conforme segue: Complexo de espécies *Fusarium solani*, *F. sterilihyphosum* e *F. decemcelulare* e complexo de espécies *F. graminearum*. Estes resultados representam o primeiro relato da espécie, *F. sterilihyphosum* como agente causal da fusariose da erva-mate no Brasil e no mundo.

Os isolados de *Fusarium* spp. deste estudo foram agrupados inicialmente com base nos marcadores morfológicos como clamidósporo, cadeia de microconídios e macroconídios e nas características das colônias conforme Leslie e Summerell (2006), assim representantes de cada grupo morfológico

foram caracterizados molecularmente. A pigmentação das colônias foi uma importante ferramenta para o agrupamento inicial dos isolados, conforme Nelson et al, (1983). Embora Summerell et al. (2003) argumentem que a pigmentação das colônias não seja um parâmetro confiável para identificação morfológica das espécies do gênero *Fusarium*, devendo ser analisada com cautela, pois o pH do meio de cultura pode influenciar na coloração do meio de cultura e do micélio. Além disso, segundo estes autores, algumas espécies podem apresentar ampla variação na coloração. Neste trabalho, os isolados EM09 e EM14 apresentaram uma coloração diferente dos demais isolados da mesma espécie *F. decemcelulare*.

Os isolados em estudo EM 09 e EM15 foram compatíveis pelas características morfológicas e pela região fator de alongação 1-  $\alpha$  enquadrando-se no complexo de espécies *Fusarium graminearum*. Na análise filogenética pode-se observar que o isolado EM15 encontra-se no clado do complexo *F. graminearum*. As características morfológicas marcantes desse complexo são a presença de clamidósporo, formato e tamanho dos macroconídios e, principalmente, ausência de microconídios. Angelotti et al. (2006) realizou a caracterização morfológica de *F. graminearum* associados a giberela do trigo e triticale, através de características morfológicas como pigmentação de colônias, em meio BDA, número de septos dos macroconídios e clamidósporo. Estes autores também utilizaram caracterização molecular para identificação de 20 espécies de *Fusarium* como utilizado no presente trabalho. Com o sequenciamento da região do fator de alongação 1-alpha (TEF1- $\alpha$ ) foram obtidos altos valores de cobertura e similaridade, com 99,39 % que aumentam a confiabilidade do alinhamento (WALKER et al., 2016). As espécies do complexo *F. graminearum* são comuns em culturas agrícolas como arroz, milho, azevém e soja (DAL PRÀ et al. 2010;; MACHADO et al., 2015, CHANG et al., 2015, GAI et al., 2016). *Fusarium graminearum* é conhecido por produzir micotoxinas, sendo as principais desoxinivalenol e zearalenona, o que respresentam ameaças à segurança alimentar (GERALDO et al., 2006; BIAZIO et al, 2008).

O isolado EM15 é proveniente de sementes de erva-mate e o isolado EM09 de raízes de plantas de erva-mate. Mireski (2018) encontrou o Complexo *Fusarium graminearum* associado a sementes de erva-mate. Souza et al (2019) identificou *F. graminearum* em sementes de erva-mate durante o processo de

estratificação. Poletto et al. (2015) encontrou o gênero *Fusarium* associado a flores, frutos e sementes de erva-mate.

Houve também convergência nos resultados morfológicos e moleculares para os isolados EM 01 e EM 10 de *Fusarium* que foram identificados como membros do complexo *F. solani* com 99,85% de similaridade. Pela análise filogenética o isolado EM10 foi identificado como *F. solani* com bootstrap de 98. Esse complexo de espécies se caracteriza pela presença de monofiálides longas o que o diferencia de *F. oxysporum*. Mezzomo (2018) trabalhando com isolados de *Fusarium* spp. oriundos de erva-mate verificou que o sequenciamento da região do fator de alongação 1- $\alpha$  reforçou a identidade dos isolados de *F. oxysporum* e *F. solani* e promoveu uma diferenciação intraespecífica mais ampla dos isolados.

