



GABRIEL DA SILVA MIGUEL

**A “SÍNDROME DO AMARELÃO” DO TABACO:
CONTRIBUIÇÃO SOBRE A ETIOLOGIA E A
SINTOMATOLOGIA**

LAVRAS – MG

2022

GABRIEL DA SILVA MIGUEL

**A “SINDROME DO AMARELÃO” NO TABACO: CONTRIBUIÇÃO SOBRE A
ETIOLOGIA E A SINTOMATOLOGIA**

Monografia apresentada à
Universidade Federal de Lavras,
como parte das exigências do
Curso de Agronomia, para a
obtenção do título de Bacharel.

Prof. Dr. Ludwig H. Pfenning

Orientador

MSc. Janaina Martins de Souza

Coorientadora

LAVRAS – MG

2022

Miguel, Gabriel da Silva.

A "síndrome do amarelão" do tabaco: contribuição sobre a
etiologia e sintomatologia / Gabriel da Silva Miguel. - 2022.

34 p.: il.

Orientador: Ludwig H. Pfenning.

Coorientadora: Janaina Martins de Sousa.

Monografia (graduação) - Universidade Federal de Lavras,
2022.

Bibliografia.

1. Tabaco. 2. Etiologia e sintomatologia. 3. Fungos. I.
Pfenning, Ludwig H. II. Sousa, Janaina Martins de. III. Título.

GABRIEL DA SILVA MIGUEL

**A “SINDROME DO AMARELÃO” NO TABACO: CONTRIBUIÇÃO SOBRE A
ETIOLOGIA E A SINTOMATOLOGIA**

Monografia apresentada à
Universidade Federal de Lavras,
como parte das exigências do
Curso de Agronomia, para a
obtenção do título de Bacharel.

Aprovado em 20 de abril de 2022.

Dra. Deila Magna dos Santos Botelho

UFLA

Prof. Dr. José Maria Villela Pádua

UFLA

Prof. Dr. Ludwig H. Pfenning

UFLA

Prof. Dr. Ludwig H. Pfenning

Orientador

MSc. Janaina Martins de Sousa

Coorientadora

LAVRAS – MG

2022

Aos meus pais, Darlene e Ari

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por ter me fornecido o discernimento e sabedoria suficientes para que esse trabalho fosse concluído.

Aos meus pais, Darlene e Ari, que dentro da realidade, me fizeram sorrir e me deram forças e apoio quando ninguém mais podia oferecer. Essa conquista é para vocês e por vocês, espero que com o mesmo amor e carinho, eu possa devolver um centésimo do que vocês me ofereceram.

Ao professor Ludwig H. Pfenning, pela orientação, auxílio, amizade e paciência, pelas conversas e pela disposição de compartilhar comigo um pouco de seus conhecimentos.

À Marileide, que mais que uma amiga, foi uma irmã e uma professora, me ensinando tudo o que podia com tamanha paciência.

À Cristina, pelos puxões de orelha e por todo o carinho materno oferecido.

À Janaína pela coorientação, pela amizade dentro e fora das paredes do laboratório, pelas experiências que compartilhamos e construímos juntos e pelas conversas e debates que tivemos ao longo desses anos.

Ao Professor José Maria Villela Pádua, pela colaboração na execução do trabalho.

À Dra. Lucimara, da empresa Souza Cruz, pelo envio de amostras e assistência nas etapas iniciais desse estudo.

Aos membros da banca examinadora, pela disponibilidade e atenção.

Aos colegas que passaram e passam pelo Laboratório de Sistemática e Ecologia de Fungos nesses anos em que compartilhamos um caminho e ideias, agradeço pelos risos e a descontração quando esses se faziam necessários.

Aos meus amigos e irmãos, por terem seguido e acompanhado essa caminhada comigo.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudos.

À UFLA, pela educação de qualidade que me foi oferecida

Agradeço a todos que me auxiliaram de alguma forma.

Os sabores que me ofereceram foram mais do que necessários para que chegássemos aqui!

Resumo

O Brasil é o maior exportador e o segundo maior produtor de tabaco. Produtores relatam a ocorrência e a importância de uma síndrome conhecida como murcha, mela ou amarelão do tabaco, causada por espécies de *Fusarium*. A doença afeta tanto mudas quanto plantas adultas. Os sintomas são amarelecimento lento e bronzeamento das folhas, sendo também relatado podridão das raízes, causando clorose e murcha das folhas a partir da região mais baixa da planta até o topo, e levando a morte dos tecidos. Os objetivos desse estudo foram (i.) isolar e identificar as espécies de *Fusarium* associadas ao tabaco com sintomas de amarelão, (ii.) estabelecer um protocolo de teste de patogenicidade e (iii.) caracterizar e documentar a sintomatologia. Isolados de *Fusarium* foram obtidos por isolamento direto e indireto, a partir de plantas sintomáticas provenientes dos estados Paraná e Rio Grande do Sul. Numa coleção de 20 isolados identificamos os morfotipos *Fusarium solani* e *F. oxysporum*. Em testes de patogenicidade com mudas de tabaco, *F. oxysporum* induziu sintomas típicos da doença. *Fusarium solani* induziu escurecimento no tecido externo das raízes e redução de sua massa. Conseguimos estabelecer um protocolo para produção de mudas e testes de patogenicidade com *Fusarium* em tabaco. Os resultados obtidos nesse trabalho contribuem como estudo inicial para esclarecer a etiologia do amarelão, auxilia na elaboração de técnicas de manejo e funciona como referência para a caracterização dos sintomas induzidos por *Fusarium* em tabaco.

Palavras-chave: *Nicotiana tabacum*, *Fusarium solani* species complex FSSC, *Fusarium oxysporum* species complex FOOSC, etiologia.

Lista de Tabelas e Figuras

Tabela 1 Isolados de *Fusarium* obtidos de *Nicotiana tabacum*

Tabela 2 Análise estatística do comprimento, da massa fresca e seca de plantas de tabaco inoculadas com *F. oxysporum*

Tabela 3 Análise estatística do comprimento, da massa fresca e seca da parte aérea e raízes de plantas de tabaco inoculadas com *F. solani*

Figura 1 *Fusarium oxysporum* **A-B**. Colônia em BDA; **C**. Falsas cabeças em micélio aéreo; **D**. Macro e microconídeos; **E**. Clamidósporo; **F-G**. Monofiálides

Figura 2 *Fusarium solani* **A-B** Colônia em BDA; **C** Falsas cabeças em micélio aéreo; **D** Macroconídeos; **E** Microconídeos; **F** Clamidósporo; **G** Monofiálide

Figura 3 A-F Planta e corte para avaliação de sintomas no sistema vascular: **A-B** Tratamento CML 1784 apresentando necrose; **C-D** Tratamento controle sem sintomas; **E-F** Tratamento GM 13 apresentando necrose; **G** Folha sadia; **H-O** Folhas sintomáticas do tratamento CML 1784: **H-I** Pontuações enegrecidas em estágio inicial e avançado respectivamente, **J** Necrose nas nervuras secundárias, **K** Clorose e murcha da folha, **L** Clorose em um dos lados da folha, **M** Superbrotamento na região apical, **N** Crestamento foliar, **O** Folha jovem sintomática; **P** Comparação da nervura central de folha sadia e folha inoculada; **Q** Representantes dos tratamentos em vaso, GM 07, Controle e GM 13 (da esquerda para direita).

Figura 4 A-D Plantas de *Nicotiana tabacum*: **A** Tratamento Controle sem sintomas, **B** Tratamento GM 07, **C** Tratamento GM 03, **D** Tratamento GM 16; **E-H** Colo de plantas de *Nicotiana tabacum*: **E** Tratamento Controle sem sintomas, **F** tratamento GM 07 apresentando podridão no sistema radicular; **G** Tratamento GM 03 apresentando lesão radicular, **H** Tratamento GM 16 apresentando lesão radicular; **I** Superbrotamento na inserção das folhas na região basal da planta inoculada com GM 16; **J** Lesão na raiz secundária das plantas inoculadas com GM 16; **K** Representantes dos tratamentos em vasos, Controle, GM 16, GM 03 e GM 07 (da esquerda para a direita).

Figura 5 Análise estatística das notas atribuídas aos sintomas na parte aérea induzidos por *F. oxysporum*, sendo **a** Controle; **b** CML 1784; **c** GM 13

Figura 6 Análise estatística das notas atribuídas aos sintomas induzidos por *F. oxysporum* no sistema vascular, sendo **a** Controle; **b** CML 1784; **c** GM 13

Figura 7 Análise estatística das notas atribuídas aos sintomas na parte aérea induzidos por *F. solani*, sendo **a** Controle; **b** GM 03; **c** GM 07; **d** GM 16

Figura 8 Análise estatística das notas atribuídas aos sintomas induzidos por *F. solani* no sistema radicular, sendo **a** Controle; **b** GM 03; **c** GM 07; **d** GM 16

Sumário

1	Introdução	10
2	Material e Métodos	11
2.1	Isolamento, obtenção de culturas monospóricas e preservação	11
2.2	Caracterização morfológica	12
2.3	Obtenção de mudas de tabaco	12
2.4	Teste de patogenicidade e caracterização da sintomatologia.....	13
	Teste de patogenicidade com <i>Fusarium oxysporum</i>	13
	Teste de patogenicidade com <i>Fusarium solani</i>	14
	Análise estatística.....	15
3.	Resultados.....	15
3.1	Obtenção de isolados e caracterização morfológica	15
3.3	Teste de Patogenicidade.....	16
3.3.1	Teste de Patogenicidade com <i>Fusarium oxysporum</i>	16
3.3.2	Teste de Patogenicidade com <i>Fusarium solani</i>	17
3.3.3	Análise estatística.....	17
4	Discussão	18
5	Perspectivas futuras	20
6	Referências bibliográficas	21

1 **1 Introdução**

2 O tabaco (*Nicotiana tabacum*) é produzido em diversos países do mundo sendo
3 o Brasil o maior exportador e o segundo maior produtor (FAO 2019). No Brasil, a
4 fumicultura é fonte de renda para diversas famílias produtoras na região sul do país,
5 onde está concentrada quase toda a produção. As folhas produzidas por essa planta,
6 depois de curadas, são utilizadas na confecção de cigarros, charutos, tabaco para
7 cachimbo, tabaco mascável, entre outros produtos (AFUBRA 2019; FAO 2019).

