

**INSTITUTO FEDERAL DE MINAS GERAIS
CAMPUS SÃO JOÃO EVANGELISTA**

ROSIANE FÁTIMA DE ALMEIDA

**DOENÇAS CAUSADAS POR FUNGOS FITOPATOGÊNICOS EM MUDAS DE
ESPÉCIES FLORESTAIS PRODUZIDAS NO VIVEIRO DO INSTITUTO
FEDERAL DE MINAS GERAIS - *CAMPUS* SÃO JOÃO EVANGELISTA**

**SÃO JOÃO EVANGELISTA-MG
2019**

ROSIANE FÁTIMA DE ALMEIDA

**DOENÇAS CAUSADAS POR FUNGOS FITOPATOGÊNICOS EM MUDAS DE
ESPÉCIES FLORESTAIS PRODUZIDAS NO VIVEIRO DO INSTITUTO
FEDERAL DE MINAS GERAIS - *CAMPUS* SÃO JOÃO EVANGELISTA**

Trabalho de conclusão de curso apresentado
ao Instituto Federal de Minas Gerais –
campus São João Evangelista como
exigência parcial para obtenção do título de
Bacharel em Engenharia Florestal.

Orientadora: Dra. Natália Risso Fonseca

**SÃO JOÃO EVANGELISTA-MG
2019**

FICHA CATALOGRÁFICA

A444d Almeida, Rosiane Fátima de.
2020

Doenças causadas por fungos fitopatogênicos em mudas de espécies florestais produzidas no viveiro do Instituto Federal de Minas Gerais - Campus São João Evangelista. / Rosiane Fátima de Almeida. – 2020.
67fl; il.

Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Engenharia Florestal) – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Minas Gerais – Campus São João Evangelista, 2020.

Orientadora: Dra. Natália Risso Fonseca.
Coorientador: Me. Ivan da Costa Ilhéu Fontan.

1. Fitopatógenos. 2. Diagnose. 3. Postulados de Koch. I. Almeida, Rosiane Fátima de. II. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Minas Gerais – Campus São João Evangelista. III. Título.

CDD 581.2

Elaborada pela Biblioteca Professor Pedro Valério
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Minas Gerais.
Campus São João Evangelista.
Bibliotecária Responsável: Rejane Valéria Santos – CRB-6/2907

ROSIANE FÁTIMA DE ALMEIDA

**DOENÇAS CAUSADAS POR FUNGOS FITOPATOGÊNICOS EM MUDAS DE
ESPÉCIES FLORESTAIS PRODUZIDAS NO VIVEIRO DO INSTITUTO
FEDERAL DE MINAS GERAIS - CAMPUS SÃO JOÃO EVANGELISTA**

Trabalho de conclusão de curso apresentado
ao Instituto Federal de Minas Gerais –
Campus São João Evangelista como
exigência parcial para obtenção do título de
Bacharel em Engenharia Florestal.

Aprovada em 18 / 12 / 2019

BANCA EXAMINADORA

Natália Riso Fonseca

Orientadora Profa. Dra. Natália Riso Fonseca
Instituto Federal de Minas Gerais - *campus* São João Evangelista

Ivan da C. L. Fontan

Coorientador Prof. Me. Ivan da Costa Ilhéu Fontan
Instituto Federal de Minas Gerais - *campus* São João Evangelista

Patrícia Lage

Dra. Patrícia Lage
Instituto Federal de Minas Gerais - *campus* São João Evangelista

AGRADECIMENTOS

Ao nosso bom Deus que me acompanhou, com seu infinito amor de Pai, em cada momento desta jornada. Á Ele, toda honra e toda glória, hoje e sempre!

À minha família linda e grande que sempre me apoiou.

À minha querida professora e orientadora Dra. Natália Risso Fonseca, que tão bem me acolheu na Fitopatologia, que não mediu esforços para estar comigo em cada fase deste trabalho, que me ensinou tantas coisas, confiou em mim e sempre me incentivou a ir além e buscar o meu melhor.

Ao meu coorientador, Profº Me. Ivan da Costa Ilhéu Fontan, por sempre me tirar da zona de conforto e me instigar a enxergar, da melhor forma, o lado prático das coisas.

Á coordenadora do Viveiro de produção de mudas do IFMG/SJE e também amiga, Dra. Patrícia Lage, pela permissão para realização deste trabalho, pelo incentivo constante e sincero e pela grande colaboração em cada atividade. Também agradeço a todos os amigos e funcionários do Viveiro que não hesitaram em ajudar-me a realizar esta pesquisa da melhor maneira.

Aos técnicos do laboratório de Fitopatologia do IFMG/SJE, Ricardo e Lucas, por toda paciência, responsabilidade e colaboração.

Ao Profº Dr. Acelino Couto Alfenas e a todo grupo Patomol, do Laboratório de Patologia Florestal Molecular, da Universidade Federal de Viçosa. Tenho em vocês imenso carinho e gratidão pela confiança e incentivo; e mais ainda pela oportunidade da convivência com tamanhos corações.

A todos os meus amigos e amigas, Stéfane, Igor, em especial, a Thaíssa, Maria José, Carlos Henrique, Álisson (Ipê), Israel e Rafaela, que atuaram diretamente junto a mim e com todo empenho, na execução de diversas atividades deste trabalho.

A todos os meus professores, por todo profissionalismo e aprendizado. Em especial àqueles que, direta ou indiretamente, foram além e contribuíram também para o meu crescimento pessoal, e aqui, peço licença para citá-los: Profº Me. Cleonir Simões, Profº Dr. João Paulo Lemos e a Profª Dra. Caroline Junqueira Sartori.

Aos colegas e amigos da turma EFL151 pela convivência como grandes “guerreiros florestais”.

RESUMO GERAL

As doenças estão entre os principais fatores que podem limitar a produção de mudas de qualidade em viveiros florestais. Os fungos se destacam entre os principais agentes causais de doenças em plantas. O objetivo através do presente trabalho foi realizar um estudo para detecção e identificação de fungos fitopatogênicos associados à mudas florestais produzidas no Viveiro do IFMG - *campus* São João Evangelista. Este trabalho foi dividido em dois capítulos: I) Detecção de fungos fitopatogênicos associados à mudas de espécies florestais; e II) Primeiro relato de *Colletotrichum karstii* em *Samanea tubulosa* (Benth.) Barneby & J. W. Grimes. No capítulo I foram obtidos 12 isolados a partir de 7 espécies florestais. Através de análises moleculares, análises morfológicas e consultas na literatura, foi possível detectar as seguintes associações patógeno-planta: complexo *Colletotrichum gloeosporioides* em *Dypsis lutescens*; *Colletotrichum karstii* em *Samanea tubulosa*; *Colletotrichum melonis* em *Clitoria faichildiana*; *Colletotrichum karstii* e *Diaporthe infecunda* em *Sapindus saponaria*; *Diaporthe phaseolorum* em *Vitex polygama*; *Diaporthe* sp. em *Psidium guineense* e *Pestalotiopsis maculans* em *Callistemon viminalis*. Adicionalmente, comparando o formato dos conídios e aspectos da colônia aos caracteres dos isolados que foram caracterizados molecular e morfológicamente, identificou-se um fungo do gênero *Colletotrichum* associado ao sintoma de manchas foliares em mudas de *Callistemon viminalis* e fungos do gênero *Pestalotiopsis* associados a manchas foliares de mudas de *Psidium guineense* e *Vitex polygama*. Contudo, a identificação de fungos fitopatogênicos baseada em análises moleculares multigênicas e análises morfológicas e culturais mais detalhadas, se fazem necessárias, para a confirmação dos resultados obtidos e melhor definição das espécies de alguns gêneros. No capítulo II, foi avaliada a patogenicidade de *C. karstii* obtido de mudas de *Samanea tubulosa* (sete-cascas), através da inoculação do isolado em folhas destacadas sadias, com e sem ferimentos, pelo método de discos de micélio. Sete dias após a inoculação foram observadas manchas foliares semelhantes às observadas nas mudas de sete-cascas que apresentavam os sintomas no viveiro. A partir do reisolamento do patógeno das folhas inoculadas foi possível concluir a presença de *C. karstii*, comprovando-se a patogenicidade do fungo e completando os Postulados de Koch. Este é o primeiro relato da antracnose na espécie *S. tubulosa*. As demais associações patógeno-planta apontadas neste trabalho precisam passar por procedimento de inoculação e o re-isolamento, dando continuidade aos Postulados de Koch, a fim de confirmar todos os patossistemas abordados.

Palavras chaves: Fitopatógenos. Diagnose. Postulados de Koch.

ABSTRACT

Diseases are among the main factors that may limit the production of quality seedlings in forest nurseries. Fungi are highlighted among the main disease-causing agents in plants. The objective of the present work was to carry out a study to detect and identify phytopathogenic fungi associated with forest seedlings produced at the IFMG Nursery - São João Evangelista campus. This work was divided into two chapters: I) Detection of phytopathogenic fungi associated with seedlings of forest species; and II) First report of *Colletotrichum karstii* in *Samanea tubulosa* (Benth.) Barneby & J. W. Grimes. In chapter I 12 were selected from 7 forest species. Through molecular analysis, morphological analysis and literature consultations, it was possible to detect the following plant-pathogens: *Colletotrichum gloeosporioides* Complex in *Dypsis lutescens*; *Colletotrichum karstii* in *Samanea tubulosa*; *Colletotrichum melonis* in *Clitoria faichildiana*; *Colletotrichum karstii* and *Diaporthe infecunda* in *Sapindus saponaria*; *Diaporthe phaseolorum* in *Vitex polygama*; *Diaporthe* sp. in *Psidium guineense* and *Pestalotiopsis maculans* in *Callistemon viminalis*. In addition, by comparing the shape of the features and aspects of the colony with the characters that were molecularly and morphologically characterized, a fungus of the genus *Colletotrichum* associated with the symptom of *Callistemon viminalis* seedlings and fungi of the genus *Pestalotiopsis* state to the seedlings of the seedlings was identified. from *Psidium guineense* and *Vitex polygama*. However, the identification of phytopathogenic fungi based on multigenic molecular analyzes and more detailed morphological and cultural analyzes are necessary to confirm the results obtained and to better define the species of some genera. In Chapter II, the pathogenicity of *C. karstii* obtained from *S. tubulosa* (seven-bark) seedlings was evaluated by inoculating the isolate into healthy detached leaves, with and without injury, by the mycelium disc method. Seven days after inoculation, leaf spots similar to those observed in seven-bark seedlings with symptoms in the nursery were observed. From the pathogen re-isolation of the inoculated leaves it was possible to conclude the presence of *C. karstii*, proving the pathogenicity of the fungus and completing the Koch Postulates. This is the first report of anthracnose in *S. tubulosa* species. The other pathogen-plant associations pointed out in this paper need to undergo inoculation procedure and re-isolation, continuing the Koch Postulates in order to confirm all the pathosystems addressed.

Keywords: Phytopathogens. Diagnosis. Koch Postulates.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	8
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	9
2.1	CONCEITOS EM FITOPATOLOGIA	9
2.2	PRODUÇÃO DE MUDAS FLORESTAIS EM VIVEIROS	12
2.3	DOENÇAS CAUSADAS POR FUNGOS EM VIVEIROS.....	13
	REFERÊNCIAS	16
3	CAPÍTULO I - DETECÇÃO DE FUNGOS FITOPATOGÊNICOS ASSOCIADOS À MUDAS DE ESPÉCIES FLORESTAIS	20
	RESUMO	20
	ABSTRACT	21
3.1	INTRODUÇÃO	22
3.2	METODOLOGIA	23
3.2.1	Obtenção das amostras.....	23
3.2.2	Amostragem e procedimentos para diagnose.....	23
3.2.3	Isolamento de fungos patogênicos de tecidos foliares.....	23
3.2.4	Identificação dos fitopatógenos associados às mudas.....	24
3.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27
3.3.1	Sintomatologia.....	28
3.3.2	Análises moleculares e filogenéticas	31
3.3.3	Análises morfológicas	37
3.3.4	O gênero <i>Colletotrichum</i>	43
3.3.5	O gênero <i>Diaporthe</i>	44
3.3.6	O gênero <i>Pestalotiopsis</i>	44
3.4	CONCLUSÕES	45
	REFERÊNCIAS	47
4	CAPÍTULO II - PRIMEIRO RELATO DE <i>COLLETOTRICHUM KARSTII</i> EM <i>SAMANEA TUBULOSA</i> (BENTH.) BARNEBY & J.W. GRIMES	53
	RESUMO	53
	ABSTRACT	54
4.1	INTRODUÇÃO	55
4.2	METODOLOGIA	56

4.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	59
4.4	CONCLUSÕES	63
	REFERÊNCIAS	64
	APÊNDICE... ..	66

1 INTRODUÇÃO GERAL

O cenário econômico e socioambiental do Brasil aponta para uma demanda cada vez maior por mudas de espécies florestais, nativas e exóticas, em resposta à necessidade da implantação de povoamentos produtivos, restauração e recuperação de áreas degradadas, silvicultura urbana, dentre outros (WALKER et al., 2011). São projetos que visam o suprimento constante de matéria-prima para mercado interno e externo do país, bem como, atender às exigências das políticas ambientais, nacionais e internacionais, que prezam pela conservação da biodiversidade e preservação de serviços ambientais que são essenciais para a manutenção da vida no planeta (MORAES et al., 2015).

Os viveiros de produção de mudas são os principais responsáveis pelo suprimento de tal demanda, e para isto, é essencial que detenham de um regime de manejo pelos quais as mudas produzidas reflitam sua qualidade no êxito dos projetos florestais estabelecidos.

A produção de mudas de qualidade é dependente de vários fatores. Dentre eles, podemos citar, a escolha cuidadosa do material genético (seleção correta da árvore matriz), a qualidade fisiológica e fitossanitária das sementes utilizadas para a propagação, qualidade dos insumos utilizados, sanidade e higiene do viveiro, técnicas de produção e manejo adotados (DELGADO, 2012, LOPES, 2004).

Contudo, as doenças se destacam entre os principais fatores que afetam negativamente a qualidade das mudas produzidas em viveiros florestais. De uma forma geral, os setores de viveiro possuem uma série de condições ambientais favoráveis ao desenvolvimento das mudas, que favorecem também a ocorrência e a multiplicação de pragas e doenças. A água em abundância, além de condições de alta umidade relativa do ar e temperatura, o tecido vegetal tenro e a proximidade das mudas, bem como, a existência de fontes de contaminação (sementes, solo, água, equipamentos contaminados), são fatores que predispõem o aparecimento e favorecem o desenvolvimento de patógenos nestes ambientes (DAVIDE; SILVA, 2008, GRIGOLETTI JÚNIOR; AUER; SANTOS, 2001). As doenças abióticas (ALFENAS et al., 2009) e as doenças causadas por fungos, estão entre as de maior ocorrência em viveiros florestais (KRUGNER, 1997).

O manejo integrado de doenças (MID) é a melhor forma de se prevenir problemas fitossanitários em viveiros e promover uma produção sustentável e de qualidade. Para tal, a realização de inspeções sistemáticas da produção visando a diagnose de anormalidades nas mudas, se torna crucial, a fim de que se possa, precocemente, tomar decisões que evitem

possíveis perdas na produção (ALFENAS et al., 2009; GRIGOLETTI JÚNIOR; AUER; SANTOS, 2001, MAFIA; ABAD; FERREIRA, 2013).

O viveiro de mudas do IFMG - *campus* São João Evangelista é um viveiro de pequeno porte que produz mudas florestais, predominantemente mudas seminais de espécies pertencentes à flora nativa brasileira, com a finalidade de atender as demandas de pequenos produtores e instituições da região. Ainda não existem trabalhos relacionados ao estudo das condições fitossanitárias do Viveiro em questão.

Neste contexto, este trabalho tem como principal objetivo realizar um estudo para detecção e identificação de fungos fitopatogênicos associados à mudas florestais produzidas no Viveiro do IFMG - *campus* São João Evangelista.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CONCEITOS EM FITOPATOLOGIA

Em condições ideais de ambiente, toda planta sadia desenvolve suas funções fisiológicas dentro da capacidade máxima de seu potencial genético (AGRIOS, 2005; ALFENAS et al., 2009).

Entretanto, em condições desfavoráveis, como a incidência e o ataque de patógenos (agentes bióticos) e condições ambientais anormais ou extremas (agentes abióticos), o vegetal pode sofrer alterações deletérias contínuas em sua fisiologia normal e, neste caso, diz-se que a planta está doente (AGRIOS, 2005, KRUGNER, 1997). Tais desvios fisiológicos são prejudiciais e levam a um desequilíbrio no balanço energético entre os processos geradores e consumidores de energia, com conseqüente prejuízo para a planta (ALFENAS et al., 2009).

As doenças bióticas são causadas por agentes bióticos ou infecciosos como fungos, bactérias, nematoides, vírus, micoplasmas, espiroplasmas, protozoários e plantas parasíticas superiores. A patogenicidade destes organismos está relacionada à respectiva capacidade de multiplicação no hospedeiro vegetal e ao fato de serem transmissíveis para plantas saudias, utilizando, para isto, diferentes meios de disseminação (AGRIOS, 2005, ALFENAS et al., 2009).

As doenças abiótica ou não infecciosa são causadas por agentes abióticos (estresse hídrico, deficiência ou excesso de luz, deficiência ou excesso de nutrientes, geadas, etc.) e não são transmissíveis de uma planta doente para uma planta sadia (ALFENAS et al., 2009, MICHEREFF, 2014, ZANARDI; GARLET, 2014, KRUGNER, 1997).

A sintomatologia é o estudo dos sintomas e sinais de uma doença visando sua diagnose. Os sintomas são uma resposta do hospedeiro em decorrência da atuação do agente causal, biótico ou abiótico, ou devido ainda à anormalidades genéticas (ALFENAS et al., 2009). Para doenças bióticas, os sintomas são classificados em primários ou secundários quanto ao local de ação do patógeno. Enquanto os sintomas primários são expressos no local de ação, os sintomas secundários manifestam-se à distância deste, como um reflexo da infecção (ALFENAS et al., 2009). Os sinais da doença são as próprias estruturas do patógeno formadas sobre e, ou, no interior do tecido ou órgão vegetal doente (AGRIOS, 2005, ALFENAS et al., 2009).

A diagnose consiste na identificação do agente causal da doença com vistas ao seu manejo ou controle (ALFENAS et al., 2009). De acordo com os autores, o primeiro passo no diagnóstico de uma doença é distinguir uma planta doente de uma planta sadia. Para isto é fundamental que o fitopatologista conheça muito bem a cultura. Em caso de detecção de anormalidades sobre as quais não se identifique, de imediato, o agente causal relacionado, amostras representativas da população infectada devem ser coletadas e enviadas à laboratórios especializados, a fim de que seja efetuada a diagnose.

Segundo Alfenas et al. (2009) e Alfenas e Mafia (2016), de uma forma geral, os procedimentos para diagnose de fungos fitopatogênicos envolvem: protocolação e fotografia das amostras, isolamentos direto ou indireto, análises moleculares (PCR (*Polymerase Chain Reaction*) e sequenciamento de DNA), Postulados de Koch, dentre outros. Contudo, cada procedimento deve ser escolhido de acordo com a condição e tipo da amostra.

Diferente das fitobactérias, os fungos fitopatogênicos esporulam em determinadas condições, podendo, muitas vezes, serem visualizadas suas estruturas (corpos de frutificação, esporos, micélios, etc.) através de um microscópio estereoscópico ou microscópio óptico e, a partir disto, realizar o isolamento direto do patógeno, por meio da transferência da estrutura fúngica para o meio de cultura apropriado (ALFENAS; MAFIA, 2016).

Em tecidos com ausência de estruturas visíveis, as condições para esporulação podem ser fornecidas por meio da incubação em câmara úmida, que pode ser feita tanto em caixa tipo gerbox forrada com papel umedecido com água destilada, quanto em meio ágar-água em placas de Petri (CAROLLO; SANTOS FILHO, 2016).

