

# CARACTERIZAÇÃO E PATOGENICIDADE DE ISOLADOS DE *Fusarium* spp. CAUSADORES DE PODRIDÃO-DE-RAÍZES DA ERVA-MATE

Igor Poletto<sup>1</sup>, Manoeli Lupatini<sup>2</sup>, Marlove Fátima Brião Muniz<sup>3</sup>, Zaida Inês Antonioli<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Eng. Florestal, Dr., UNIPAMPA, São Gabriel, RS, Brasil - igorpoletto@unipampa.edu.br

<sup>2</sup>Eng<sup>a</sup>. Agrônoma, Mestranda em Solos, UFSM, Santa Maria, RS, Brasil - mlupatini@gmail.com

<sup>3</sup>Eng<sup>a</sup>. Agrônoma, Dr<sup>a</sup>., Depto. de Defesa Fitossanitária, UFSM, Santa Maria, RS, Brasil - marlove@smail.ufsm.br

<sup>4</sup>Bióloga, Dr<sup>a</sup>., Depto. de Solos, UFSM, Santa Maria, RS, Brasil - zaida@smail.ufsm.br

Recebido para publicação: 08/09/2010 – Aceito para publicação: 14/10/2011

## Resumo

Uma das principais doenças da erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.), em viveiro e, principalmente, a campo, é a podridão-de-raízes, causada por *Fusarium* spp. O controle da doença é dependente da diagnose correta de seu agente etiológico e as características moleculares e morfológicas permitem diagnosticar o patógeno. Assim, o objetivo deste trabalho foi determinar as características morfológicas e moleculares de seis isolados de *Fusarium* spp. oriundos de plantios de erva-mate doentes. Para isso, colônias puras cultivadas em meio BDA e FCA foram analisadas quanto à sua forma e estrutura, em microscópio óptico de luz e em microscópio binocular estereoscópico. A extração de DNA de cada isolado foi realizada a partir de micélio produzido em meio líquido BD pelo método CTAB. As amostras de DNA genômico foram submetidas à reação em cadeia da polimerase (PCR) com os oligonucleotídeos iniciadores ITS1 e ITS4, e o produto gerado foi sequenciado. Entre os isolados de *Fusarium* analisados, encontraram-se duas espécies: *F. solani* e *F. oxysporum*, todas patogênicas e com baixa variabilidade genética dentro da espécie.

**Palavras-chave:** Biologia molecular; morfologia; *Ilex paraguariensis*; patologia florestal.

## Abstract

*Characterization and pathogenicity of Fusarium spp. isolates causing erva-mate root-rot.* One of the main diseases of erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.), in nursery and mainly in plantations, is the root-rot, caused by *Fusarium* sp. The disease control depends on correct diagnosis of causal agent and molecular and morphological characteristics allow diagnosing the pathogen. This work aims to determine morphological and molecular characteristics of six *Fusarium* spp. isolates from diseased erva-mate plantations. In order to that, pure colonies grown on PDA and FCA environment were analyzed in relation to form and structure, under optical and stereoscopic microscope. The DNA extraction of each isolated was performed from mycelium produced on PD liquid medium by CTAB method. The samples of DNA genomic were submitted to Polymerase Chain Reaction with the universal primers ITS1 and ITS4 and the final product was sequenced. Among the *Fusarium* spp. isolates analyzed two species were found: *F. solani* and *F. oxysporum*, all pathogenic and with low genetic variability within species.

**Keywords:** Molecular biology; morphology; *Ilex paraguariensis*; forest pathology.

## INTRODUÇÃO

O cultivo da erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.) compõe um dos sistemas agroflorestais mais antigos e característicos da região Sul do Brasil, assumindo significativa importância ambiental e socioeconômica, constituindo-se numa das principais fontes de renda e de emprego em todos os segmentos da cadeia produtiva, especialmente para os pequenos e médios produtores. As folhas e galhos finos preparados segundo método apropriado fornecem o mate ou chimarrão, o mais popular chá consumido no Brasil e exportado para todo o mundo.

O crescente aumento da área plantada desencadeou uma série de epidemias de pragas e doenças pelo acúmulo de hospedeiro suscetível tanto em campo como em viveiro. Um dos maiores problemas fitossanitários da erva-mate, nos últimos anos, é a podridão-de-raízes causada por espécies do gênero *Fusarium*. As árvores apresentam sintomas de amarelecimento ascendente das folhas, estagnação do crescimento e queda excessiva das folhas mais velhas, morte parcial (de alguns galhos da planta) e, em casos mais avançados da doença, morte total da planta. As raízes apodrecem, começando com manchas escuras na superfície. Normalmente as plantas sintomáticas estão distribuídas em reboleiras, entretanto pode ter padrão de distribuição aleatório, sendo, nesse caso, encontrada em todo o plantio. Nos ervais atacados, as perdas na produtividade podem chegar a mais de 30% (POLETTI *et al.*, 2006).