O gene que codifica a região fator de alongação 1-alfa tem sido o mais utilizado na identificação de *Fusarium* sp. pelo fato de ser um gene de cópia única e informativo a ponto de separar espécies relacionadas (GEISER et al., 2004). Todos os isolados amplificaram a região do fator de alongação 1-alpha, o fragmento de 680 pb que é eficiente para espécies de *Fusarium* (PARK et al., 2011).

Os isolados EM 08, EM20, EM20A, EM22 assemelham-se morfológicamente com o complexo *F. fujikuroi*. As características morfológicas marcantes desses isolados foram a presença de monofiálides e polifiálides, o que está de acordo com Leslie e Summerell (2006). Os Macroconídios apresentaram 3-5 septos, sem curvatura significativa, de tamanho médio e delgado, célula basal pouco desenvolvida e célula apical cônica. Os microconídios eram ovais, sem septos e com presença de falsas cabeças abundantes em micélio aéreo. No entanto, os resultados desses isolados são divergentes com a análise molecular da região fator de alongação 1-  $\alpha$  que indica tratar-se de *Fusarium decemcellulare*. No entanto, há uma divergência morfológica entre estas espécies porque *F. decemcellulare* forma apenas monofiálides (LESLIE; SUMMERELL, 2006) diferentemente dos isolados desse estudo. Leslie e Summerell (2006) afirmam que morfológicamente *F. decemcellulare* é raramente confundido com outras espécies de *Fusarium* devido ao grande tamanho do macroconídio e das outras características morfológicas únicas.

Neste estudo, verificou-se também que os isolados EM 24, EM 25, EM 26 e EM 28 em estudo apresentaram 100% de similaridade com sequência do banco de dados com *F. decemcellulare*, mas morfologicamente assemelham-se com *F. nisikadoi*. Esta divergência é devido a presença de polifíalides nos isolados em estudo, as quais não ocorrem em *F. decemcelullare* (LESLIE & SUMMERELL, 2006). Os isolados em estudo apresentaram cadeias de microconídios, falsas cabeças em micélio aéreo, microconídios de formato oval a clavado sem septos, macroconídios longos e falcados com célula basal em formato de pé com 7 a 10 septos, formação abundante de esporodóquio alaranjado em diversos meios de cultura e pigmentação difundida no meio vermelho-carmim. Segundo Martins (2005), isolados de *F. oxysporum* f. s. *melonis* foi encontrado em pupunha, soja, melão e cactos e apresentaram grande diversidade genética entre os hospedeiros. Assim, mais estudos são necessários para elucidar o comportamento desses isolados de *Fusarium* da erva-mate. Poletto et al. (2006) identificou *F. decemcelullare* proveniente de raízes de plantas causando podridão de raízes da erva-mate e comprovou sua patogenicidade.

Os isolados EM 08, 20,20A e 22, 24, 25, 26 e 8 foram identificados molecularmente como pertencentes a *F. decemcelulare*, porém as características morfológicas destes isolados são distintas, pois os macroconídios dos isolados EM 24, 25, 26 e 28 são grandes com 7-10 septos enquanto que os isolados EM 08, 20,20A e 22 apresentaram 3-5 septos nos macroconídios, menor comprimento e formato distinto. Na coloração de esporodóquio, estes foram alaranjado os isolados EM 24, 25, 26 e 28 e formaram esporodóquio branco os isolados EM 08, 20,20A e 22. Baseado nestes indicadores parecem tratar-se de duas espécies distintas e não *F. decemcellulare*.

Os isolados em estudo EM12A, EM14, EM16, EM17, EM18 e EM19 foram identificados através da análise filogenética como pertencentes ao clado de *Fusarium sterilihyphosum* com grupo monofilético e bootstrap de 87. Morfologicamente esses isolados assemelham-se com a espécie *F. sterilihyphosum* pertencente ao complexo *F. fujikuroi*, que se caracteriza por apresentarem espessamento de hifas que facilmente podem ser confundidas com a formação de clamidósporo. Os macroconídios com 3 - 5 septos, célula basal pouco desenvolvida, mono e polifíalide assim como falsas cabeças com

microconídios e presença de hifa espiralada estéril, também há a formação de esporodóquio creme nos isolados EM 18 e EM 19. Este é o primeiro relato de *F. sterilihyphosum* causando doença em mudas de erva-mate. Estes isolados são provenientes de sementes de erva-mate.