Entretanto, em muitos casos, o patógeno está dentro dos tecidos da planta e não produz estruturas na superfície do órgão lesionado (ausência de sinais) (CAROLLO; SANTOS FILHO, 2016). Nestas situações, o isolamento indireto pode ser feito a partir de fragmentos vegetais recém-infectados, pela transferência deste material, previamente desinfestado, para o meio de cultura (ALFENAS; MAFIA, 2016).

A partir do isolamento e cultivo dos fungos em cultura pura, a identificação dos mesmos pode se dá, em nível de gênero ou até mesmo de espécie, por meio do estudo das características culturais e morfológicas, tais como tamanho, aspecto e coloração de colônias e a descrição das estruturas reprodutivas sexuais e assexuais, como os esporos e corpos de frutificação (AGRIO, 2005). Quando não é possível identificar um microrganismo apenas por suas características culturais e morfológicas, técnicas moleculares, como a PCR e o sequenciamento do material genético, podem ser empregadas e apresentam grande confiabilidade para confirmar ou complementar a diagnose.

A *Polymerase Chain Reaction* (PCR) é um método *in vitro* de amplificação, em progressão geométrica, de uma determinada região do DNA de um organismo definida por *primers* específicos, por atuação da enzima Taq DNA Polimerase. A partir da PCR é possível identificar microrganismos a nível molecular e, ou, subsidiar o sequenciamento do material genético que, por sua vez, torna possível a identificação através de análises de similaridade da sequência genética obtida em relação à genomas já descritos e depositados em bancos de dados públicos (ALFENAS; MAFIA, 2016).

Os Postulados de Koch (KOCH, 1884) são empregados para se determinar a patogenicidade de um microrganismo, ou seja, a capacidade que o organismo, associado ao hospedeiro, tem de causar doença. Para tal, de acordo com os Postulados, é necessário que se observe seguintes condições (AGRIOS, 2005, CAROLLO; FILHO, 2016):

- 1) O agente causal suspeito deve estar presente em todos os organismos doentes examinados;
- 2) O agente causal suspeito deve ser isolado a partir do organismo hospedeiro doente e cultivado em cultura pura;

- 3) Quando a cultura pura do agente causal anteriormente isolado é inoculada num hospedeiro susceptível saudável, este deve reproduzir a doença específica, sendo esta visível na forma de características sintomáticas;
- 4) O organismo do hospedeiro susceptível doente deve ser reisolado em cultura pura visando comparar com a cultura pura original.

A confirmação da patogenicidade do microrganismo é prerrogativa para estudo da etiologia, epidemiologia, manejo e controle da doença.

2.2 PRODUÇÃO DE MUDAS FLORESTAIS EM VIVEIROS

O setor florestal brasileiro se destaca, a nível, mundial, por sua grande capacidade e diversidade produtiva. A extensão territorial do Brasil, as condições edafoclimáticas e a grande disponibilidade hídrica, as legislações ambientais vigentes, a pesquisa e as tecnologias desenvolvidas, são os principais fatores que contribuem para o sucesso do setor no país (EMBRAPA FLORESTAS, 2015).

Além da responsabilidade de produção, visando suprir a demanda madeireira e não-madeireira do mercado interno e externo, o setor florestal brasileiro é também responsável pela preservação da biodiversidade, que está ameaçada. E, para isso, tem como diretrizes as políticas ambientais, nacionais e internacionais, que prezam pelo desenvolvimento sustentável (EMBRAPA FLORESTAS, 2015).

Os viveiros florestais atuam na base de todo o setor florestal, sendo responsáveis pela produção de mudas de espécies nativas e exóticas, visando à implantação de povoamentos de exploração comercial, silvicultura urbana, instalação de projetos de restauração e recuperação de áreas degradadas, dentre outros (DELGADO, 2012, VENTURA et al., 2017, WALKER et al., 2016).

Um diagnóstico realizado no ano de 2015 pelo Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada – IPEA (SILVA et al., 2015), aponta que o Brasil possui aproximadamente 1.276 viveiros produtores de espécies florestais nativas. A maioria dos viveiros pesquisados possui a produção média entre 50 e 100 mil mudas/ano.

Contudo, Alfnas et al. (2009) e Dias et al. (2006) apontam que os viveiros de produção de espécies florestais nativas, apresentam atraso tecnológico de mais de 30 anos em relação aos viveiros clonais de produção de mudas de *Pinus* e *Eucalyptus*.

No que se diz respeito à ocorrência de doenças bióticas, que são uns dos principais fatores limitantes à produção de mudas de qualidade pelos viveiros (ZANARDI; GARLET, 2014), os viveiros clonais hoje se sobressaem aos viveiros de produção de mudas nativas, no investimento em um sistema de manejo que seja eficiente e viável. De forma geral, os viveiros clonais estão evoluindo para a construção dos setores produtivos com estruturas metálicas individualizadas e com tetos móveis; automatização dos controles climáticos, de fertilização e de irrigação; uso de canteiros suspensos; seleção de material propagativo de alto vigor genético e livre de inóculos fitopatogênicos e inspeção fitossanitária contínua e rigorosa de ambiente, equipamentos e insumos da produção (FILHO, 2009). São fatores que, de forma integrada, corroboram para a menor ocorrência de doenças nestes viveiros (FILHO, 2009).

Os principais fatores que podem comprometer a qualidade das mudas nos viveiros de produção de espécies florestais nativas, pela maior ocorrência de doenças bióticas, estão comumente associados à escolha do material genético de baixo vigor fisiológico e ao seu processamento e armazenamento em condições inadequadas; uso de insumos contaminados; uso da água advinda de cursos hídricos ou de poços artesianos, sem o devido tratamento prévio para irrigação; irregularidades na irrigação e fertilização das mudas; viveiros não cobertos por sombrites ou lonas; plantio em canteiros não suspensos; dentre outros fatores (ALMEIDA et al., 2007, SILVA et al., 2015).

Neste contexto, o que pode ser feito em relação a estas realidades é um fluxo de informações entre as técnicas que estão sendo adotadas atualmente nos viveiros clonais e aquilo que pode ser adaptado ao sistema produtivo dos viveiros de produção de mudas nativas, no que tange a prevenção e o manejo das doenças florestais, visando o fornecimento de mudas satisfatório às exigências e necessidade do setor florestal brasileiro.

2.3 DOENÇAS CAUSADAS POR FUNGOS EM VIVEIROS

De acordo com Krugner (1997), em viveiros de produção de mudas é muito comum a ocorrência de doenças como o *damping-off* ou tombamento de mudas, a podridão de raízes e as doenças foliares (manchas e crestamentos). A morte de ponteiros e as necroses de tecidos do caule, as ferrugens e oídios também podem ocorrer com frequência (DAVIDE; SILVA, 2008).

O *damping-off* pode ocorrer em qualquer espécie florestal, tanto na fase de pré-emergência, quando o patógeno coloniza a semente e causa sua morte antes da germinação ou atacam a radícula impedindo o desenvolvimento da plântula, quanto na pós-emergência, quando a infecção ocorre na haste da muda, principalmente na região do coleto, causando anelamento do floema com conseqüente murcha e tombamento (ALFENAS et al., 2009).

Fungos do gênero *Calonectria* (= *Cylindrocladium*), *Rhizoctonia* e *Botrytis* são ditos como os principais causadores de tombamentos de mudas em espécies de *Eucalyptus* (ALFENAS et al., 2009). Lazarotto et al. (2012) também relataram *Rhizoctonia* sp. como agente causal do tombamento de mudas da espécie arbórea nativa brasileira, *Cedrela fissilis* (cedro).

Outros fungos também podem estar associados ao tombamento de mudas de espécies florestais em viveiros, como alguns do gênero *Pythium*, *Phytophthora* e *Fusarium* (ALFENAS et al., 2009, BELLEI, 2013). Walker et al. (2016) relataram *Fusarium acuminatum* e *Fusarium verticillioides* causando tombamento em pré e pós emergência em *Cordia americana* (guajuvira), espécie florestal amplamente distribuída no território brasileiro e que apresenta importância econômica e ambiental, devido à qualidade de sua madeira e potencial de utilização em reflorestamentos.

O fungo *Sclerotium rolfsii* Sacc possui ampla gama de hospedeiro, já sendo constatada a associação do patógeno ao tombamento de mudas de *Anadenanthera peregrina* (angico-vermelho), *Chorisia speciosa* (paineira-rosa), *Clitoria fairchildiana* (sombreiro), *Copaifera langsdorffii* (copaíba), *Delonix regia* (flamboyant-vermelho), *Enterolobium contortisiliquum* (orelha-de-negro), *Leucaena leucocephala* (leucena), *Mabea fistulifera* (canudo-de-pito), *Platymiscium pubescens* (tamboril-da-mata), *Senna macranthera* (fedegoso), *Spathodea campanulata* (espatódea) e *Handroanthus avellanadae* (ipê-roxo) (MAFIA; ALFENAS; RESENDE JÚNIOR, 2007).

A podridão de raízes também é uma doença comumente encontrada em viveiros, sendo associada à fungos do gênero *Calonectria* (= *Cylindrocladium*), *Fusarium*, *Pythium*, *Rhizoctonia* e *Phytophthora* (BERGAMIN FILHO; AMORIN, 2011). Segundo os autores, geralmente, o patógeno causa necrose nos tecidos radiculares, provocando sintomas de escurecimento e apodrecimento. Este tipo de doença tem ocorrido com maior frequência em espécies de *Pinus*, sendo fungos do gênero *Fusarium* e *Calonectria* (= *Cylindrocladium*) os mais associados nestes casos (AUER et al. 2001, KRUGNER, 1997). Na região central e sudeste do Brasil, Ferreira (1989) apud Assis, Coelho Netto e Barbosa (2007) relatou a

ocorrência de podridão de raízes de *Araucaria angustifolia* Bert. (araucária), causada por *Calonectria* (= *Cylindrocladium*) *clavatum*. Mazarotto et al. (2019) relataram *Fusarium* causando má formação e podridão de raízes de *Aspidosperma polyneuron* (peroba-rosa).

Em mudas com folhagem já desenvolvidas podem ocorrer as doenças de parte aérea, como as manchas e crestamentos foliares. Doenças desta natureza prejudicam o desenvolvimento vegetativo e reprodutivo dos hospedeiros, através da redução da área ativa para fotossíntese (DAVIDE; SILVA, 2008). Os sintomas variam de acordo com o agente etiológico, as condições ambientais e o hospedeiro. Contudo, em geral, surgem lesões circulares alongadas, às vezes circundadas por halo amarelado, que evoluem para necrose do tecido, morte parcial ou total das folhas e quedas das mesmas (DAVIDE; SILVA, 2008). Em *Pinus* e *Eucalyptus*, espécies de *Calonectria* (= *Cylindrocladium*) são os agentes mais comumente envolvidos causando manchas foliares (KRUGNER, 1997). *Botrytis cinerea*, *Quambalaria eucalypti*, *Hainesia lythri*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Pestalotiopsis* sp., *Phytophthora* sp. e *Cercospora* sp. são outros fungos que atacam partes aéreas de mudas de *Eucalyptus* em viveiro, causando manchas e lesões foliares (ALFENAS et al., 2009, DAVIDE; SILVA, 2008, KRUGNER, 1997).

Vários outros fungos podem estar associados à doenças de parte aérea. Em espécies nativas da flora brasileira, há relatos de *Sclerotium coffeicola* Bull. causando manchas foliares em *Swietenia macrophylla* King. (mogno) (ASSIS; COELHO NETTO; BARBOSA, 2007). Hanada, Gasparotto e Ferreira (2004) relataram *Pseudobeltrania cedrelae* P. Hennings causando manchas foliares em *Cedrela odorata* L. em Manaus-AM. Maciel et al., (2012) relataram que *Pestalotiopsis* sp. mostrou-se patogênico à mudas de *Schinus terebinthifolius* Raddi. (aroeira-vemelha), causando manchas foliares. Auer (2001) aponta *Corynespora cassiicola*, *Asteromidium Handroanthuse*, *Phaeoramularia Handroanthuse* causando manchas foliares em espécies de *Handroanthus* (ipês).

REFERÊNCIAS

- AGRIOS, G. N. **Doenças de plantas**. 5. ed. Elsevier Academic Press, 2005. 1051 p.
- ALFENAS, A. C.; MAFIA R. G. **Métodos em Fitopatologia**. 2. ed. Viçosa – MG: UFV, 2016. 516p.
- ALFENAS, A. C.; ZAUZA, A. A. V.; MAFIA, R. G.; ASSIS, T. F. **Clonagem e doenças do eucalipto**. 2. ed. Viçosa – MG: UFV, 2009. 442p.
- ALMEIDA, D. S.; MOREIRA, P.; FERRARI, S. L.; CERQUEIRA, L. ALMEIDA, I. Diagnóstico dos viveiros de produção e mudas nativas da mata atlântica existentes nos estados da Bahia e Espírito Santo. **Riosba ± Rede Mata Atlântica de Sementes Florestais**, 2007.
- ASSIS, L. A. G.; COELHO NETTO, R. A.; BARBOSA, A. P. Ocorrência de mancha foliar em mogno causada por *Sclerotium coffeicola* no estado do Amazonas. **Summa phytopathol.**, Botucatu , v. 33, n. 1, 2007.
- AUER, C. G.. **Doenças em Ipês: identificação e controle**. Colombo: Embrapa Florestas, 2001.
- AUER, C. G.; GRIGOLETTI JÚNIOR, A.; SANTOS, Á. F. **Doenças em Pinus: identificação e controle**. Colombo: Embrapa Florestas, 2001.
- BELLEI, A. F. Produção de mudas nativas no viveiro do parque municipal da Lagoa do Peri, Florianópolis – SC. Universidade Federal de Santa Catarina. 2013.
- BERGAMIN FILHO, A.; AMORIM, L. Manejo integrado de doenças. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. (Eds.) **Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos**. São Paulo: Agronômica Ceres, 2011.
- CAROLLO, E. M.; SANTOS FILHO, H. P. **Manual básico de técnicas fitopatológicas**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura BA, 2016.
- DAVIDE, A. C.; SILVA, E. A. A. **Produção de Sementes e Mudas de Espécies Florestais**. 1 ed. Lavras:UFLA, 2008.
- DELGADO, L. G. M. Produção de mudas nativas sob diferentes manejos hídricos. Botucatu. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2012.
- DIAS, E. S.; KALIFE, C; MENEGUCCI, Z. R. H.; SOUZA, P. R. **Produção de mudas de espécies florestais nativas: manual**. Série rede sementes do pantanal. Campo Grande: UFMS, 2006. 59 p.

EMBRAPA FLORESTAS. Plantações florestais: geração de benefícios com baixo impacto ambiental. 2015. Disponível em: < <http://acr.org.br/download/biblioteca/01.pdf>>. Acesso em: mar. 2019.

FILHO, J. Z. Mudanças: a evolução dos viveiros das empresas florestais e viveiros particulares. **Revista da Madeira**, n.118, 2009. Disponível em: <http://www.remade.com.br/br/revistadamadeira_materia.php?num=1355&subject=Mudanças&title=A%20evolu%20E3o%20dos%20viveiros%20das%20empresas%20florestais%20e%20viveiros%20particulares>. Acesso em: out. 2019.

GRIGOLETTI JÚNIOR, A.; AUER, C. G.; SANTOS, A. F. Estratégias de Manejo de Doenças em Viveiros Florestais. **Embrapa**, Circular Técnica Embrapa 47, Colombo-PR, 2001.

HANADA, R. E.; GASPAROTTO, L.; FERREIRA, A. F. Primeiro relato de mancha foliar em *Cedrela odorata* causada por *Pseudobeltrania cedrelae*. **Fitopatologia Brasileira** 30: 299-301. 2005.

KRUGNER, T. L. Controle de doenças fúngicas em viveiros de *Eucalyptus* e *Pinus*. **IPEF - Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais**, Circular Técnica 26, 1997.

LAZAROTTO, M.; MUNIZ, M. F. B.; BELTRAME, R.; SANTOS, Á. F.; MACIEL, C. G.; LONGHI, S. J. Sanidade, transmissão via semente e patogenicidade de fungos em sementes de *Cedrela fissilis* procedentes da região sul do Brasil. **Ciênc. Florest.**, Santa Maria, v. 22, n. 3, p. 493-503, Set. 2012.

LOPES, J. L. W. Produção de mudas de *Eucalyptus grandis* W. (Hill ex. Maiden) em diferentes substratos e lâminas de irrigação. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Agrônomicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2004.

MACIEL, C. G.; FERRER, T. S.; BOVOLINI, M. P.; GONZATTO, R.; MUNIZ, M. F. B.; BURIOL, G. A. Transmissão de fungos via semente e patogenicidade de *Pestalotiopsis* sp. em mudas de *Schinus terebinthifolius* Raddi. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 33, suplemento 1, p. 2767-2774, 2012.

MAFIA, R. G.; ABAD, J. I. M.; FERREIRA, M. A. Desafios e perspectivas para o controle de doenças do eucalipto. 2013. Disponível em: < https://www.researchgate.net/publication/324656888_Desafios_e_perspectivas_para_o_controle_de_doencas_do_eucalipto>. Acesso em: set. 2018.

MAFIA, R. G.; ALFENAS, A. C.; RESENDE JUNIOR, M. F. R. Tombamento de mudas de espécies florestais causado por *Sclerotium rolfsii* Sacc. **Rev. Árvore**, Viçosa, v. 31, n. 4, p. 629-634, Ago. 2007.

MAZAROTTO, E. J.; PIMENTEL, I. C.; ABREU, D. C. A.; SANTOS, A. F. Association of *Fusarium* and *Phomopsis* with Peroba Rosa Seeds. **Floresta Ambient.**, Seropédica, v. 26, n. 2, 2019.

MICHEREFF, S. J. Conceito e importância das doenças de plantas. Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2014.

MORAES, C. C.; BARRETO, E. J. C.; VIEIRA, M. D. R.; COSTA, P. S.; TITO, S. P. S.; AUGUSTO, W.; CARVALHO, A. C. M. Projetos desenvolvidos em prol da conservação da biodiversidade da Floresta Amazônica. **Revista Pensar Gestão e Administração**, v. 3, n. 2, 2015.

SILVA, A. P. M.; MARQUES, H. R.; SANTOS, T. V. M. N.; TEIXEIRA, A. M. C.; LUCIANO, M. S. F.; ROSA, R. H. Diagnóstico da Produção de Mudanças Florestais Nativas no Brasil. **Ipea**, Brasília, 2015.

VENTURA, J. A.; LIMA, I. M.; MARTINS, M. V. V.; COSTA, H. Impacto e manejo das doenças na propagação das fruteiras. **Rev. Bras. Frutic.**, Jaboticabal - SP, v. 39, p. 173-194, 2017.

WALKER, C.; ARAÚJO, M. M.; MACIEL, C. G.; MARCUZZO, S. B. Viveiro florestal: evolução tecnológica e legalização. **Revista Verde**, Mossoró –RN, v.6, n.5, p. 08-14, 2011. Edição especial.

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**, v. 26, n. 2, p. 463-473, jun. 2016.

ZANARDI, O. C., GARLET, J. Levantamento de doenças em viveiros florestal clonal no Cone Sul de Rondônia. **Enciclopédia Biosfera: Centro Científico Conhecer**, Goiânia, v.10, n.19, 2014.