8 Apesar do constante desestímulo provocado por setores ligados a saúde pública
9 antitabagistas para conscientizar a população sobre os malefícios ocasionados pelo
10 consumo excessivo do tabaco, a fumicultura é muito rentável tanto às empresas
11 exportadoras, quanto para os pequenos produtores que ainda trabalham com a cultura,
12 devido a garantia de compra do produto (AFUBRA 2019; FAO 2019).

13 Em viveiro e no campo a síndrome conhecida como murcha, mela ou amarelão
14 do tabaco afeta tanto mudas quanto plantas adultas. As plantas afetadas apresentam
15 amarelecimento lento e bronzeamento das folhas. Também é relatada podridão nas
16 raízes, clorose e murcha das folhas, inicialmente na parte mais baixa até o topo, levando
17 a morte da planta. O sistema vascular necrosa e adquire coloração amarronzada. No
18 campo, pode haver perdas de produção, já que a doença pode levar a morte e/ou o
19 subdesenvolvimento das plantas infectadas. (Souza Cruz 2007; Tjamos et al. 2006;
20 Berruezo et al. 2018).

21 A murcha em tabaco foi reportada pela primeira vez em Maryland, nos Estados
22 Unidos em 1916, sendo atribuído a *F. oxysporum f. sp. nicotianae* e *F. oxysporum f. sp.*
23 *batatas* como os agentes causais (Johnson 1921). Atualmente, essa síndrome vem sendo
24 relatada em diversos países ao redor do mundo, tais como Argentina, China, Espanha,
25 Estados Unidos e Grécia (Tjamos et al. 2006; Wang et al. 2013; LaMondia 2015;
26 Mercado Cárdenas et al. 2015; Berruezo et al, 2018; Yang et al. 2020). Espécies dos
27 complexos *Fusarium oxysporum* (FOSC) e *Fusarium solani* (FSSC) são frequentemente
28 identificados como os agentes causais da doença. Por exemplo, na Argentina, as
29 espécies *F. paranaense* e *F. keratoplasticum* pertencentes ao FSSC e diferentes *formae*
30 *specialis* do FOSC foram identificados como os agentes causais (Berruezo et al. 2018).
31 Já na China, espécies dos complexos FSSC e *Fusarium sambucinum* (FSAMSC) foram
32 encontradas associadas a murcha no tabaco (Wang et al. 2013; Yang et al. 2020).
33 Espécies do FOSC foram identificadas na Espanha e Grécia causando murcha em
34 tabaco (Tjamos et al. 2006; Alves-Santos et al. 2013; Rodríguez-Molina et al. 2013).
35 Entretanto, outros fungos, tais como *Rizoctonia solani*, *Pythium sp.* e *Phytophthora sp.*

36 também são registrados em associação com plantas de tabaco com sintomas da
37 síndrome (Souza Cruz 2007; Mercado Cárdenas et al. 2015).

38 No Brasil, produtores relatam a ocorrência e a importância do amarelão em áreas
39 produtoras. Porém, não há trabalhos primários sobre a etiologia e caracterização dos
40 sintomas da síndrome no país. Os objetivos desse estudo foram (i.) isolar e identificar as
41 espécies de *Fusarium* associadas ao tabaco com sintomas de amarelão, (ii.) estabelecer
42 um protocolo de teste de patogenicidade e (iii.) caracterizar e documentar a
43 sintomatologia. Os resultados obtidos com esse estudo poderão subsidiar pesquisas
44 futuras, sobre etiologia da doença e seleção de materiais resistentes em programas de
45 melhoramento.

46

47 **2 Material e Métodos**

48 **2.1 Isolamento, obtenção de culturas monospóricas e preservação**

49 Amostras de plantas sintomáticas foram coletadas em dois estados da região Sul
50 do Brasil (Paraná e Rio Grande do Sul) e foram processadas no Laboratório de
51 Sistemática e Ecologia de Fungos do Departamento de Fitopatologia da Universidade
52 Federal de Lavras. Foram realizados isolamentos direto e indireto a partir dos tecidos do
53 caule e das raízes. Para o isolamento indireto, segmentos obtidos do caule e das raízes
54 foram lavados e submetidos à desinfestação superficial com álcool 70%, hipoclorito de
55 sódio a 1% e água destilada autoclavada. A seguir, os fragmentados de
56 aproximadamente 2 mm foram plaqueados em meio Malte. Para o isolamento direto,
57 estruturas fúngicas foram observadas nas plantas sintomáticas com o auxílio de lupa,
58 após identificadas, as estruturas foram isoladas do material vegetal utilizando agulha
59 estéril e transferidas para placas de Petri contendo meio Malte. Após a realização dos
60 isolamentos, as placas foram observadas com o auxílio de microscópio de luz, durante 4
61 dias. Culturas com características morfológicas de *Fusarium* foram transferidas para
62 placas de Petri de 60mm de diâmetro, contendo meio de cultura extrato de malte 2%
63 (MA2) com antibiótico.

64 Em meio SNA, esporos dos isolados foram transferidos para um tubo com 1 mL
65 de água destilada esterilizada e agitados. Uma pequena alíquota foi transferida para
66 meio ágar-água e espalhada com uma alça de Drigalski. Após 24h as placas foram
67 observadas em microscópio estereoscópio, e um conídio com a presença de um tubo
68 germinativo foi transferido desta placa para outra contendo meio SNA. Em seguida,
69 esse isolado foi incubado em BOD a 25°C e fotoperíodo de 12h por 7 dias. As culturas
70 monospóricas obtidas foram cultivadas em meio completo, preservadas em água

71 destilada esterilizada e armazenados a 10°C no escuro. As culturas foram
72 criopreservadas em suspensão de esporos glicerol 15% a -80°C, e depositados na
73 Coleção Micológica de Lavras (CML), Laboratório de Sistemática e Ecologia de
74 Fungos, Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras (UFLA).

75

76 **2.2 Caracterização morfológica**

77 A caracterização morfológica dos isolados seguiu os protocolos de Leslie e
78 Summerell (2006). Os isolados foram cultivados em placas de Petri de 6 cm de
79 diâmetro, contendo meio batata-dextrose-ágar (BDA) e incubados em câmara tipo BOD,
80 a temperatura de 25°C. No escuro por 3 dias para avaliação da taxa de crescimento das
81 colônias, com fotoperíodo de 12h por 10 dias para avaliação da pigmentação. As
82 características micromorfológicas foram avaliadas em meio SNA com folha de cravo, os
83 isolados foram incubados em câmara tipo BOD, a temperatura de 25°C, com
84 fotoperíodo de 12h, em um período de 10 e 15 dias de crescimento, nos quais as
85 dimensões dos conídios produzidos no micélio aéreo e esporodóquio foram medidas,
86 bem como a observação de seu formato e septação. As características dos conidióforos e
87 a produção de clamidósporos também foram observadas.

88

89 **2.3 Obtenção de mudas de tabaco**

90 As plantas que foram utilizadas nos testes de patogenicidade foram cultivadas a
91 partir de sementes da cultivar do tipo Virgínia K326, reconhecida como susceptível a
92 amarelão. De acordo com o protocolo definido neste trabalho e descrito a seguir.

93 As mudas foram produzidas no sistema “float”, para utilizar esse sistema de
94 produção é necessário que se construa um tanque no qual as bandejas serão alocadas e
95 permanecerão em contato com uma lâmina de água, com aproximadamente 3-5 cm de
96 altura, e deve ser reposta semanalmente ou de acordo com a necessidade, lembrando
97 sempre de utilizar de água limpa no momento de reposição. Não deve sobrar água ao
98 final do processo, caso isso ocorra deixá-la evaporar. O cultivo deve ser conduzido em
99 um local arejado e sem insolação direta, pois as mudas de fumo são sensíveis a luz e
100 podem apresentar branqueamento das folhas. Dentro de estufas, se possível, evitar
101 instalar o sistema próximo a porta e ao exaustor, para se garantir a sanidade das mudas

102 As sementes de tabaco são muito pequenas, o que dificulta a semeadura. Para
103 auxiliar a distribuição delas na bandeja, é aconselhado utilizar o próprio pacote das
104 sementes e ter muito cuidado ao distribuí-las, aproximadamente 3 sementes por célula.
105 A germinação ocorre em aproximadamente 10 dias após a semeadura e, assim que

106 possível, deve ser realizado o desbaste de plantas excedentes para que não ocorra
107 concorrência. Quando as mudas atingirem 5 cm, deve-se realizar uma poda para
108 aumentar a uniformidade e resistência das mudas. Esse procedimento deve ser realizado
109 fora do tanque com o auxílio de uma linha de nylon ou outra ferramenta desinfectada,
110 como uma tesoura, e deve ser repetido de duas a três vezes até o transplântio.