O isolado EM 12, não se enquadrou em nenhuma espécie pelas características morfológicas. No entanto, na análise da árvore filogenética o isolado é caracterizado como *F. sterilihyphosum*. O Isolado EM 13 apresentou características morfológicas semelhantes aos isolados pertencentes ao complexo *Fusarium graminearum* devido a características como ausência de microconídios e presença de clamidósporo, porém na análise filogenética o isolado também se agrupou com *F. sterilihyphosum*. Estudos complementares serão necessários para um melhor conhecimento desses isolados.

O método utilizado neste estudo para avaliação de fusariose nas plantas no estágio de muda foi eficiente. O sucesso desta inoculação se deve a utilização de grãos de trigo colonizados, permitindo a expressão dos sintomas da fusariose nas plantas e diminuindo as injúrias causadas pela inoculação.

Todos os isolados de *Fusarium* foram patogênicos às mudas de erva-mate e apresentaram níveis variados de agressividade. Os sintomas iniciais da fusariose na parte aérea foram observados aos 14 dias após a inoculação (DAI) e caracterizaram-se pelo escurecimento do ápice foliar. Em seguida, verificou-se que toda a folha ficava escurecida seguida de sua queda. Esta queda de folhas se acentuava culminando com a queda total das folhas e morte das plantas. Com relação ao sistema radicular observava-se uma redução das raízes secundárias com a evolução da doença. As plantas mortas apresentavam ausência de raízes secundárias. Sintomas parecidos foram observados por Poletto et al. (2006) e Poletto et al. (2007). Segundos esses autores inicialmente ocorreu o amarelecimento seguido de escurecimento e queda de folhas, evoluindo a seca e morte da planta. Em plantas adultas os sintomas são caracterizados pelo amarelecimento, queda de folhas e apodrecimento das raízes assim como estagnação do crescimento, podendo chegar a morte da planta (GRIGOLETTI JÚNIOR E AUER, 2001; AUER E SANTOS, 2016).

Neste estudo as raízes das plantas com fusariose apresentaram coloração escura, apodrecimento e eram pouco desenvolvidas quando comparadas à testemunha. Poletto et al. (2015) também observaram que os

isolados patogênicos de *Fusarium* à erva-mate causaram indícios de necrose no sistema radicular e escurecimento de ponta das raízes, da mesma forma que os resultados encontrados por Grigoletti Júnior e Auer (2001), que constataram que o gênero *Fusarium* é o principal patógeno associado à podridão de raízes. Em geral, os sintomas associados à podridão de raízes iniciam-se com escurecimento de raízes mais novas, chegando as mais velhas e no final do processo as mesmas tem coloração escura a totalmente negra, o escurecimento pode estar acompanhado do apodrecimento, sendo as principais evidências do comprometimento das raízes os sintomas reflexos na parte aérea (BEDENDO, 2011). Lazarotto (2013) constatou sintomas de podridão de raízes, murcha da parte aérea e morte da planta causadas por *Fusarium* em noqueira pecan.

O reisolamento de *Fusarium* spp. das raízes mostrou que mesmo em valores baixos de incidência da fusariose houve uma alta porcentagem de reisolamento de *Fusarium*, demonstrando que o patógeno sobrevive na rizosfera ou infecta as raízes e não causa sintomas reflexos na parte aérea. Algumas mudas de erva-mate não apresentavam sintomas na parte aérea, porém quando observadas as raízes, estas apresentavam-se escurecidas e comprometidas. Esta observação é de grande importância, pois o patógeno pode ser disseminado através de mudas assintomáticas.

## 6 CONCLUSÕES

Todos os isolados de *Fusarium* associados a raízes de plantas com sintomas de fusariose e sementes de erva-mate foram patogênicos em plântulas de erva-mate com variados níveis de agressividade.