Medidas de manejo de fitopatógenos são dependentes da correta diagnose. Para fungos fitopatogênicos, rotineiramente, isso é feito por meio de observação de aspectos morfológicos do micro-organismo por meio de técnicas de microscopia. Entretanto, para alguns grupos, a identificação de espécies torna-se confusa e difícil, devido a variações morfológicas em razão dos aspectos relacionados ao substrato, idade da colônia, temperatura, fotoperíodo e, também, diferenças relacionadas às características do hospedeiro em campo, sendo *Fusarium* spp. um dos casos em que essa situação se aplica. Atualmente, métodos moleculares têm sido usados como ferramentas auxiliares na identificação de fitopatógenos, sendo esses métodos inerentes ao genótipo do micro-organismo e, dessa forma, não influenciados por variações relacionadas aos aspectos supracitados que podem influenciar a identificação baseada em morfologia (MANICON *et al.*, 1987; THOMAS *et al.*, 1994; RAHJOO *et al.*, 2008).

Para auxiliar na identificação e na relação filogenética desse gênero de fungos, análises baseadas no espaço intergênico transcrito (ITS) do rDNA (rDNA ribossômico) têm sido empregadas frequentemente. A região ITS está localizada entre os genes 18SrDNA e 28SrDNA. O ITS é dividido em ITS1, localizado entre os genes 18S e o 5.8S, e ITS2, que separa os genes 5.8S e 28S, os quais contêm sinais para o processamento do rRNA transcrito (HILLIS; DIXON, 1991). As regiões dos espaçadores ITS, por evoluírem mais rapidamente, possuem uma homologia na sequência nucleotídica intra e interespecífica menor do que os genes 18S e 28S (WATANABE *et al.*, 2011), e, por variarem intra e interespecificamente no número de pares de bases (GERBI, 1985), são frequentemente usadas para taxonomia de espécies do gênero *Fusarium* (VISENTIN *et al.*, 2009; KURAMAE; SOUZA, 2002; CHEHRI *et al.*, 2011).

Outras regiões do DNA também podem ser utilizadas para identificação e filogenia de organismos do gênero *Fusarium*, como os genes SSU (18S) e LSU (28S) do rDNA, e os genes responsáveis pela produção de histonas, principalmente o gene relacionado à histona H3. Porém os genes do rDNA ribossômicos são altamente conservados (WATANABE *et al.*, 2011), muitas vezes não sendo possível a diferenciação entre as espécies do mesmo gênero (KIM *et al.*, 1999). Os genes da histona H3, por outro lado, como apresentam grandes quantidades de íntrons, podem ser utilizados para separação de organismos estreitamente relacionados. Esse gene apresenta maior taxa de substituição nucleotídica do que as regiões ITS1 e ITS2, sendo possível separar organismos em nível de subespécies (STEENKAMP, 1999; STEENKAMP, 2000).

O presente trabalho teve por objetivo caracterizar as espécies de *Fusarium* morfológicamente e pela variabilidade genética da região ITS do rDNA, bem como estudar a patogenicidade dos isolados a plantas de erva-mate.

## MATERIAL E MÉTODOS

Para obtenção dos isolados de *Fusarium* spp., foram identificadas seis propriedades rurais com ervais apresentando sintomas de podridão-de-raízes. Essas propriedades localizam-se nos municípios de Arvorezinha, Ilópolis, Putinga e Anta Gorda, pertencentes à região do Vale do Taquari, Rio Grande do Sul, Brasil, com altitudes variando de 200 a 800 m, relevo ondulado a montanhoso (BRASIL, 1973) e clima, segundo a classificação climática de Köppen, Cfa, subtropical, com temperatura média do mês mais frio compreendida entre -3° e 18 °C e temperatura média do mês mais quente superior a 22 °C. A precipitação média anual é de 1800 mm (MORENO, 1961). Os ervais possuem as seguintes características (Tabela 1).

Em cada erval amostrado, foram arrancadas três árvores doentes, e destas, foram coletadas duas amostras de raízes com cerca de 1,0 cm de diâmetro e 10,0 cm de comprimento cada, localizadas 5 a 10 cm de profundidade no solo. Elas foram embaladas em sacos plásticos, identificadas e conduzidas ao laboratório para análise.

Tabela 1. Localização dos ervais amostrados e suas principais características.  
 Table 1. Location of the plantings samplings and their main characteristics.

| Local<br>(município RS) | Idade do<br>povoamento* | Principais características dos ervais   | Isolado     |
|-------------------------|-------------------------|---|-------------|
| Ilópolis                | 11                      | O plantio é puro, localizado em topografia inclinada com solo bem drenado. Adubação realizada é orgânica e mineral (CO(NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> ). O controle de plantas daninhas é feito com herbicida (Glifosat). A cultura que antecedia era acácia-negra ( <i>Acacia mearnsii</i> De Wild.). Os primeiros sintomas apareceram há sete anos.                         | UFSMF-4.4   |
| Arvorezinha             | 10                      | O plantio é puro, localizado em topografia moderadamente inclinada com solo bem drenado. Não é realizada adubação. O controle de plantas daninhas é feito com herbicida (Glifosat). Antecedendo o erval existia mata nativa. Os primeiros sintomas apareceram há sete anos.   | UFSMF-5.1   |
| Putinga                 | 50                      | O plantio é puro, localizado em topografia moderadamente inclinada com solo moderadamente drenado. Não é realizada adubação. O controle de plantas daninhas é feito com roçadas. Antecedendo o erval existia mata nativa. Os primeiros sintomas apareceram há 15 anos.  | UFSMF-10    |
| Putinga                 | 6                       | O plantio é consorciado com mata nativa, localizado em topografia moderadamente inclinada com solo bem drenado. A adubação é realizada com super-fosfato-triplo (10Ca(H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> ). O controle de plantas daninhas é feito com roçadas e capinas. Antecedendo o erval existia mata nativa. Os primeiros sintomas apareceram há cinco anos. | UFSMF-12.4a |
| Putinga                 | 5                       | O plantio é puro, localizado em topografia moderadamente inclinada com solo moderadamente drenado. A adubação é realizada com super-fosfato-triplo. O controle de plantas daninhas é feito com roçadas e capinas. Antecedendo o erval existia mata nativa. Os primeiros sintomas apareceram há quatro anos.   | UFSMF-12.4b |
| Anta Gorda              | 8                       | O plantio é puro, localizado em topografia inclinada com solo pouco drenado. Adubação realizada é orgânica. O controle de plantas daninhas é feito com roçadas e capinas. As culturas que antecidiam o erval eram milho e feijão. Os primeiros sintomas apareceram há sete anos.  | UFSMF-14.2  |