CAPÍTULO I
DETECÇÃO DE FUNGOS FITOPATOGÊNICOS ASSOCIADOS À MUDAS DE
ESPÉCIES FLORESTAIS

3 CAPÍTULO I - DETECÇÃO DE FUNGOS FITOPATOGÊNICOS ASSOCIADOS À MUDAS DE ESPÉCIES FLORESTAIS

RESUMO

Os fungos fitopatogênicos são responsáveis por aproximadamente 90% das doenças bióticas que ocorrem em viveiros florestais. Geralmente causam *damping-off*, podridão de raízes e doenças foliares. A identificação precisa dos agentes causais das doenças é fundamental para os estudos da etiologia, epidemiologia, manejo e controle. Desta forma, o objetivo do presente trabalho foi detectar os principais fungos fitopatogênicos associados à mudas florestais sintomáticas do Viveiro do IFMG-SJE. Após o isolamento dos fungos em meio de cultura, a identificação dos mesmos foi realizada através da caracterização morfológica e da caracterização molecular, realizada pelo sequenciamento da região ITS rDNA (*Internal Transcribed Spacer*) utilizando os *primers* ITS1/ITS4. Foram obtidos 12 isolados de fungos a partir de 7 espécies florestais. Dos 12 isolados obtidos, 9 forneceram DNA suficiente para amplificação por PCR e então foram sequenciados, obtendo-se a identificação das seguintes associações patógeno-planta: complexo *Colletotrichum gloeosporioides* em *Dypsis lutescens*; *Colletotrichum karstii* em *Samanea tubulosa*; *Colletotrichum melonis* em *Clitoria faichildiana*; *Colletotrichum karstii* e *Diaporthe infecunda* em *Sapindus saponaria*; *Diaporthe phaseolorum* em *Vitex polygama*; *Diaporthe* sp. em *Psidium guineense* e *Pestalotiopsis maculans* em *Callistemon viminalis*. Adicionalmente, comparando o formato dos conídios e aspectos da colônia aos caracteres dos isolados que foram caracterizados molecular e morfológicamente, identificou-se um fungo do gênero *Colletotrichum* associado ao sintoma de manchas foliares em mudas de *Callistemon viminalis* e fungos do gênero *Pestalotiopsis* associados a manchas foliares em mudas de *Psidium guineense* e *Vitex polygama*. Através de buscas na literatura não foram encontrados relatos das associações patógeno-planta apontadas neste trabalho. Dessa forma, é essencial que se conclua, futuramente, os Postulados de Koch, a fim de confirmar a patogenicidade dos fungos identificados em seus respectivos hospedeiros.

Palavras-chave: Manchas Foliares. Região ITS rDNA. Caracterização Morfológica.

ABSTRACT

Phytopathogenic fungi are responsible for approximately 90% of biotic diseases that occur in forest nurseries. They can cause damping, root rot and leaf disease. Accurate identification of causal disease agents is critical for studies of etiology, epidemiology, management and control. Thus, the objective of the present work was to detect the main phytopathogenic fungi associated with symptomatic forest seedlings of IFMG-SJE Nursery. After isolation of the fungi in the culture medium, their identification was performed through morphological characterization and molecular characterization, performed by sequencing the ITS rDNA (*Internal Transcribed Spacer*) region using the ITS1/ITS4 primers. Twelve types of fungi were selected from seven forest species. Of the 12 selected, 9 provided sufficient DNA for PCR amplification and then sequenced to identify the following plant descriptions: *Colletotrichum gloeosporioides* Complex in *Dypsis lutescens*; *Colletotrichum karstii* in *Samanea tubulosa*; *Colletotrichum melonis* in *Clitoria faichildiana*; *Colletotrichum karstii* and *Diaporthe infecunda* in *Sapindus saponaria*; *Diaporthe phaseolorum* in *Vitex polygama*; *Diaporthe* sp. in *Psidium guineense* and *Pestalotiopsis maculans* in *Callistemon viminalis*. In addition, by comparing the conidia shape and colony aspects to the characteristic traits that were molecularly and morphologically characterized, a fungus of the genus *Colletotrichum* associated with the symptom of leaf drafts in *Callistemon viminalis* seedlings and fungi of the genus *Pestalotiopsis* affiliated with several foliars was identified in seedlings of *Psidium guineense* and *Vitex polygama*. Through literature searches no reports of associations related to plants and plants were found in this work. Therefore, it is essential that you complete the Koch Postulates in the future in order to confirm the pathogenicity of the identified fungi on your hosted servers.

Key words: Leaf Spot. ITS rDNA Region. Morphological Characterization.

3.1 INTRODUÇÃO

O setor florestal brasileiro vem se expandindo ao longo dos últimos anos, visando suprir, continuamente, o aumento da demanda por produtos florestais madeireiros e não-madeireiros e por serviços ambientais. Ressalvadas as condições ambientais, econômicas e científicas favoráveis à atual expansão florestal no Brasil, existem os fatores que podem limitar as perspectivas de desenvolvimento do setor, como é o caso das doenças florestais, que podem causar danos e prejuízos em todos os elos da cadeia de produção.

As doenças florestais são, em sua maioria, de causa abiótica, decorrentes de intempéries, de condições inadequadas de manejo ou da ação momentânea de fatores físicos e, ou, químicos adversos (ALFENAS et al., 2009). No entanto, a ocorrência de agentes bióticos, como vírus, nematoides, fungos e bactérias fitopatogênicas, também é comum e podem causar grandes perdas econômicas. Em condições de viveiro, os fitopatógenos podem atacar diversos órgãos da planta, incluindo folhas, caule e raízes (ALFENAS et al., 2009).

Os fungos, organismos microscópicos, aclorofilados e eucarióticos (GRIFFIN, 1994) são responsáveis por aproximadamente 90% das doenças bióticas que ocorrem em viveiros florestais (DAVIDE; SILVA, 2008). Causam doenças como o *damping-off*, a podridão de raízes, doenças foliares, morte de ponteiros, necroses de tecidos do caule (KRUGNER, 1997), ferrugens e oídios (DAVIDE; SILVA, 2008).

Assim como os viveiros de produção clonal de *Eucalyptus* e de *Pinus* evoluíram em seus processos produtivos, no que se diz respeito às práticas de prevenção e medidas de manejo integrado de doenças (ALFENAS et al., 2009), os viveiros de produção de mudas nativas, que possuem importante papel no fornecimento de mudas para projetos de conservação, restauração e recuperação de ambientes degradados, também precisam estar bem assistidos de informações que, na prática, culminem na melhoria de seu sistema produtivo visando o fornecimento de mudas com melhor qualidade fisiológica e sanitária.

O presente trabalho parte destas prerrogativas e teve como objetivo, detectar os principais fungos fitopatogênicos associados à mudas florestais sintomáticas no Viveiro do IFMG-SJE, como prerrogativa à estudos futuros para o manejo das doenças.

3.2 METODOLOGIA

3.2.1 Obtenção das amostras

As mudas avaliadas no estudo foram obtidas no Viveiro Florestal do IFMG - *campus* São João Evangelista, localizado na cidade de São João Evangelista – MG que pertence à Mesorregião do Vale do Rio Doce, Bacia do Rio Suaçuí, região centro-nordeste do Estado de Minas Gerais.

De acordo com a classificação proposta por Köppen, na região predomina o clima do tipo Cwa, temperado chuvoso-mesotérmico, caracterizado por invernos secos e verões chuvosos, precipitação média anual de 1.400 mm e temperatura média anual de 21°C, com máxima média de 27°C e mínima média de 14°C (ANTUNES, 1986).

3.2.2 Amostragem e procedimentos para diagnose

Em visitas ao Viveiro, as mudas que foram detectadas apresentando sintomas de doença biótica foram transportadas, diretamente nos tubetes de plantio, para o Laboratório de Fitopatologia do Instituto Federal de Minas Gerais – *campus* São João Evangelista (IFMG/SJE).

No laboratório, as mudas de cada espécie florestal foram fotografadas, protocoladas e, de acordo com os sintomas e, ou, sinais foliares observados em microscópio estereoscópio, definiram-se os procedimentos a serem realizados para diagnose. Sendo que, a presença de esporulação foi condição para realização de isolamento direto de fungo; enquanto que a ausência de esporulação e de exsudação de pus bacteriano serviu como direcionamento para preparo de câmara úmida e, ou isolamento indireto dos microrganismos associados ao tecido vegetal aparentemente infectado.

3.2.3 Isolamento de fungos patogênicos de tecidos foliares

Os fungos foram isolados de forma direta e, ou, indireta a partir de folhas das amostras, seguindo as metodologias propostas por Alfenas e Mafia (2016).

O isolamento direto foi realizado a partir da visualização das estruturas vegetativas ou reprodutivas do patógeno sobre o órgão infectado, com auxílio de um microscópio

estereoscópico, com a posterior transferência direta das estruturas observadas para placas de Petri, em triplicata, contendo meio de cultura BDA (batata-dextrose-ágar).

Nos casos onde não houve presença de sinais fúngicos nas amostras, foram realizados testes de exsudação em gota, a fim de verificar se a mancha foliar observada poderia estar sendo causada por infecção bacteriana. Para realização do teste de exsudação, pequenos fragmentos (0,5 x 0,5 cm) foram cortados nas margens da lesão do tecido infectado. Logo em seguida, os fragmentos foram colocados em uma lâmina microscópica sobre a qual, adicionou-se gotas de água destilada, depositando, ao final, uma lamínula (ALFENAS, MAFIA, 2016).

Quando não foi constatada a exsudação de pus bacteriano nas amostras analisadas, as mesmas foram lavadas em água corrente e incubadas em câmara úmida a 25°C, fotoperíodo de 12 horas, por um período de 24 horas, a fim de favorecer a esporulação e permitir o isolamento direto de fungos potencialmente associados.

Quando não houve presença de sinais, mesmo após a câmara úmida, o isolamento indireto foi realizado, por meio da desinfestação de fragmentos vegetais retirados da região de transição entre tecido infectado e sadio, seguida da transferência destes fragmentos para placas de Petri, em triplicata, contendo meio de cultura BDA. A desinfestação dos fragmentos foi feita seguindo a série: I. Imersão em álcool 70% por 30 segundos; II. Imersão em hipoclorito de sódio 0,1% por 3 minutos; e III. Imersão em água destilada e esterilizada por 1 minuto, três vezes.

As placas, tanto do isolamento direto quanto do isolamento indireto, foram incubadas em câmara tipo B.O.D. (*Biochemical Oxygen Demand*) a 25 °C, com fotoperíodo de 12 horas, até a formação de colônias. A fim de obter a cultura pura de cada isolado, as culturas fúngicas crescidas foram repicadas para placas com o mesmo meio de cultura utilizado para o isolamento e incubadas novamente em câmara B.O.D.

3.2.4 Identificação dos fitopatógenos associados às mudas

3.2.4.1 Amplificação por PCR e sequenciamento da região ITS rDNA

A identificação dos fungos isolados e em cultura pura foi feita através de técnicas moleculares realizadas em parceria com o Laboratório de Patologia Florestal Molecular, da Universidade Federal de Viçosa.

A extração de DNA dos fungos isolados foi feita utilizando o Kit Wizard Genomic DNA Purification[®], de acordo com as instruções do fabricante (Promega Biotecnologia, Brasil). Após a extração, a concentração do DNA de cada amostra foi quantificada pelo Programa Nanodrop2000, utilizando-se o espectrofotômetro Nanodrop[®] (Thermo Scientific) e, a partir dos resultados da quantificação, o DNA foi diluído para a concentração de 15 ng μL^{-1} .

Após o feito, as amostras foram submetidas à PCR para amplificação da região ITS rDNA (500-1000pb), utilizando os *primers forward* ITS1 (5' TTC CGT AGG TGA ACC TGC GG 3') e *reverse* ITS4 (5' TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3') (WHITE et al., 1990). A reação de PCR foi preparada para um volume final de 30 μL , contendo 2,0 μL de DNA (15 ng μL^{-1}), 1,5 μL de cada *primer* (10 mM); 15 μL de GoTaq Master Mix[®] (Promega) e 10 μL de água destilada ultrapura. As amplificações por PCR foram realizadas no Termociclador Veriti 96[®] Well Thermal Cycler, utilizando um programa que consistiu de um ciclo de desnaturação inicial a 96 °C por 1 minuto, seguido de 35 ciclos de desnaturação (96°C por 15 segundos), anelamento (50°C por 15 segundos) e extensão (60°C por 4 minutos).

O produto da PCR foi analisado em gel de agarose, que foi preparado com 1,5g de agarose e 150mL de Tris Acetato EDTA (TAE). O gel foi posteriormente corado com Brometo de Etídio (1,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e fotodocumentado no aparelho fotodocumentador tipo L.PIX (Loccus Biotecnologia).

Os mesmos *primers* utilizados para amplificação do DNA foram utilizados no sequenciamento. A região amplificada de cada amostra foi sequenciada utilizando o sequenciador modelo 3500 da Applied Biosystems.

As seqüências obtidas através do sequenciamento foram editadas pelo software Sequence Scanner 2.0 da Applied Biosystems e alinhadas pelo programa ClustalW concatenado ao software Mega 5.2 (TAMURA et al. 2011). A seqüência consenso de cada amostra foi utilizada para realizar buscas por seqüências similares depositadas no *GenBank*, utilizando o software *Basic Local Alignment Search Tool* (BLASTn) (NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION - NCBI).

3.2.4.2 Análise Bayesiana

A partir das sequências obtidas, juntamente com sequências de maior similaridade apresentadas no BLASTn (Apêndice 1), foram geradas árvores filogenéticas, empregando o método de Inferência Bayesiana, utilizando o programa MrBayes 3.1.2 (HUELSENBECK; RONQUIST, 2001). O modelo de substituição de nucleotídeos foi escolhido com base no critério de informação de Akaike (AIC) no MrModelTest 2.0 (NYLANDER, 2004), o qual compara cada modelo com todos os outros. A probabilidade *a posteriori* na distribuição de árvores foi criada usando algoritmo MCMC (*Metropolis-coupled Markov Chain Monte Carlo*) de duas cadeias iniciadas a partir de uma árvore ao acaso, com 1.000.000 de gerações executadas, sendo descartadas 25% das primeiras árvores. As árvores filogenéticas foram visualizadas e editadas no programa FigTree 1.3.1. (<http://tree.bio.ac.uk/software>) e Inkscape 0.92.4 <<https://inkscape.org/pt-br/>>.

A espécie *Cercospora fagopyri* foi escolhida como *outgroup* da análise filogenética das sequências de *Colletotrichum* spp. Enquanto que a espécie *Phoma neerlandica* foi escolhida como *outgroup* para as análises filogenéticas das sequências de *Pestalotiopsis* e *Diaporthe*.

3.2.4.3 Caracterização morfológica dos isolados

A fim de complementar as análises moleculares, realizou-se a caracterização morfológica dos isolados.

Os isolados obtidos de *Colletotrichum* foram avaliados morfológicamente a partir de lâminas de microcultivo (KERN; BLEVINS, 1999 apud SBRAVATTI JÚNIOR et al., 2013).

Para a técnica do microcultivo foram utilizadas placas de Petri esterilizadas, contendo em seu interior uma lâmina e um chumaço de algodão para cada isolado. Um cubo de meio de cultura MEYA (extrato de malte - extrato de levedura - ágar), de aproximadamente 1 cm³ foi cortado e colocado sobre a lâmina contida no interior da placa. O respectivo isolado foi repicado em todos os lados do cubo, o qual foi posteriormente coberto por uma lamínula esterilizada. O algodão no interior da placa foi umedecido com água destilada esterilizada. A placa foi lacrada e mantida em câmara B.O.D. por 7 dias a 25°C e fotoperíodo de 12 horas.

Após o tempo determinado, a lamínula foi retirada e colocada sobre outra lâmina limpa contendo uma gota de lactoglicerol (ácido láctico 85%, glicerol e água destilada, na proporção 1:2:1), sendo as bordas vedadas com esmalte.

As lâminas preparadas foram observadas em microscópio óptico, utilizando a objetiva de 40× e as estruturas observadas foram fotografadas.

Avaliou-se o tamanho de 50 conídios, por meio da medição do comprimento e da largura (PERES et al., 2002; TOZZE JÚNIOR et al., 2015; SUTTON, 1992 apud ANDRADE et al., 2007), utilizando o software Motic Images Plus 2.0.

A avaliação dos formatos dos conídios de cada isolado foi feita de acordo com a descrição de Sutton (1992) apud Tozze Júnior et al., (2015), em que o Formato 1 (F1) é reto, fusiforme, com ápices afilados; o Formato 2 (F2) é reto, oblongo, com ápices arredondados; o Formato 3 (F3) é reto, clavado, afilado em uma extremidade e redondo na outra; e o Formato 4 (F4) é reto, com constrição.

Quanto ao formato dos apressórios, os mesmos foram classificados em: i) irregular e lobado, com as margens onduladas; ii) irregular e fracamente lobado, com as margens pouco onduladas; e iii) circular e liso, com as margens sem ondulação (SUTTON, 1992 apud ANDRADE et al., 2007).

O isolado de *Pestalotiopsis* foi caracterizado morfológicamente quanto ao tamanho de 50 conídios, número e tamanho de 50 apêndices e coloração e número de células dos conídios (LAZAROTTO et al., 2014; VASIĆ et al., 2017), a partir da observação de tais estruturas em lâminas de microcultivo (KERN; BLEVINS, 1999 apud SBRAVATTI JÚNIOR et al., 2013), preparadas conforme já descrito anteriormente.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram obtidos 12 isolados de fungos associados à mudas sintomáticas de 7 espécies florestais, sendo elas: araçá-do-campo (*Psidium guineense* Sw.), palmeira-areca (*Dyopsis lutescens* (H. Wendl.) Beentje & J. Dransf.), turumã-do-cerrado (*Vitex polygama* Cham.), calisteno (*Callistemon viminalis* (Sol. ex Gaertn.), saboneteira (*Sapindus saponaria* L.), sete-cascas (*Samanea tubulosa* (Benth.) Barneby & J.W. Grimes) e sombreiro (*Clitoria fairchildiana* R.A. Howard) (Tabela 1).

Tabela 1 ± Isolados obtidos neste trabalho e respectivas espécies vegetais associadas.

Isolado/Espécie	Espécie vegetal	Coletor/Referência
IFMG1	<i>Psidium guineense</i>	R. F. Almeida
IFMG2	<i>Psidium guineense</i>	R. F. Almeida
IFMG4	<i>Dypsis lutescens</i>	R. F. Almeida
IFMG5	<i>Dypsis lutescens</i>	R. F. Almeida
IFMG6	<i>Vitex polygama</i>	R. F. Almeida
IFMG 7	<i>Vitex polygama</i>	R. F. Almeida
IGMG8	<i>Callistemon viminalis</i>	R. F. Almeida
IGMG9	<i>Callistemon viminalis</i>	R. F. Almeida
IFMG12	<i>Sapindus saponaria</i>	R. F. Almeida
IFMG13	<i>Sapindus saponaria</i>	R. F. Almeida
IFMG15	<i>Samanea tubulosa</i>	R. F. Almeida
IFMG16	<i>Clitoria fairchildiana</i>	R. F. Almeida

Fonte: o autor.

Todos os isolados foram armazenados na micoteca do Laboratório de Fitopatologia, do Instituto Federal de Minas Gerais – *campus* São João Evangelista (IFMG/SJE).

3.3.1 Sintomatologia

As mudas de araçá-do-campo (*P. guineense*), com 10 meses de idade, apresentavam sintomas de manchas foliares roxo-avermelhadas arredondadas que ganhavam coloração mais esbranquiçada e com aspecto necrótico na porção mais interna com o avanço da doença. As manchas apresentavam-se mais intensas e numerosas nas folhas mais velhas (Figura 1A, 1B). Associados a estes sintomas, por isolamento indireto, obtiveram-se os isolados IFMG1 e IFMG2.

Mudas de palmeira-areca (*Dypsis lutescens*), com 24 meses de idade, apresentavam manchas foliares pequenas, arredondadas e deprimidas, de coloração marron-escuro com bordos levemente alaranjados, que ganhavam coloração mais esbranquiçada e com aspecto necrótico na porção mais interna com o avanço da doença. Sobre as manchas surgiam massas pontuais róseo-esbranquiçadas de conídios. As mudas também apresentaram sintomas de queima nas pontas das folhas (Figura 1C, 1D, 1E). Associados a tais sintomas foram obtidos os isolados IFMG4 e IFMG5, através de isolamento direto.