Verificou-se que a espécie *F. decemcelulare* e o complexo de espécies *F. solani* associados a raízes e *F. sterilihyphosum* e complexo de espécies *F. graminearum* associados a sementes são causadores da fusariose da erva-mate.

Este é o primeiro relato de *F. sterilihyphosum* como agente causal da fusariose da erva-mate no Brasil e no mundo.

## 7 REFERÊNCIAS

- ALEXANDER, N. J.; MCCORMICK, S. P.; WAALWIJK, C.; DER LEE, T. V.; PROCTOR, R. H. The genetic basis for 3-ADON and 15-ADON trichothecene chemotypes in *Fusarium*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 48, p. 485-495, 2011.
- ANGELOTTI, F. 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.
- ANTONIAZZI, M. S.; ROCHA, L. D.; SOUZA, E. L.; GUERRA, D.; SILVA, D. M.; REDIN, M. Análise da cultura de erva-mate como alternativa social, econômica e ambiental para comunidades rurais. **Revista Extensão em Foco**, n. 15, p. 108-119, 2018.
- AUER, C. G.; SANTOS, A. F. dos. **Deteção de *Fusarium subglutinans* em sementes de pinus**. Colombo: Embrapa Florestas. p. 4, 2007.
- AUER, C. G.; SANTOS, A. F. dos. Doenças da erva-mate. IN: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. **Manual de Fitopatologia: doenças de plantas cultivadas**. 5. ed. Ouro Fino: Agronômica Ceres. p. 343-349. 2016.
- BEDENDO, I. P. Doenças Vasculares. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. **Manual de Fitopatologia: Princípios e conceitos**. 3ed., São Paulo: Editora Agronômica Ceres, p. 838-847, 1995.
- BERGER, F.H.L. **Biomassa em plantios de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil), no município de Nova Prata, RS**. 94 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal). Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2006.
- BIAZIO, G. R. D.; TESSMANN, D.J.; BARBOSA, I.P.T. A new PCR approach for the identification of *Fusarium graminearum*. **Brazilian Journal of Microbiological**. São Paulo. v.39, n 3. p. 554-560, 2008.
- BORRERO, C.; CAPOTE, N.; GALLARDO, M. A.; AVILÉS, M. First report of vascular wilt caused by *Fusarium proliferatum* on strawberry in Spain. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 103, n. 3, p. 1-3, 2018.
- BRODY, J.R.; KERN, S.E. Sodium boric acid: a Tris-free, cooler conductive médium for DNA electrophoresis. **Biotechniques**, v.36, p. 214-216, 2004.
- BROWN, D. W.; PROCTOR, A. *Fusarium: genomics, molecular and cellular biology*. 1. ed. USA: Caister Academic Press, 2013, 194 p.
- BUENO, C. J.; AMBROSIO, M. M. Q.; SOUZA, N. L. Produção e avaliação da sobrevivência de estruturas de resistência de fungos fitopatogênicos habitantes do solo. **Summa Phytopathologica**. Botucatu, v.33 n.1, 2007.

CARDOZO JUNIOR, E. L.; MORAND, C. Interest of mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) as a new natural functional food to preserve human cardiovascular health - a review. **Journal Functional Foods**. v. 21, n.1, p. 440-454, 2016.

CARELLI, G.; MACEDO, S.M.D.; VALDUGA, A.T.; CORAZZA, M.L.; OLIVEIRA, J.V.; FRANCESCHI, E.; VIDAL, R.; JASKULSKI, M.R. Avaliação preliminar da atividade microbiana do extrato de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) obtido por extração com CO<sub>2</sub> supercrítico. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. Botucatu, v. 13, n.1, 2011.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies Arbóreas Brasileiras**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica; Colombo: Embrapa Florestas. v.2, p. 627, 2006.