111 As sementes foram cultivadas em bandejas contendo 50 células, com
112 volume/célula de aproximadamente 100mL, e alocadas em casa de vegetação com
113 temperatura de 25°C e fotoperíodo de 12h de luz. A primeira adubação ocorreu aos 15
114 dias após a semeadura, sendo necessário 8g de adubo Peters® 20-20-20 por bandeja de
115 200 células, ou 2g para cada bandeja de 50 células. O adubo foi diluído em uma garrafa
116 pet 2L e a solução despejada no tanque, 2-3 vezes durante o processo de produção. Para
117 evitar eutrofização da água no tanque e auxiliar na aeração das raízes, foi utilizada uma
118 bomba de aquário modelo NS F160. A duração do cultivo até o transplântio é de
119 aproximadamente 70 dias, quando as plantas estão no estágio vegetativo 1004.
120 (Papenfus e Billenkamp, 2019)

121

122 **2.4 Teste de patogenicidade e caracterização da sintomatologia**

123

124 **Teste de patogenicidade com *Fusarium oxysporum***

125 Para a obtenção do inóculo, 2 isolados foram selecionados baseado em origem e
126 características morfológicas. Os isolados CML 1784 e GM 13 foram cultivados em
127 placas de Petri contendo MA2 e mantidos a 25°C sob fotoperíodo de 12h por 15 dias
128 (Leslie e Summerell 2006). A suspensão de esporos foi preparada através da adição de
129 10 mL de água destilada às placas de Petri contendo o fungo cultivado, seguido de
130 filtragem em camada dupla de gaze para a remoção de fragmentos do micélio e ajuste
131 da concentração de conídios em câmara de Neubauer para 1×10^6 conídios mL⁻¹.

132 As plântulas de tabaco previamente cultivadas e no estágio fenológico 1004
133 (Papenfus e Billenkamp, 2019) foram removidas das células e transferidas para vasos de
134 5L contendo substrato composto por solo, areia e Carolina soil (1:1:1). A inoculação
135 ocorreu no mesmo dia do transplântio e utilizou o método proposto por Berruezo et al.
136 (2018). Esse método consiste em despejar 10 mL da suspensão do isolado ao redor da
137 planta. Para o tratamento controle, água autoclavada foi despejada no lugar da
138 suspensão de esporos. As plantas foram irrigadas conforme necessidade hídrica. O
139 delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com quatro
140 repetições, sendo cada parcela experimental composta por seis plantas, contando com o

141 controle. As avaliações foram realizadas diariamente durante 30 dias, caracterizando e
142 foto documentando os sintomas observados. Severidade e incidência foram avaliadas
143 utilizando a escala diagramática na qual a nota varia de 0-4, sendo, 0: plantas saudáveis;
144 1: plantas atrofiadas ou sem cor; 2: plantas com uma folha sintomática; 3: plantas com
145 mais de uma folha sintomática; 4: planta morta, propostas por LaMondia e Taylor
146 (1987). Após a conclusão do teste aferimos a também o comprimento, peso de massa
147 fresca (MF) e seca (MS) das plantas. Também foi realizada a secção de aéreas
148 sintomáticas e assintomáticas das plantas, para a conclusão do postulado de Koch.

149

150

151 **Teste de patogenicidade com *Fusarium solani***

152 Assim como no ensaio anterior, três isolados do morfotipo *F. solani* foram
153 selecionados baseado em origem e características morfológicas. Para o teste de
154 patogenicidade, foi utilizada a metodologia camada de inóculo proposta por Hartman et
155 al. (1997). Nesse ensaio, os isolados GM 03, GM 07 e GM 16 cresceram em placa de
156 Petri contendo MA2, por sete dias a 25°C no escuro. Em seguida, seis discos de micélio
157 foram transferidos para tubos Falcon de 50 mL contendo 24g de grão de sorgo,
158 previamente autoclavados (2 dias, 1h a 121 kgf). Após infestado, os tubos com sorgo
159 foram incubados 15 dias a 25°C com fotoperíodo de 12h. Os vasos foram preparados
160 com uma camada de substrato composto por solo, areia e Carolina soil (1:1:1), seguido
161 por uma camada de grãos de sorgo e novamente por uma camada de substrato. As
162 mudas de tabaco, previamente cultivadas até o estágio fenológico 1004, foram
163 transferidas para os vasos e acomodadas em casa de vegetação a 25°C. Adubação e
164 irrigação foram realizadas de acordo com a necessidade das plantas. As plantas foram
165 avaliadas diariamente durante 30 dias, caracterizando e foto documentando os sintomas
166 observados. Severidade e incidência foram avaliadas utilizando a escala diagramática na
167 qual a nota varia de 0-5, sendo, 0: ausência de lesão; 1: Pontuações no local de
168 inoculação ou pequenas lesões (<1cm); 2: lesões intermediárias (lesão 1-2cm); 3: lesões
169 (lesão 2,1-3cm); 4: lesões (lesão >3cm); 5: desfolha, murcha ou plantas mortas;
170 adaptadas de Bueno et al. (2014). Após a conclusão do teste aferimos a também o
171 comprimento, peso de massa fresca (MF) e seca (MS) de parte aérea e das raízes.
172 Também foi realizada a secção de aéreas sintomáticas e assintomáticas das plantas, para
173 a conclusão do postulado de Koch.

174

175 **Análise estatística**

176 As análises estatísticas para comparar a virulência dos isolados testados, bem
177 como o efeito dos mesmos no comprimento das plantas, no peso de massa fresca e seca,
178 e no tamanho das lesões, foi realizado no Software R para ambos os testes com *F.*
179 *oxysporum* e *F. solani*. Contudo, para as avaliações utilizando as notas provenientes das
180 escalas aplicadas nos testes, as comparações foram realizadas seguindo o teste Krustal-
181 Wallis, devido os dados não serem paramétricos. Para as análises de comprimento, e
182 lesões, foram realizadas a análise de variância, considerando os pressupostos da Anova
183 pelos testes de Shapiro-Wilk (distribuição normal) e o teste de Bartlett (homogeneidade
184 de variância). Sendo necessário p-value > 0,05 para se aceitar os pressupostos. Em
185 seguida os dados foram submetidos aos testes de médias Scott Knott para conferir a
186 existência de diferença significativa entre os tratamentos e com base nisso, agrupar os
187 semelhantes.

188

189 **3. Resultados**

190 **3.1 Obtenção de isolados e caracterização morfológica**

191 Foram recebidas seis amostras de tabaco (*Nicotiana tabacum*) do Rio Grande do
192 Sul e do Paraná com sintomas de amarelão, destas obteve-se uma coleção de 16
193 isolados, sendo 10 isolados com o morfotipo de *F. solani*, 6 de *F. oxysporum*. Foram
194 adicionados ao trabalho 4 isolados de *F. oxysporum* depositados na CML (Tabela 1).

195 Os isolados de *Fusarium oxysporum* apresentaram coloração de colônia bege, o
196 crescimento micelial apresentou um diâmetro 1,2 cm por dia de cultivo em meio BDA,
197 incubados em BOD a 25°C no escuro. Microconídios produzidos no micélio aéreo em
198 monofialides apresentaram forma oval e elipsoidal, com número de septos variando de
199 0-2, variando 2-12 x 2 µm. Macroconídeos produzidos no micélio aéreo e em
200 esporodóquio apresentaram forma cilíndrica e falcada com célula pé bem desenvolvida,
201 número de septos variando de 2-3, cujas dimensões variaram entre 22-32 x 2 µm. Em
202 meio SNA com folha de cravo produziram clamidósporos e esporodóquio de coloração
203 bege (Figura 1).

204 Os isolados de *Fusarium solani* apresentaram coloração de colônia bege. O
205 crescimento micelial apresentou diâmetro de 1 cm por dia de cultivo em meio BDA,
206 incubados em BOD a 25°C no escuro. Microconídios produzidos no micélio aéreo em
207 monofialides apresentaram forma oval e cilíndrico, com número de septos variando de
208 0-1, com dimensões variando entre 2-17 x 2 µm. Macroconídios produzidos no micélio
209 aéreo e em esporodóquio apresentaram número de septos variando de 2-3, formatos

210 cilíndrico, falcado, comprimento reduzido e região ventral larga, 20-30 x 2-5 µm, e
211 célula pé bem desenvolvida. Em meio SNA com folha de cravo produziram
212 clamidósporos e esporodóquio de coloração bege (Figura 2).

213

214 **3.3 Teste de Patogenicidade**

215 **3.3.1 Teste de Patogenicidade com *Fusarium oxysporum***

216 Das plantas inoculadas com *F. oxysporum*, apenas as que receberam o
217 tratamento com o isolado CML 1784, induziram os sintomas típicos de amarelão, que
218 consistem em murcha, amarelecimento lento das folhas, necrose e atrofia da parte aérea.
219 Os sintomas iniciaram-se 10 dias após a inoculação (DAI), com pontuações enegrecidas
220 próximas as nervuras das folhas mais velhas de um lado da planta, nesse ponto já era
221 possível observar redução do crescimento em comparação com as plantas controle
222 (Figura 3 I).