\* A coleta e o levantamento dessas informações foram realizadas no ano de 2006.

No laboratório de Fitopatologia do Departamento de Defesa Sanitária/CCR/UFSM, as amostras de raízes foram lavadas em água corrente, desinfestadas superficialmente com hipoclorito de sódio a 1% e lavadas com água destilada esterilizada. Posteriormente, foram colocadas em câmara úmida em caixas gerbox contendo duas folhas de papel filtro esterilizadas, umedecidas e incubadas a 25 °C (± 2 °C) sob fotoperíodo de 12 horas. Após quatro dias, as amostras foram examinadas com auxílio de microscópio binocular estereoscópico para verificação do desenvolvimento de *Fusarium* sp. Em caso positivo, porções do micélio crescido na superfície das amostras foram transferidas, com auxílio de uma agulha, para placas de Petri contendo meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA). O material foi incubado a 25 °C (± 2 °C) sob fotoperíodo de 12 horas. As colônias crescidas em BDA foram purificadas conforme a técnica de cultura monospórica descrita por Fernandes (1993).

Seguindo a metodologia descrita por Ventura (2000), porções de micélio retiradas das culturas puras foram transferidas, com auxílio de uma agulha histológica, para três placas de Petri contendo BDA, obtendo-se uma colônia localizada no centro de cada placa, incubadas a 25 °C (± 2 °C) com fotoperíodo de 12 horas. Após 72 horas, foram medidos os diâmetros das colônias desenvolvidas. Porções dessas colônias também foram transferidas para placas de Petri com meio de cultura folhas-de-cravo-ágar (FCA) e mantidas nas mesmas condições. Após, fragmentos do meio de cultura com crescimento fúngico foram examinados em microscópio óptico, bem como diretamente nas placas. A identificação das espécies de *Fusarium* foi realizada seguindo a chave de classificação de espécies de Ventura (2000) e descrições

feitas por Gerlach e Nirenberg (1982), na quais são consideradas a forma, o crescimento e a coloração das colônias crescidas em BDA e a presença, forma e tamanho de estruturas, como macro e microconídios, clamidósporos, exsudatos, fiálides e esporodóquios das colônias crescidas em FCA.

Para a realização da análise molecular, cultivaram-se os isolados de *Fusarium* sp. em meio batata-dextrose (BD), a 24 °C ( $\pm$  2 °C) com fotoperíodo de 12 h por 10 dias. A extração de DNA foi realizada conforme método CTAB (DOYLE; DOYLE, 1991), sendo o DNA extraído a partir de micélio produzido em meio líquido BD.

As amostras de DNA genômico foram submetidas à reação de polimerase em cadeia (PCR), para a amplificação da região ITS do rDNA com os oligonucleotídeos iniciadores ITS1 (5' TTCCGTAGGTGAACCTGCGG 3') e ITS4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3') (WHITE *et al.*, 1990). A reação totalizou 25  $\mu$ L contendo aproximadamente 30 ng de DNA, tampão 10X, 2,5  $\mu$ M de cada DNTP, 20 nM de MgCl<sub>2</sub>, 25  $\mu$ moles de cada um dos oligonucleotídeos iniciadores, cinco unidades da enzima *Taq* polimerase e água ultrapura para completar o volume da reação. As reações foram realizadas em termociclador MJ Research, INC. PTC – 100<sup>MT</sup>, sob as seguintes condições térmicas: 94 °C por 2 min., 30 ciclos de 94 °C por 45 s, 55 °C por 30 s, 72 °C por 35 s e 72 °C por 10 min.

Os fragmentos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,2%, em tampão TBE 1X, contendo brometo de etídio, visualizados sob luz ultravioleta. Os produtos da PCR foram purificados com PEG 8000 (13%) e o sequenciamento foi realizado no sequenciador Mega BACE 500 (Amersham). Após, as sequências-consenso obtidas foram inseridas no GenBank, sediado no National Center for Biotechnology Information (NCBI) ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) (ALTSCHUL *et al.*, 1997), onde receberam códigos de acesso (Tabela 2).

Tabela 2. Isolados de *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. e *Fusarium oxysporum* Schlecht. utilizados na construção do dendrograma filogenético.