CHANG, K.F.; HWANG, S.F.; CONNER, R.L.; AHMED, H.U. ZHOU, Q.; TURNBULL, G.D.; STRELKIV, S.E.; MCLAREN, D.L.; GOSSEN, B.D. First report of *Fusarium proliferatum* causing root rot in soybean (*Glycine max* L.) in Canada. **Crop protection**. v.67, p.52-58, 2015.

DAL PRA, M.; TONTI, S.; PANCALDI, D.; NIPOTI, P.; ALBERTI, I. First report of *Fusarium andiyzi* associated with rice bakanae in Italy. *Disease notes*. v. 94, n.8, p. 1070, 2010.

DEAN, R.; VAN KAN, J. A.; PRETORIUS, Z.A.; HAMMOND-KOSACK, K. E.; DI PIETRO, A.; SPANU, P.D.; RUDD, J.J.; DICKMAN, M.; KAHMANN, R.; ELLIS, J. J.; FOSTER, G.D. The top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. **Molecular Plant Pathology**. Londres, v. 13, n. 4, p. 414-430, 2012.

ESMELINDRO, M. C.; TONIAZZO, G.; WACZUK, A.; DARIVA, C.; OLIVEIRA, D. D. Caracterização físico-química da erva-mate: influência das etapas do processamento industrial. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, v. 22, n. 2, p. 193-204, 2002.

EVANS, W. C. **Tease and Evan's Pharmaccognosy**. WB Saunders Company, Londres, ed. 14, p. 403, 1998.

FALEIRO, F. G.; LUZ, E. D. M. N.; CERQUEIRA, A. O.; ROCHA, C. S. S. Uso de marcadores RAPD na classificação de isolados de *Phytophthora* spp. causadores da podridão parda do cacauero no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 3, mai./jun., 2003.

FAOSTAT. **Maté: World list, import quantity**. Disponível em: < <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC> >. Acesso em: 10.jul.2019.

GAI, X.T.; YANG, R.X.; PAN, X.J.; YUAN, Y.; WANG, S.N.; LIANG, B.B.; GAO, Z.G. First Reporto of *Fusarium incarnatum* Causing Stalk Roto n maize in Chine. **Disease Notes**. v. 100, n.5, p. 1010, 2016.

GEISER, D. M.; JIMÉNEZ-GASCO, M. D. M.; KANG, S.; MAKALOWSKA, I.; VEERARAGHAVAN, N.; WARD, T. J.; ZHANG, N.; KULDAU, G. A.; O'DONNELL, K. FUSARIUM-ID v. 1.0: A DNA sequence database for identifying

*Fusarium*. **European Journal of Plant Pathology**, v. 110, n. 5-6, p. 473-479, 2004.

GERALDO, M.R.F.; TESSMANN, D.J.; KEMMELMEIER, C. Production of mycotoxins by *Fusarium graminearum* isolated from small cereals (wheat, triticale and barley) affected with scab disease in southern Brazil. **Brazilian Journal of Microbiological**. São Paulo, n. 37, 58-63, 2006.

GRIGOLETTI JÚNIOR, A.; AUER, C. G.; MASCHIO, L. M. A. Doenças em erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hill) na região sul do Brasil. **Boletim de Pesquisa Florestal**, n. 32/33, p. 43-51, 1996.

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

HALPERN, H. C.; BELL, A. A.; WAGNER, T. A.; LIU, J.; NICHOLS, R. L.; OLVEY, J.; WOODWARD, J. E.; SANOGO, S.; JONES, C. A.; CHAN, C. T.; BREWER, M. T. First report of *Fusarium* wilt of cotton caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* race 4 in Texas, USA. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 102, n. 2, p. 446-446, 2018.

HENRIQUE, F. H.; CARBONELL, S. A. M.; ITO, M. F.; GONÇALVES, J. G. R.; SASSERON, G. R.; CHIORATO, A. F. Classification of physiological races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* in common bean. **Bragantia**, Campinas, v. 74, n. 1, p. 84-92, 2015.

INDEX FUNGORUM. Disponível em: < <http://www.indexfungorum.org/> >. Acesso em: 22.jul.2019.