223 As pontuações, inicialmente progrediram para outras folhas e expandiram em
224 tamanho evoluindo para um crestamento foliar (Figura 3 J, K e N). Aos 25 DAI, foi
225 possível observar a necrose nas folhas mais jovens e morte do meristema apical de
226 algumas repetições (Figura 3 O). Também foi observada a presença de superbrotamento
227 na região apical (Figura 3 M). Ao completar 30 DAI, foi realizado corte longitudinal das
228 plantas para a observação de lesões no sistema vascular, com isso foi observado necrose
229 generalizada dos tecidos internos desde a raiz principal atingindo o meristema apical e
230 as folhas das plantas inoculadas (Figura 3 A-B, E-F e P).

231 Nas plantas inoculadas o isolado GM 13, não foi possível observar sintomas
232 típicos de amarelão (Figura 3 C-D). No entanto, a partir de 10 DAI, ocorreu crescimento
233 reduzido das plantas tratadas em comparação com as plantas controle, o que resultou em
234 um quadro de atrofia. Em média os tratamentos Controle apresentaram 71 cm de altura
235 e 6,5 cm de largura do colmo, enquanto os tratamentos GM 13 e CML 1784
236 apresentaram 51 cm e 28 cm de altura, 4,5 e 3,2 cm de largura do colmo,
237 respectivamente (Figura 3 Q).

238 Aos 30 DAI, ao realizar o corte longitudinal na planta, foi possível observar
239 escurecimento do tecido vascular a partir do colo, porém mais sutis em GM 13 quando
240 comparadas ao tratamento CML 1784. Não foram observados sintomas no tratamento
241 controle (Figura 3 A-F).

242

243 **3.3.2 Teste de Patogenicidade com *Fusarium solani***

244 Quanto a parte aérea os isolados GM 03 e GM 07 induziram atrofia nas plantas
245 inoculadas. Em média os tratamentos Controle apresentaram 38 cm de altura e 10 cm de
246 largura do colmo, enquanto os tratamentos GM 03 e GM 07 apresentaram largura de 33
247 cm e 19 cm, e largura do colmo de 9 e 7 cm, respectivamente. Mas apesar de o
248 tratamento GM 16 não ter induzido atrofia na parte aérea, 36 cm de altura e 10 cm de
249 largura do colmo, este induziu redução no crescimento das raízes 21 cm em comparação
250 com tratamento controle 40 cm (Figura 4 K).

251 Apesar das plantas inoculadas com o isolado GM 16 não terem apresentado
252 nenhum sintoma de amarelão, foi observado superbrotamento na inserção da folha na
253 região basal em uma das plantas inoculadas (Figura 4 I). O tratamento controle não
254 apresentou nenhuma das alterações observadas nas plantas inoculadas com *F. solani*.
255 (Figura 4 A-H)

256 Após corte longitudinal das raízes pode-se observar lesões necróticas em todas
257 as plantas inoculadas, sintoma observado principalmente na área externa das raízes
258 (Figura 4 E-H). Os isolados GM 07 e GM 16 induziram lesões em raízes primárias e
259 secundárias (figura 4 J). Entretanto, as lesões induzidas por GM 07 foram as mais
260 severas, ocasionando podridão da raiz principal (Figura 4 F).

261 Foi possível notar que apesar de as raízes do tratamento GM 16 apresentarem
262 lesões estas eram mais vigorosas e exploraram mais da extensão do vaso assim como as
263 plantas controle. Enquanto as raízes dos tratamentos GM 03 e GM 07, se concentraram
264 na região mais superficial do vaso, além de serem menos vigorosas.

265

266 **3.3.3 Análise estatística**

267 Para os tratamentos com *F. oxysporum*, observamos nas análises não
268 paramétricas com o teste Kruskal-Wallis, que o tratamento CML 1784 diferiu
269 estatisticamente do Controle e de GM 13, quanto as notas atribuídas aos sintomas na
270 parte aérea, a 5% de significância (Figura 5). Quanto as notas atribuídas as lesões no
271 sistema vascular, nas análises não paramétricas com o teste Kruskal-Wallis, o
272 tratamento CML 1784 e GM 13 diferiram estatisticamente do Controle, a 5% de
273 significância (Figura 6). Nas análises de comprimento e massa fresca da planta, todos os
274 tratamentos diferiram estatisticamente entre si a um nível de significância de 5%. Os
275 tratamentos apresentaram agrupamentos diferentes destacando o tratamento CML 1784
276 como o que apresentou a menor comprimento e MF, e o tratamento controle o maior.
277 Para MS, a um nível de significância de 5%, os tratamentos CML 1784 e GM 13

278 diferiram do tratamento controle, sendo o tratamento CML 1784 o que apresentou a
279 menor MS e o tratamento controle a maior (Tabela 2).

280 Nas notas atribuídas aos sintomas da parte aérea do ensaio com os isolados de *F.*
281 *solani*, observamos nas análises não paramétricas com o teste Kruskal-Wallis, que os
282 tratamentos GM 03 e GM 07 diferiram estatisticamente do controle e de GM 16, a 5%
283 de significância (Figura 6). Quanto as notas atribuídas as lesões no sistema radicular, as
284 análises não paramétricas com o teste Kruskal-Wallis, o tratamento GM 07 diferiu
285 estatisticamente dos demais tratamentos, a 5% de significância (Figura 7).

286 Nas análises de comprimento da parte aérea, os isolados de *F. solani* diferiram
287 estatisticamente do tratamento controle, a um nível de significância de 5%. Quanto ao
288 comprimento das raízes, os tratamentos apresentaram agrupamentos diferentes
289 destacando o tratamento GM 07 com o menor o comprimento de raízes, os tratamentos
290 GM 03 e GM 16 comprimentos de raiz intermediário e o controle o maior comprimento.
291 Quanto ao peso de massa fresca da parte aérea e das raízes, o tratamento GM 07 diferiu
292 dos demais a um nível de significância de 5%. Enquanto a massa seca da parte área e
293 das raízes, os tratamentos GM 03 e GM 07, diferiram dos tratamentos controle e GM 16
294 (Tabela 3).

295

296 **4 Discussão**

297 Por definição, fala-se de uma "síndrome" quando em conjunto de sintomas e
298 sinais caracteriza um patossistema específico." De acordo com a literatura, espécies de
299 *Fusarium*, *Rhizoctonia solani*, *Pythium* sp. e *Phytophthora* sp. são considerados agentes
300 etiológicos do amarelão no tabaco (Tjamos et al. 2006; Alves-Santos et al. 2013;
301 Rodríguez-Molina et al. 2013; Souza Cruz 2007; Mercado Cárdenas et al. 2015),
302 trataremos o amarelão como uma síndrome. Neste estudo, foram obtidos a partir de
303 amostras sintomáticas provenientes dos estados da região Sul do Brasil, apenas
304 representantes dos complexos FOOSC e FSSC, cujos marcadores morfológicos são
305 monofiálides curtas e longas respectivamente (Leslie e Summerell 2006).

306 Dentro do gênero *Fusarium*, os complexos FOOSC, FSSC e FSAMSC são
307 relatados em associação com o tabaco na Argentina, China, Espanha, Estados Unidos e
308 Grécia (Tjamos et al. 2006; Wang et al. 2013; LaMondia 2015; Cárdenas et al. 2015;
309 Berruezo et al. 2018; Yang et al. 2020). No Brasil, esse é primeiro estudo com foco em
310 esclarecer a etiologia da doença e nesse primeiro momento, baseados em marcadores
311 morfológicos, sendo necessário realizar análises de filogenia molecular para identificar

312 quais as espécies dentro dos complexos FOOSC e FSSC são os agentes causais dessa
313 síndrome no país.

314 Os isolados de *F. oxysporum* induziram inicialmente clorose, necrose, pequenas
315 pontuações de coloração amarronzada e crestamento. Os sintomas evoluíram para
316 murcha e necrose generalizada dos tecidos levando a morte das plantas. Essa
317 sintomatologia está de acordo com o que foi relatado para *F. oxysporum* em outros
318 países. (Tjamos et al. 2006; LaMondia 2015).

319 Para *F. solani*, é atribuída a indução de sintomas como descoloração vascular e
320 necrose da raiz principal e podridão das raízes (Berruezo et al. 2018; Yang et al. 2020),
321 no entanto, embora os trabalhos descrevam os sintomas induzidos pelo patógeno, não há
322 imagens que possam ser usadas como referência para os sintomas descritos. O ensaio
323 conduzido com os isolados GM 03, GM 07 e GM 16, não apresentou todos os sintomas
324 característicos de acordo com a literatura, sendo possível observar apenas atrofia,
325 constatada por meio da aferição do comprimento, MF e MS da parte aérea e raízes,
326 lesões e podridão nas raízes. As plantas inoculadas apresentaram também escurecimento
327 do tecido externo das raízes e diminuição em sua quantidade quando comparadas ao
328 controle. Esses resultados podem ter sido influenciados devido à baixa pressão de
329 inóculo e/ou a lignificação dos tecidos das mudas, que estavam no estágio fenológico
330 1004. Outro fator que pode ter influenciado os resultados obtidos é o tempo de
331 avaliação dos experimentos, o qual foi finalizado 30 dias após a inoculação.