Table 2. *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. and *Fusarium oxysporum* Schlecht. isolates used in the construction of the phylogenetic dendrogram.

| Isolado                                       | Número de acesso* | Referência                             |
|---|-------------------|--|
| <i>F. oxysporum</i> isolate XSD-78            | EU326216          | Jiang, J. <i>et al.</i> 2007           |
| <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> | DQ452454          | Kim, E. A. e Min, B.R., 2006           |
| <i>F. oxysporum</i>                           | DQ459007          | Xu, L. <i>et al.</i> 2006              |
| <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>     | EF590328          | Wang, C. <i>et al.</i> 2007            |
| <i>F. solani</i> strain 0114                  | EU263916          | Xiaoming, B. e Huaiwei, L. 2007        |
| <i>F. solani</i> FMR 8038                     | AM412618          | Azor, M. <i>et al.</i> 2006            |
| <i>F. solani</i> FMR 8039                     | AM412619          | Azor, M. <i>et al.</i> 2006            |
| <i>F. solani</i>                              | DQ026012          | Yanez-Morales, M.J. <i>et al.</i> 2005 |
| Isolado UFSMF12.4a                            | EU727450          | Poletto, I. <i>et al.</i> 2007         |
| Isolado UFSMF 12.4b                           | EU727451          | Poletto, I. <i>et al.</i> 2007         |
| Isolado UFSMF 14.2                            | EU727452          | Poletto, I. <i>et al.</i> 2007         |
| Isolado UFSMF 4.4                             | EU727453          | Poletto, I. <i>et al.</i> 2007         |
| Isolado UFSMF 5.1                             | EU727454          | Poletto, I. <i>et al.</i> 2007         |
| Isolado UFSMF 10                              | EU727455          | Poletto, I. <i>et al.</i> 2007         |

\* Número de acesso ao GenBank – NCBI.

Para a construção da árvore filogenética, as sequências-consenso obtidas pelo programa STADEN PACKAGE (STADEN *et al.*, 2000) foram submetidas ao alinhamento pelo Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). As sequências do GenBank que apresentaram os maiores scores foram selecionadas para análise filogenética (Tabela 2). As sequências de nucleotídeos foram alinhadas pelo algoritmo ClustalW e a análise filogenética foi conduzida utilizando-se o método “Neighbour-joining” com 5000 replicatas pelo programa MEGA versão 4 (TAMURA *et al.*, 2007). A similaridade das sequências de nucleotídeos entre os isolados foi calculada pelo programa DNASTAR (LASERGENE, 1994).

Para o teste de patogenicidade, plantas de erva-mate com aproximadamente 1 ano de idade foram cultivadas em sacos plásticos pretos com dimensões 18 x 25 cm. Como substrato foi utilizado solo coletado em meio à mata nativa, na profundidade entre 10 a 20 cm, no município de Santa Maria (RS),

distante da área de cultivo da erva-mate, garantindo, assim, ausência de contaminação por *Fusarium* sp. patogênico à erva-mate. Colônias puras de *Fusarium* sp. foram cultivadas em meio BDA por 15 dias. Em seguida foram seccionadas em porções de 1 cm<sup>2</sup> e inoculadas quatro porções, dispostas em cruz, enterradas 2 cm abaixo da superfície do solo, junto às raízes. Cada isolado foi inoculado em quatro plantas, que foram mantidas em viveiro com temperatura ambiente e sombreamento de 30%. Para a irrigação foi utilizada água de poço artesianos, evitando, assim, a contaminação das mudas por eventual inóculo contido nela. Durante 180 dias após a inoculação, foram realizadas avaliações semanais, analisando-se, visualmente, o aparecimento de sintomas em cada muda, como clorose, necrose das folhas, murcha, amarelecimento, encarquilhamento e queda de folhas.

Ao final do teste, as mudas foram arrancadas e suas raízes lavadas em água corrente e analisadas quanto à presença de necrose das raízes. Em seguida, de cada muda foi retirada uma amostra do caule e da raiz, colocada em câmara úmida em caixa gerbox e mantida na câmara de incubação a 25 °C (± 2 °C) com fotoperíodo de 12 h por 6 dias. Após esse período, foi observado o desenvolvimento ou não de *Fusarium* sp. nas amostras, com auxílio de um microscópio binocular estereoscópico e confecção de lâminas para observação em microscópio óptico.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Obteve-se, de tecido radicular de plantas de erva-mate sintomáticas, seis isolados fúngicos, identificados como *Fusarium* spp., sendo classificados em duas espécies: isolados UFSMF-12.4a, UFSMF-12.4b e UFSMF-14.2 identificados como *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. e os isolados UFSMF-4.4, UFSMF-10 e UFSMF-5.1 como *Fusarium oxysporum* Schlecht.

### Caracterização morfológica dos isolados

As principais características morfológicas que os isolados UFSMF-12.4a, UFSMF-12.4b e UFSMF-14.2 de *Fusarium solani* possuem em comum são: **colônia** - as colônias cultivadas em meio BDA, após três dias a 25 °C cresceram menos que 2 cm de diâmetro, possuindo micélio aéreo esparso; **macroconídios** - abundantes, longos, fusiformes, a maioria com quatro a seis células, produzidos em esporodóquios com múltiplas ramificações e em monofiálides longas. Célula basal distintamente pedicelada e a apical levemente curvada; **microconídios** - pouco abundantes, com uma ou duas células, de forma oval a cilíndrica, formados em monofiálides longas; **clamidósporos** - desenvolvem-se abundantemente após 10 dias de crescimento em meio FCA, possuem forma globosa a oval, com paredes lisas ou rugosas, formados na extremidade de uma hifa lateral ou intercalados entre as células das hifas, geralmente em pares, podendo ocorrer solitários ou em cadeias com três ou mais.

