



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus de Botucatu



**MARÍLIA PIZETTA**

**CARACTERIZAÇÃO DE *Fusarium decemcellulare*, *F. oxysporum* E  
*F. incarnatum* EM SERINGUEIRA NO ESTADO DE SÃO PAULO, RESISTÊNCIA  
CLONAL E SENSIBILIDADE A FUNGICIDAS**

**Botucatu**

**2017**



**MARÍLIA PIZETTA**

**CARACTERIZAÇÃO DE *Fusarium decemcellulare*, *F. oxysporum* E  
*F. incarnatum* EM SERINGUEIRA NO ESTADO DE SÃO PAULO, RESISTÊNCIA  
CLONAL E SENSIBILIDADE A FUNGICIDAS**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências  
Agronômicas da Unesp Câmpus de  
Botucatu, para a obtenção do título de  
Doutora em Ciência Florestal

Orientador: Prof. Dr. Edson Luiz Furtado

**Botucatu**

**2017**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO - DIRETORIA TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP - FCA - LAGEADO - BOTUCATU (SP)

P695c Pizetta, Marília, 1988-  
Caracterização de *Fusarium decemcellulare*, *F. oxysporum* e *F. incarnatum* em seringueira no Estado de São Paulo, resistência clonal e sensibilidade a fungicidas / Marília Pizetta. - Botucatu : [s. n.], 2017  
111 p. : il. color., graf. s., tabs.

Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2017  
Orientador: Edson Luiz Furtado  
Inclui bibliografia

1. *Fusarium* 2. Fungos - controle. 3. Seringueira - Cultivo. I. Furtado, Edson Luiz. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Campus de Botucatu). Faculdade de Ciências Agrônômicas. III. Título.

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte"

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: "CARACTERIZAÇÃO DE *Fusarium decemcellulare*, *F. oxysporum* E *F. incarnatum* EM SERINGUEIRA NO ESTADO DE SÃO PAULO, RESISTÊNCIA CLONAL E SENSIBILIDADE A FUNGICIDAS"

AUTORA: MARILIA PIZETTA

ORIENTADOR: EDSON LUIZ FURTADO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em CIÊNCIA FLORESTAL, pela Comissão Examinadora:



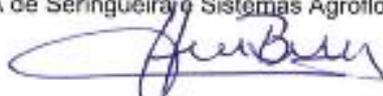
Prof. Dr. EDSON LUIZ FURTADO  
Departamento de Proteção Vegetal / Faculdade de Ciências Agronômicas de Botucatu - UNESP



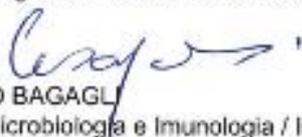
PROF. DR. NELSON SIDNEI MASSOLA JUNIOR  
Departamento de Fitopatologia / ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA



Dr. ERIVALDO JOSÉ SCALOPPI JUNIOR  
Centro APTA de Seringueira e Sistemas Agroflorestais / Instituto Agronômico de Campinas



Dr. CÉSAR JUNIOR BUENO  
Instituto Biológico / Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (APTA)



Prof. Dr. EDUARDO BAGAGLI  
Departamento de Microbiologia e Imunologia / Instituto de Biociências do Câmpus de Botucatu da UNESP

Botucatu, 26 de maio de 2017.



*A Deus, por mais uma conquista em minha vida  
À minha mãe Maria Luiza, por sempre acreditar em mim  
Ao meu amor Matheus, por sempre estar ao meu lado*

***Dedico***



## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, que em todos estes anos, proporcionou-me saúde para trilhar um caminho de muito aprendizado e lições.

À minha família, em especial a minha mãe, por todo o apoio e incentivo aos estudos, seguindo sempre sonhando, ensinando, lutando, torcendo e crescendo junto comigo, transformando os desafios em lições de vida e maturidade.

Ao meu amor Matheus, por estar presente em todos os momentos da minha pós-graduação, aconselhando-me, encorajando-me, fortalecendo-me para que eu alcance mais esta conquista.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Edson Luiz Furtado, por uma década de aprendizagem e oportunidades durante minha formação profissional na FCA/Unesp e ensinar a Fitopatologia de uma forma prazerosa e bem-humorada.

À Dra. Martha Passador e ao Dr. Júlio Marubayashi por acreditarem em mim e permitirem vivenciar uma das melhores experiências da minha vida.

Ao MSc. Helio Makoto Umemura por todo o suporte oferecido para a realização do intercâmbio e todas as dicas importantíssimas para a minha adequação ao estilo de vida japonês.

À Profa. Dra. Izabel Cristina Takitane pelo seu exímio trabalho como representante do convênio entre TUAT Nokodai e FCA/Unesp, proporcionando a tantos alunos, oportunidades de crescimento profissional e pessoal.

Ao Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), pela autorização de exportação do material para a pesquisa utilizado durante o intercâmbio.

Ao meu supervisor na TUAT, Prof. Dr. Tsutomu Arie, pelo interesse no meu trabalho e por todo o suporte financeiro e intelectual durante a realização do intercâmbio.

A todos os professores e funcionários da seção de intercâmbios da TUAT, pelo aprendizado e suporte aos alunos. Aos colegas do Laboratório de Proteção de Plantas, pela amizade, em especial, ao Takeshi Kashiwa e Yu Ayukawa pelas orientações e Sumika Abo e Chisato Mouri pelo aprendizado técnico.

Ao Coordenador do PPG – Ciência Florestal, Prof. Dr. Iraê Amaral Guerrini, e a secretária do Programa, Thaís Tavares, pelos serviços e suporte financeiro para a realização desta pesquisa.

A todos os professores e funcionários da FCA/Unesp por todo o conhecimento transmitido e suporte aos alunos da pós-graduação.

À Profa. Dra. Maria Marcia Pereira Sartori pelo suporte estatístico.

À Fazenda Aphidias em Pirajuí-SP, pela coleta de isolados fúngicos. Ao Diogo Esperante por compartilhar sua rede de contatos em prol do incentivo a pesquisa com seringueira. Aos viveiristas Clóvis Nakano, Guilherme Guiducci, Percy Putz e Gilson Azevedo pela doação das mudas para o teste de resistência clonal.

À amiga Caroline Pierozzi, parceira de todas as horas, por todo auxílio, dedicação e motivação pela pesquisa.

Aos colegas do Laboratório de Patologia Florestal da FCA pelos momentos agradáveis de trabalho e amizade durante todos esses anos.

À Faculdade de Ciências Agronômicas que me acolheu nesses 11 anos, abrindo portas e transformando minha vida profissional.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estudos concedida.

Aos membros da banca examinadora pelo aceite e contribuições para o trabalho.

Muito obrigada!

“Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina”

**Cora Coralina**



## RESUMO

A heveicultura é de grande importância para o estado de São Paulo, especialmente, no Planalto Paulista. Representa uma das culturas florestais mais plantadas no país, tendo como principal objetivo, a extração do látex, que serve como fonte de matéria-prima para confecção de produtos para as indústrias pneumáticas, hospitalares, calçadistas, etc. Porém, pelo cultivo em caráter perene, o gênero *Hevea* sofre com o ataque de patógenos, principalmente, fungos. A fusariose, causada por *Fusarium* spp., é uma doença descrita recentemente, que afeta a casca das plantas adultas, interferindo na exploração de látex pelos produtores. Os sintomas surgem como trincas no caule, seguidos de necrose na casca, podendo causar o “secamento” do látex da árvore e, conseqüente, morte da planta. Mesmo sabendo-se da importância dessa doença afetando plantações de seringueira, há poucos estudos na literatura sobre os agentes causais, seu comportamento, resistência genética e outras formas de controle da doença. Portanto, no presente estudo objetivou-se caracterizar patogenicamente, morfológicamente e molecularmente 51 isolados de *Fusarium* spp., realizando, também, teste de resistência clonal e testando diferentes ingredientes ativos no controle “*in vitro*” dos isolados patogênicos. Para a caracterização morfológica dos esporos, foram avaliados a forma, o tamanho e o número de septos, os tipos de clamidósporos, a formação das fialides e conidiogênese dos microconídios e mesoconídios. A caracterização cultural avaliou a taxa de crescimento micelial, presença ou ausência de esporodóquios e a coloração das colônias. Os estudos moleculares abrangeram análises filogenéticas do DNA dos isolados para as regiões rDNA ITS, rDNA IGS, gene TEF1- $\alpha$  e gene H3. No teste de resistência clonal, foram avaliados diferentes materiais clonais de seringueira quanto à resistência a *Fusarium* spp., sendo utilizados os clones RRIM 600 (produzido em substrato), RRIM 600 (produzido em solo - controle), IAC 502, IAC 511, IRCA 111, PB 350, PR 255, RRIM 937 (produzidos em solo), todos provenientes de enxertia. Para o teste de controle “*in vitro*”, foram testados oito produtos comerciais e um ativador de plantas, com os seguintes princípios ativos: clorotalonil, tiofanato metílico, tiofanato metílico + clorotalonil, azoxistrobina + tebuconazol, tebuconazol, piraclostrobina + epoxiconazol, azoxistrobina + ciproconazol, trifloxistrobina + tebuconazol, acibenzolar-S-metílico, dispostos em quatro concentrações (1.000, 100, 10 e 1  $\mu\text{L L}^{-1}$ ), sendo três deles registrados para a

cultura da seringueira. Baseando-se nos resultados obtidos através dos caracteres morfológicos, culturais e moleculares, foram identificadas três espécies de *Fusarium* ocorrendo em seringueira no estado de São Paulo, *Fusarium decemcellulare*, *Fusarium incarnatum* e *Fusarium oxysporum*, os quais os dois últimos ainda não foram relatados em seringueira no Brasil. Para o estudo de resistência clonal, os clones IRCA 111 e IAC 502 foram classificados como resistente e suscetível, respectivamente, à espécie *F. oxysporum*. Os materiais clonais IAC 511 e PR 255 foram resistente e suscetível, respectivamente, à espécie *F. incarnatum*. Para a espécie *F. decemcellulare* as informações não foram significativas entre os materiais testados, sendo necessários estudos complementares. As três espécies de *Fusarium* (*F. oxysporum*, *F. incarnatum* e *F. decemcellulare*) foram sensíveis aos fungicidas a base de tebuconazol e trifloxistrobina + tebuconazol, podendo ser alternativas para o manejo da fusariose em seringueira.

**Palavras-chave:** Heveicultura, fusariose, taxonomia fúngica, resistência clonal, enxertia, controle químico.

## ABSTRACT

The rubber tree cultivation represents a great importance for the São Paulo state, especially, in the São Paulo uplands. It represents one of the most planted forest crops in the country, with the main objective, the latex extraction, which serves as a source of raw material for the manufacture of products for the pneumatic, hospital, footwear industries, etc. However, by the cultivation on a perennial basis, the genus *Hevea* suffers from pathogens attack, mainly, fungi. The fusariosis, caused by *Fusarium* spp., is a disease described recently that affects the bark of adult plants, interfering in the latex exploitation by the producers. The symptoms appear as cracks in the stem, followed by necrosis in the bark, which may cause the “tree drying” of the latex of the tree and, consequently, death of the plant. Even knowing about the importance of this disease affecting rubber tree plantations, there are few studies about the biology of the species, its behavior, genetic resistance and other ways of disease control. Therefore, the study aimed to perform studies about pathogenic, morphological and molecular characterization of 51 isolates of *Fusarium* spp., also performing a clonal resistance test and to study different active ingredients in the “*in vitro*” control of the pathogenic isolates. For the morphological characterization of the spores, were evaluated the shape, size and septa number, types of chlamydospores, the formation of phialides and conidiogenesis of the microconidia and mesoconidia. The cultural characterization evaluated the mycelial growth rate, the presence or absence of sporodochia and the pigmentation of the colonies. The molecular studies covered phylogenetic analysis of the isolates DNA analyzes from rDNA ITS region, rDNA IGS region, TEF1- $\alpha$  gene and H3 gene. At the clonal resistance test, different clones of rubber trees were evaluated for resistance to *Fusarium* spp., the clones were RRIM 600 (produced from substrate), RRIM 600 (produced in soil - control), RRIM 937, PB 350, PR 255, IRCA 111, IAC 511, IAC 502 (produced in soil), all from bud grafting. For the “*in vitro*” control test, eight commercial products and one plant activator were tested with the following active ingredients: chlorothalonil, methyl thiophanate, methyl thiophanate + chlorothalonil, azoxystrobin + tebuconazole, tebuconazole, pyraclostrobin + epoxiconazole, azoxystrobin + cyproconazole, trifloxystrobin + tebuconazole, acibenzolar-S-methyl, arranged at four concentrations (1,000, 100, 10 and 1  $\mu\text{L L}^{-1}$ ), three of them registered for the rubber tree culture. Based on the results obtained through morphological, cultural and molecular

characters, three *Fusarium* species were identified, occurring in rubber trees in the São Paulo state, *Fusarium decemcellulare*, *Fusarium incarnatum* and *Fusarium oxysporum*, which the last two have not yet been reported in rubber trees in Brazil. For the clonal resistance study, the IRCA 111 and IAC 502 clones were classified as resistant and susceptible, respectively, to *F. oxysporum* species. The clonal materials IAC 511 and PR 255 were resistant and susceptible, respectively, to *F. incarnatum* species. For the *F. decemcellulare* species, the information was not significant among the tested materials and additional studies were necessary. The three *Fusarium* species (*F. oxysporum*, *F. incarnatum* and *F. decemcellulare*) were sensitive to fungicides based on tebuconazole and trifloxystrobin + tebuconazole, and could be an alternative to the management of the fusariosis in rubber tree.