332 A sintomatologia relatada e atribuída até o momento a síndrome do amarelo,
333 consiste em amarelecimento lento, murcha em um dos lados da planta, além de
334 podridão, necrose, descoloração do sistema vascular e pontuações amarronzadas nas
335 folhas (Tjamos et al. 2006; Wang et al. 2013; LaMondia 2015; Berruezo et al. 2018;
336 Yang et al. 2020). Nesse trabalho, foi possível observar que os isolados de *F.*
337 *oxysporum* foram os responsáveis por induzir os sintomas típicos da síndrome, sendo o
338 isolado CML 1784 mais virulento que o isolado GM 13.

339 Enquanto os isolados de *F. solani* induziram a atrofia da parte aérea da planta,
340 esse sintoma resulta das lesões induzidas pelo fungo no sistema radicular. Dentre os
341 isolados testados, GM 07 foi o mais virulento por induzir podridão nas raízes, em
342 comparação com os demais isolados. Os sintomas induzidos em comum por *F.*
343 *oxysporum* e *F. solani* são atrofia, murcha e necrose, ambos observados a partir do
344 estágio fenológico 1005.

345

346 **5 Perspectivas futuras**

347 Quanto as espécies de *Fusarium*, realizar análise de filogenia molecular
348 utilizando genes barcode *tef1* e *rpb2*, para esclarecer quais representantes dos
349 Complexos FOOSC e FSSC são os agentes causais da síndrome do amarelão. Avaliar se
350 existe efeito misto quando as plantas são submetidas a inoculação simultânea de *F.*
351 *oxysporum* e *F. solani*. E avaliar se existe transmissão de *Fusarium* por meio de
352 sementes.

353 Obter mais isolados de áreas produtoras, para analisar e caracterizar a
354 morfologia, sintomatologia induzida por *Rhizoctonia* e *Pythium* em tabaco, candidatos a
355 agentes causais da síndrome do amarelão do tabaco.

356

357

358 **6 Referências bibliográficas**

359 Afubra (2019) Fumicultura, safra 2018-2019. Available at:
360 <https://afubra.com.br/fumicultura-brasil.html>. Accessed on June 18, 2021.

361

362 Alves-Santos FM, Martínez-Bermejo D, Rodríguez-Molina MC, Diez JJ (2007)
363 Cultural characteristics, pathogenicity and genetic diversity of *Fusarium oxysporum*
364 isolates from tobacco fields in Spain. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 71:
365 26–32.

366

367 Berruezo LA, Cárdenas EM, Harries EM, Stenglein SA, Curti RN, Rodriguero MS,
368 Galván MZ (2018) Characterization of *Fusarium* species associated with tobacco
369 diseases in Northwestern Argentina. *European Journal of Plant Pathology* 151: 1065-
370 1079.

371

372 Bueno CJ, Fischer IH, Rosa DD, Firmino AC, Harakava R, Oliveira CMG, Furtado EL.
373 (2014) *Fusarium solani* f. sp. *passiflorae*: a new *forma specialis* causing collar rot in
374 yellow passion fruit. *Plant Pathology* 63: 382-389.

375

376 Clark CA, Hyun JW, Hoy MW (1998) Relationships among wilt-inducing isolates of
377 *Fusarium oxysporum* from sweetpotato and tobacco. *Plant Disease* 82: 5.

378

379 FAO (2019) Production quantities of Tobacco, unmanufactured by country 1994/2019.
380 FAOSTAT. Available at: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>. Accessed
381 on June 3, 2022.

382

383 Johnson J (1921) *Fusarium* wilt of Tobacco. *Journal of Agricultural Research* 20: 515-
384 535.

385

386 LaMondia JA (2015) *Fusarium* wilt of tobacco. *Crop Protection* 73: 73-77.

387

388 LaMondia JA, Taylor GS (1987) Influence of the tobacco cyst nematode (*Globodera*
389 *tabacum*) on *Fusarium* wilt of Connecticut broadleaf tobacco. *Plant Disease* 71: 1129–
390 1132.

391

392 Leslie JF, Summerell BA (2006) The *Fusarium* laboratory manual. Blackwell
393 Publishers, Malden.

394

395 Mercado Cárdenas GE, Galván MZ, Barrera VA, Rodriguero MS, Carmona MA, March
396 GJ, Shew HD (2015) Molecular identification and pathogenicity of *Rhizoctonia* spp.
397 from tobacco growing areas in northwestern Argentina. *Tropical Plant Pathology* 40:
398 160–168.

399

400 Papenfus H, Billenkamp N (2019) CORESTA Guide N° 7: A Scale for Coding Growth
401 Stages in Tobacco Crops. Cooperation Centre for Scientific Research Relative to
402 Tobacco (CORESTA). Available at: [https://www.coresta.org/scale-coding-growth-](https://www.coresta.org/scale-coding-growth-stages-tobacco-crops-29211.html)
403 [stages-tobacco-crops-29211.html](https://www.coresta.org/scale-coding-growth-stages-tobacco-crops-29211.html). Accessed on: April 25, 2022.

404

405 Rodríguez-Molina MC, Morales-Rodríguez MC, Palo C, Osuna MD, Iglesias MJ,
406 García JA (2013) Pathogenicity, vegetative compatibility and RAPD analysis of
407 *Fusarium oxysporum* isolates from tobacco fields in Extremadura. *European Journal of*
408 *Plant Pathology* 136: 639–650.

409

410 Souza Cruz (2007) *Cultura do Tabaco: Manejo Integrado de Pragas e Doenças*. Souza
411 Cruz. 69p.

412

413 Tjamos SE, Markakis EA, Antoniou P, Paplomatas EJ (2006) First record of *Fusarium*
414 wilt of tobacco in Greece imported as seedborne inoculum. *Journal of Phytopathology*
415 154: 193-196.

416

417 Wang HC, Wang MS, Xia HQ, Yang SJ, Guo YS, Xu DQ, Li WH, Xiang Y, Shang SH,
418 Shi JX (2013) First Report of Fusarium Wilt of Tobacco Caused by *Fusarium*
419 *kyushuense* in China. APS Publications. Available at:
420 <https://apsjournals.apsnet.org/doi/abs/10.1094/PDIS-09-12-0835-PDN>. Accessed on
421 April 20, 2022

422

423 Yang M, Cao J, Zheng Y, Wang J, Zhou H, He M, Duan J, Tong W, Deng X, Chen X,
424 Yan D (2020) First report of *Fusarium* root rot of tobacco caused by *Fusarium solani* in
425 Lincang, China. *Plant Disease* 104: 1541.

Tabela 1 Isolados de *Fusarium* obtidos de *Nicotiana tabacum*

Código de trabalho	Morfotipo	Origem
GM01.1	<i>F. solani</i>	São João do Triunfo, PR
GM01.2	<i>F. falciforme</i>	São João do Triunfo, PR
GM01.3	<i>F. solani</i>	São João do Triunfo, PR
GM 03	<i>F. martii</i>	São João do Triunfo, PR
GM 04	<i>F. suttoniana</i>	Rebouças, PR
GM 05	<i>F. solani</i>	Rebouças, PR
GM 06	<i>F. solani</i>	Rebouças, PR
GM 07	<i>F. solani</i>	Teixeira Soares, PR
GM 16	<i>F. solani</i>	São Lourenço do Sul, RS
GM 15	<i>F. solani</i>	Chuveisco, RS
GM 08	<i>F. oxysporum</i>	São João do Triunfo, PR
GM 09	<i>F. oxysporum</i>	São João do Triunfo, PR
GM 10	<i>F. oxysporum</i>	São João do Triunfo, PR
GM 12	<i>F. oxysporum</i>	Teixeira Soares, PR
GM 13	<i>F. oxysporum</i>	Rebouças, PR
GM 17	<i>F. oxysporum</i>	Chuveisco, RS
CML 1779	<i>F. oxysporum</i>	Santa Cruz do Sul, RS
CML 1778	<i>F. oxysporum</i>	Santa Cruz do Sul, RS
CML 1783	<i>F. oxysporum</i>	Santa Cruz do Sul, RS
CML 1784	<i>F. oxysporum</i>	Santa Cruz do Sul, RS

GM= Gabriel Miguel

Tabela 2 Análise estatística do comprimento, da massa fresca e seca de plantas de tabaco inoculadas com *F. oxysporum*

Tratamentos	Comprimento (cm)*	MF (g)**	MS (g)**
Controle	71,2	a 185,0	a 53,3
CML 1784	27,8	c 24,2	c 4,2
GM13	50,8	b 105,8	b 19,2

*Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste Scott-Knott ($P < 0,05$)

** Abreviações: MF - Massa Fresca; MS - Massa seca

Tabela 3 Análise estatística do comprimento, da massa fresca e seca da parte aérea e raízes de plantas de tabaco inoculadas com *F. solani*

Tratamentos	Comprimento parte aérea (cm)*		MF parte aérea (g)**		MS parte aérea (g)**		Comprimento raízes (cm)*		MF raízes (g)**		MS raízes (g)**	
Controle	36,0	a	188,8	a	67,5	a	40,4	a	90,0	a	12,5	a
GM 03	33,8	a	132,5	a	33,8	b	27,5	b	63,8	a	7,5	b
GM 07	21,0	b	56,3	b	7,5	b	16,7	b	27,5	b	2,6	b
GM 16	37,3	a	186,3	a	73,8	a	23,75	c	72,5	a	12,5	a

*Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste Scott-Knott ($P < 0,05$)

** Abreviações: MF - Massa Fresca; MS - Massa seca

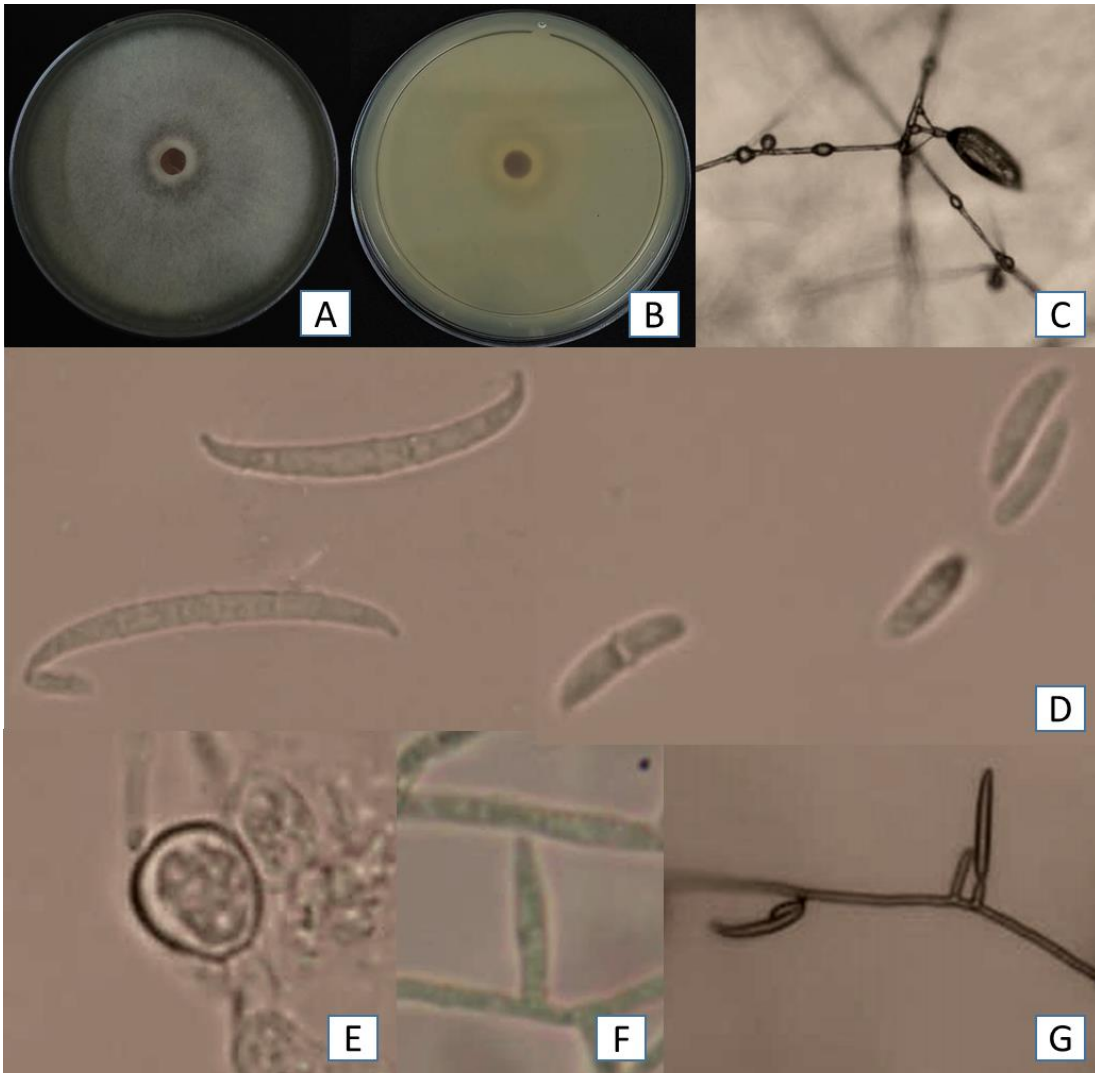


Figura 1 *Fusarium oxysporum* A-B Colônia em BDA; C Falsas cabeças em micélio aéreo; D Macro e microconídeos; E Clamidósporo; F-G Monofiáides

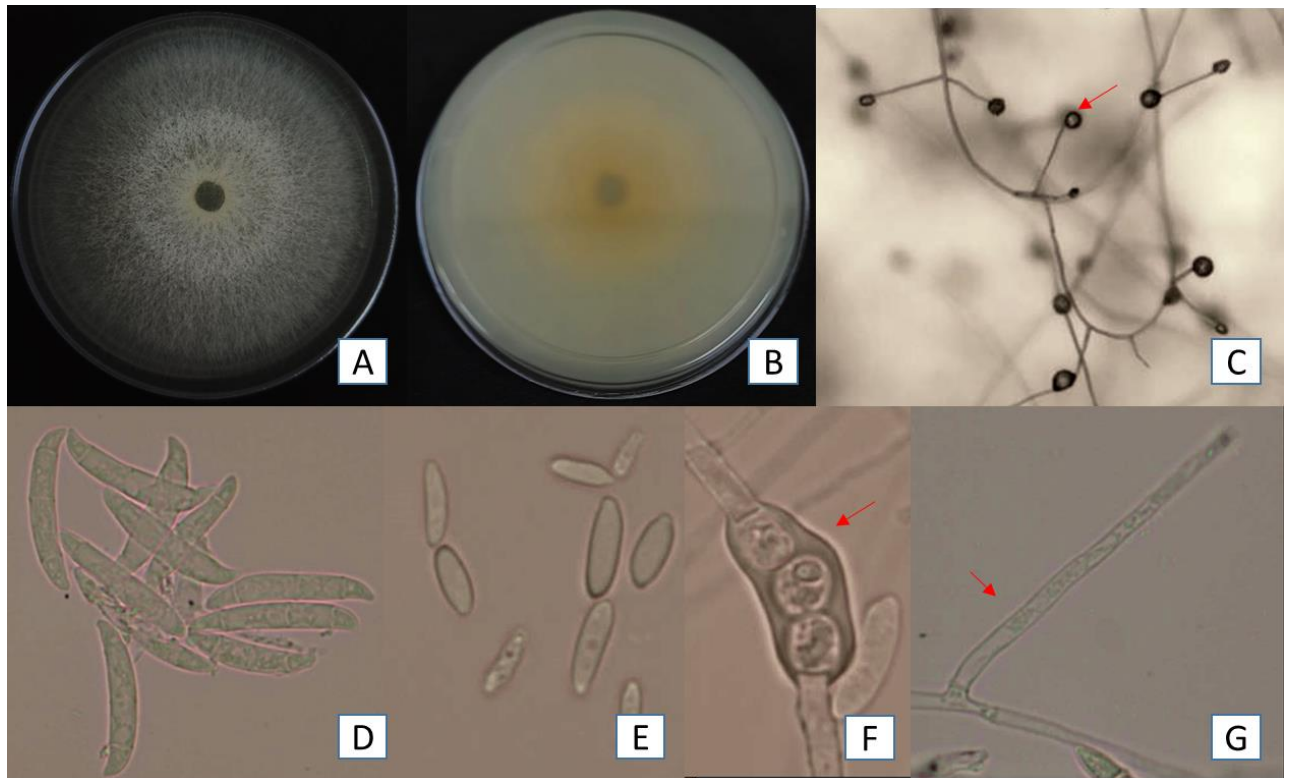


Figura 2 *Fusarium solani* A-B Colônia em BDA; C Falsas cabeças em micélio aéreo; D-E macroconídeos; e microconídeos; F Clamidóspero; G Monofiálide