As características morfológicas distintas que os isolados UFSMF-12.4a, UFSMF-12.4b e UFSMF-14.2 de *Fusarium solani* possuem são: **Isolado UFSMF-12.4a** - crescimento da colônia em meio BDA em anéis concêntricos, porém pouco definidos, crescimento rasteiro com pouco micélio aéreo, coloração da colônia bege, esbranquiçada a azulada; **Isolado UFSMF-12.4b** - crescimento da cultura em meio BDA em anéis concêntricos bem definidos, micélio totalmente rasteiro, coloração da cultura verde-azulada a acinzentada; **Isolado UFSMF-14.2** - crescimento da colônia em meio BDA em anéis concêntricos bem definidos, micélio totalmente rasteiro, coloração da cultura bege a alaranjada.

As principais características morfológicas que os isolados UFSMF-4.4, UFSMF-10 e UFSMF-5.1 de *Fusarium oxysporum* possuem em comum são: **colônia** - a cultura crescida em meio BDA, após três dias a 25 °C, cresceu menos que 2 cm de diâmetro, com micélio aéreo cotonoso de coloração branca a violácea; **macroconídios** - falcatos, moderadamente curvados, a maioria com quatro células, podendo ocorrer de três a seis células, produzidos em esporodóquios com múltiplas ramificações ou em ramificações laterais nas hifas, sempre em monofiálides curtas (em formato de garrafa), célula basal distintamente pedicelada e a apical levemente curvada; **microconídios** - abundantes, com uma ou duas células, de forma oval, cilíndrica, elipsoidal ou reniforme, formados em falsas cabeças nas ramificações laterais das hifas ou em esporodóquios, sempre em monofiálides curtas com formato de garrafa; **clamidósporos** - desenvolvem-se abundantemente após 10 dias de crescimento em meio FCA, possuem forma globosa a oval, com paredes lisas ou rugosas, formados nas extremidades das hifas laterais ou intercalados entre as células das hifas, geralmente em pares, podendo ocorrer solitários ou em cadeias com três ou mais.

Somente o isolado UFSMF-4.4 possui uma característica que difere dos demais (UFSMF-10 e UFSMF-5.1), que é a predominância de microconídios de forma reniforme.

Na literatura são descritas algumas características principais que determinam as espécies de *Fusarium* e, também, ajudam a diferenciar *F. solani* de *F. oxysporum*. As características observadas para os isolados de *Fusarium solani*, como crescimento da colônia em BDA a 25 °C menor que 2 cm, macroconídios abundantes, longos, com quatro a seis células e esporodóquios com múltiplas ramificações e em monofálides longas, e para *Fusarium oxysporum*, como crescimento da colônia em BDA a 25 °C menor que 2 cm, micélio aéreo cotonoso, a maioria dos macroconídios com quatro células e microconídios produzidos em monofálides curtas e com formato de garrafa, descritas neste trabalho, são semelhantes às descritas por Nelson *et al.* (1983), Ventura (2000) e Sanabria *et al.* (2002) para as mesmas espécies.

Algumas características que são distintas entre isolados de mesma espécie podem sugerir uma especialização deste frente às condições ambientais onde fora coletado (características químicas do solo, umidade, microclima, técnicas de cultivo etc.) (Tabela 1) ou em função do hospedeiro (variedade, nutrição, idade etc.). Além disso, essa distinção de características pode confundir e dificultar a correta identificação da espécie.

### Caracterização molecular dos isolados

Os fragmentos da região ITS, gerados via PCR, visualizados em gel de agarose demonstram similaridade de tamanho, contendo aproximadamente 550 pares de base (pb) cada. Essa similaridade de tamanho pode ser devido aos organismos pertencerem ao mesmo gênero, estando assim próximos evolutivamente. Porém, através do sequenciamento, pode-se detectar distinção entre os organismos pela composição nucleotídica encontrada.

O alinhamento de sequências da região ITS revelou diferenças que possibilitaram classificar os isolados em duas espécies. Os agrupamentos obtidos foram com os fungos *F. solani* para os isolados UFSMF-12.4a, UFSMF-12.4b e UFSMF-14.2, e *F. oxysporum* para os isolados UFSMF-4.4, UFSMF-5.1 e UFSMF-10 (Figura 1).