As mudas de turumã-do-cerrado (*Vitex polygama*) com 26 meses de idade apresentavam manchas foliares pequenas e numerosas, arredondadas, deprimidas, de

coloração marrom e contornadas por regiões cloróticas coalescentes (Figura 1F, 1G). Por isolamento indireto foram obtidos dois isolados associados aos sintomas: o isolado IFMG6 e o IFMG7.

Mudas de calisteno (*Callistemon viminalis*), com 7 meses de idade, apresentaram manchas pequenas e numerosas, arredondadas e avermelhadas (Figura 1H, 1I, 1J). Associados a tais sintomas foram obtidos o isolado IFMG8 e o isolado IFMG9, através de isolamento indireto.



Figura 1 ± Sintomas de doenças bióticas em mudas florestais. A e B. Manchas foliares em *Psidium guineense*. C, D e E. Manchas foliares em *Dypsis lutescens* com detalhe de massa de conídios em E (seta). F e G. Manchas foliares em *Vitex polygama*. H, I e J. Manchas foliares em *Callistemon viminalis*. Fonte: o autor.

As amostras de saboneteira (*Sapindus saponaria*), com 16 meses de idade, apresentavam sintomas de manchas foliares necróticas coalescentes, irregulares, deprimidas e esbranquiçadas, com numerosas pontuações negras visíveis em microscópio estereoscópio, sendo estas as próprias estruturas reprodutivas do patógeno. As manchas apresentaram-se mais intensas nas folhas mais velhas e no bordo do limbo foliar (Figura 2L, 2M). Associados a tais sintomas, por isolamento indireto, foram obtidos os isolados IFMG12 e IFMG13.

As mudas de sete-cascas (*Samanea tubulosa*), aos 5 meses de idade, apresentavam grandes áreas cloróticas no limbo foliar, presença de manchas irregulares necróticas levemente deprimidas e com bordo de coloração marrom. Sobre as manchas foi possível observar, a olho nu, numerosas pontuações negras, sendo os locais de rompimento da epiderme e surgimento dos acérvulos, com setas visíveis em microscópio estetoscópio (Figura 2N, 2O, 2P). Associados a tais sintomas foi obtido um único isolado por isolamento direto: o isolado IFMG15.



Figura 2 ± Sintomas de doenças bióticas em mudas florestais. L e M. Manchas foliares em *Sapindus saponaria*. N, O e P. Manchas foliares em *Samanea tubulosa* com detalhe das estruturas reprodutivas e presença de setas em P. Q, R e S. Manchas foliares em *Clitoria fairchildiana*. Fonte: o autor.

As amostras de sombreiro (*Clitoria fairchildiana*), aos 12 meses de idade, apresentavam pequenas manchas foliares arredondadas, deprimidas, com coloração esbranquiçada no interior, correspondendo à massa de conídios, e bordos necróticos marrom-escuros bem definidos, com halo amarelado. Regiões de rompimento da epiderme foram visíveis ao microscópio estetoscópio (Figura 2Q, 2R, 2S). Associados a tais sintomas foi obtido um único isolado por isolamento direto: o isolado IFMG16.

3.3.2 Análises moleculares e filogenéticas

Dos 12 isolados obtidos, 9 forneceram DNA suficiente para amplificação por PCR e foram então sequenciados e identificados a nível de espécie ou complexo. Os outros 3 isolados restantes foram identificados apenas a nível de gênero, através de características morfológicas e culturais.

Na Tabela 2, a seguir, estão apresentados os resultados do BLASTn para os nove isolados que foram sequenciados.

Tabela 2 ± Espécies florestais estudadas, isolados obtidos e resultados gerados pelo BLASTn.

Espécie vegetal	Isolado	Similaridade	Espécies de Fungo
<i>Psidium guineense</i>	IFMG1	99,57%	<i>Diaporthe terebinthifolii</i> e <i>Diaporthe schini</i>
<i>Dyopsis lutescens</i>	IFMG4	100%	<i>Colletotrichum fructicola</i> e <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>
	IFMG5	99,03%	<i>Colletotrichum theobromicola</i> e <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>
<i>Vitex polygama</i>	IFMG6	100%	<i>Diaporthe phaseolorum</i>
<i>Callistemon viminalis</i>	IGMG8	100%	<i>Pestalotiopsis maculans</i> , <i>P. mangiferae</i> , <i>P. microspora</i> , <i>P. oxyanthi</i> e <i>P. clavispora</i>
<i>Sapindus saponaria</i>	IFMG12	99,20%	<i>Colletotrichum karstii</i> e <i>Colletotrichum boninense</i>
	IFMG13	100%	<i>Diaporthe infecunda</i>
<i>Samanea tubulosa</i>	IFMG15	100%	<i>Colletotrichum karstii</i> e <i>Colletotrichum boninense</i>
<i>Clitoria fairchildiana</i>	IFMG16	99,78%	<i>Colletotrichum melonis</i>

Fonte: o autor.

A análise das sequências da região ITS rDNA dos isolados IFMG1, IFMG6 e IFMG13, no BLAST, apontou similaridade entre estes e sequências de fungos do gênero *Diaporthe*. O isolado IFMG1 apresentou mesma similaridade, igual a 99,57%, com os fungos *Diaporthe terebinthifolii* e *Diaporthe schini*. O isolado IFMG6 apresentou 100% de similaridade com *Diaporthe phaseolorum* e o isolado IFMG13 apresentou 100% de similaridade com *Diaporthe infecunda*.

Os isolados IFMG4, IFMG5, IFMG12, IFMG15 e IFMG16 apresentaram similaridade com fungos do gênero *Colletotrichum*. O isolado IFMG4 apresentou 100% de

similaridade com as espécies *Colletotrichum fructicola* e *Colletotrichum gloeosporioides*. Resultados semelhantes também ocorreram entre o isolado IFMG5 e as espécies *Colletotrichum theobromicola* e *Colletotrichum gloeosporioides* e, entre os isolados IFMG12 e IFMG15 com as espécies *Colletotrichum karstii* e *Colletotrichum boninense*. O isolado IFMG16 apresentou maior similaridade com a espécie *Colletotrichum melonis*.

O isolado IFMG8, por sua vez, apresentou 100% de similaridade com as espécies *Pestalotiopsis maculans*, *Pestalotiopsis mangiferae*, *Pestalotiopsis microspora*, *Pestalotiopsis oxyanthi* e *Pestalotiopsis clavispora*.

Na Inferência Bayesiana, o melhor modelo de substituição de nucleotídeos selecionado pelo MrModeltest 2.3 para análise filogenética das sequências de *Diaporthe* spp., foi o modelo K80+I+G, com os parâmetros I= 0,4550 e G = 0,4730. A árvore filogenética construída está apresentada na Figura 3 a seguir.

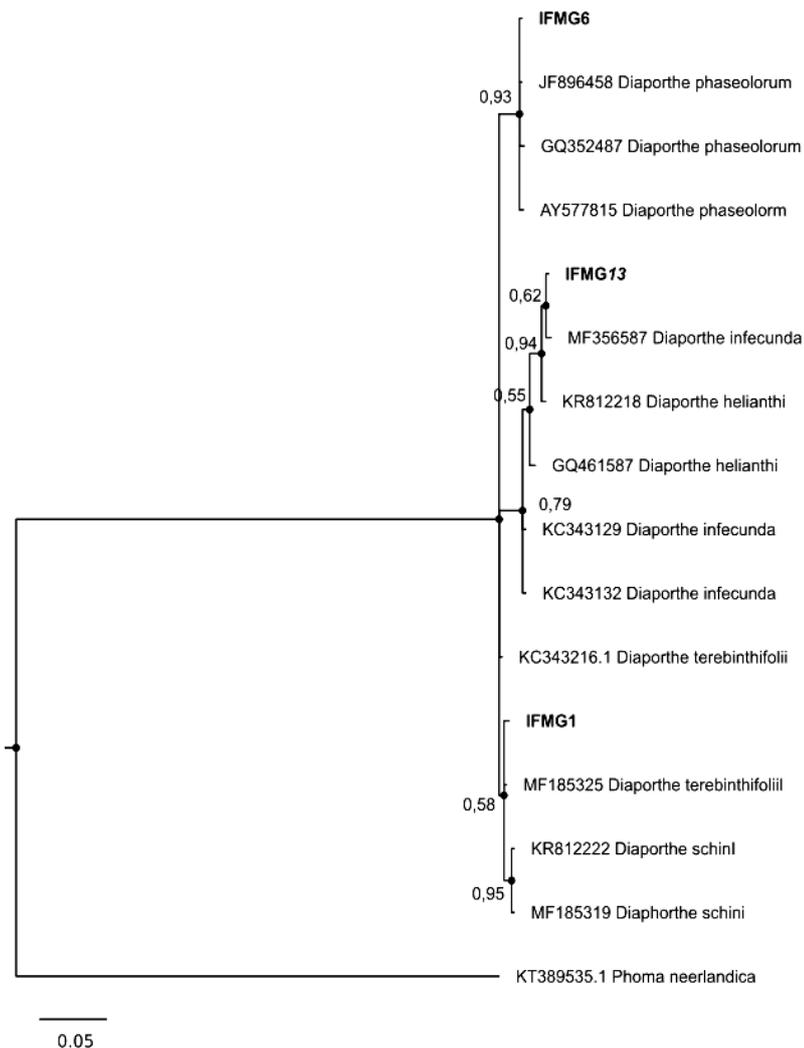


Figura 3 ± Árvore filogenética construída por Inferência Bayesiana para os isolados de *Diaporthe* spp., com base na região ITS rDNA. Fonte: o autor.

O isolado IFMG6 se agrupou no clado monofilético no qual se incluiu a espécie *D. phaseolorum*, suportado por alta probabilidade a *posteriori*, igual a 93%. O isolado IFMG13 se agrupou no clado no qual se incluiu a espécie *D. infecunda*; clado este suportado por 62% de probabilidade a *posteriori*. Já o isolado IFMG1 se agrupou no clado as quais se incluíram duas diferentes espécies de *Diaporthe*: *D. terebinthifolii* e *D. schini*, suportado por 58% de probabilidade a *posteriori*.

Para análise filogenética das sequências de *Colletotrichum* spp., o melhor modelo de substituição de nucleotídeos selecionado pelo MrModeltest 2.3. foi o SYM+G, com o parâmetros $G = 0,5122$. A árvore filogenética construída pelo método de Inferência Bayesiana, considerando as sequências de *Colletotrichum* spp. do *GenBank* e os isolados IFMG4, IFMG5, IFMG12, IFMG15 e IFMG16. está apresentada na Figura 4 a seguir.

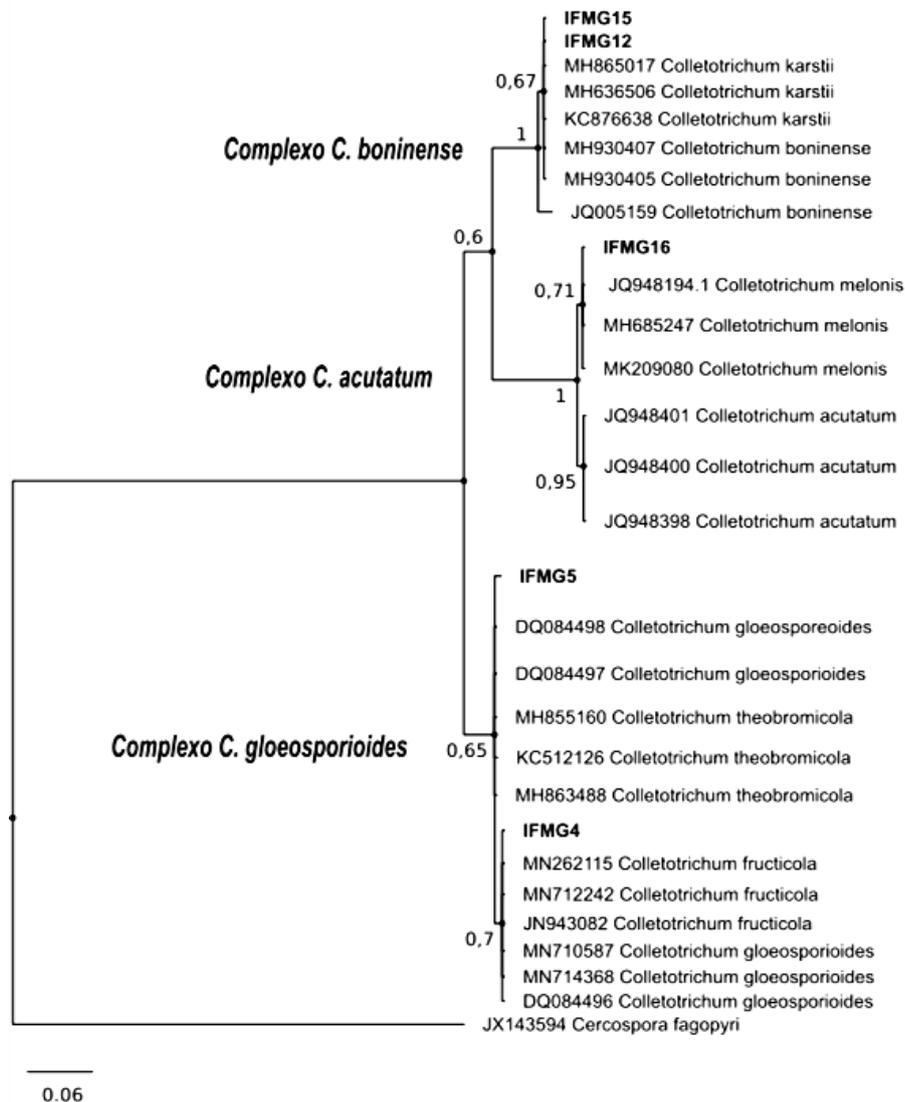


Figura 4 ± Árvore filogenética construída por Inferência Bayesiana para os isolados de *Colletotrichum* spp., com base na região ITS rDNA. Fonte: o autor.

O isolado IFMG4 se agrupou no clado as quais se incluíram as espécies *C. fructicola* e *C. gloeosporioides*, suportado por 70% de probabilidade a *posteriori*. Enquanto que o isolado IFMG5 se agrupou no clado das espécies *C. gloeosporioides* e *C. theobromicola*; clado este suportado por 65% de probabilidade a *posteriori*. Os isolados IFMG12 e IFMG15 se agruparam no clado das espécies *C. karstii* e *C. boninense*, com 67% de probabilidade a *posteriori*. E o isolado IFMG16 se agrupou no mesmo clado de *C. melonis*, suportado com 71% de probabilidade a *posteriori*.

Com base nestes resultados e tomando a classificação proposta por Damm, Cannon e Crous (2012) para fungos do gênero *Colletotrichum*, foi possível observar apenas a ocorrência de três diferentes complexos relacionados aos isolados obtidos, sendo eles: Complexo de espécies de *Colletotrichum gloeosporioides*, a qual pertence *C. gloeosporioides*, *C. fructicola* e *C. theobromicola*; Complexo de espécies de *Colletotrichum boninense*, a qual pertence *C. boninense* e *C. karstii*; e Complexo de espécies de *Colletotrichum acutatum*, a qual pertence a espécie *C. melonis*.

Analisando a árvore filogenética construída pelo método de Inferência Bayesiana considerando o isolado IFMG8 e outras sequências de *Pestalotiopsis* spp. do *GenBank* (Figura 5), foi possível observar que o isoaldo IFMG8 se agrupou no clado as quais se incluíram *P. maculans*, *P. mangiferae* e *P. clavispora*. O modelo de substituição de nucleotídeos selecionado pelo MrModeltest 2.3 para análise das sequências foi o HKY.

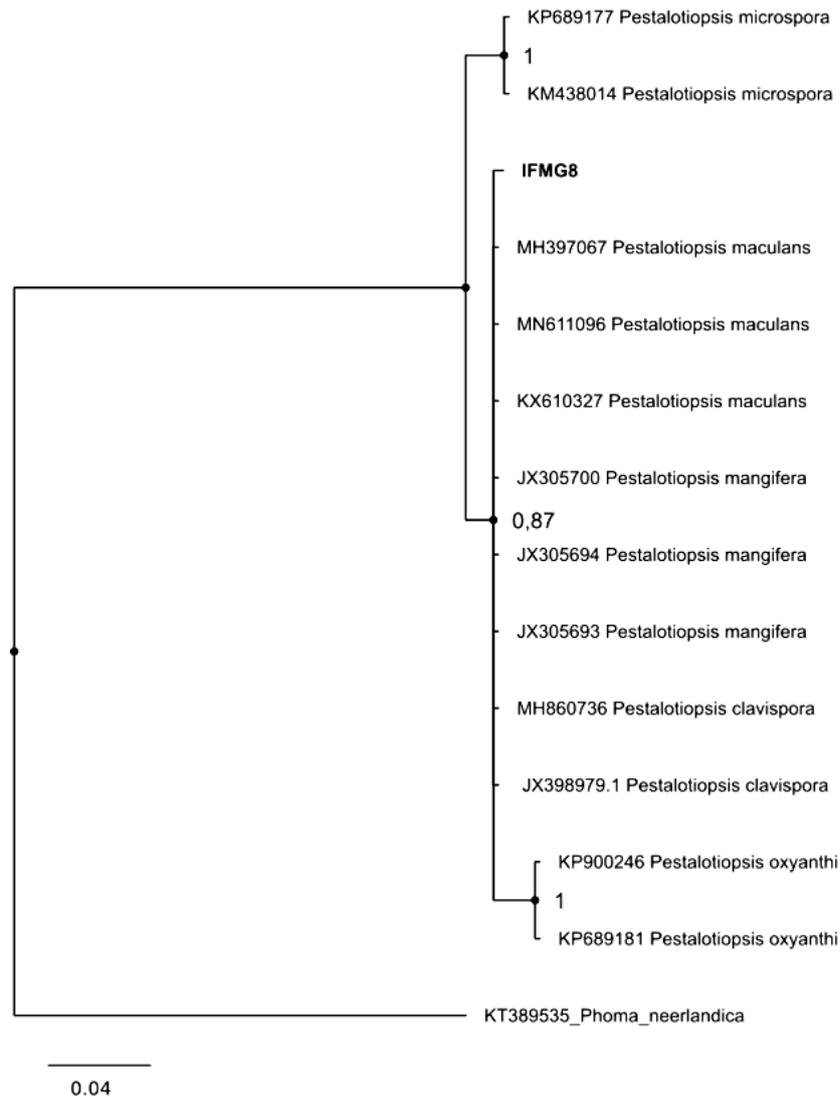


Figura 5 ± Árvore filogenética construída por Inferência Bayesiana para os isolados de *Pestalotiopsis* spp., com base na região ITS rDNA. Fonte: o autor.

A partir dos resultados obtidos, algumas considerações podem ser feitas em relação à identificação mais precisa a nível de complexo, para alguns isolados de *Colletotrichum*, e a nível de gênero, para isolados de *Diaporthe* e *Pestalotiopsis*, como foi apresentado neste estudo, em detrimento a identificação da espécie.

A região ITS do rDNA é considerada um marcador genético universal para identificação molecular de diversos organismos (CAI et al., 2009, SCHOCH et al., 2012). Geralmente, é uma região que se conserva bem intraespecificamente, mas é variável entre espécies diferentes (BRUNS; WHITE; TAYLOR, 1991). Contudo, estudos apontam que a identificação molecular, a nível de espécie, utilizando este marcador, é mais precisa para fungos do filo Basidiomycota, em detrimento a fungos do Filo Ascomycota (SCHOCH et al., 2012).

Desta forma, como todos os isolados deste trabalho foram inicialmente identificados como pertencentes a gêneros do filo Ascomycota, pode-se justificar, em parte, a menor especificidade do marcador ITS para uma definição mais precisa de qual espécie de fungo corresponde, exatamente, cada um dos isolados.