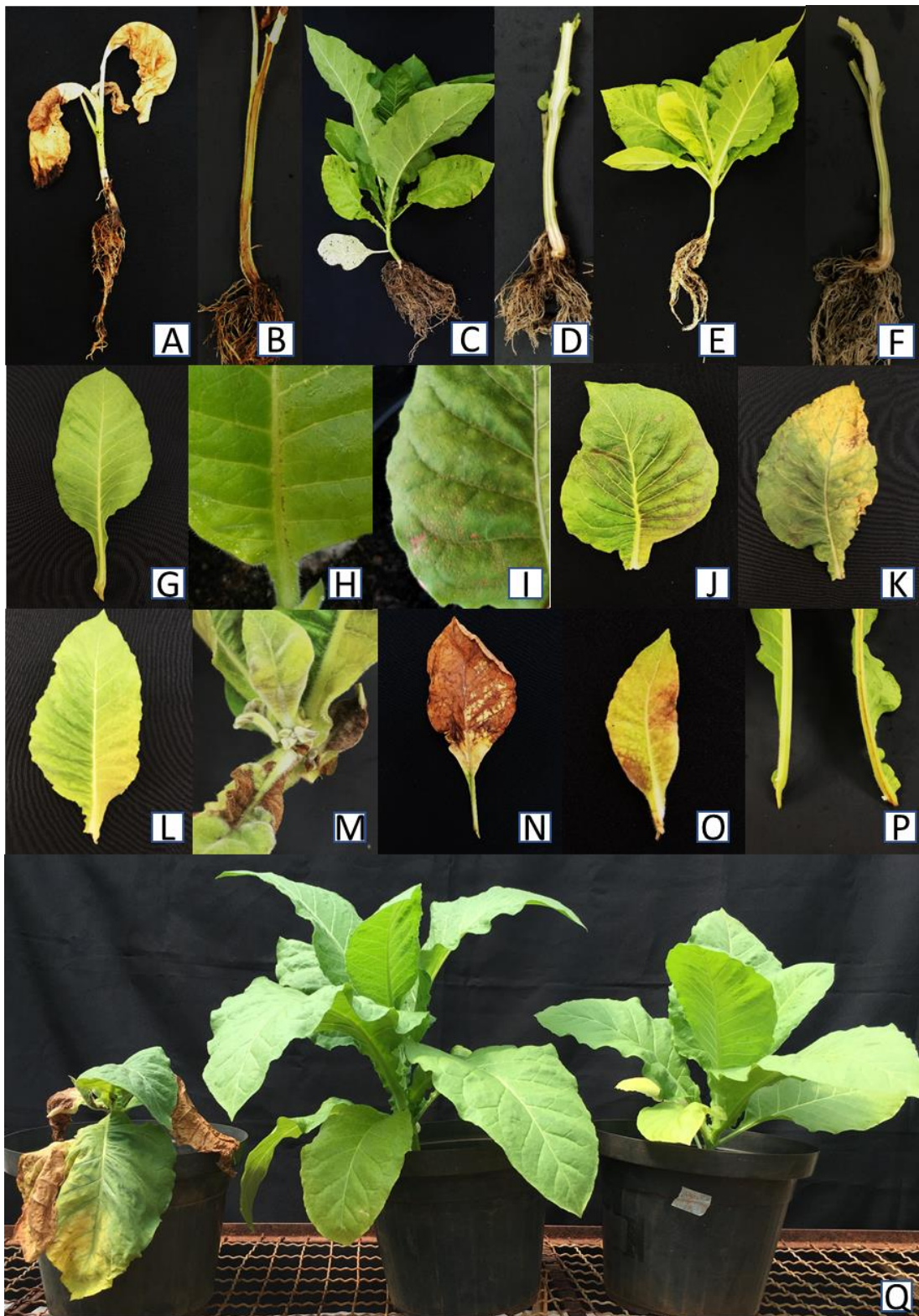


Figura 3 A-F Planta e corte para avaliação de sintomas no sistema vascular: A-B Tratamento CML 1784 apresentando necrose; C-D Tratamento controle sem sintomas; E-F Tratamento GM 13 apresentando necrose; G Folha sadia; H-O Folhas sintomáticas do tratamento CML 1784: H-I Pontuações enegrecidas em estágio inicial e avançado respectivamente, J Necrose nas nervuras secundárias, K Clorose e murcha da folha, L Clorose em um dos lados da folha, M Superbrotamento na região apical, N Crestamento foliar, O Folha jovem sintomática; P Comparação da nervura central de folha sadia e folha inoculada; Q Representantes dos tratamentos em vaso, GM 07, Controle e GM 13 (da esquerda para direita).

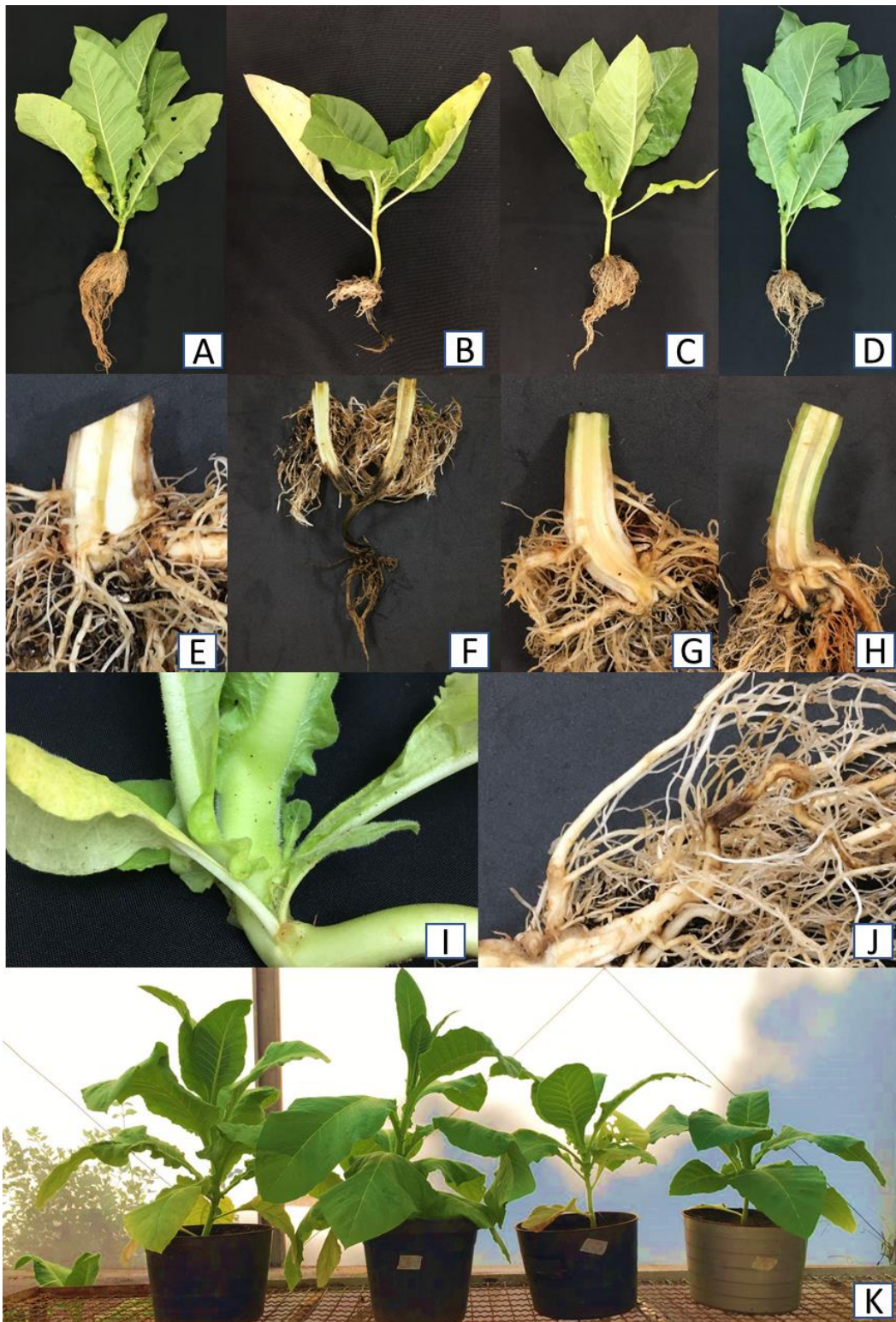


Figura 4 A-D Plantas de *Nicotiana tabacum*: A Tratamento Controle sem sintomas, B Tratamento GM 07, C Tratamento GM 03, D Tratamento GM 16; E-H Colo de plantas de *Nicotiana tabacum*: E Tratamento Controle sem sintomas, F tratamento GM 07 apresentando podridão no sistema radicular; G Tratamento GM 03 apresentando lesão radicular, H Tratamento GM 16 apresentando lesão radicular; I Superbrotamento na inserção das folhas na região basal da planta inoculada com GM 16; J Lesão na raiz secundária das plantas inoculadas com GM 16; K Representantes dos tratamentos em vasos, Controle, GM 16, GM 03 e GM 07 (da esquerda para a direita).

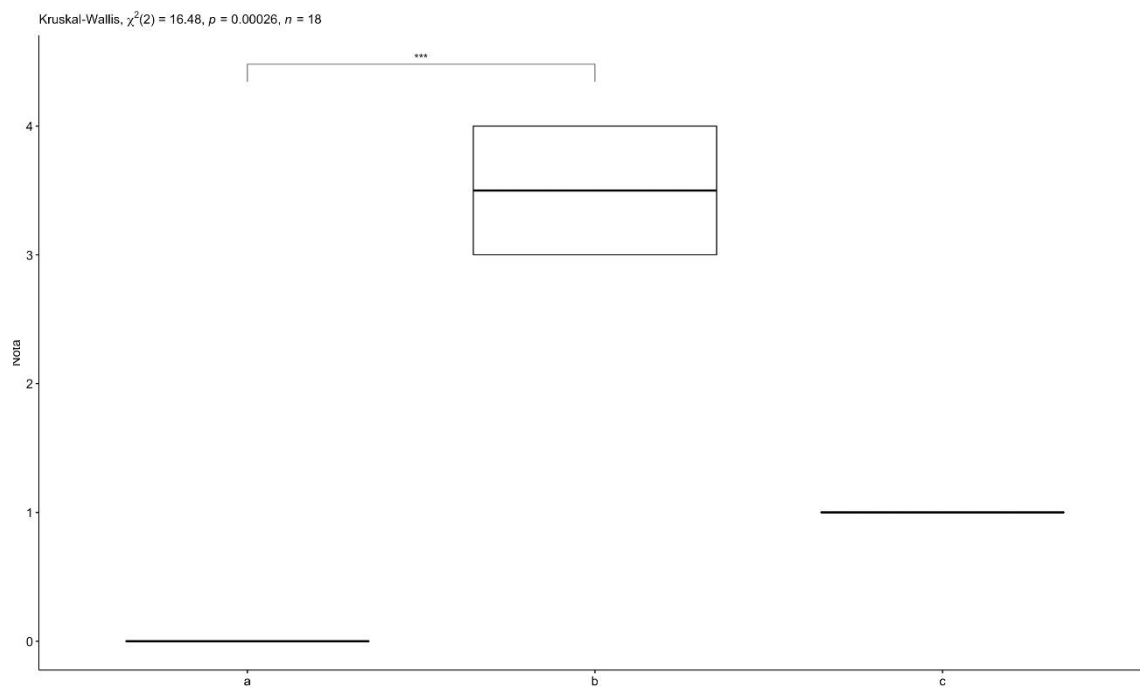


Figura 5 Análise estatística das notas atribuídas aos sintomas na parte aérea induzidos por *F. oxysporum*, sendo **a** Controle; **b** CML 1784; **c** GM 13