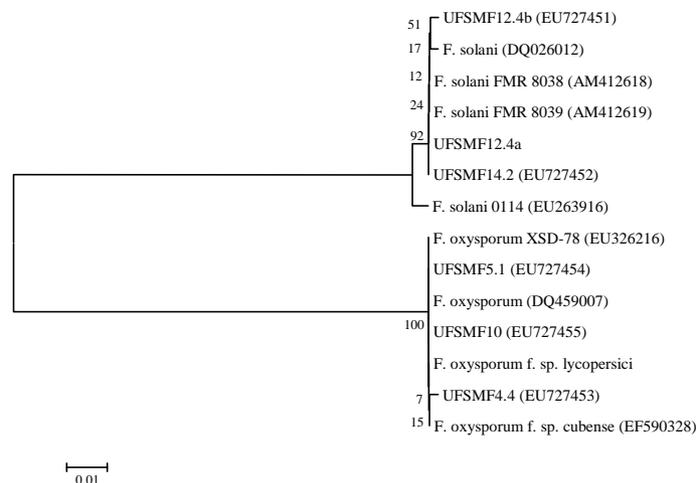


Figura 1. Dendrograma filogenético baseado na análise da região ITS do rRNA dos isolados UFSMF-12.4a, UFSMF-12.4b, UFSMF-14.2, UFSMF-4.4, UFSMF-5.1 e UFSMF-10 e de isolados do GenBank construído pelo método Neighbor-joining com base em 5000 réplicas de bootstraps. O número nas ramificações representa o valor de bootstraps.

Figure 1. Phylogenetic dendrogram based in the analysis of the rRNA ITS region of the isolates UFSMF-12.4a, UFSMF-12.4b, UFSMF-14.2, UFSMF-4.4, UFSMF-5.1 e UFSMF-10 and isolated of GenBank built by the method Neighbor-joining with base in 5000 bootstraps replicas. The number in the ramifications represents the bootstraps value.

Observa-se, pela análise do dendrograma, a formação de dois grupos bem distintos, com valor de bootstrap de 99, o que a torna uma topologia correta (TAMURA, *et al.*, 2007). Um dos agrupamentos contém os isolados UFSMF-4.4, UFSMF-5.1 e UFSMF-10 com similaridade acima de 97% à espécie *F. oxysporum*, e no outro grupo ficaram os isolados UFSMF-12.4a, UFSMF-12.4b e UFSMF-14.2, que também apresentaram similaridade acima de 97% com à espécie *F. solani*. As similaridades citadas aqui foram obtidas pela comparação com outras sequências pertencentes ao GenBank.

A matriz de similaridade constatou que a região ITS dos isolados de *F. solani* UFSMF-12.4a, UFSMF-12.4b e UFSMF-14.2 apresentou similaridade acima de 98,2% entre eles, e os isolados UFSMF-4.4, UFSMF-5.1 e UFSMF-10 de *F. oxysporum* apresentaram uma similaridade acima de 99%. Esses dados obtidos indicam que os isolados UFSMF-12.4a, UFSMF-12.4b e UFSMF-14.2 pertencem à mesma espécie, assim como os isolados UFSMF-4.4, UFSMF-5.1 e UFSMF-10 (Tabela 3), o que suporta a identificação morfológica realizada pelo método de classificação das espécies (VENTURA, 2000).

Tabela 3. Matriz de similaridade genética (%) das regiões ITS1, ITS2 e ITS do rDNA entre os isolados UFSMF-12.4a, UFSMF-12.4b, UFSMF-14.2, UFSMF-4.4, UFSMF-5.1 e UFSMF-10, baseada no método Wilbur-Lipman.

Table 3. Similarity matrix genetic (%) of ITS1, ITS2 and ITS regions of the rDNA among the isolates UFSMF-12.4a, UFSMF-12.4b, UFSMF-14.2, UFSMF-4.4, UFSMF-5.1 and UFSMF-10 based on the method Wilbur-Lipman.

| Região | Isolados    | UFSMF<br>12.4a | UFSMF<br>12.4b | UFSMF<br>14.2 | UFSMF<br>4.4 | UFSMF<br>5.1 | UFSMF<br>10 |
|--------|-------------|----------------|----------------|---------------|--------------|--------------|-------------|
| ITS 1  | UFSMF 12.4a | 100            | 98,8           | 100           | 59,6         | 59,6         | 59,6        |
|        | UFSMF 12.4b |                | 100            | 99,4          | 59,9         | 60,6         | 60,4        |
|        | UFSMF 14.2  |                |                | 100           | 58,4         | 58,4         | 58,4        |
|        | UFSMF 4.4   |                |                |               | 100          | 100          | 100         |
|        | UFSMF 5.1   |                |                |               |              | 100          | 100         |
|        | UFSMF 10    |                |                |               |              |              | 100         |
| ITS 2  | UFSMF 12.4a | 100            | 99,5           | 100           | 61,2         | 61,7         | 61,7        |
|        | UFSMF 12.4b |                | 100            | 99,5          | 56,1         | 56,6         | 56,6        |
|        | UFSMF 14.2  |                |                | 100           | 60,7         | 57,7         | 57,7        |
|        | UFSMF 4.4   |                |                |               | 100          | 99,5         | 99,5        |
|        | UFSMF 5.1   |                |                |               |              | 100          | 100         |
|        | UFSMF 10    |                |                |               |              |              | 100         |
| ITS    | UFSMF 12.4a | 100            | 98,2           | 100           | 72,6         | 72,3         | 72,5        |
|        | UFSMF 12.4b |                | 100            | 99,6          | 72,2         | 72,5         | 72,5        |
|        | UFSMF 14.2  |                |                | 100           | 71,4         | 71,2         | 71,3        |
|        | UFSMF 4.4   |                |                |               | 100          | 99,8         | 99,8        |
|        | UFSMF 5.1   |                |                |               |              | 100          | 100         |
|        | UFSMF 10    |                |                |               |              |              | 100         |