Cannon et al. (2000) apontaram que as análises filogenéticas realizadas com apenas único marcador genético, como no caso, somente a região ITS, geralmente não se mostram bem-sucedidas na definição de espécies do gênero *Colletotrichum*.

Contudo, por ser considerado marcador universal, o ITS rDNA ainda é o mais utilizado na identificação inicial de microrganismos e, conforme o caso, atua como alternativa mais viáveis para subsidiar a escolha de outros marcadores moleculares que sejam mais específicos na definição de espécies.

De acordo com Cai et al., (2009) e com Prihastuti et al. (2009), análises filogenéticas multi-gênicas, baseadas em marcadores como: Actina parcial (ACT), β -tubulina (TUB2), Calmodulina (CAL), Glutamina sintetase (GS) e Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GPDH), fornecem uma compreensão mais acurada das relações de *Colletotrichum*, e devem ser empregados sempre que possível e em conjunto com caracteres polifásicos reconhecíveis, como morfologia, fisiologia, patogenicidade, características culturais e metabólitos secundários.

Hu et al. (2007) apontam que, também para identificação de espécies de *Pestalotiopsis*, a combinação de genes marcadores proporciona uma resolução filogenética melhor, quando comparado a análises feitas considerando apenas um gene. Maharachchikumbura et al. (2013) testaram 10 regiões gênicas (Actina parcial (ACT), Calmodulina (CAL), Glicamina sintetase (GS), Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GPDH), ITS, LSU, 18S nrDNA, RNA polimerase II, TEF e TUB) buscando definir espécies de *Pestalotiopsis*. Os autores compararam os dados morfológicos com sequenciais de cada gene para estabelecer quais caracteres resolveram satisfatoriamente os limites de espécies e, ITS, TUB e TEF, demonstraram serem os melhores marcadores moleculares para tal fim. Entretanto, neste mesmo estudo, o reconhecimento de espécies filogenéticas com base nas regiões combinadas dos genes ITS, TUB e TEF forneceu clados com valores de confiabilidade ainda maior.

3.3.3 Análises morfológicas

Em relação à caracterização morfológica, os isolados de *Colletotrichum* spp. (IFMG4, IFMG12, IFMG15 e IFMG16) apresentaram conídios hialinos, unicelulares e predominantemente retos, cilíndricos, com ápices arredondados (F2), com pequenas variações em alguns isolados (Figura 6A, 6B, 6C, 6D).

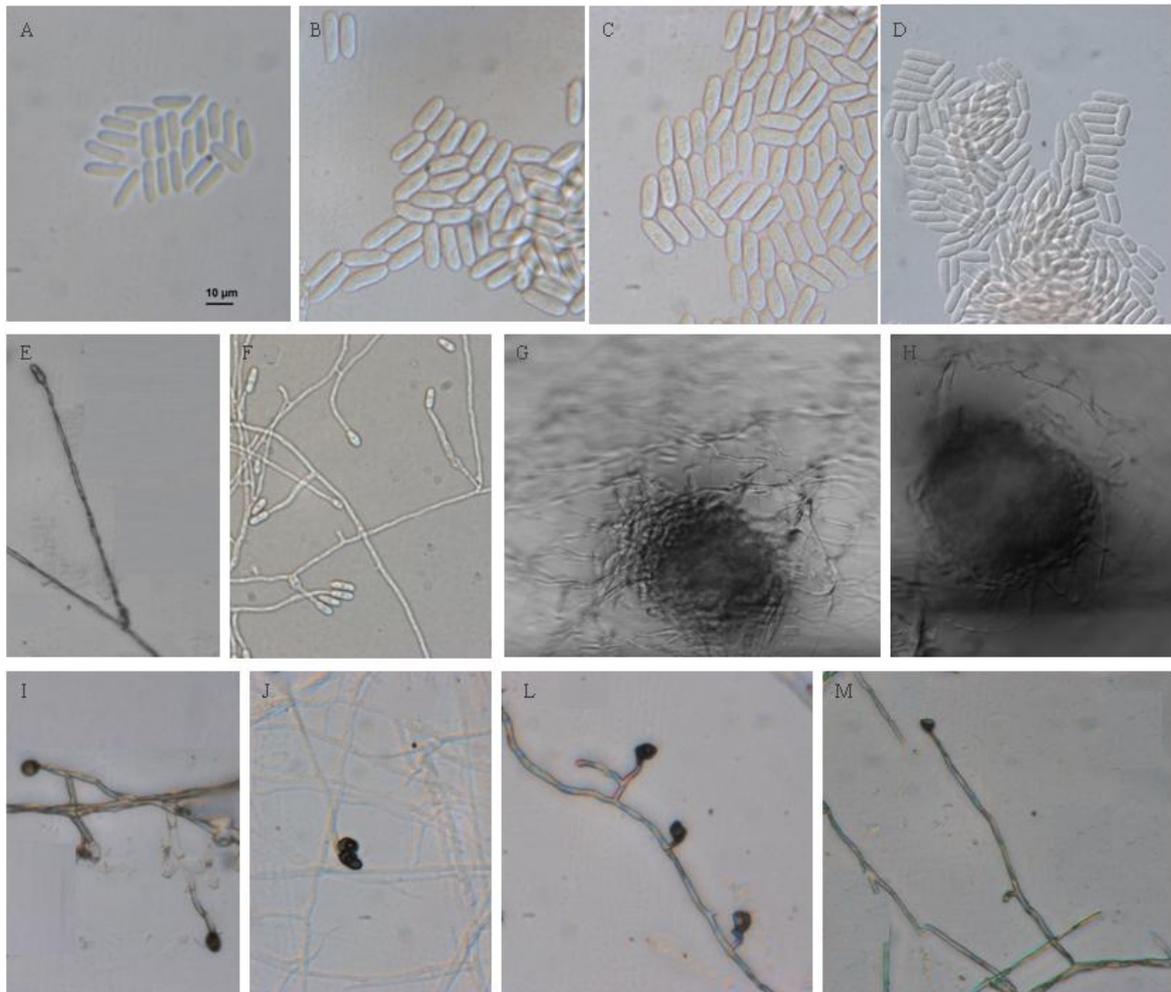


Figura 6 – Conídios, conidióforos e apressórios dos isolados de *Colletotrichum* spp. A. Conídios do isolado IFMG4. B. Conídios do isolado IFMG12. C. Conídios do isolado IFMG15. D. Conídios do isolado IFMG16. E. Conidióforo livre do isolado IFMG4. F. Conidióforo livre do isolado IFMG16. G. Formação de acérvulo do isolado IFMG12. H. Formação de acérvulo do isolado IFMG15. I. e M. Apressórios de coloração marrom-escuro de formato circular e liso dos isolados IFMG4 e IFMG16. J. e L. Apressórios de coloração marrom-escuro de formato irregular e fracamente lobado dos isolados IFMG12 e IFMG15, respectivamente. Fonte: o autor.

A mensuração do comprimento e da largura (μm) de 50 conídios de cada isolado revelou diferenças significativas em relação à largura ($p < 0,05$) (Tabela 3). Contudo, não

houve diferença entre os isolados, em relação comprimento do conídio, a 5% de significância (Tabela 4).

Tabela 3 ± Análise da largura dos conídios dos isolados de *Colletotrichum* spp.

Tratamentos	Médias
IFMG16	3.5372a
IFMG4	3.9274b
IFMG12	4.8416c
IFMG15	5.1664d
Média geral	4.3681
Erro padrão	0.0602
CV (%)	9.74

Médias acompanhadas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, segundo Teste Tukey a 5% de significância. Médias acompanhadas de letras diferentes diferem estatisticamente entre si, segundo Teste Tukey a 5% de significância. Fonte: o autor.

Tabela 4 ± Análise do comprimento dos conídios dos isolados de *Colletotrichum* spp.

Tratamentos	Médias
IFMG15	14.1279a
IFMG16	14.1828a
IFMG12	14.6586a
IFMG4	14.6689a
Média geral	14.4095
Erro padrão	0.2080
CV (%)	10.21

Médias acompanhadas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, segundo Teste Tukey a 5% de significância. Médias acompanhadas de letras diferentes diferem estatisticamente entre si, segundo Teste Tukey a 5% de significância. Fonte: o autor.

Os conídios dos isolados de *Colletotrichum* spp. variaram entre 10,92 e 22,53 μm de comprimento e entre 2,75 e 6,15 μm de largura, sendo o isolado IFMG15 o que apresentou maior largura de conídios, com valor igual a 5,17 μm e o isolado IFMG16 o que apresentou menor largura, igual a 3,54 μm .

Os isolados IFMG4 e IFMG16 apresentaram conidióforos livres nas lâminas microcultivadas (Figura 6E, 6F), enquanto que os isolados IFMG12 e IFMG15 apresentaram estruturas arredondadas semelhantes a acérvulos (Figura 6G, 6H).

Os isolados IFMG4 e IFMG16 produziram apressórios de coloração marrom-escuro, com formato circular e oval e margens lisas, sem ondulação (Figura 6I, 6M). Já os isolados IFMG12 e IFMG15 produziram apressórios de coloração marrom-escuro de formato predominantemente irregular e fracamente lobado (com as margens pouco onduladas) (Figura 6J, 6L).

A coloração das colônias de *Colletotrichum* spp., em meio de cultura BDA, aos 7 dias de cultivo e a 25°C, foi predominante branco-azinzentada na porção superior, com presença de massa de conídios de cor laranja, e pigmentação alaranjada no verso (Figura 7A, 7B, 7C, 7D, 7E, 7F).

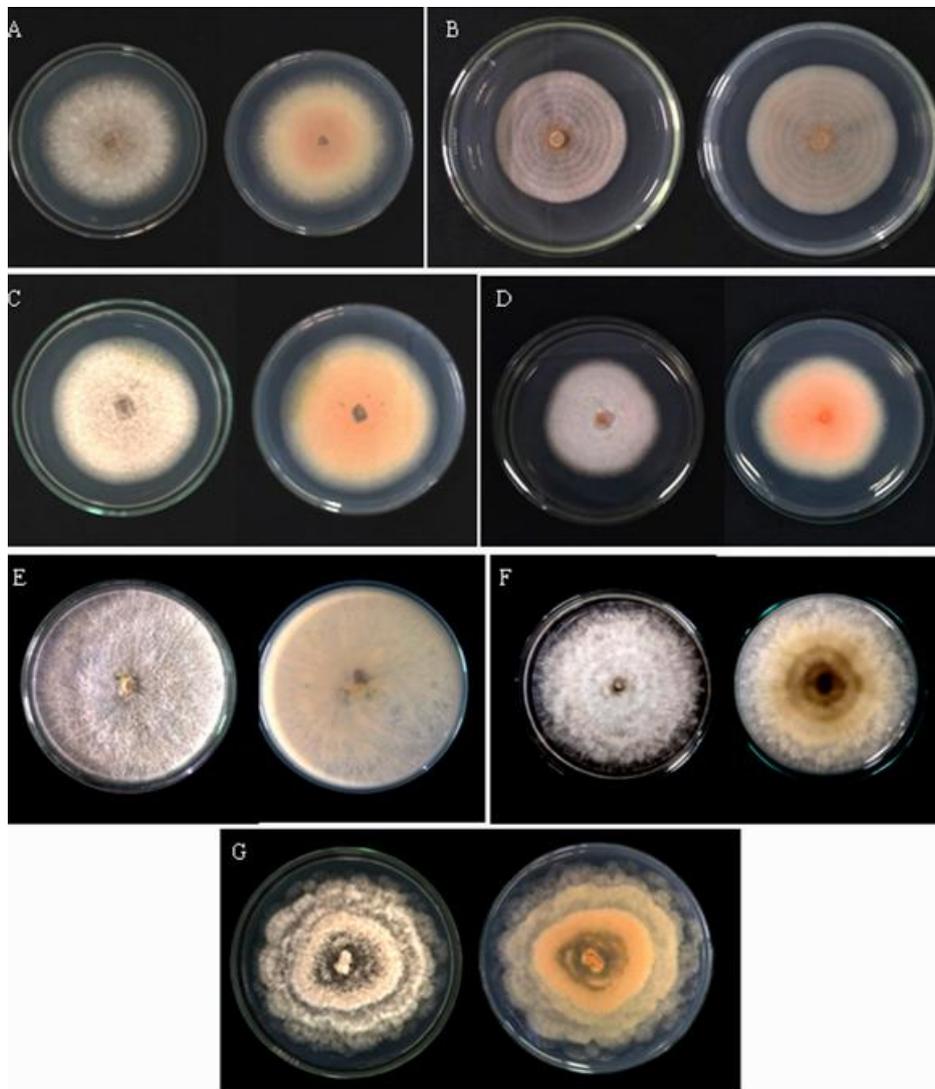


Figura 7 – Colônias dos isolados de *Colletotrichum* spp. A. Colônia do isolado IFMG4. B. Colônia do isolado IFMG12. C. Colônia do isolado IFMG15. D. Colônia do isolado IFMG16. E. Colônia do isolado IFMG6. F. Colônia do isolado IFMG13. G. Colônia do isolado IGMG8. Fonte: o autor.

O isolado IFMG8 de *Pestalotiopsis* apresentou conídios multiseptados composto de 5 células, sendo as três células medianas de coloração marrom (concolourous) e as da extremidade hialinas (Figura 8A). Os conidióforos são curtos e simples em acérvulos circulares e escuros (Figura 8B).



Figura 8 ± Conídios de *Pestalotiopsis* sp. em A. Acérvulo de *Pestalotiopsis* sp. em B. Fonte: o autor.

Os conídios do isolado IFMG8 de *Pestalotiopsis* variaram entre 22,5 e 41,3 μm de comprimento, com média e desvio padrão iguais a de 31,6 μm e 3,52 μm , respectivamente, e entre 4,5 e 7,5 μm de largura, com média de 6,4 μm e desvio de 0,69 μm . A extremidade apical do conídio apresenta dois ou três apêndices filiformes e simples variando de 13,4-26,51 μm de comprimento, com média de 18,4 μm e desvio padrão de 3,59 μm .

A colônia do isolado em meio de cultura BDA, aos 7 dias de cultivo e a 25°C, apresenta coloração micelial branca na superfície com pigmentação rósea no verso (Figura 7G), podendo ser observado massas negras pequenas e pontuais de conídios, produzidas pelos acérvulos submersos.

Não foi possível realizar a caracterização morfológica do isolado IFMG5 de *Coletotrichum* sp. e dos isolados IFMG1, IFMG6 e IFMG13 de *Diaporthe*, em razão da baixíssima taxa de crescimento no meio de cultura utilizado e no período avaliado.

Analisando os resultados da caracterização morfológica realizada neste estudo com caracterizações morfológicas apresentadas em vários trabalhos científicos publicados, observou-se que os valores dados às mesmas variáveis (formato, comprimento e largura de conídios, apressórios, apêndices, coloração de colônias, etc.) para uma mesma espécie, variam grandemente, e espécies diferentes podem apresentar características similares.

Foi o que ocorreu, por exemplo, com o isolado IFMG4, identificado molecularmente como pertencentes ao complexo de espécies de *Colletotrichum gloeosporioides*, uma vez que, tanto *C.gloeosporioides* quanto com *C.fructicola* apresentaram similaridade aos isolados que se agruparam conjuntamente nos mesmos cladogramas. Rabuske et al. (2018), no primeiro relato de *C. gloeosporioides* causando doença em *Cassia fistula*, no Brasil, descreveram os conídios do fungo como de formato fusiforme, hialino, unicelular, de 10 a 17,5 µm de comprimento e 2,5 a 5,0 µm de largura. Mafacioli et al. (2005) realizaram a caracterização morfo-fisiológica de *C. gloeosporioides* da pupunheira. Os autores descreveram que o fungo apresenta conídios hialinos e unicelulares, de formatos que variam de bastonete, elíptico à claviforme, com ápice obtuso ou arredondado e a base arredondada, podendo algumas vezes ser truncada. O tamanho dos conídios variam de 10,0 – (17,7) – 24,2 µm de comprimento e 2,5 – (3,7) – 5,0 µm de largura. Os apressórios são de formato clavado, irregular e oval e coloração castanha. Carraro et al. (2019), no primeiro relato de *C. fructicola* em caqui, no Brasil, descreveram os conídios do fungo isolado como sendo cilíndricos e hialinos, com comprimento e largura de 13,2×6,2 µm. Na caracterização morfológica feita por Costa et al. (2017), *C. fructicola* apresentou conídios cilíndricos, assépticos, hialinos, arredondados em ambas as extremidades, apresentando 10,5 a 22,5 µm de comprimento e 3,0 a 6,5 µm de largura. Os apressórios eram globosos, clavados e irregulares.

Como se pode observar, tomando como base o formato de apressório (tanto circular quanto oval) e os valores médios do comprimento e largura do isolado IFMG4, iguais a 14,67 µm e 3,93 µm, respectivamente (Tabelas 3 e 4), o mesmo se enquadraria nas descrições morfológicas tanto de *C. gloeosporioides* quanto de *C. fructicola*. Portanto, os caracteres morfológicos analisados, assim com as análises moleculares da região ITS, não foram suficientes para definir a qual espécie de *Colletotrichum* pertence o isolado IFMG8.

Lima et al. (2013) descreveram *C. karstii* causando antracnose em manga e caracterizaram a espécie com conídios hialinos, cilíndricos e assépticos, com 14,52 µm (10,40 a 20,20) de comprimento e 4,90 µm (3,80 a 6,50) de largura. Bi et al. (2016) caracterizaram *C. boninense* com conídios hialinos e elipsóides, medindo 10,2 a 14,2 × 4,8 a 6,0 µm. Freitas et al. (2011) caracterizaram a mesma espécie e também descreveram os conídios como hialinos e elipsóides, cujas dimensões estavam entre 10,0-16,0 µm de comprimento e 5,0-7,5 µm de largura.

Uma vez que os isolados IFMG12 e IFMG15 apresentaram conídios de formato cilíndrico, de dimensões médias iguais a 14,66 x 4,84 μm e 14,13 x 5,17 μm , respectivamente, pode-se inferir maior semelhança de tais isolados à *C. karstii*, com base na descrição morfológica feita por Lima et al. (2013).

A caracterização morfológica feita para o IFMG16 se assemelha à descrição de *C. melonis* isolado do caule de *Antriscus*, feita por Damm, Connon e Crous (2012): conídios hialinos, paredes lisas, assépticos, retos, cilíndricos com extreminadades que variam entre arredondadas, clavadas e fusiforme e dimensões (9–) 12–17 (–20) \times (3,5–) 4–4,5 (–5) μm , média \pm DP = 14,5 \pm 2,3 \times 4,2 \pm 0,3 μm .

Em relação à *Pestalotiopsis*, Trapero et al. (2003) caracterizaram morfológicamente *Pestalotiopsis maculans* contendo conídios lisos de 5 células, células apicais e basais hialinas e as três células medianas de coloração marron. Os conídios mediram 22 a 30 μm (comprimento médio) e 5 a 9 μm (largura média) e comumente apresentavam três apêndices apicais, com média de 17 μm de comprimento.

Chen et al. (2012) caracterizam morfológicamente *Pestalotiopsis mangiferae* contendo conídios fusiformes com cinco células, sendo as células apicais hialinas e as três células medianas marrons escuras. Os conídios variaram de 17,8 a 25,2 μm de comprimento e 6,7 a 9,2 μm de largura e apresentaram de dois a três apêndices filiformes hialinos, de 9,8 a 23,5 μm de comprimento.

Lazarotto et al. (2014) fizeram a caracterização morfológica de *Pestalotiopsis clavispora* e, segundo os autores, os conídios do fungo apresentam 5 células, possuem 30,75 μm de comprimento médio e 7,45 μm de largura média e apresentam de 2 a 3 apêndices filiformes.