**Keywords:** Rubber tree cultivation, fusariosis, fungi taxonomy, clonal resistance, grafting, chemical control.

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO GERAL.....</b>	<b>15</b>
<b>CAPÍTULO 1 - CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, CULTURAL E MOLECULAR DE ISOLADOS DE <i>Fusarium</i> spp. COLETADOS EM SERINGUEIRA NO ESTADO DE SÃO PAULO.....</b>	<b>25</b>
1.1 INTRODUÇÃO .....	28
1.2 MATERIAL E MÉTODOS .....	29
1.2.1 COLETA E ISOLAMENTO DOS ISOLADOS .....	29
1.2.2 OBTENÇÃO DOS ISOLADOS MONOSPÓRICOS.....	31
1.2.3 CARACTERIZAÇÃO PATOGÊNICA DOS ISOLADOS.....	31
1.2.4 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E CULTURAL DOS ISOLADOS .....	32
1.2.5 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS ISOLADOS .....	34
1.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	38
1.3.1 CARACTERIZAÇÃO PATOGÊNICA, MORFOLÓGICA E CULTURAL DOS ISOLADOS .....	38
1.3.2 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS ISOLADOS .....	54
REFERÊNCIAS.....	62
<b>CAPÍTULO 2 - AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA DE CLONES DE SERINGUEIRA A <i>Fusarium</i> spp.....</b>	<b>67</b>
2.1 INTRODUÇÃO .....	68
2.2 MATERIAL E MÉTODOS .....	70
2.2.1 AVALIAÇÃO DE RESISTÊNCIA DE CLONES DE SERINGUEIRA A <i>FUSARIUM</i> SPP.....	71
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	72
REFERÊNCIAS.....	78
<b>CAPÍTULO 3 - CONTROLE QUÍMICO EM DIFERENTES ESPÉCIES DE <i>Fusarium</i> DE SERINGUEIRA.....</b>	<b>81</b>
3.1 INTRODUÇÃO .....	83
3.2 MATERIAL E MÉTODOS .....	85
3.2.1 CONTROLE “ <i>IN VITRO</i> ” DE DIFERENTES ESPÉCIES DE <i>FUSARIUM</i> DE SERINGUEIRA .....	85
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	87
REFERÊNCIAS.....	101
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>107</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>109</b>



## INTRODUÇÃO GERAL

A seringueira caracteriza-se por ser uma árvore de grande porte e ciclo perene, sendo uma planta nativa da região Amazônica que integra a família Euphorbiaceae (GONÇALVES et al., 2002). Dentre os gêneros que pertencem a essa família, destacam-se *Hevea* (seringueira), *Ricinus* (mamona) e *Manihot* (mandioca). No Brasil, o gênero *Hevea* compreende 11 espécies de seringueiras (***Hevea guianensis*** Aublet, ***Hevea benthamiana*** Müll-Arg., ***Hevea brasiliensis*** (Willd. ex A. Juss.) Müll-Arg., ***Hevea pauciflora*** (Spruce ex Benth.) Müll-Arg., ***Hevea nitida*** Mart. ex. Müll-Arg., ***Hevea spruceana*** (Benth.) Müll-Arg., ***Hevea microphylla*** Ule, ***Hevea paludosa*** Ule, ***Hevea rigidifolia*** (Spruce ex Benth.) Müll-Arg., ***Hevea camporum*** Ducke e ***Hevea camargoana*** Pires) (GONÇALVES; CARDOSO; ORTOLANI, 1990; CORDEIRO; SECCO, 2015), sendo *Hevea brasiliensis*, a espécie mais importante para a produção de látex (GOMES, 1981).

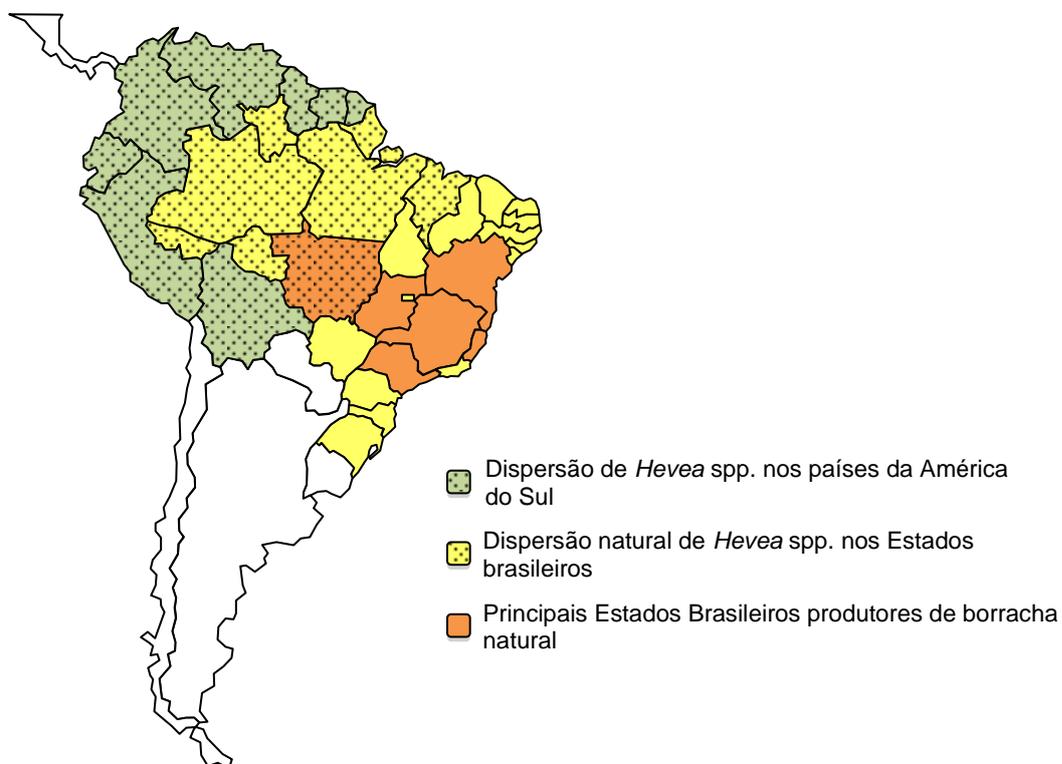
O botânico Adolfo Ducke dedicou anos de estudos a respeito do gênero *Hevea*, que pode ser encontrado amplamente distribuído na bacia Amazônica, compreendendo países como Brasil, Bolívia, Peru, Colômbia, Equador, Venezuela, Guiana Francesa, Suriname e Guiana (DUCKE, 1941; GONÇALVES; CARDOSO; ORTOLANI, 1990). No Brasil, o gênero encontra-se naturalmente disperso nos estados do Amazonas, Pará, Acre, Roraima, Amapá, nordeste do estado do Maranhão, norte do estado do Mato Grosso e Rondônia (DUCKE; BLACK, 1954).