Apesar de os isolados de *F. oxysporum* e *F. solani* serem originários de diferentes origens geográficas, para os isolados da mesma espécie a variabilidade na região ITS foi baixa ou não detectada, sendo por isso ser possível separar os isolados encontrados nas duas espécies citadas (Figura 1 e Tabela 3). Esse resultado corrobora os resultados encontrados por Visentin *et al.* (2009), em que foi possível separar isolados de *Fusarium* nas espécies *Fusarium verticillioides* Sacc. Nirenberg e *Fusarium proliferatum* (Matsush.) Nirenberg ex Gerlach & Nirenberg provenientes de diferentes locais em Piedmont, Itália, e de Cheri *et al.* (2011), que encontraram baixa ou nenhuma variabilidade entre os isolados de *Fusarium* da mesma espécie originados de diferentes regiões geográficas, sendo possível somente separá-los em espécie através da região ITS.

Além disso, outros trabalhos também relatam a baixa variabilidade na região ITS do rRNA. Kuramae e Souza (2002), estudando quatro *formae speciales* (f.sp.) de *F. oxysporum* através das regiões ITS1, ITS2 e 5.8S, verificaram que a similaridade entre as diferentes f.sp. nas regiões ITS1 e ITS2 foi maior que 97,2%, e 100% na região 5.8S, não sendo possível identificá-las ao nível de f.sp. Do mesmo

modo, Monteiro (2004) também encontrou baixa variabilidade genética na região ITS, não apresentando informações suficientes para discriminar os isolados de *F. oxysporum* f.sp. em diferentes *formae speciales*.

Apesar da baixa variação encontrada na região do rRNA estudada nos isolados da mesma espécie de *Fusarium*, a utilização e a eficiência do ITS para separar espécies desse gênero é conhecida na literatura e relatada por vários autores. Edel *et al.* (1996), estudando 18 espécies de *Fusarium* obtidas de várias origens geográficas diferentes, observou que a região ITS foi capaz de separar em espécies grande parte das isolados estudados, com exceção de alguns isolados da mesma espécie que são altamente relacionados filogeneticamente. Do mesmo modo, Tan e Niessen (2003), analisando isolados de diferentes espécies de *Fusarium*, concluíram que a região ITS foi eficaz para separação entre as diferentes espécies analisadas.

A utilização da região ITS como marcador filogenético não apresentou nenhum sítio informativo que possa ser usado para separação de diferentes isolados da mesma espécie, entretanto, para a identificação de *Fusarium* ao nível de espécie, as caracterizações morfológica e molecular mostraram os mesmos resultados, indicando a eficiência das duas formas de identificação.

Comparando-se com os resultados da análise molecular, os isolados pertencentes a uma mesma espécie apresentaram alta similaridade genética, mesmo que, pela análise morfológica, tenham-se observado algumas diferenças em suas estruturas.

### Patogenicidade dos isolados

Os primeiros sintomas observados nas plantas inoculadas com os isolados de *F. solani* e *F. oxysporum* foram detectados cerca de 90 dias após a inoculação, e foram similares aos observados nas plantas a campo: amarelecimento, estagnação do crescimento, clorose das folhas seguida de necrose, queda de folhas e, principalmente, necrose das raízes.

Amostras de tecido caulinar e radicular obtidos de plantas inoculadas, ao serem submetidas à câmara úmida por 25 °C ( $\pm$  2 °C) com fotoperíodo de 12 h por 6 dias, apresentaram estruturas fúngicas típicas de *Fusarium* sp., demonstrando a colonização dos tecidos pelo patógeno.

### CONCLUSÕES

- Existem duas espécies de *Fusarium* entre os isolados analisados: *F. solani* e *F. oxysporum*.
- Não há variabilidade genética na região ITS dentro das espécies descritas, porém há variabilidade entre as espécies.
- Todos os isolados analisados são patogênicos para a erva-mate.
- A união das técnicas morfológicas e moleculares fornecem dados eficientes para a identificação de espécies e de estudos de populações de *Fusarium* sp.

### REFERÊNCIAS

ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHAFFON, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein data base search programs. **Nucleic Acids Research**. v. 25, p. 3389 - 3402, 1997.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Divisão de Pesquisas Pedológicas. **Levantamento de reconhecimento dos solos do estado do Rio Grande do Sul**. Recife, 1973. 431 p.

CHEHRI, K.; SALLEH, B.; YLI-MATTILA, T.; REDDY, K. R. N.; ABBASI, S. Molecular characterization of pathogenic *Fusarium* species in cucurbit plants from Kermanshah province, Iran. **Saudi Journal of Biological Sciences**, [online publ.], 11 p., 2011.

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

FERNANDES, M. R. **Manual para laboratório de fitopatologia**. Passo Fundo: EMBRAPA-CNPT, 1993. 128 p.