Considerando que os conídios do isolado IFMG8 variaram entre 22,5 e 41,3 μm de comprimento, com média e desvio padrão iguais a de 31,6 μm e 3,52 μm , respectivamente, e entre 4,5 e 7,5 μm de largura, com média de 6,4 μm e desvio de 0,69 μm , e apresentaram apêndices medindo de 13,4–26,51 μm de comprimento, com média de 18,4 μm e desvio padrão de 3,59 μm , pode-se verificar que os valores médios do isolado IFMG8 se aproximam melhor daqueles apresentados na caracterização de *P. maculans* (TRAPERO et al., 2003).

Com base apenas no formato de conídios e aspecto da colônia em meio de cultura BDA, em comparação com os isolados que foram caracterizados molecularmente e morfológicamente, identificou-se um fungo do gênero *Colleotrichum* (IFMG9), associado

aos sintomas de manchas foliares nas mudas da espécie calisteno (*Callistemon viminalis*), e fungos do gênero *Pestalotiopsis* (IFMG2 e IFMG7), associados à manchas foliares nas mudas de araçá-do-campo (*Psidium guineense*) e turumã-do-cerrado (*Vitex polygama*), respectivamente. Entretanto, a identificação a nível molecular tende a ser mais confiável, em razão da grande variação que os aspectos morfológicos e culturais podem apresentar em condições diferentes para o mesmo organismo (CAI et al., 2009; PRIHASTUTI et al., 2009).

3.3.4 O gênero *Colletotrichum*

O gênero *Colletotrichum* engloba fungos anamórficos ou imperfeitos pertencentes ao filo *Ascomycota*, classe *Coelomycetes*, ordem *Melanconiales* e apresentam associação teleomórfica com estirpes do gênero *Glomerella* (SUTTON, 1992 apud RABUSKE, 2016).

Fungos do gênero estão distribuídos principalmente em regiões tropicais e subtropicais (SUTTON, 1992 apud HYDE et al., 2009, TOZZE JÚNIOR et al., 2015), onde encontram condições que lhes são favoráveis, como climas quentes e úmidos.

O gênero *Colletotrichum* compreende um dos mais importantes grupos de fungos fitopatogênicos do mundo, que causam a doença denominada antracnose cujo sintomas abrange manchas foliares, podridões (colmo, caules e frutos) e seca de ponteiros em diversos hospedeiros, incluindo culturas agrícolas, frutíferas, plantas medicinais e espécies florestais (banana, manga, maracujá, pêssego, abacate pimenta, morango, citrus, café, eucalipto, ficus, pequi, chuva-de-ouro) (ALFENAS et al., 2009, DAMM; CANNON; CROUS, 2012, HYDE et al., 2009, FREEMAN; KATAN; SHABI, 1998, RABUSKE, 2016; YANG et al., 2009, TOZZE JÚNIOR et al., 2015). Contudo, ainda não há relato de nenhuma doença causada por *Colletotrichum* nas espécies florestais consideradas neste trabalho, indicando que a gama de hospedeiros de fungos do gênero pode ser ainda maior.

Em condições ideais de ambiente e na presença e susceptibilidade de hospedeiros, o processo de infecção de *Colletotrichum* spp. se inicia pela germinação do conídio e adesão do apressório à superfície do hospedeiro, com posterior crescimento de hifas que podem colonizar todo o tecido do vegetal e emitir estruturas reprodutivas (RABUSKE, 2016).

Na ausência do hospedeiros as estruturas dos fungos podem permanecer viáveis por vários meses no ambiente, seja no solo, em restos de culturas, sementes, ou na própria

planta hospedeira, causando infecções latentes. Em condições favoráveis, pode-se dar início a novos ciclos da doença (SUTTON, 1992 apud RABUSKE, 2016).

As formas mais comuns de dispersão dos conídios de *Colletotrichum* são através chuva, água de irrigação, vento, insetos e ferramentas contaminadas. Porém, para que ocorra a liberação para disseminação dos conídios, é necessário que o acérvulo esteja úmido (RABUSKE, 2016).

3.3.5 O gênero *Diaporthe*

O gênero *Diaporthe*, anamorfo *Phomopsis*, pertence ao filo *Ascomycota*, classe *Sordariomycetes* e ordem *Diaporthales* (GOMES, 2012).

Gomes (2012) cita que espécies do gênero *Diaporthe* têm sido descritas como fitopatogênicas, endofíticas, saprofíticas e recentemente foi descrita causando problemas de saúde em humanos e outros mamíferos. De acordo com as citações do autor, fungos fitopatogênicos do gênero *Diaporthe* causam doenças em diversas espécies como soja, aroeira, baru, caju-do-campo, mangaba, algodão, citros, fícus, morango, pêssego, feijão, uva, cafeeiro, entre outras. Contudo, ainda não há relato de *Diaporthe* spp. causando doenças em nenhuma das espécies florestais descritas neste trabalho, a fim de suportar as associações que foram observadas.

Os fungos do gênero *Diaporthe* estão comumente associados à semente, sendo essa a principal forma de dispersão do patógeno a longas distâncias. A disseminação dentro de uma área produtiva, como nos viveiros, ocorre principalmente por restos culturais infectados (GARZONIO; MCGEE, 1983; HILDEBRAND, 1956 apud TORNEM, 2014). Os conídios e ascósporos são envoltos por matriz mucilaginosa, sendo necessária a ocorrência de chuva para a liberação, dispersão e deposição dos esporos nas plantas hospedeiras (TORNEM, 2014).

3.3.6 O gênero *Pestalotiopsis*

O gênero *Pestalotiopsis* pertence ao filo *Ascomycota* e ordem a *Xylariales* (MAHARACHCHIKUMBURA et al., 2016).

Espécies do gênero são comuns em ecossistemas tropicais e temperados (BATE-SMITH; METCALFE, 1957). Existem espécies endofíticas e, algumas destas, se destacam

por produzirem uma vasta gama de metabólitos químicos (MAHARACHCHIKUMBURA et al., 2014). Existem espécies saprofitas (HU et al., 2007) e ainda espécies que podem causar doenças de plantas (MAHARACHCHIKUMBURA et al., 2014).

As espécies fitopatogênicas de *Pestalotiopsis* causam uma variedade de doenças, incluindo lesões foliares, morte de brotações, manchas, queimas, podridões e várias doenças pós-colheita (CROUS et al., 2011). Maharachchikumbura et al. (2014) e Maciel et al. (2012) citam que espécies de *Pestalotiopsis* causam danos em aroeira-vermelha, maçã, mirtilo, côco, castanha, gengibre, vinha, goiaba, avelã, lichia, manga, orquídeas e pêssego.

A fonte do inóculo primário de *Pestalotiopsis* pode ser plantas nativas ou voluntárias (KEITH; VELASQU; ZEE, 2006), sementes, restos culturais, solo, ferramentas contaminadas e água da irrigação (SUTTON, 1980 apud SOUZA, 2017). O inóculo pode sobreviver em condições climáticas adversas por longos períodos. A disseminação do inóculo é feita, principalmente, pelo vento, insetos e respingos de chuva ou água de irrigação (ELLIOTT et al., 2004).

As condições favoráveis para o desenvolvimento das doenças causadas por *Pestalotiopsis* são alta precipitação e altas temperaturas (KEITH; VELASQU; ZEE, 2006). Nestas condições, os conídios germinam e penetram nos tecidos vegetais, por ferimentos ou por aberturas naturais, causando a infecção.

3.4 CONCLUSÕES

Através das técnicas moleculares e morfológicas empregadas e de consultas na literatura foram detectadas as seguintes associações patógeno-planta: Complexo *Colletotrichum gloeosporioides* em palmeira-areca (*Dypsis lutescens*); *Colletotrichum karstii* em sete-cascas (*Samanea tubulosa*); *Colletotrichum melonis* em sombreiro (*Clitoria faichildiana*); *Colletotrichum karstii* e *Diaporthe infecunda* em saboneteira (*Sapindus saponaria*); *Diaporthe phaseolorum* em turumã-do-cerrado (*Vitex polygama*); *Diaporthe* sp. em araçá-do-campo (*Psidium guineense*) e *Pestalotiopsis maculans* em calisteno (*Callistemon viminalis*).

Com base apenas no formato de conídios e aspecto da colônia identificou-se um fungo do gênero *Colletotrichum* (IFMG9) associado ao sintoma de manchas foliares em mudas de calisteno (*Callistemon viminalis*), além de fungos do gênero *Pestalotiopsis* (IFMG2, IFMG7) associados a manchas foliares em mudas araçá-do-campo (*Psidium*

guineense) e turumã-do-cerrado (*Vitex polygama*), respectivamente. Contudo, análises morfológicas e culturais realizadas de forma isoladas não são precisas para identificar corretamente espécies de fungos. Logo, recomenda-se realizar análises moleculares e o sequenciamento dos isolados IFMG2, IFMG7 e IFMG9, bem como análises morfológicas mais detalhadas, visando obter uma definição precisa de quais espécies de fungos se referem os isolados.

Mesmos para os isolados para os quais se empregaram técnicas moleculares de identificação (IFMG1; IFMG4; IFMG5; IFMG6; IFMG8; IFMG12; IFMG13; IFMG15; IFMG16), recomenda-se que novas avaliações sejam feitas, com o emprego de análises multigênicas, visando confirmar a identificação de cada patógeno.

Como não há relato na literatura de nenhuma das associações planta-patógeno apontadas neste trabalho, os procedimentos de inoculação e re-isolamento do fungo fitopatogênico a partir do potencial hospedeiro, precisam ser ainda realizados, como etapas posteriores à esta de detecção, dando continuidade aos Postulados de Koch, a fim de confirmar todos os patossistemas abordados.

REFERÊNCIAS

- ALFENAS, A. C.; MAFIA R. G. **Métodos em Fitopatologia**. 2. ed. Viçosa – MG: UFV, 2016. 516p.
- ALFENAS, A. C.; ZAUZA, A. A. V.; MAFIA, R. G.; ASSIS, T. F. **Clonagem e doenças do eucalipto**. 2. ed. Viçosa – MG: UFV, 2009. 442p.
- ANDRADE, E. M., UESUGI, C. H., UENO, B.; FERREIRA, M. A. S. V. Caracterização morfo-cultural e molecular de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* patogênicos ao mamoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, v. 32, 2007.
- ANTUNES, F. Z. Caracterização climática do estado de Minas Gerais. Informe Agropecuário, v. 12, p. 9-13, 1986.
- BATE-SMITH, E. C.; METCALFE, C. R.; LEUCO-ANTHOCYANINS. The nature and systematic distribution of tannins in dicotyledonous plants, **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 55, n. 362, 1957.
- BI, Y.; GUO, W.; ZHANG, G. J.; LIUE, S. C.; YANG, B. D. First Report of *Colletotrichum boninense* Causing Anthracnose of Strawberry in China. **Plant Disease**, v.102, n. 1, 2017.
- BRUNS, T. D; WHITE, T. J.; TAYLOR, J. W. Fungal Molecular Systematics. **Annual Review of Ecology and Systematics**, 1991.
- CAI, L., HYDE, K. D., TAYLOR, P. W. J., WEIR, B. S., WALLER, J., ABANG, M .M., ZHANG, J. Z., YANG, Y. L., PHOULIVONG, S., LIU, Z. Y., PRIHASTUTI, H., SHIVAS, R. G., MCKENZIE, E. H. C. AND JOHNSTON, P. R. A polyphasic approach for studying *Colletotrichum*. **Fungal Diversity**, v. 39, 2009.
- CANNON, P. F.; BRIDGE, P. D.; MONTE, E. Linking the past, present, and future of *Colletotrichum* systematics. In: *Colletotrichum: Host Specificity, Pathology, and Host Pathogen Interaction* (PRUSKY, D.; FREEMAN, S.; DICKMAN, M. B.). **APS Press**, Minnesota, USA, 2000.
- CARRARO, T. A.; LICHTENBERG, P. S. F.; MICHAELIDES, T. J.; PEREIRA, W. V.; J. FIGUEIREDO, A. G.; MAY- DE MIO, L. L. First Report of *Colletotrichum fructicola*, *C. nymphaeae*, and *C. melonis* Causing Persimmon Anthracnose in Brazil. **Plant Disease**, v. 103, n. 10, 2019.
- CHEN, F.Y.; LU, L. M.; NI, H. Z.; WANG, Y.; WANG, Y. G.; LI, G. Q. First Report of *Pestalotiopsis mangiferae* and *P. vismiae* Causing Twig Dieback of *Myrica rubra* in China. **Plant Disease**, 2012.
- COSTA, J. F. O.; R. R.SOBRINHO; T. P. CHAVES; A. R. G.SILVA; J. R. A.SILVA; D. B. PINHO; K. C. CORREIA; G. S. A. LIMA; I. P. ASSUNÇÃO. Primeiro relato de

Colletotrichum fructicola causando antracnose em folhas de *Annona* spp. no Brasil. **Summa Phytopathologica**. Botucatu, v.3, 2017.

CROUS, P. W.; SUMMERELL, B. A.; SWART, L.; DENMAN, S.; TAYLOR, J. E.; BEZUIDENHOUT, C. M.; PALM, M. E.; MARINCOWITZ, S.; GROENEWALD, J. Z. Fungal pathogens of proteaceae. **Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi**, v.27, 2011.

DAMM, U.; CANNON P. F.; CROUS, P. W. *Colletotrichum*: complex species or species complexes?. **Studies in Mycology** 73, p 1-36, 2012.

DAMM, U; CANNON, P. F.; WOUDEBERG, J.H.C.; JOHNSTON, P.R.; WEIR, B.S.; TAN, Y.P.; SHIVAS, R.G.; CROUS, P.W. The *Colletotrichum boninense* species complex, **Studies in Mycology**, v.73, 2012.

DAVIDE, A. C.; SILVA, E. A. A. **Produção de Sementes e Mudas de Espécies Florestais**. 1 ed. Lavras:UFLA, 2008.

ELLIOTT, M. L. *Pestalotiopsis (Pestalotia)*. **Diseases of Palm**, 2015. Disponível em: <<http://edis.ifas.ufl.edu/pdf/PP/PP14100.pdf>> Acesso em: dez. 2019.

FREEMAN, S.; KATAN, T.; SHABI, E. Characterization of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose diseases of various fruits. **Plant Disease**, v. 82, n. 6, 1998.

FREITAS, R. L.; ZAMBOLIM, E. M.; LELIS, D. T.; CAIXETA, E. T.; ZAMBOLIM, L. *Colletotrichum gloeosporioides* e *C. boninense* associados à antracnose do café no Brasil. In: Simpósio de Pesquisa dos cafés do Brasil (7: 2011: Araxá, MG). Anais Brasília, D.F: Embrapa - Café, 2011.

GARZONIO, D. M.; MCGEE, D. C. Comparison of seeds and crop residues as sources of fields were within 11 km of each other inoculum for pod and stem blight of soybeans. **Plant Disease**, 1983.

GOMES, R. R. Filogenia e taxonomia do gênero *Diaporthe* e a sua aplicação no controle biológico da mancha preta dos citros. Universidade Federal do Paraná, 2012.

GRIFFIN, D. **Fungal Physiology**. New York: Wiley Liss. 1994. Disponível em:< https://books.google.com.br/books?id=IBYWQaKzrFkC&printsec=frontcover&hl=pt-BR&source=gbs_ViewAPI&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false >. Acesso em: dez. 2019.

HU, H. L.; JEEWON, R.; ZHOU, D. Q.; ZHOU, T. X.; HYDE, K. D. Phylogenetic diversity of endophytic *Pestalotiopsis* species in *Pinus armandii* and *Ribes* spp.: evidence from rDNA and β - tubulin gene phylogenies. **Fungal Diversity**, 2007.

HUELSENBECK, J. P.; RONQUIST, F. MRBAYES: bayesian inference of phylogenetic trees. **Bioinformatics**, Oxford, v. 17, n. 8, p. 754–755, 2001.

HYDE; K. D.; CAI; L.; MCKENZIE; E. H. C.; YANG; Y. L.; ZHANG, J. Z.; PRIHASTUTI, H. *Colletotrichum*: a catalogue of confusion. **Fungal Diversity**, 2009.

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

KRUGNER, T. L. Controle de doenças fúngicas em viveiros de *Eucalyptus* e *Pinus*. **IPEF - Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais**. Circular Técnica 26, 1997.

LAZAROTTO, M.; BOVOLINI, M. P.; MUNIZ, M. F. B.; HARAKAWA, R.; REINIGER, L. R. S.; SANTOS, Á. F. Identification and characterization of pathogenic *Pestalotiopsis* species to pecan tree in Brazil. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v.49, n.6, p.440-448, 2014.

LIMA, N. B.; MARQUES, M. W.; MICHEREFF, S.; MORAIS, M.; BARBOSA, M.; CÂMARA, M. S. First Report of Mango Anthracnose Caused by *Colletotrichum karstii* in Brazil. **Plant Disease**. v.97, n.9, 2013.

MACIEL, C. G.; FERRER, T. S.; BOVOLINI, M. P.; GONZATTO, R.; MUNIZ, M. F. B.; BURIOL, G. A. Transmissão de fungos via semente e patogenicidade de *Pestalotiopsis* sp. em mudas de *Schinus terebinthifolius* Raddi. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 33, suplemento 1, p. 2767-2774, 2012.

MAFACIOLI, R.; TESSMANN, D. J.; SANTOS, A. F.; VIDA, J. B. Characterization morpho-physiological and pathogenicity of *Colletotrichum gloeosporioides* from peach palm. **Summa Phytopathologica**, v.32, n.2, p. 113-117, 2006.

MAHARACHCHIKUMBURA S. S. N; HYDE, K. D.; GROENEWALD, J. Z.; XU, J. J.; CROUS, P. W. *Pestalotiopsis* revisited. **Studies in Mycology**, 2014.

MAHARACHCHIKUMBURA, S. S. N.; CHUKEATIROTE, E.; GUO, L.; CROUS, PEDRO W.; MCKENZIE, E. H. C.; HYDE, K. D. *Pestalotiopsis* species associated with *Camellia sinensis* (tea). **Mycotaxon**, v. 123, p. 47-61(15), 2013.

MAHARACHCHIKUMBURA, S.; LARIGNON, P.; HYDE, K.; AL-SADI, A; LIU, Z.. Characterization of *Neopestalotiopsis*, *Pestalotiopsis* and *Truncatella* species associated with grapevine trunk diseases in France. **Phytopathologia Mediterranea**, 2016.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION – NCBI. BLAST. Disponível em: < <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>>. Acesso em: nov. 2019.

NYLANDER, J. A. A. MrModeltest 2.3. 2004.

PERES, N. A. R.; KURAMA, E. E.; DIAS, M. S. C.; SOUXA, N. L. Identification and characterization of *Colletotrichum* spp. affecting fruit after harvest in Brazil. **Phytopathology**, v. 151, 2002.

PRIHASTUTI, H.; CAI, L.; CHEN, H.; MCKENZIE, E. H. C.; HYDE, K. D. Characterization of *Colletotrichum* species associated with *coffee berries* in Chiang Mai, Thailand. **Fungal Diversity**, 2009.

RABUSKE, J. E. *Colletotrichum* sp. causando mancha foliar em *Cassia fistula* L.: patogenicidade, morfologia, caracterização molecular e controle *in vitro*. 2016. Dissertação (Mestrado), Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), 2016.

RABUSKE, J. E.; MUNIZ, M. F. B.; POLETTO, T.; WALKER, C.; BLUME, E.; KRAHN, J. R. T.; BRUN, T.; HARAKAVA, R. First report of *Colletotrichum gloeosporioides* causing anthracnose spot on *Cassia fistula* in Brazil. **Plant Disease**, v.102, n.6, pp.1172-1173, 2018.

SANTOS, J. M. Resolução do complexo de espécies de *Phomopsis* e dos seus teleomorfos Diaporthe no hospedeiro *Foeniculum vulgare*. 2008. Dissertação (Mestrado) - Centro de Recursos Microbiológicos, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade de Lisboa. 2008.