*Hevea brasiliensis* caracteriza-se como uma planta lactescente, semidecídua, heliófita ou esciófita, típica da floresta amazônica de várzeas inundáveis e, em menor frequência, da floresta de terra firme ocorrendo, de preferência, em solos argilosos e férteis (LORENZI, 2014), utilizada de modo extrativista cuja finalidade é a produção de borracha natural (CAMPELO JÚNIOR, 2000). É uma espécie vegetal adaptável a diferentes condições climáticas, sendo plantada em grandes monocultivos em outras regiões do país, como o Sudeste (SP, ES e MG), Centro-Oeste (MT e GO), Nordeste (BA) (Figura 1) e, em outros países, principalmente os asiáticos (AGRIANUAL, 2015; IBGE, 2017), que representam importantes áreas de escape às principais doenças acometidas pela cultura em sua região de origem.

Em 2015, a área plantada de seringueira no país atingiu, aproximadamente, 154 mil hectares distribuídos nos estados produtores (IBGE, 2017). No mesmo período, a produção mundial de borracha natural foi de 12.277 mil toneladas, sendo

aproximadamente, 11.345 mil toneladas originárias do Sudeste Asiático e nas Américas produziram-se 334 mil toneladas, cerca de 2,72% da produção mundial. A Ásia representa o continente que mais consome o produto (72,8%), seguido pelas Américas (14,1%) e EMEA (Europa, Oriente Médio e África – 13,1%) e os valores da tonelada de borracha natural variaram entre US\$ 1,442 a US\$ 1,560 para o ano base 2015 (IRSG, 2017).

Figura 1 - Ocorrência natural de espécies do gênero *Hevea* na América do Sul e principais estados brasileiros produtores de borracha natural (Fontes: DUCKE, 1941; DUCKE; BLACK, 1954; GONÇALVES; CARDOSO; ORTOLANI, 1990; AGRIANUAL, 2015; IBGE, 2017).



A cultura apresenta multíusos, tendo como principal objetivo, a extração da borracha natural (látex – poliisopreno), através da seiva, que serve como fonte de matéria-prima para confecção de produtos para as indústrias pneumáticas e comércio (pneus de automóveis, caminhões, aviões e revestimentos diversos, luvas cirúrgicas, preservativos, entre outros). Posteriormente, a utilização da madeira pode ser realizada para energia, celulose e com o tratamento químico, pode ser utilizada na indústria de móveis e na fabricação de portas, janelas, formas para concreto armado, vigas, colunas, painéis e madeira compensada. Outros produtos não madeireiros podem ser aproveitados da seringueira como fonte de renda, como óleo de sementes (usado na indústria de tintas e vernizes), mel e torta para alimentação

animal (GONÇALVES, 2002; LORENZI, 2014). A seringueira ainda apresenta um benefício ambiental importante pelo fato de substituir a borracha sintética (derivada do petróleo) pela borracha natural, diminuindo a pressão sobre este recurso mineral (FRANCISCO; BUENO; BAPTISTELLA, 2004).

Para o estabelecimento de um seringal é importante a uniformidade dos indivíduos obtida através de melhoramento genético e obtenção de clones. Materiais clonais apresentam menor variabilidade em relação a diferentes caracteres como espessura da casca, produção, propriedades do látex, nutrição, tolerância às pragas e doenças, facilitando o manejo para o produtor. Os clones de importância comercial para regiões de escape são formados a partir de indivíduos parentais que apresentam, em geral, alta produtividade durante os primeiros anos de sangria aliada à alta taxa de retorno econômico sobre o investimento aplicado em curto espaço de tempo. Estes são alguns clones disponíveis para seringueira no mercado: GT 1, IAC 35, IAC 40, IAC 300, IAC 302, IAC 500, IAC 502, IAC 505, IAC 511, IRCA 111, PB 217, PB 252, PB 350, PC 119, PR 255, PR 261, RRIM 600, RRIM 713, RRIM 937 e RRIM 938. Muitas pesquisas têm alcançado resultados promissores quanto à produtividade e vigor de novos clones de seringueira, contudo, no planalto do estado de São Paulo, o clone RRIM 600 ainda é um dos mais plantados (IAC, 2013).

Estudos abrangendo melhoramento genético para esta espécie florestal encontram-se em constante progresso por pesquisadores brasileiros e de outros países, esforço necessário para garantir a produtividade crescente para as futuras plantações.

Com o avanço do monocultivo, gera uma preocupação quanto ao manejo de pragas e doenças, agentes responsáveis por grandes prejuízos econômicos. O conhecimento do patógeno, sua caracterização e estudos relacionados à resistência de materiais genéticos são fundamentais para a implantação e condução de uma floresta sadia. A seringueira é acometida por várias doenças bióticas e abióticas nas diferentes fases de desenvolvimento da planta, desde o crescimento do porta-enxerto a indivíduos adultos em campo. Clima quente e úmido, característico de zonas tropicais, é favorável à ocorrência da maioria dos patógenos em seringueiras, com destaque para a doença mal das folhas (*Microcyclus ulei*), considerada uma das mais destrutivas à cultura (GASPAROTTO; PEREIRA, 2012). Um dos motivos para o sucesso dos seringais no território paulista deve-se às diferenças climáticas

comparadas às regiões de origem, propiciando o controle evasivo do *M. ulei*. Além do mal das folhas, outras doenças que atacam os seringais:

**a) Doenças foliares:** antracnose das folhas (*Colletotrichum gloeosporioides* e *Colletotrichum acutatum*); requeima e queda anormal das folhas (*Phytophthora* spp.); mancha areolada (*Thanatephorus cucumeris*); crosta negra (*Phyllachora huberi*); mancha de *Cercospora* (*Cercospora heveae*); mancha de *Corynespora* (*Corynespora cassiicola*); oídio (*Oidium heveae*); mancha de *Periconia* (*Periconia manihoticola*); queima-do-fio (*Corticium koleroga*); doença de origem viral (patógeno do gênero *Carlavirus*); mancha de alternaria (*Alternaria* sp.) e mancha de alga (causada pela alga *Cephaleuros* spp.) (FURTADO; TRINDADE, 2005; GASPAROTTO et al., 2012a).

**b) Doenças de caule:** cancro estriado e cancro do tronco (*Phytophthora* spp.); mofo cinzento (*Ceratocystis fimbriata*); rubelose (*Erythricium salmonicolor*); morte descendente, cancro do enxerto e podridão do caule (doenças associadas, principalmente, ao parasita fraco *Lasiodiplodia theobromae*); antracnose do painel de sangria (*Colletotrichum gloeosporioides*); seca de ponteiros (causada por diversos fatores bióticos e abióticos que acarretam em sintomas muito semelhantes, exemplo, desfolhas sucessivas por doenças foliares, deficiência nutricional, matocompetição, etc.); tumores; *Fusarium* sp.; *Diplodia* sp. e *Cephalosporium* sp. (GASPAROTTO et al., 2012b).

**c) Doenças de raízes:** podridão vermelha (*Ganoderma philippii*); branca (*Rigidoporus lignosus*) e parda (*Phellinus noxius*) e nematoides (*Meloidogyne* sp., *Pratylenchus brachyurus*, *Rotylenchulus* sp., *Paratrichodorus* sp., Criconematideos) (GASPAROTTO; PEREIRA; FURTADO, 2012; WILCKEN et al., 2015).