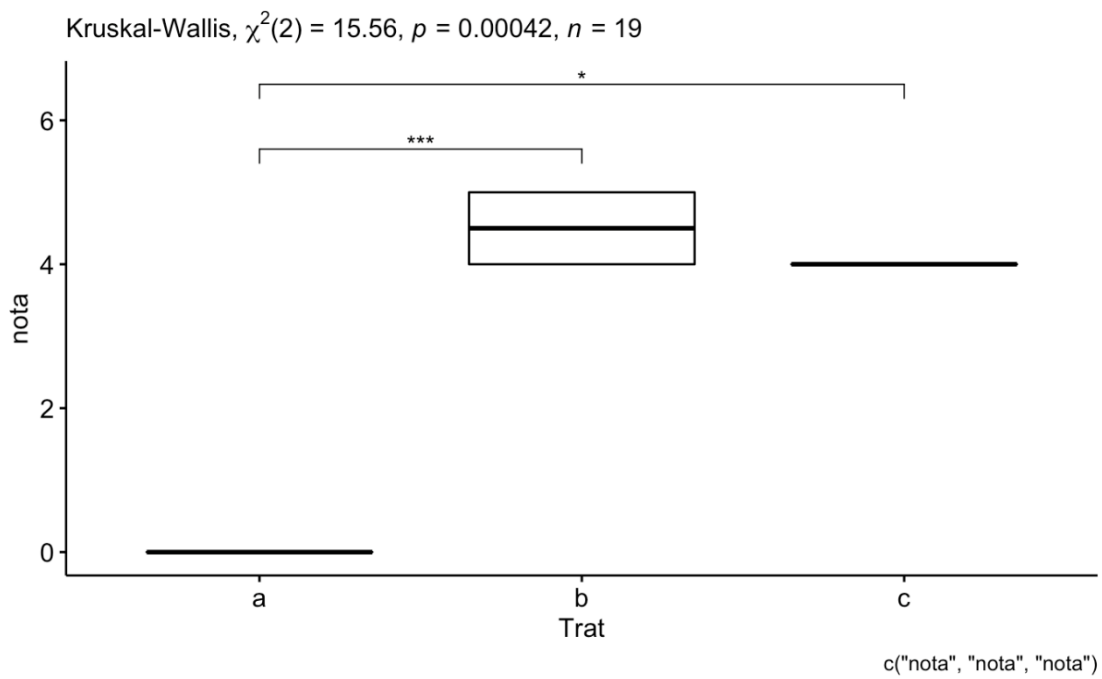


Figura 6 Análise estatística das notas atribuídas aos sintomas induzidos por *F. oxysporum* no sistema vascular, sendo **a** Controle; **b** CML 1784; **c** GM 13

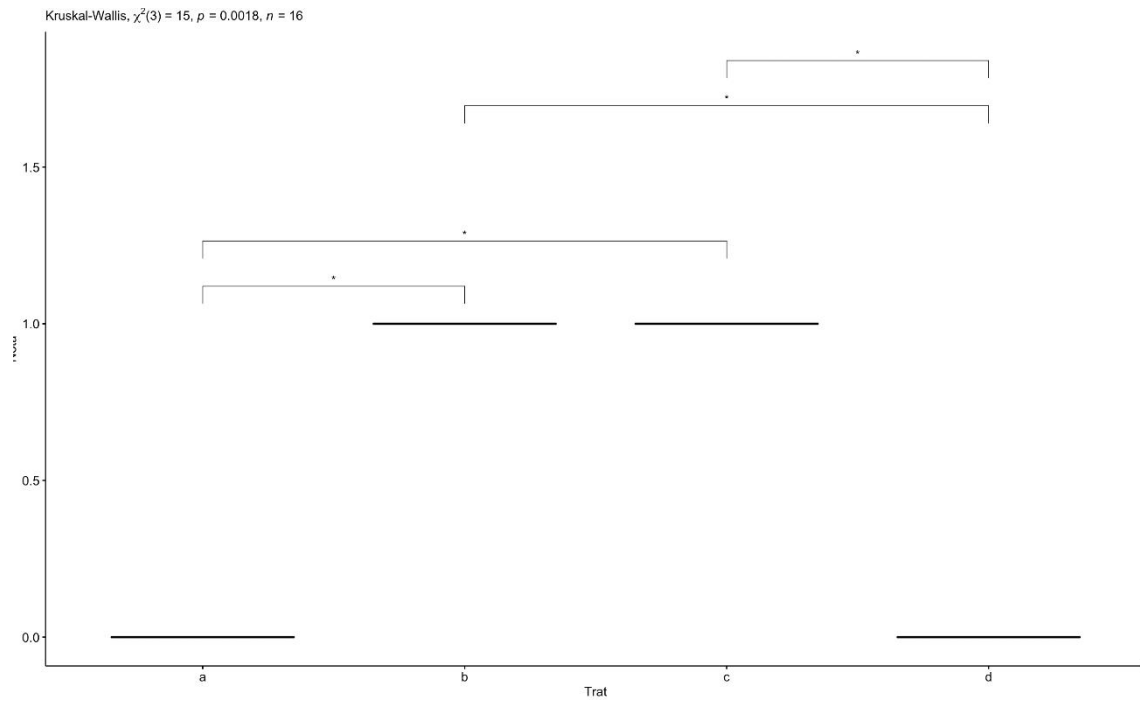


Figura 7 Análise estatística das notas atribuídas aos sintomas na parte aérea induzidos por *F. solani*, sendo **a** Controle; **b** GM 03; **c** GM 07; **d** GM 16

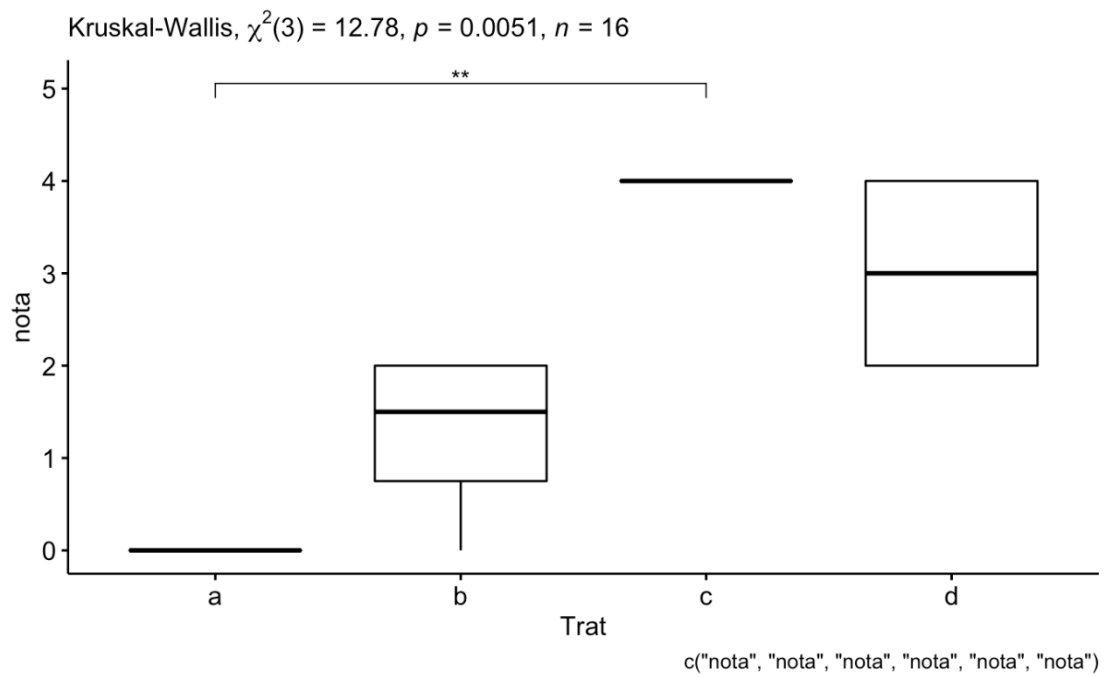


Figura 8 Análise estatística das notas atribuídas aos sintomas induzidos por *F. solani* no sistema radicular, sendo **a** Controle; **b** GM 03; **c** GM 07; **d** GM 16