SBRAVATTI JÚNIOR, J. A.; AUER, C. G.; PIMENTEL, I. C.; SANTOS, Á. F.; SCHULTZ, B. Seleção *in vitro* de fungos endofíticos para o controle biológico de *Botrytis cinerea* em *Eucalyptus benthamii*. **Floresta**, Curitiba, PR, v. 43, n. 1, p. 145 - 152, 2013.

SCHOCH, C.; SEIFERT, K.; HUHDORF, S.; ROBERT, V.; SPOUGE, J. L.; C. LEVESQUE, A.; CHEN, W. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. **Fungal Barcoding Consortium**. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2012, 109 (16) 6241-6246.

SOUZA, L. N. Complexo Pestalotioid associado a doenças em mangueiras e goiabeiras: abordagem filogenética e patogênica. Jaboticabal, 2017. Dissertação (mestrado), Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2017.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular biology and evolution**, v. 28, n. 10, p. 2731-2739, 2011.

TORMEN, N. R.. Incidência da seca da haste da soja (*Diaporthe phaseolorum* var. *sojae*) em função do espaçamento entre linhas, cultivar e aplicação de fungicida. Brasília, 2014. Dissertação (mestrado), Programa de Pós-graduação em Fitopatologia, Universidade de Brasília, Brasília, 2014.

TOZZE JÚNIOR, H. J.; FIRMINO, A.C.; FISCHER, I. H.; FURTADO, E. L.; MASSOLA JÚNIOR, N. S. Caracterização de isolados de *Colletotrichum* spp. associados às frutíferas no Estado de São Paulo. **Summa Phytopathologica**, v.41, n.4, p.270-280, 2015.

TRAPERO-CASAS, A.; ROMERO, M.; VARO, M. R.; SÁNCHEZ, M. E. First Report of *Pestalotiopsis maculans* Causing Necrotic Leaf Spots in Nursery Plants of *Arbutus unedo* and *Ceratonia siliqua* in Spain. **Plant Disease**, v.87, p. 1263, 2013.

VASIĆ, T.; JEVREMOVIĆ, D.; KRNJAJA, V.; LEPOSAVIĆ, A.; ANDJELKOVIĆ, S., ŽIVKOVIĆ, S.; PAUNOVIĆ, S. Short communication: Morphological description and

molecular detection of *Pestalotiopsis* sp. on hazelnut in Serbia. **Spanish Journal of Agricultural Research**, v.15, 2017.

WHITE, T. J. et al. Amplification and direct sequencing of fungal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M. A. et al. (Ed.). PCR Protocols: a guide to methods and applications. **Academic Press**, New York, 1990. p.315-322.

YANG, Y. L.; LIU, Z. Y.; CAI, L.; HYDE, K. D.; YU, Z. N.; MCKENZIE, E. H. C. *Colletotrichum* anthracnose of Amaryllidaceae. **Fungal Diversity**, 2009.

CAPÍTULO II**PRIMEIRO RELATO DE *Colletotrichum karstii* EM *Samanea tubulosa* (BENTH.)****BARNEBY & J.W. GRIMES**

4 CAPÍTULO II - PRIMEIRO RELATO DE *Colletotrichum karstii* EM *Samanea tubulosa* (BENTH.) BARNEBY & J.W. GRIMES

RESUMO

A espécie *Samanea tubulosa* (Benth.) Barneby & J.W. Grimes, vulgarmente conhecida como sete-cascas, é uma Fabaceae nativa no Brasil, comumente utilizada em projetos de arborização urbana e de restauração e recuperação de áreas degradadas, é forrageira para o gado, pode ser utilizada na produção de álcool e a madeira pode ser empregada na movelaria, utilizada como mourões ou servir como lenha. O objetivo deste trabalho foi identificar o agente etiológico da mancha foliar em *S. tubulosa*. Amostras de mudas de sete-cascas com os sintomas de manchas foliares, irregulares e necróticas, levemente deprimidas e com bordo de coloração marrom, foram coletadas no Viveiro do Instituto Federal de Minas Gerais – campus São João Evangelista - MG (IFMG/SJE). Realizou-se o isolamento direto do agente etiológico a partir das folhas infectadas. Através do sequenciamento da região ITS rDNA do fungo isolado e através de análises morfológicas, o isolado, denominado IFMG15, foi identificado como *Colletotrichum karstii*. Para confirmar a patogenicidade do isolado obtido, folhas destacadas de sete-cascas foram inoculadas com e sem ferimentos, empregando-se o método de discos de micélio. Sete dias após a inoculação, os folíolos que foram feridos apresentaram manchas foliares semelhantes às observadas nas mudas sintomáticas no viveiro. A partir do reisolamento do patógeno das folhas inoculadas foi possível concluir a presença de *C. karstii*, comprovando-se a patogenicidade do fungo e completando os Postulados de Koch. Não foi constatado, até o momento, nenhum relato de doenças causadas por *Colletotrichum* em *S. tubulosa*.

Palavras-chave: Sete-cascas. Fungo. Postulados de Koch.

ABSTRACT

The species *Samanea tubulosa* (Benth.) Barneby & JW Grimes, commonly known as seven-bark, is a native Fabaceae in Brazil, commonly used in urban afforestation and restoration and restoration of degraded areas, and is forage for cattle. be used in the production of alcohol and the wood can be used in furniture making, used as posts or serve as firewood. The objective of this work was to identify the etiological agent of leaf spot in *S. tubulosa*. Samples of seven-bark seedlings with the symptoms of slightly depressed, necrotic leaf spots, slightly depressed and brown in color, were collected at the Nursery of the Federal Institute of Minas Gerais - São João Evangelista *campus* - MG (IFMG/SJE). Direct isolation of the etiological agent was performed from the infected leaves. By sequencing the ITS rDNA region of the isolated fungus and by morphological analysis, the isolate, called IFMG15, was identified as *Colletotrichum karstii*. To confirm the pathogenicity of the obtained isolate, detached leaves of seven-bark were inoculated with and without injuries, using the mycelium disc method. Seven days after inoculation, the leaflets that were injured presented leaf spots similar to those observed in the nursery symptomatic seedlings. From the pathogen reisolation of the inoculated leaves it was possible to conclude the presence of *C. karstii*, proving the pathogenicity of the fungus and completing the Koch Postulates. To date, no reports of diseases caused by *Colletotrichum* in *S.tubulosa* have been reported.

Keywords: Seven-barks. Fungus. Koch Postulates.

4.1 INTRODUÇÃO

A espécie *Samanea tubulosa* (Benth.) Barneby & J.W. Grimes, vulgarmente conhecida como sete-cascas, é uma Fabaceae (Mimosoideae) nativa no Brasil, que apresenta grande porte, podendo atingir de 4-18 metros de altura e 25-45 centímetros de diâmetro. A espécie apresentam folhas compostas bipinadas de 8-28 cm. A inflorescência é em capítulos terminais, cada um com 12-20 flores sobre pedúnculos de 4-10 cm de comprimento. Os frutos são tipo legume, séssil, indeiscente, de 10-18 cm de comprimento, com 20-30 sementes (LORENZI, 2002). O tronco é considerado ereto e cilíndrico, com casca bastante espessa (até 20 mm), sendo representativa do nome popular ‘sete-cascas’. Possui coloração castanho-clara, é áspera, muito suberosa, com fissuras longitudinais formando placas estreitas e com formato acanalado (CARVALHO, 2007, GIACHINI et al., 2010).

S.tubulosa é comumente utilizada em projetos de arborização urbana como espécie ornamental. É considerada espécie pioneira, sendo também recomendada para programas de restauração e recuperação de áreas degradadas (LORENZI, 2002). A vagem é forrageira para o gado (LORENZI, 2002) e também podem ser utilizados na produção de álcool com rendimento de, aproximadamente, de 11,5 L para cada 100 kg de frutos (CARVALHO, 2007). A madeira é considerada de alta densidade (0,78g/cm³), pesada, dura, de média resistência mecânica e moderadamente durável, podendo ser empregada na movelaria, utilizada como mourões ou servir como lenha (LORENZI, 2002).

O gênero *Colletotrichum* engloba fungos anamórficos ou imperfeitos pertencentes ao filo *Ascomycota*, classe *Coelomycetes*, ordem *Melanconiales* e apresentam associação teleomórfica com estirpes do gênero *Glomerella* (SUTTON, 1992 apud RABUSKE, 2016). O gênero compreende um dos mais importantes grupos de fungos fitopatogênicos do mundo, causando a doença conhecida como antracnose, em diversas espécies vegetais (HYDE et al., 2009, TOZZE JÚNIOR et al., 2015). Contudo, até o momento, não foram constatados relatos de nenhuma doença causada por *Colletotrichum* em *S. tubulosa*.

Em abril de 2019 foram observadas mudas de *S. tubulosa* expressando sintomas de manchas foliares irregulares e necróticas, levemente deprimidas e com bordo de coloração marrom. As mudas estavam com 5 meses de idade e pertenciam ao Viveiro do Instituto Federal de Minas Gerais – *campus* São João Evangelista (IFMG/SJE). O referido Viveiro é de pequeno porte e produz mudas florestais, predominantemente mudas seminais de

espécies pertencentes à flora nativa brasileira, com a finalidade de atender as demandas de pequenos produtores e instituições da região.

O objetivo desse trabalho foi identificar o agente etiológico da mancha foliar em *Samanea tubulosa* (sete-cascas), constatada em condições naturais do município de São João Evangelista – Minas Gerais.

4.2 METODOLOGIA

Amostras de mudas de sete-cascas com sintomas de doença foram coletadas no Viveiro do IFMG/SJE e examinadas no Laboratório de Fitopatologia da instituição, onde realizou-se o isolamento direto do agente etiológico a partir das folhas infectadas, em meio de cultura MEYA (extrato de malte-extrato de levedura-ágar) (ALFENAS; MAFIA, 2016).

A identificação do isolado em cultura pura, denominado isolado IFMG15, foi feita através do uso de técnicas moleculares realizadas em parceria com o Laboratório de Patologia Florestal Molecular, da Universidade Federal de Viçosa.

A extração de DNA foi feita utilizando o Kit Wizard Genomic DNA Purification®, de acordo com as instruções do fabricante (Promega Biotecnologia, Brasil). Após a extração, a concentração do DNA da amostra foi quantificada pelo Programa Nanodrop2000, utilizando-se o espectrofotômetro Nanodrop® (Thermo Scientific) e, a partir dos resultados da quantificação, o DNA foi diluído para a concentração de 15 ng μL^{-1} . Após o feito, a amostra foi submetida à PCR para amplificação da região ITS do rDNA (500-1000pb), utilizando os *primers forward* ITS1 (5' TTC CGT AGG TGA ACC TGC GG 3') e *reverse* ITS4 (5' TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3'). A reação de PCR foi preparada para um volume final de 30 μL , contendo 2,0 μL de DNA (15 ng μL^{-1}), 1,5 μL de cada *primer* (10 mM); 15 μL de GoTaq Master Mix® (Promega) e 10 μL de água destilada ultrapura. As amplificações por PCR foram realizadas no Termociclador Veriti 96® Well Thermal Cycler, utilizando um programa que consistiu de um ciclo de desnaturação inicial a 96 °C por 1 minuto, seguido de 35 ciclos de desnaturação (96°C por 15 segundos), anelamento (50°C por 15 segundos) e extensão (60°C por 4 minutos).

O produto da PCR foi analisado em gel de agarose, que foi preparado com 1,5g de agarose e 150mL de Tris Acetato EDTA (TAE). O gel foi posteriormente corado com Brometo de Etídio (1,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e fotodocumentado em fotodocumentador tipo L.PIX (Loccus Biotecnologia).

Os mesmos *primers* utilizados para amplificação do DNA foram utilizados no sequenciamento. A região ITS amplificada foi sequenciada utilizando o sequenciador modelo 3500 da Applied Biosystems.

A sequência obtida através do sequenciamento foi editada pelo software Sequence Scanner 2.0 da Applied Biosystems e alinhadas pelo programa ClustalW concatenado ao software Mega 5.2 (TAMURA et al., 2011). A sequência consenso da amostra foi utilizada para realizar buscas de sequências similares depositadas no *Genbank*, utilizando o software *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) (NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION - NCBI).

Para a análise filogenética, inicialmente foram feitos alinhamentos múltiplos entre a sequência obtida do isolado IFMG15 e outras sequências de *Colletotrichum* spp. depositadas no *Genbank* (Tabela 1), utilizando-se o programa CLUSTALW, concatenado ao software MEGA 5.2. As árvores filogenéticas foram construídas empregando o método de Inferência Bayesiana, utilizando o programa MrBayes 3.1.2 (HUELSENBECK; RONQUIST, 2001). O modelo de substituição de nucleotídeos foi escolhido com base no critério de informação de Akaike (AIC) no MrModelTest 2.0 (NYLANDER, 2004), o qual compara cada modelo com todos os outros. A probabilidade *a posteriori* na distribuição de árvores foi criada usando algoritmo MCMC (*Metropolis-coupled Markov Chain Monte Carlo*) de duas cadeias iniciadas a partir de uma árvore ao acaso, com 1.000.000 de gerações executadas, sendo descartadas 25% das primeiras árvores. As árvores filogenéticas foram visualizadas e editadas no programa FigTree 1.3.1. (<http://tree.bio.ac.uk/software>) e Inkscape 0.92.4 <<https://inkscape.org/pt-br/>>. A espécie *Cercospora fagopyri* foi escolhida como *outgroup*.

Tabela 1 ± Isolado de *Colletotrichum* sp. obtido de *S. tubulosa* e números de acesso de sequências similares do *Genbank*.

Isolado	Nº de Acesso no <i>Genbank</i>	Coletor/Referência
IFMG15	-	R. F. Almeida
<i>Colletotrichum fructicola</i>	MN262115.1	Wen; Zhang., 2019
	MN712242.1	Schoch et al., 2012
	JN943082.1	Qiang., 2019
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	MN710587.1	Gurung.; Bag, 2019
	MN714368.1	Bora, et al., 2019
	DQ084498.1	Maymon et al., 2006

Continua...		
	DQ084497.1	Maymon et al., 2006
	DQ084496.1	Maymon et al., 2006
<i>Colletotrichum theobromicola</i>	MH855160.1	Vu et al., 2019
	KC512126.1	Alvarez et al., 2014
	MH863488.1	Vu et al., 2019
<i>Colletotrichum karstii</i>	MH865017.1	Vu et al., 2019
	MH636506.1	Li et al., 2018
	KC876638.1	Velho et al., 2014
<i>Colletotrichum boninense</i>	MH930407.1	Leung et al., 2018
	MH930405.1	Leung et al., 2018
	JQ005159.1	Damm et al., 2012
<i>Colletotrichum melonis</i>	JQ948194.1	Damm et al., 2012
	MH685247.1	Moral et al., 2018
	MK209080.1	Carraro et al., 2018
<i>Colletotrichum acutatum</i>	JQ948401.1	Damm et al., 2012
	JQ948400.1	Damm et al., 2012
	JQ948398.1	Damm et al., 2012
	KP689181.1	Wang et al., 2016
<i>Cercospora fagopyri</i>	JX143594.1	Jama et al., 2013

Fonte: o autor.

De forma complementar às análises moleculares, a técnica do microcultivo (KERN; BLEVINS, 1999 apud SBRAVATTI JÚNIOR et al., 2013) foi utilizada para subsidiar a caracterização morfológica do isolado IFMG15. Características morfométricas como tamanho e formato de 50 conídios e formato dos apressórios foram utilizadas para a identificação do isolado (SUTTON, 1992 apud ANDRADE et al., 2007, SUTTON, 1992 apud TOZZE JÚNIOR et al., 2015).

Para confirmar a patogenicidade do isolado IFMG15, folhas destacadas sadias de sete-casas, obtidas de mudas com seis meses de idade, foram inoculadas empregando-se o método de discos de micélio (ALFENAS; MAFIA, 2016). Inicialmente, a cultura pura do fungo foi multiplicada em MEYA, cujas placas foram incubadas em câmara tipo B.O.D. (*Biochemical Oxygen Demand*) a 25 °C e fotoperíodo de 12 horas por 15 dias. A inoculação consistiu na adesão de um disco de 5 mm de diâmetro da cultura do fungo em 4 folíolos de 4 folhas completas destacadas, após ferimento dos mesmos no local de inoculação de cada disco, com auxílio de uma agulha subepidérmica esterilizada. Cada folha destacada inoculada foi individualmente acondicionada sobre a grade de caixas gerbox estéreis e forradas com papel estéril previamente umedecidas com água destilada esterilizada. Os pecíolos de cada folha foram envoltos por um chumaço de algodão embebido em água

destilada esterilizada. As caixas foram incubadas em câmara tipo B.O.D., com fotoperíodo de 12 horas, a 25 °C. O mesmo método de inoculação também foi empregado em folhas destacadas sem ferimento, na porção abaxial e abaxial, com o mesmo número de repetições para cada caso. Quatro folhas destacadas sadias submetidas às mesmas condições, porém tratadas com discos de MEYA estéreis, serviram como testemunhas.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os sintomas observados nas mudas de sete-cascas do Viveiro do IFMG/SJE consistiam de grandes áreas cloróticas no limbo foliar com formação de manchas irregulares necróticas, levemente deprimidas e com bordo de coloração marrom (Figura 1). Sobre as manchas foi possível observar, a olho nu, numerosas pontuações negras, com setas visíveis em microscópio óptico (Figura 2A e 2B).



Figura 1 – Manchas foliares em *Samanea tubulosa*. Fonte: o autor.

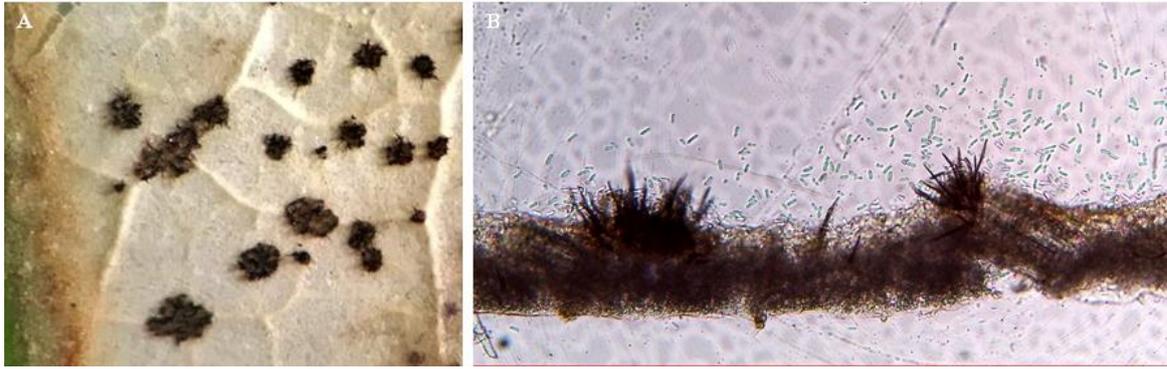


Figura 2 ± Pontuações negras (A) sobre manchas foliares em *Samanea tubulosa* e setas (B) visíveis em corte anatômico transversal do limbo foliar, observadas em microscópio óptico (10x). Fonte: o autor.

A colônia do fungo isolado apresentou coloração róseo-esbranquiçada na porção superficial, com pigmentação alaranjada mais intensa no verso, após 7 dias de cultivo a 25°C e fotoperíodo de 12 horas (Figura 3A e 3B). Os apressórios são de coloração marrom-escuros, de formato irregular e fracamente lobados (Figura 3C). Os conídios são hialinos, asseptados, retos e predominantemente cilíndricos com extremidades arredondadas (Figura 3D). As dimensões dos conídios variaram de 11,5- (14,1) -15,8 μm de comprimento e 3,5 - (5,2)-6,2 μm de largura, com desvio padrão de 0,98 μm e 0,45 μm , respectivamente. A relação comprimento/largura foi igual a 3,76. A descrição é semelhante à realizada por Lima et al. (2013) no primeiro relato de *Colletotrichum karstii* causando antracnose em manga.