JAREK, T. M.; **Fusariose da pupunheira no Brasil: métodos de inoculação, efeito da compactação do solo, patogenicidade e identificação de espécies**. 94 p. Tese (Doutorado em Agronomia – Produção Vegetal) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2018.

JAREK, T. M., SANTOS, A.F dos., TESSMANN, D. J., VIEIRA, E. S. N. Inoculation methods aggressiveness of five *Fusarium* species against peach palm. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 48, n. 4, 2018.

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

KURAMAE, E. E.; SOUZA, N. L. Variabilidade genética entre formae speciales de *Fusarium oxysporum* e raças 1 e 2 de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* através de RAPD e sequências de regiões ITS e Rdna. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 24, n. 5, p. 1481-1485, 2002.

LAZAROTTO, M. **Identificação e caracterização de *Fusarium* spp. e *Pestalotiopsis* spp. associados a *Carya illinoensis* no Rio Grande do Sul.** 2013. 156 f. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal) Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2013.

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

LOGRIECO, A.; SEIFERT, K. A.; LESLIE, J. F. A. Biodiversity of toxigenic *Fusarium* species. **Sydowia**, Horn, v. 30, n. 1, p. 1-11, 1997.

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

LUZ, M.; DAL SOGLIO, F. K.; KUBO, R. R. Resistência camponesa no âmbito da fabricação artesanal de erva-mate, Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Agroecologia**, Pelotas, v. 12, n. 1, p. 68-80, 2017.

MACHADO, F.J.; MOLLER, P.A.; NICOLLI, C.P.; DEL PONTE, E.M. First report of *Fusarium graminearum*, *F. asiaticum* and *F. cortaderiae* as Head Blight Pathogens of annual Ryegrass in Brazil. **Disease notes**. v.99, n.12, p.1859, 2015.

MACIEL, C. G.; WALKER, C.; SANTOS, R. F. dos.; MUNIZ, M. F. B.; BRUM, D. L. *Fusarium oxysporum* and *F. verticillioides* associated with damping-off in *Pinus* spp. **Revista Ciência Agrônômica**, Fortaleza, v. 48, n. 1, p. 134-141, 2017.

MARTINS, M. K. **Variabilidade genética de isolados de *Fusarium* spp. e estudo da interação com a planta hospedeira.** Tese (Doutorado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

MASSOLA JÚNIOR, N. S. Fungos Fitopatogênicos. IN: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos.** 5. ed. Ouro Fino: Agrônômica Ceres. p. 112. 2018.

MATOS, K. S.; ALMEIDA, L. B. de.; NASCIMENTO, A. R.; HANADA, R. E.; SILVA, G. F. da. Inflorescence oversprouting and vascular and rachis necrosis caused by *Fusarium decemcellulare* in *Anacardium occidentale* in Brazil. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 100, n. 8, p. 1781-1781, 2016.

MEDRADO, M. J. S.; LOURENÇO, R.S.; RODIGHERI, H.R.; DEDECEK, R.A.; PHILLIPOVSKY, J.F. CORREA, G. **Implantação de ervais.** Embrapa Florestas, Colombo-Pr. p.22, 2000.

MEDRADO, M. J. S.; VILCAHUAMAN, L. J. M. **Cultivo da Erva-Mate: Importância socioeconômica e ambiental.** Embrapa Florestas – Sistemas de produção. 2014. Disponível em: <

[https://www.spo.cnptia.embrapa.br/conteudo?p\\_p\\_id=conteudoportlet\\_WAR\\_sistemasdeproducaolf6\\_1ga1ceportlet&p\\_p\\_lifecycle=0&p\\_p\\_state=normal&p\\_p\\_mode=view&p\\_p\\_col\\_id=column-1&p\\_p\\_col\\_count=1&p\\_r\\_p\\_-76293187\\_sistemaProducaold=3601&p\\_r\\_p\\_-996514994\\_topicold=2902](https://www.spo.cnptia.embrapa.br/conteudo?p_p_id=conteudoportlet_WAR_sistemasdeproducaolf6_1ga1ceportlet&p_p_lifecycle=0&p_p_state=normal&p_p_mode=view&p_p_col_id=column-1&p_p_col_count=1&p_r_p_-76293187_sistemaProducaold=3601&p_r_p_-996514994_topicold=2902) >. Acesso em: 11.jul.2019.