A preocupação com o manejo para a resistência às pragas e doenças são de extrema importância devido aos sérios prejuízos e danos econômicos que podem causar aos seringais, como exemplo, a alta incidência de *Microcyclus ulei* nos seringais da região amazônica que inviabilizaram o cultivo nas décadas de 1930 e 1940.

Graças aos avanços nos estudos de melhoramento genético de seringueira, melhoristas têm trabalhado para obtenção de clones mais produtivos e resistentes às principais doenças. Estudos correlacionando a variabilidade do patógeno, a resistência do hospedeiro, a fisiologia das espécies e o melhoramento genético,

viabilizaram a heveicultura nas regiões quentes e úmidas da Amazônia nas últimas décadas, mesmo sob alta incidência de *M. ulei* (GASPAROTTO; PEREIRA, 2012).

Dentre as doenças importantes para a cultura da seringueira, destacam-se àquelas que incidem no caule, como *Fusarium* spp., que debilitam a planta e reduzem o potencial da produção laticífera. Em condições ideais de infecção, podem causar grandes prejuízos afetando tanto a produção quanto a qualidade da madeira. Com relação ao gênero *Fusarium* spp., este é considerado de grande importância acadêmica e econômica para a agricultura por englobar muitas espécies, raças e metabólitos relevantes na patogenia de plantas (LESLIE; SUMMERELL, 2006).

No âmbito agrícola, grandes perdas estão associadas pela ocorrência de *Fusarium* spp. nas lavouras relatadas para tomateiro, feijoeiro, milho, soja, entre outros. A doença mal-do-Panamá (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*), descoberta inicialmente no Panamá, no século passado, é exemplo de uma doença endêmica que se espalhou rapidamente pela maioria das regiões produtoras no mundo, dizimando os pés de bananeiras da variedade 'Gros Michel'. No Brasil, a variedade banana maçã é a mais suscetível a essa doença (PLOETZ, 2015; LESLIE; SUMMERELL, 2006).

Na literatura, *Fusarium* spp. foi inserido, primeiramente, por Link em 1809, sendo identificado pela presença de macroconídios em formato de canoa ou banana, caractere clássico para o diagnóstico deste gênero. Desde então, a taxonomia de *Fusarium* tem passado por diversas mudanças importantes para a correta identificação das inúmeras espécies existentes registradas para cada hospedeiro dentro do gênero. Os primeiros pesquisadores a estabelecerem um sistema taxonômico foram Wollenweber e Reinking, em 1935, que utilizaram a morfologia dos macroconídios e a pigmentação das colônias como critérios para a distinção das espécies, até então, divididas em 16 seções, 65 espécies e 77 variedades e formas subespecíficas (LESLIE; SUMMERELL, 2006).

Outros grandes estudiosos contribuíram para aprimorar o sistema taxonômico moderno de *Fusarium*. Raillo (1930-1950), salientou o cultivo de um único esporo para a identificação e baseou-se no formato do macroconídio e presença de microconídio e clamidósporos; Gordon (1930-1960) acrescentou o conceito de teleomorfismo; Snyder e Hansen, nas décadas de 40 e 50, reduziram para nove o número de espécies e enfatizaram a importância da cultura monospórica para uma identificação confiável; Messiaen e Cassini (1950-1960) basearam-se em variedades

botânicas em vez de cultivares; Bilai (1950-1970) estudou os caracteres fisiológicos na identificação ligados à temperatura, umidade e meio de cultura; Booth (1960-1970) introduziu a morfologia das células conidiogênicas; Matuo (1972), baseando-se na classificação de Snyder e Hansen, acrescentou uma espécie à taxonomia; Gerlach e Nirenberg (1982) reconheceram um grande número de espécies; Nelson, Toussoun e Marasas (1983) publicaram um guia para identificação de *Fusarium* com fotos nítidas para cada espécie, baseando-se na classificação proposta por Snyder e Hansen; Joffe (1986) acrescentou quesitos micotoxicológicos para a identificação (LESLIE; SUMMERELL, 2006).

De acordo com a literatura mais recente dedicada a taxonomia de espécies de *Fusarium* de Leslie e Summerell (2006), existem mais de 80 espécies patogênicas às plantas, contudo, com o avanço das técnicas moleculares, este número poderá aumentar drasticamente nos próximos anos.

Para realizar a identificação das espécies deste gênero, é necessário aferir os aspectos morfológicos e confirmar o resultado através do uso de técnicas moleculares. Apesar dos caracteres morfológicos serem ferramentas úteis na classificação inicial de fungos, são limitados em números, podendo estar sujeitos à seleção, e a expressão é sensível às mudanças ambientais. Portanto, devido às diferentes causas que podem originar a especiação de *Fusarium*, os conceitos biológicos e filogenéticos têm se tornado importantes para conferir veracidade à taxonomia do gênero (LESLIE; SUMMERELL, 2006).

A caracterização morfológica para espécies do gênero *Fusarium* deve compreender caracteres indispensáveis para uma correta identificação em nível de espécie, tais como: formato das células apicais e basais, tamanho e número de septos dos macroconídios e microconídios ou mesoconídios; células conidiogênicas (fialides); aparência dos clamidósporos, presença ou ausência de esporodóquio. Outras características secundárias podem ser utilizadas para diferenciar as espécies, são os caracteres culturais, como: coloração e taxa de crescimento das colônias; e fisiológicos, como: produção de micotoxinas e metabólitos secundários (LESLIE; SUMMERELL, 2006).

Referindo-se aos caracteres biológicos, podem-se citar alguns conceitos de fertilidade como espécies heterotálicas, homotálicas ou pseudohomotálicas, testes VCGs (grupos de compatibilidade vegetativa) e mating type que estuda a reprodução sexual dos fungos. Quanto aos caracteres filogenéticos, estes estão

associados às técnicas moleculares que são métodos mais sensíveis e específicos na caracterização do patógeno, como exemplo, o PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) e o teste ELISA (Enzime-linked immunosorbent assay) que são algumas técnicas utilizadas para a diagnose de diversos vírus, bactérias e fungos patogênicos a plantas (LESLIE; SUMMERELL, 2006; REZENDE et al., 2011).

Dentro do patossistema *Fusarium*-seringueira, foram encontradas diferentes espécies de *Fusarium* causando danos em plantios de seringueira nos países produtores: *Fusarium oxysporum* (China e Malásia – *H. brasiliensis*); *Fusarium solani* (China e Malásia – *H. brasiliensis*; Brasil – *Hevea* spp.); *Fusarium semitectum* – (sin.: *Fusarium incarnatum*) (Malásia – *H. brasiliensis*); *Fusarium tumidum* (Malásia – *H. brasiliensis*); *Fusarium javanicum* (China, Índia e Sri Lanka – *H. brasiliensis*); *Fusarium decemcellulare* (Brasil e Congo – *H. brasiliensis*); *Fusarium moniliforme* (Brasil – *Hevea* spp.); *Fusarium verticillioides* (Brasil – *Hevea* spp.); *Fusarium venfricosum* (China – *Hevea* spp.) (USDA, 2017; HUANG et al., 2016; JIANG et al., 2015; LI et al., 2014; DÓRIA, 2012; BETELONI et al., 2009; FURTADO et al. 2001).