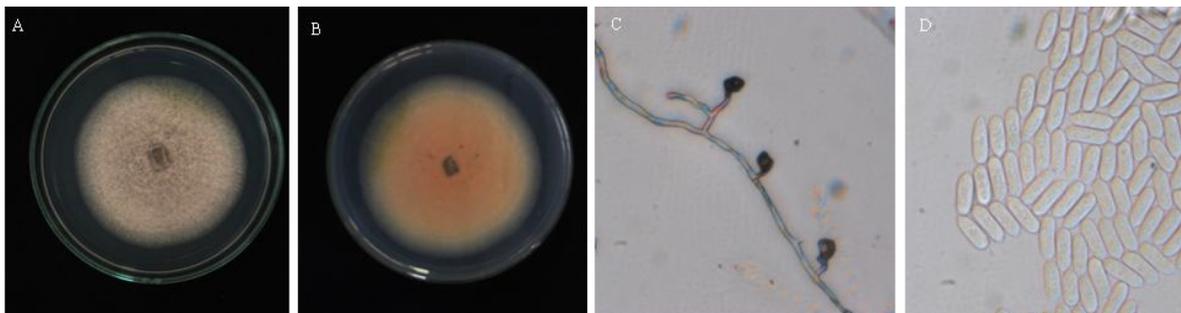


Figura 3 ± Colônia, apressórios e conídios do isolado de IFMG15. A e B Colônia do fungo em MEYA. C. Apressórios de formato irregular e fracamente lobados. D. Conídios hialinos, asseptados, retos e predominantemente cilíndricos. Fonte: o autor.

Pela análise filogenética, o isolado IFMG15 se agrupou no clado das espécies *Colletotrichum karstii* e *Colletotrichum boninense*, com 70% de probabilidade a *posteriori*, indicando apenas, por esta análise, estar relacionado ao Complexo de Espécies de *Colletotrichum boninense* (Figura 4).

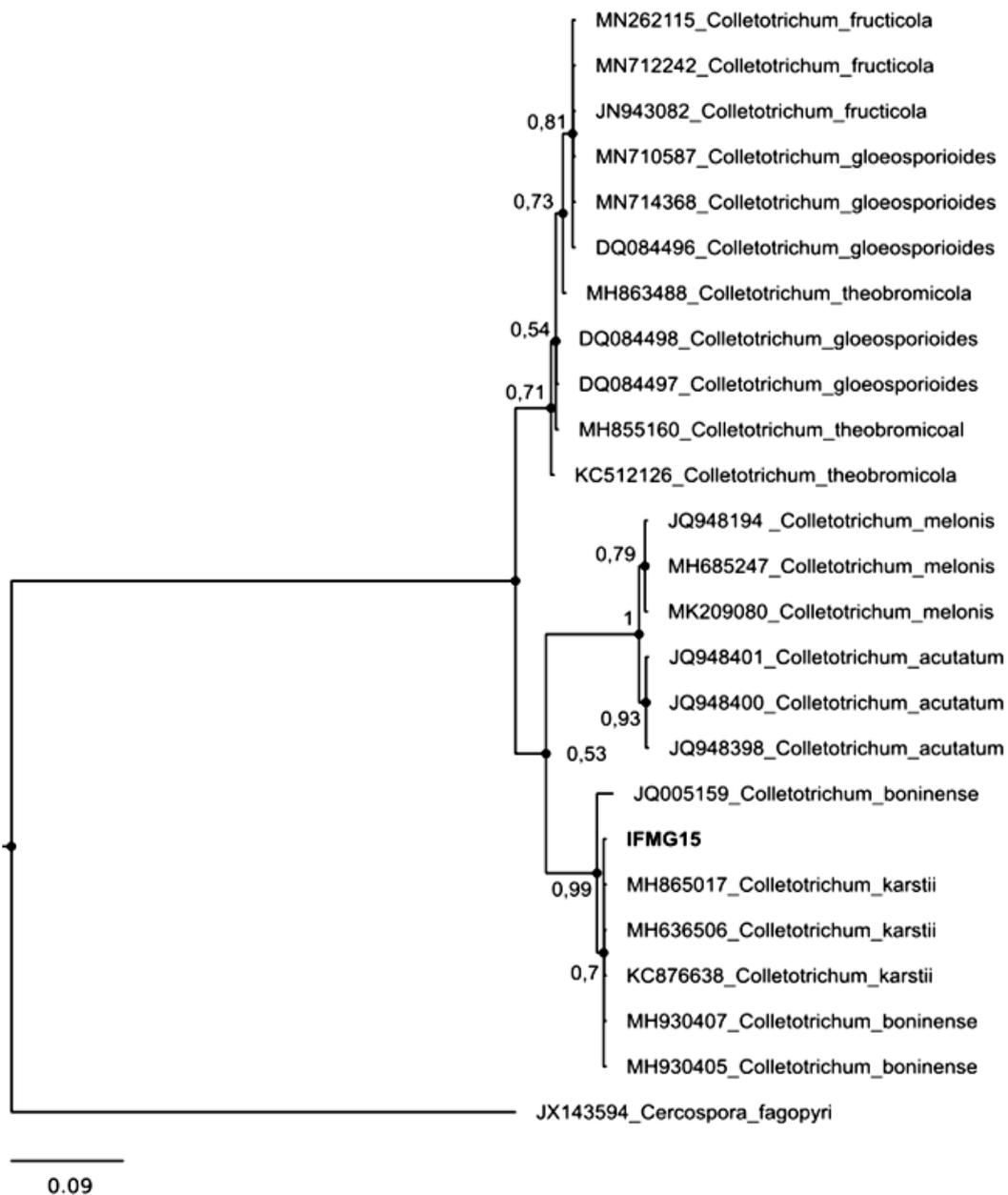


Figura 4 ± Árvore filogenética construída por Inferência Bayesiana considerando o isolado IFMG15 e outras sequências de *Colletotrichum* spp. do *GenBank*, com base no sequenciamento da região ITS rDNA. Fonte: o autor.

Avaliando a análise filogenética em conjunto com a caracterização morfológica realizadas, pode-se concluir que o isolado IFMG15 em consideração, apresenta maior similaridade com *C. karstii*.

Em relação ao teste de patogenicidade, os sintomas de antracnose (Figura 5A e 5B) foram observados somente nos folíolos em que se realizaram os ferimentos, em todas as folhas inoculadas, surgindo a partir de sete dias após a inoculação. Os folíolos sem ferimento e as testemunhas permaneceram assintomáticos (Figura 5C e 5D). Alguns dos

folíolos apresentaram somente necroses pontuais, devido aos ferimentos realizados. Contudo, nenhuma colônia fúngica cresceu a partir de fragmentos destas regiões incubados em meio de cultura MEYA.

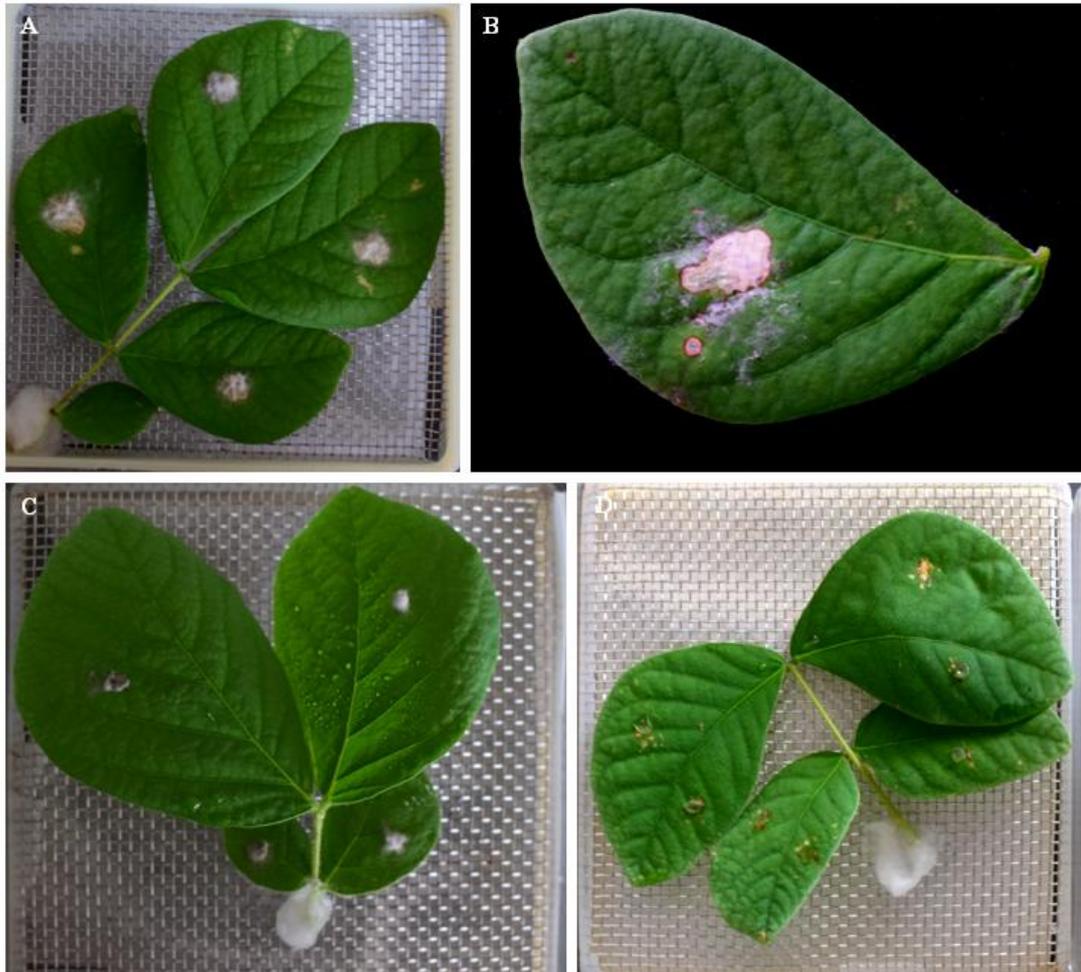


Figura 5 ± Resultados do teste de inoculação com discos de micélios em folhas destacadas de *Samanea tubulosa* (sete-cascas). A e B. Sintomas de antracnose causada por *Colletrotrichum karstii* nos folíolos (com ferimento) inoculados. C. Folíolos (sem ferimento) assintomáticos inoculados com *Colletrotrichum karstii*. D. Testemunhas sem sintomas de antracnose. Fonte: o autor.

O reisolamento de *C. karstii*, a partir dos sintomas nos folíolos (com ferimento) infectados, comprovou os postulados de Koch, confirmando-se assim a hipótese de que esse fungo é o agente causal da antracnose de sete-cascas.

No Brasil há relatos de *C. karstii* causando doença em pitaya (*Hylocereus undatus*) (NASCIMENTO et al., 2019); graviola (*Annona muricata*) (BELISÁRIO; BORGES; FURTADO, 2018); manga (*Mangifera indica* L.); mirtilo (*Vaccinium* sp.) (RIOS et al., 2014); e maçã (*Malus domestica* Borkh.) (VELHO et al., 2013).

No entanto, não há relatos do gênero *Colletotrichum* em *S. tubulosa*. Desta forma, consideramos que este trabalho representa o primeiro relato de antracnose cuasada por *C. karstii* em *S. tubulosa* (sete-cascas).

4.4 CONCLUSÕES

Análises moleculares empregando a região ITS do rDNA e análises morfológicas, em conjunto com a realização dos postulados de Kock, comprovaram que a antracnose presente em mudas de *Samanea tubulosa* (sete-cascas) é causada por *Colletotrichum karstii*. Este é o primeiro relato da doença na espécie *S. tubulosa*.

REFERÊNCIAS

- LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil**. 2. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002. v. 2, 368 p.
- CARVALHO, P. E. R. Bordão-de-Velho, *Samanea tubulosa*. Embrapa, Circular Técnica 132, 2007.
- GIACHINI, R. M.; LOBO, F.A.; ALBUQUERQUE, M. C. F.; ORTIZ, C. E. R. Influência da escarificação e da temperatura sobre a germinação de sementes de *Samanea tubulosa* (Benth.) Barneby & J.W. Grimes (sete cascas). **Acta Amaz.**, Manaus, v. 40, n. 1, p. 75-80, 2010.
- HYDE; K. D.; CAI; L.; MCKENZIE; E. H. C.; YANG; Y. L.; ZHANG, J. Z.; PRIHASTUTI, H. *Colletotrichum*: a catalogue of confusion. **Fungal Diversity**, 2009.
- RABUSKE, J. E. *Colletotrichum* sp. causando mancha foliar em *Cassia fistula* L.: patogenicidade, morfologia, caracterização molecular e controle *in vitro*. 2016. Dissertação (Mestrado), Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), 2016.
- TOZZE JÚNIOR, H. J.; FIRMINO, A.C.; FISCHER, I. H.; FURTADO, E. L.; MASSOLA JÚNIOR, N. S. Caracterização de isolados de *Colletotrichum* spp. associados às frutíferas no Estado de São Paulo. **Summa Phytopathologica**, v.41, n.4, p.270-280, 2015.
- ALFENAS, A. C.; MAFIA R. G. **Métodos em Fitopatologia**. 2. ed. Viçosa – MG: UFV, 2016. 516p.
- NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION – NCBI. BLAST. Disponível em: < <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> >. Acesso em: nov. 2019.
- NYLANDER, J. A. A. MrModeltest 2.3. 2004.
- TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular biology and evolution**, v. 28, n. 10, p. 2731-2739, 2011.
- SBRAVATTI JÚNIOR, J. A.; AUER, C. G.; PIMENTEL, I. C.; SANTOS, Á. F.; SCHULTZ, B. Seleção *in vitro* de fungos endofíticos para o controle biológico de *Botrytis cinerea* em *Eucalyptus benthamii*. **Floresta**, Curitiba, PR, v. 43, n. 1, p. 145 - 152, 2013.
- ANDRADE, E. M., UESUGI, C. H., UENO, B.; FERREIRA, M. A. S. V. Caracterização morfocultural e molecular de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* patogênicos ao mamoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, v. 32, 2007.

BELISÁRIO, R.; BORGES, L. S.; FURTADO, G. Q. First Report of *Colletotrichum karstii* Causing Anthracnose on *Annona muricata* in Brazil. **Plant Disease**, v.102, n.11, 2018.

NASCIMENTO, M.; BELLÉ, C.; AZAMBUJA, R.; MAICH, S.; NEVES, C.; JUNIOR, I.; FARIAS, C.; BARROS, D.. First Report of *Colletotrichum karstii* causing anthracnose spot on pitaya (*Hylocereus undatus*) in Brazil. **Plant Disease**, vol. 103, n. 8, 2019.

RIOS, J.; PINHO, D.; MOREIRA, W.; PEREIRA, O.; RODRIGUES, F. First Report of *Colletotrichum karstii* Causing Anthracnose on *Blueberry* Leaves in Brazil. **Plant Disease**, v.99, n.1, 2014.

VELHO, A. C.; STADNIK, M. J.; CASANOVA, L.; MONDINO, P.; ALANIZ, S. First Report of *Colletotrichum karstii* Causing Glomerella Leaf Spot on Apple in Santa Catarina State, Brazil. **Plant Disease**, v.98, n.1, 2014.

HUELSENBECK, J. P.; RONQUIST, F. MRBAYES: bayesian inference of phylogenetic trees. **Bioinformatics**, Oxford, v. 17, n. 8, p. 754–755, 2001.

APÊNDICE

Tabela ± Isolados obtidos e sequências do *GenBank* utilizadas nas análises filogenéticas.

Isolado/Espécie	Hospedeiro vegetal	Acesso no <i>Genbank</i>	Coletor/Referência
IFMG1	<i>Psidium guineense</i>	-	R. F. Almeida
IFMG2	<i>Psidium guineense</i>	-	R. F. Almeida
IFMG4	<i>Dyopsis lutescens</i>	-	R. F. Almeida
IFMG5	<i>Dyopsis lutescens</i>	-	R. F. Almeida
IFMG6	<i>Vitex polygama</i>	-	R. F. Almeida
IFMG 7	<i>Vitex polygama</i>	-	R. F. Almeida
IGMG8	<i>Callistemon viminalis</i>	-	R. F. Almeida
IFMG9	<i>Callistemon viminalis</i>	-	R. F. Almeida
IFMG12	<i>Sapindus saponaria</i>	-	R. F. Almeida
IFMG13	<i>Sapindus saponaria</i>	-	R. F. Almeida
IFMG15	<i>Samanea tubulosa</i>	-	R. F. Almeida
IFMG16	<i>Clitoria fairchildiana</i>	-	R. F. Almeida
<i>Colletotrichum fructicola</i>	-	MN262115.1	Wen; Zhang., 2019
	-	MN712242.1	Schoch et al., 2012
	-	JN943082.1	Qiang., 2019
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	-	MN710587.1	Gurung.; Bag, 2019
	-	MN714368.1	Bora, et al., 2019
	-	DQ084498.1	Maymon et al., 2006
	-	DQ084497.1	Maymon et al., 2006
	-	DQ084496.1	Maymon et al., 2006
<i>Colletotrichum theobromicola</i>	-	MH855160.1	Vu et al., 2019
	-	KC512126.1	Alvarez et al., 2014
	-	MH863488.1	Vu et al., 2019
<i>Colletotrichum karstii</i>	-	MH865017.1	Vu et al., 2019
	-	MH636506.1	Li et al., 2018
	-	KC876638.1	Velho et al., 2014
<i>Colletotrichum boninense</i>	-	MH930407.1	Leung et al., 2018
	-	MH930405.1	Leung et al., 2018
	-	JQ005159.1	Damm et al., 2012
<i>Colletotrichum melonis</i>	-	JQ948194.1	Damm et al., 2012
	-	MH685247.1	Moral et al., 2018
	-	MK209080.1	Carraro et al., 2018
<i>Colletotrichum acutatum</i>	-	JQ948401.1	Damm et al., 2012
	-	JQ948400.1	Damm et al., 2012
	-	JQ948398.1	Damm et al., 2012
Continua...			

Continua...			
<i>Diaporthe schini</i>	-	KR812222.1	Reis et al., 2015
	-	MF185319.2	Davila; Chaves-Acuna; Yanez, 2018
<i>Diaporthe terebinthifolii</i>	-	MF185325.2	Davila; Chaves-Acuna; Yanez, 2018
	-	KC343216.1	Gomes et al., 2013
<i>Diaporthe phaseolorum</i>		JF896458.1	Iriart et al., 2011
	-	GQ352487.1	Sim et al., 2010
	-	AY577815.1	Schwarz et al., 2004
<i>Diaporthe infecunda</i>	-	MF356587.1	Zhao et al, 2018
	-	KC343129.1	Zhao et al, 2018
	-	KC343132.1	Gomes et al., 2013
<i>Diaporthe helianthi</i>	-	KR812218.1	Reis et al., 2015
	-	GQ461587.1	Rhoden, et al., 2012
<i>Pestalotiopsis maculans</i>	-	MH397067.1	Hamzah et al., 2018
	-	MN611096.1	Choi; Park; Eom, 2019
	-	KX610327.1	Gomez-Cornelio et al., 2016
<i>Pestalotiopsis mangiferae</i>	-	JX305700.1	Chen et al., 2013
	-	JX305694.1	Chen et al., 2012
	-	JX305693.1	Chen et al., 2013
<i>Pestalotiopsis microspora</i>	-	KP689177.1	Wang et al.2016
	-	KM438014.1	Najiah et al., 2014
<i>Pestalotiopsis clavispora</i>	-	MH860736.1	Vu et al., 2017
	-	JX398979.1	Wu et al., 2012
<i>Pestalotiopsis oxyanthi</i>	-	KP900246.1	Wang et al., 2016
	-	KP689181.1	Wang et al., 2016
<i>Cercospora fagopyri</i>	-	JX143594.1	Jama et al., 2013
<i>Phoma neerlandica</i>	-	KT389535.1	Chen et al., 2015

Fonte: o autor.