MEZZOMO, R. **Caracterização morfofisiológica, molecular, enzimática e compatibilidade vegetativa de *Fusarium oxysporum* e *F. solani* em erva-mate**. 2018. 98 p. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2017.

MEZZOMO, R.; ROLIM, J. M.; SANTOS, A. F.; POLETTO, T.; WALKER, C.; MACIEL, C. G.; MUNIZ, M. F. B. Aggressiveness of *Fusarium oxysporum* and *F. solani* isolates to yerba-mate and production of extracellular enzymes. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 45, n. 2, p. 141-145, 2019.

MICHEREFF, S. J.; ANDRADE, D. E. G. T.; PERUCH, L. A. M.; MENEZES, M. **Importância dos patógenos e das doenças radiculares em solos tropicais**. IN: MICHEREFF, S. J.; ANDRADE, D. E. G. T.; MENEZES, M. **Ecologia e manejo de patógenos radiculares em solos tropicais**. Recife: UFRPE, Imprensa Universitária, p. 1-18, 2005

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.

MIRESKI, M. C. **Fatores físicos, químicos e biológicos que afetam a germinação de *Ilex paraguariensis* St. Hil**, 2018. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2018.

MURAKAMI, A. N. N. et al. Concentration of biologically active compounds extracted from *Ilex paraguariensis* St. Hil. by nanofiltration. **Food Chemistry**, Rockville Pike, v. 141, n. 1, p. 60-65, 2013.

NELSON, P. E.; DIGNANI, M. C.; ANAISSIE, E. J.; Taxonomy, biology and clinical aspects of *Fusarium* species. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 7, n. 4, p. 479-504, 1994.

O'DONNELL, K.; CIGELNIK, E. Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 7, n. 1, p. 103-116, 1997.

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, n. 1, p. 631-634, 2002.

OMAR, D. **Erva-Mate: Sistema de Produção e Processamento Industrial**. 1. ed. Dourados: Editora UFGD. p.291, 2009.

ONO, E. Y. S.; FUNGARO, M. H. P.; SOFIA, S. H.; MIGUEL, T. de. Á.; SUGIURA, Y.; HIROOKA, E. Y. *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, p. 953-960, 2010.

PARK, B; PARK, J.; CHEONG, K., CHOI, J.; JUNG, K.; KIM, D.; LEE, Y.; WARD, T. J.; O'DONNELL, K.; GEISER, D. M.; KANG, S. Cyber infrastructure for *Fusarium*: three integrated platforms supporting strain identification, phylogenetics, comparative genomics and Knowledge sharing. **Nuclei Acids Research**, v. 39. 2011.

PAULA, S.; WOLF, K.R.; MARTINI, A.F.; MILANESI, P.M. Doenças fúngicas em erva-mate. **Scientific Electronic Archives**. v.11, p. 27-34, 2018.

PENTEADO JUNIOR, J.F.; GOULART, I.C.G.R. **Erva 20: sistema de produção de erva-mate**. Embrapa. Brasília –DF. p.152, 2019.

PERALTA, R.; LE BOURLEGAT, C. A. Trajetória da produção e da comercialização da erva-mate na fronteira sul de Mato Grosso do Sul. **Geografia Agrária**, Uberlândia, v. 07, n. 13, p. 188-209, 2012.

PINHEIRO, M. R. R. **Estudo da 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.

PLOETZ, R.; FREEMAN, S.; KONKOL, J.; AL-ABED, A.; NASER, Z.; SHALAN, K.; BARAKAT, R.; ISRAELI, Y. Tropical race 4 of Panama disease in the Middle East. **Phytoparasitica**, v. 43, n. 3, p. 283-293, 2015.