- EDEL, V.; STEINBERG, C.; GAUTHERON, N.; ALABOUVETTE, C. Evaluation of restriction analysis of polymerase chain reaction (PCR)-amplified ribosomal DNA for the identification of *Fusarium* species. **Mycological Research**, v. 101, p.179 - 187, 1996.
- GERBI, S. A. Evolution of ribosomal DNA. In: MCINTYRE, R. E. **Molecular Evolutionary Genetics**. New York: Plenum Press, 1985. p. 419 - 517.
- GERLACH, W.; NIRENBERG, H. **The genus *Fusarium*: a pictorial atlas**. Berlin: Biologische Bundesanstalt für Land-und. Institut für Mikrobiologie, 1982. 406 p.
- HILLIS, D. M.; M. T. DIXON. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. **Quarterly Review of Biology**, v. 66, n. 4, p. 411 - 453, 1991.
- KIM, S. H.; HAN, A.; KRONSTAD, J.; BREUIL, C. Differentiation of sapstain fungi by restriction fragment length polymorphism patterns in nuclear small subunit ribosomal DNA. **FEMS Microbiology Letters**, v. 177, p. 151 - 157, 1999.
- 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**, v. 24, n. 5, p. 1481 - 1485, 2002.
- LASERGENE. **User's guide. A manual for the Lasergene System**. Biocomputing software for windows: Madson, 1994. 253 p.
- MANICON, B. Q.; BAR-JOSEPH, M.; ROSNER, A.; VIGODSKY-HAAS, H.; KÓTZE, J. M. Potential applications of random DNA probes and restriction fragment length polymorphisms in the taxonomy of the Fusaria. **Phytopathology**, v. 77, p. 669 - 672, 1987.
- MONTEIRO, A. S. **Análise genômica e sequenciamento automático de rDNA em populações de *Fusarium oxysporum***. 2004, 75 f. Dissertação (Mestrado em Química e Biotecnologia) - Universidade Federal de Alagoas, Alagoas, 2004.
- MORENO, J. A. **Clima do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: Secretaria da Agricultura, 1961. 41 p.
- NELSON, P. E.; TOUSSON, T. A.; MARASAS, W. F. O. ***Fusarium* species: an illustrated manual for identification**. Philadelphia: Pennsylvania State University Press, 1983. 193 p.
- POLETTO, I.; MUNIZ, M. F. B.; CECONI, D. E.; SANTIN, 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 Taquari-RS. **Ciência Florestal**, v. 16, n. 1, p. 1 - 10, 2006.
- RAHJOO, V.; ZAD, M.; JAVAN-NIKKHAH, M.; GOHARI, A. M.; OKHOVVAT, S. M.; BIHAMTA, M. R.; RAZZAGHIAN, J.; KLEMSDAL S. S. Morphological and molecular identification of *Fusarium* isolated from maize ears in Iran. **Journal os Plant Pathology**, n. 90, v. 3, p. 463 - 468. 2008.
- SANABRIA, N. de A.; GUADARRAMA, A.; ROMERO, H. Caracterización de especies de *Fusarium* mediante patrones electroforéticos de proteínas. **Revista de la Facultad de Agronomía**, v. 28, p. 161 - 173, 2002.
- STADEN, R.; BEAL, K. F.; BONFIELD, J. K. The Staden package, 1998. **Methods in Molecular Biology**, v. 132, p. 115 - 130, 2000.
- STEENKAMP, E. T.; BRITZ, H.; COUTINHO, T.; WINGFIELD, B.; MARASAS, W.; WINGFIELD, M. Molecular characterization of *Fusarium subglutinans* associated with mango malformation. **Molecular Plant Pathology**, v. 1, p. 187 - 193, 2000.
- STEENKAMP, E. T.; WINGFIELD, B. D.; COUTINHO, T. A.; WINGFIELD, M. J.; MARASAS, W. F. O. Differentiation of *Fusarium subglutinans* f. sp. *pini* by histone gene sequence data. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 3401 - 3406, 1999.

- TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 24, p. 1596 - 1599, 2007.
- TAN, M.; NIESSEN, L. M. Analysis of rDNA ITS sequences to determine genetic relationships among, and provide a basis for simplified diagnosis of, *Fusarium* species causing crown rot and head blight of cereals. **Mycological Research**, v. 107, p. 811 - 821, 2003.
- THOMAS, V.; RUTHERFORD, M. A.; BRIDGE, P. D. Molecular differentiation of two races of *Fusarium oxysporum* especial form cubense. **Letters in Applied Microbiology**, v. 18, p. 193 - 196, 1994.
- VENTURA, J. A.; Taxonomia de *Fusarium* e seus segredos. Parte II - Chaves para identificação. In: LUZ, W. C da (ed.). **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 8, 2000. p. 303 - 338.
- VISENTIN, I.; TAMIETTI, G.; VALENTINO, D.; PORTIS, E.; KARLOVSKY, P.; MORETTI, A.; CARDINALE, F. The ITS region as a taxonomic discriminator between *Fusarium verticillioides* and *Fusarium proliferatum*. **Mycological Research**, v. 113, n. 10, p. 1137 - 1145, 2009.
- WATANABE, M.; YONEZAWA, T.; LEE, K.; KUMAGAI, S.; SUGITA-KONISHI, Y.; GOTO, K.; HARA-KUDO, Y. Evaluation of genetic markers for identifying isolates of the species of the genus *Fusarium*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, [online publ.], 11 p., 2011.
- WHITE, T.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M. A.; GELFAND, D. H. J. J.; SCHLOTTERER, C.; HAUSER, M. T.; HUESLER, A.; TAUTZ, D. (ed.). **PCR protocols: a guide to methods and applications**. New York: Academic Press, Inc., 1990. p. 315 - 322.