A fusariose em seringueira acarreta danos no painel de sangria da planta, interferindo na produção de látex. Na China, em plantios de seringueira na Província de Yunnan, os danos causados por *Fusarium oxysporum* começaram por secreções marrons no caule de 5 a 6 cm acima do chão. Ocasionalmente, as secreções poderiam escurecer não havendo produção de látex na região. Após a secreção ser removida, a doença na casca estava putrescente mas ao redor da lesão estava sadio. Em situações mais severas, parte das folhas da copa ficaram amareladas e a raiz, próxima ao caule doente, estava seca e avermelhada (LI et al., 2014).

Em Jino, na China, outros sintomas da podridão do colo, causada pela espécie *Fusarium venfricosum* foram observados. As árvores apresentavam necroses nas cascas infectadas cobertas por oídio e, após realizar a remoção da casca, a parte do xilema afetado aparentava um gel branco e sem odor. Em situações mais extremas, a casca doente resultava em morte das plantas (JIANG et al., 2015).

Em seringais paulistas, os sintomas de *Fusarium* spp. podem ser observados nas cascas como trincas, estendendo-se do porta-enxerto em direção ao painel, provocando o secamento na região da área lesionada. Esta lesão pode crescer, com o passar do tempo, desprendendo a casca, o que torna o processo de sangria inviável (DÓRIA, 2012).

Os sintomas observados diferem entre as espécies, porém as lesões no caule, como as trincas, são características desta doença, seguidas por necroses. Em situações mais severas de infecção, as lesões podem originar o secamento e a morte da planta toda. O controle da fusariose pode ser realizado através de uma mistura com produto fungicida aplicada direto no painel infectado. Esta mistura consiste em meio litro de tinta látex branca, para proteger o tronco dos raios de sol e fixar o fungicida, meio litro de água e 5 mL de fungicida a base de ingrediente ativo tebuconazol. Para aplicar é preciso retirar a casca apodrecida e aplicar a pasta sobre a área lesionada. Para evitar a disseminação do patógeno, é essencial que os seringueiros desinfestem a faca de sangria de uma árvore para outra, com hipoclorito de sódio (GLOBO RURAL ONLINE, 2013).

Devido a ocorrência recente da doença fusariose e às frequentes perdas associadas à produtividade do látex, literaturas sobre o patossistema *Fusarium*-seringueira são pouco encontradas. Diante disso, tornam-se importantes estudos de identificação dos agentes patogênicos, interações destes com os materiais clonais plantados comercialmente e formas de controle eficientes a fim de auxiliar os produtores no manejo da heveicultura.

Com o propósito de conhecer as características dos fungos e suas interações com o hospedeiro, são necessários estudos que permitem uma melhor identificação do patógeno, diferenciando-o de outras espécies. Portanto, o primeiro estudo deste trabalho visou identificar isolados de *Fusarium* spp. coletados em seringais no estado de São Paulo, que apresentavam sintomas da doença, a fim de obter uma melhor identificação a nível de espécie.

Além disso, testes realizados para avaliar a resistência de uma espécie vegetal ou material clonal a um patógeno são importantes para o embasamento da seleção de genótipos resistentes. Desse modo, após o conhecimento das espécies causadoras de fusariose em *H. brasiliensis*, prosseguiu-se o segundo estudo com a finalidade de verificar a resistência de materiais clonais, utilizados comercialmente, expostos à doença fusariose, permitindo assim, encontrar clones resistentes, sendo uma informação relevante para o programa de melhoramento da cultura.

Como premissa de auxiliar os produtores no controle da fusariose no painel de sangria da seringueira, o terceiro estudo objetivou testar ingredientes ativos, sendo alguns registrados para a cultura para diferentes doenças, buscando encontrar

aquele que consiga controlar as diferentes espécies de *Fusarium*, como um todo, de modo eficiente.

Portanto, os objetivos do trabalho foram:

a) Realizar a caracterização morfológica e cultural dos agentes causadores da seca patológica do painel;

b) Realizar a caracterização molecular dos isolados patogênicos;

c) Verificar a reação de genótipos de seringueira a diferentes espécies de *Fusarium*;

d) Verificar a sensibilidade das espécies de *Fusarium* do painel da seringueira a alguns princípios ativos.

Os itens a e b, estão presentes no Capítulo I, o item c, está presente no Capítulo II e o item d, no Capítulo III.



**CAPÍTULO 1**  
**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, CULTURAL E MOLECULAR DE**  
**ISOLADOS DE *Fusarium* spp. COLETADOS EM SERINGUEIRA NO ESTADO DE**  
**SÃO PAULO**

Marília Pizetta, Caroline Geraldi Pierozzi, Yu Ayukawa, Takeshi Kashiwa, Ken  
Komatsu, Tohru Teraoka, Tsutomu Arie, Edson Luiz Furtado

**Resumo:** A heveicultura é a terceira cultura florestal mais eminente para o estado de São Paulo. Dentre os problemas fitossanitários ocorrentes nos seringais do noroeste paulista, a fusariose, causada por *Fusarium* spp., é uma doença que está causando danos preocupantes para os produtores, pois afeta a casca da planta, interferindo na produção de látex. O objetivo deste estudo foi realizar estudos sobre caracterização morfológica, cultural e molecular de 51 isolados de *Fusarium* spp. coletados em seringueira no estado de São Paulo. Para os estudos morfológicos e culturais, foram avaliados a forma, o tamanho e o número de septos dos conídios, a taxa de crescimento micelial, presença ou ausência de esporodóquios, os tipos de clamidósporos, a formação das fialides e conidiogênese dos microconídios e mesoconídios e a coloração das colônias. Os estudos moleculares abrangeram análises filogenéticas do DNA dos isolados para as regiões rDNA ITS, rDNA IGS, gene TEF1- $\alpha$  e gene H3. Foram identificadas três espécies de *Fusarium* em seringueira, *Fusarium oxysporum* (FO) em 13 isolados, *Fusarium incarnatum* (FI) em 4 isolados e *Fusarium decemcellulare* (FD) em 34 isolados. Em meio de cultura SNA, entre 7–10 dias, o tamanho dos macroconídios de FO variou entre 20,14 – 44,99  $\mu\text{m}$  x 3,83 – 5,10  $\mu\text{m}$  (comprimento e largura), 1–6 septos, com células apicais nas formas abrupta, papilar ou curva e células basais mal ou distintamente entalhadas ou em formato de pé e os microconídios observados apresentavam forma oval, ovoide ou reniforme, com 0–1 septo e tamanho de 8,38 – 12,61  $\mu\text{m}$  x 2,78 – 3,86  $\mu\text{m}$  (comprimento e largura). Para FI, o tamanho dos macroconídios esteve entre 24,92 – 52,95  $\mu\text{m}$  x 3,55 – 4,17  $\mu\text{m}$  (comprimento e largura), 3–6 septos, com forma abrupta, papilar ou curva para células apicais e mal ou distintamente entalhadas ou em formato de pé para as células basais. A forma do mesoconídio é fusoide, de 1–3 septos e tamanho variando entre 18,32 – 20,79  $\mu\text{m}$  x 3,07 – 3,68  $\mu\text{m}$  (comprimento e largura). Em FD, os macroconídios variaram entre 70,79 – 94,85