POLETTO, I.; MUNIZ, M. F. B.; CECONI, D. E.; SANTI, D.; WEBER, M. N. D.; BLUME, E. Zoneamento e identificação de *Fusarium* spp. causador de podridão-de-raízes em plantios de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.) na região do vale do Taquarí, RS. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 16, n. 1, p. 1-10, 2006.

POLETTO, I.; MUNIZ, M. F. B.; CECONI, D. E.; WEBER, M. N. D.; BLUME, E. Primeira ocorrência de *Pythium* sp. e *Rhizoctonia* sp. causando podridão-de-raízes em ervais no Rio Grande do Sul. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 17, n. 1, p. 65-71, 2007.

POLETTO, I. **Caracterização e manejo do patossistema erva-mate/podridão de raízes**. 94 f. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal). Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, 2010.

POLETTO, I.; MUNIZ, M. F. B.; CECONI, D. E.; POLETTO, T. Aspectos epidemiológicos da podridão-de-raízes da erva-mate (*Ilex paraguariensis*). **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 25, n. 2, p. 281-291, 2015.

SUMMERELL, B. A.; SALLEH, B.; LESLIE, J. F. A utilitarian approach to *Fusarium* identification. **Plant Disease**, n. 87, p. 117 - 128, 2003.

SUMMERELL, B. A.; LAURENCE, M. H.; LIEW, E. C. Y.; LESLIE, J. F. Biogeography and phylogeography of *Fusarium*: a review. **Fungal Diversity**, Chiang Mai, v. 44, n. 1, p. 3-13, 2010.

SILVA, F. P. da.; VECHIATO, M.; HARAKAVA, R. EF-1 $\alpha$  gene and IGS rDNA sequencing of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* and *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* reveals polyphyletic origino f strains. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 39, n. 1, p. 64-73, 2014.

SILVA, T. W. R. da.; SANTOS, A. F. dos.; AUER, C. G.; TESSMANN, D. J. Métodos de detecção, transmissão e patogenicidade de *Fusarium* spp. em sementes de *Pinus taeda*. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 27, n. 1, p. 73-84, 2017.

SMITH, J.E.; MOSS, M.O. **Mycotoxins: Formation, Analysis and Significance**. John Wiley & Sons. Chichester. UK, p. 148, 1985.

SOUZA, G.F.; OLIVEIRA, L.M.; AGOSTINETTO, L.; PUCHALE, L.Z.; SÁ, A.C.S. Efeito da estratificação em substrato esterelizado na qualidade sanitaria de sementes de *Ilex paraguariensis*. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v.29, n.2, p.854-862, 2019.

TAPIA, C.; AMARO, J. Género *Fusarium*. **Revista Chilena de Infectología**, Santiago, v. 31, n. 1, p. 85-86, 2014.

VENTURA, J. A. Taxonomia de *Fusarium* e seus segredos. Parte II – chaves para identificação. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 8, n. 1, p. 303-338, 2000.

VIEIRA, M.A.; MARASCHIN, M.; PAGLIOSA, C.M.; PODESTÁ, R.; DE SIMAS, K.N.; ROCKENBACH, I.I.; AMBONI, R.D.; AMANTE, E.R. Phenolic acids and methylxanthines composition and antioxidante properties of mate (*Ilex paraguariensis*) Residue. **Journal of Food Science**. v. 75, p. 283-285, 2010.

VIEIRA, T. **Viabilidade econômica da cultura de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. – Hill) em áreas de reserva legal no Paraná**. 135 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

WALKER, C.; MACIEL, C.G.; MILANESI, P.M.; MUNIZ, M. F. B.; MEZZOMO, R.; POLLET, C. S. Caracterização morfológica, molecular e patogenicidade de *Fusarium acuminatum* e *Fusarium verticillioides* a *Cordia Americana*. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v.26, n. 2, p. 463-473, 2016.

ZACCARO, R. P.; CARARETO-ALVES, L. M.; TRAVENSOLO, R. F.; WICKERT, E.; LEMOS, E. G. M. Utilização de marcador molecular SCAR na identificação de *Fusarium subglutinans*, o agente causal da malformação da mangueira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 29, n. 3, p. 563-570, 2007.