$\mu\text{m}$  x 5,70 – 7,47  $\mu\text{m}$  (comprimento e largura), 6–10 septos, sendo as células apicais com forma abrupta, papilar ou curva e as células basais como mal ou distintamente entalhadas ou em formato de pé. Os microconídios apresentaram forma oval ou ovoide, 0 a 1 septos e 8,82 – 10,83  $\mu\text{m}$  x 3,52 – 4,67  $\mu\text{m}$  (comprimento e largura). Em meio de cultura SNA aos 21 dias, os clamidósporos encontrados para *FO*, *FI* e *FD* foram do tipo único, duplo ou em cadeia e a formação conidiogênica dos microconídios para *FO* deu-se em monofialides em falsa-cabeças, dos mesoconídios para *FI* em conídios únicos em monofialides e polifialides e em *FD* por monofialides em cadeia. Em meio de cultura BDA aos 10 dias, a coloração das colônias variou entre branco a violeta claro e violeta escuro para *FO*, de bege a marrom claro para *FI* e, em magenta claro, magenta a magenta escuro para isolados de *FD* e os IVCMS foram de 12,0 mm dia<sup>-1</sup> para *FO*, de 14,5 mm dia<sup>-1</sup> e 9,6 mm dia<sup>-1</sup> para *FI* e 6,4 mm dia<sup>-1</sup> para *FD*. As análises moleculares ratificaram os dados morfológicos e culturais, sendo os 51 isolados de *Fusarium* agrupados em três clados e comparados às sequências nucleotídicas do GenBank para cada região ou gene, com exceção de *FD*, região rDNA IGS, que não foi encontrada sequência de nucleotídeos na base de dados. As similaridades dos isolados *FO*, *FI* e *FD* variou de 97 a 100% para a região rDNA ITS, de 94 a 100% para a região rDNA IGS, de 98 a 100% para o gene TEF-1 $\alpha$  e de 95 a 100% para o gene H3, sendo a espécie *Colleotrichum gloeosporioides* escolhida como outgroup.

**Palavras-chave:** fusariose, heveicultura, identificação de fungos.

**Abstract:** The rubber cultivation is the third most eminent forest crop for the São Paulo state. Among the phytosanitary problems that occur in rubber tree plantations in northwest of the São Paulo state, fusariosis, caused by *Fusarium* spp., is a disease that is causing concern damage to producers, because it affects the bark of the plant, interfering on the latex exploitation. The objective of this study was to perform studies about morphological, cultural and molecular characterization of 51 isolates of *Fusarium* spp. collected in rubber trees in the São Paulo state. For the morphological and cultural studies, were evaluated the shape, size and septa number of the conidia, mycelial growth rate, presence or absence of the sporodochia, the types of the chlamydospores, the formation of phialides and conidiogenesis of microconidia and mesoconidia and the pigmentation of the colonies. The molecular

studies covered the phylogenetic analysis of the isolates DNA from the rDNA ITS region, rDNA IGS region, TEF1- $\alpha$  gene and H3 gene. Three species of *Fusarium* were identified in rubber tree, *Fusarium oxysporum* (*FO*) in 13 isolates, *Fusarium incarnatum* (*FI*) in 4 isolates and *Fusarium decemcellulare* (*FD*) in 34 isolates. In SNA culture medium, among 7-10 days, the size of the macroconidia of *FO* ranged from 20.14 to 44.99  $\mu\text{m}$  x 3.83 to 5.10  $\mu\text{m}$  (length and width), 1-6 septa, with apical cells in abrupt, papillate or hooked forms and basal cells in barely or distinctly notched or foot-shaped forms and microconidia were observed in oval, ovoid or reniform forms, with 0-1 septum and size from 8.38 to 12.61  $\mu\text{m}$  x 2.78 to 3.86  $\mu\text{m}$  (length and width). For *FI*, the size of the macroconidia was among 24.92 to 52.95  $\mu\text{m}$  x 3.55 to 4.17  $\mu\text{m}$  (length and width), 3-6 septa, with abrupt, papillate or hooked apical cells and barely or distinctly notched or foot-shaped basal cells. The mesoconidia were fusoid, 1-3 septa and 18.32 to 20.79  $\mu\text{m}$  x 3.07 to 3.68  $\mu\text{m}$  (length and width). In *FD*, the macroconidia ranged from 70.79 to 94.85  $\mu\text{m}$  x 5.70 to 7.47  $\mu\text{m}$  (length and width), 6-10 septa, with abrupt, papillate or hooked apical cell and barely or distinctly notched or foot-shaped basal cells. The microconidia were oval or ovoid, 0-1 septa and with 8.82 to 10.83  $\mu\text{m}$  x 3.52 to 4.67  $\mu\text{m}$  (length and width). At 21 days, in the SNA culture medium, the chlamydospores observed to *FO*, *FI* and *FD* were single, paired and in chain types and the conidiogenesis formation of the microconidia to *FO* occurred in monophialides in false-heads, to mesoconidia of *FI* in singly conidia in monophialides and polyphialides and in *FD* by monophialides in chain. In PDA culture medium, at 10 days, the pigmentation of the colonies ranged from white to light violet and dark violet for *FO*, from beige to light brown for *FI* and light magenta, magenta and dark magenta for *FD* isolates and the IVCMs were 12.0  $\text{mm day}^{-1}$  for *FO*, 14.5  $\text{mm day}^{-1}$  and 9.6  $\text{mm day}^{-1}$  for *FI* and 6.4  $\text{mm day}^{-1}$  for *FD*. The molecular analysis ratified the morphological and cultural data, and the 51 isolates of *Fusarium* were grouped into three clades and compared with the nucleotide sequences in the GenBank for each region or gene, except *FD*, rDNA IGS region, which was not found the nucleotide sequence database. The similarities of the isolates *FO*, *FI* and *FD* ranged from 97 to 100% for the rDNA ITS region, from 94 to 100% for the rDNA IGS region, from 98 to 100% for the TEF-1 $\alpha$  gene and from 95 to 100% for the H3 gene, and the specie *Colleotrichum gloeosporioides* as outgroup.

**Keywords:** fusariosis, rubber tree cultivation, fungi identification.

## 1.1 INTRODUÇÃO

A seringueira é uma planta originária da região Amazônica, pertencente a família Euphorbiaceae (GONÇALVES et al., 2002), de ciclo perene e destaca-se pelas suas propriedades laticíferas, na produção de látex, matéria prima de importância para as indústrias automobilísticas, pneumáticas e farmacêuticas, sendo a espécie *Hevea brasiliensis* a mais produtiva economicamente (GOMES, 1981).

Em 2015, a produção mundial de borracha natural atingiu 12.277 mil toneladas e o cenário brasileiro foi responsável por 2,6% do total produzido neste ano. Devido às condições favoráveis ao cultivo de seringueira, o estado de São Paulo se destaca na produtividade brasileira, representando 57,1% do total produzido no país (IRSG, 2017; IBGE, 2017).

Apesar da seringueira originar-se na América do Sul, o mercado produtivo da heveicultura localiza-se, principalmente, nos países asiáticos, que além das vantagens climáticas para a cultura, são áreas de evasão às doenças encontradas em seu local de origem, como o mal das folhas, ocasionado por *Microcyclus ulei*. Já o estado de São Paulo representa uma área de escape ou evasão dentro do território brasileiro para o mal das folhas.

Vários patógenos atacam a cultura trazendo prejuízos à produtividade de látex. A fusariose, doença acometida pelo fungo *Fusarium* spp., vem destacando-se pelo aumento de árvores infectadas nos seringais paulistas nos últimos anos. O fungo pode penetrar na planta através de ferimentos ocasionados pela prática da sangria, sendo disseminado rapidamente, se não houver a esterilização do material de corte.

Na literatura foram registrados os danos ocasionados por *Fusarium* spp.. Em plantios na China, pesquisadores observaram danos de *Fusarium oxysporum* no painel de sangria, representados por secreções marrons que interferiam na produtividade do látex (LI et al., 2014). Jiang et al. (2015) notificaram sintomas de podridão do colo, causada por *Fusarium venfricosum*, caracterizados por necroses nas cascas, que ao serem removidas, apresentavam um gel branco e sem odor, que em situações mais extremas, ocasionava a morte das plantas. Sintomas de *Fusarium solani*, em árvores no campo, caracterizaram-se por estriamento do painel de sangria tornando-se marrom, as folhas caíam com o avanço das lesões e as plantas estagnavam o crescimento (HUANG et al., 2016).

No Brasil, foi relatada a presença de *Fusarium decemcellulare* em plantas cultivadas no noroeste paulista. As lesões típicas para o ataque deste patógeno são

trincas no tronco das árvores, estendendo-se do porta-enxerto em direção ao painel, secando a região afetada. As lesões na madeira possuem coloração avermelhada na região de sangria, que debilitam a planta, interferindo na extração do látex (DÓRIA, 2012).

Devido às recentes ocorrências dessa doença nos seringais paulistas, poucas literaturas sobre o patossistema *Fusarium*-seringueira são encontradas. Estudos sobre o comportamento dos fungos e suas interações com o hospedeiro tornam-se importantes a fim de estabelecer estratégias para o manejo de doenças e ferramentas na seleção de genótipos resistentes para fins comerciais. Diante disso, o trabalho teve por objetivo realizar a caracterização morfológica, cultural e molecular de isolados de *Fusarium* spp. coletados em três regiões do estado de São Paulo, Brasil.

## **1.2 MATERIAL E MÉTODOS**

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Patologia Florestal localizado no Departamento de Proteção Vegetal, na Fazenda Experimental Lageado, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu – São Paulo – Brasil e no Laboratório de Patologia de Plantas localizado na Tokyo University of Agriculture and Technology, Fuchu – Tóquio – Japão.

### **1.2.1 Coleta e isolamento dos isolados**

As coletas dos isolados de *Fusarium* spp. foram realizadas em três áreas no estado de São Paulo, Brasil, sendo duas áreas de produção de seringueira que apresentavam a ocorrência da fusariose. No total, foram coletados 51 isolados, sendo 14 isolados provenientes de seringais da região de Barretos-SP, 26 isolados oriundos de seringais da região de Pirajuí-SP e 11 isolados coletados em pomares de pesquisa na cidade de Botucatu-SP (Tabela 1).

O isolamento foi realizado a partir de fragmentos dos materiais coletados, submetidos ao processo de desinfestação superficial em álcool 70% durante um minuto, seguido de desinfestação em hipoclorito de sódio a 2% durante dois minutos e, posteriormente, realizando-se a lavagem em água destilada autoclavada e secagem dos fragmentos em papel filtro autoclavado.

Tabela 1 - Identificação dos isolados de *Fusarium* spp. coletados em seringueira no estado de São Paulo.

Isolados de <i>Fusarium</i> spp.			
ID do isolado	Hospedeiro	Local da coleta	Data da coleta
F1	<i>Hevea brasiliensis</i>	Barretos-SP	19/02/2014
F2	<i>Hevea brasiliensis</i>	Barretos-SP	19/02/2014
F3	<i>Hevea brasiliensis</i>	Barretos-SP	19/02/2014
F4	<i>Hevea brasiliensis</i>	Barretos-SP	19/02/2014
F5	<i>Hevea brasiliensis</i>	Barretos-SP	19/02/2014
F6	<i>Hevea brasiliensis</i>	Barretos-SP	19/02/2014
F7	<i>Hevea brasiliensis</i>	Barretos-SP	19/02/2014
F8	<i>Hevea brasiliensis</i>	Barretos-SP	19/02/2014
F9	<i>Hevea brasiliensis</i>	Barretos-SP	19/02/2014
F10	<i>Hevea brasiliensis</i>	Barretos-SP	19/02/2014
F11	<i>Hevea brasiliensis</i>	Barretos-SP	19/02/2014
F12	<i>Hevea brasiliensis</i>	Barretos-SP	19/02/2014
F13	<i>Hevea brasiliensis</i>	Barretos-SP	19/02/2014
F14	<i>Hevea brasiliensis</i>	Barretos-SP	19/02/2014
F15	<i>Hevea brasiliensis</i>	Botucatu-SP	12/03/2014
F16	<i>Hevea brasiliensis</i>	Botucatu-SP	12/03/2014
F17	<i>Hevea brasiliensis</i>	Botucatu-SP	12/03/2014
F18	<i>Hevea brasiliensis</i>	Botucatu-SP	12/03/2014
F19	<i>Hevea brasiliensis</i>	Botucatu-SP	12/03/2014
F20	<i>Hevea brasiliensis</i>	Botucatu-SP	19/03/2014
F21	<i>Hevea brasiliensis</i>	Botucatu-SP	19/03/2014
F22	<i>Hevea brasiliensis</i>	Botucatu-SP	19/03/2014
F23	<i>Hevea brasiliensis</i>	Botucatu-SP	19/03/2014
F24	<i>Hevea brasiliensis</i>	Botucatu-SP	19/03/2014
F25	<i>Hevea brasiliensis</i>	Botucatu-SP	19/03/2014
F26	RRIM 600	Pirajuí-SP	08/07/2014
F27	RRIM 600	Pirajuí-SP	08/07/2014
F28	RRIM 600	Pirajuí-SP	08/07/2014
F29	RRIM 600	Pirajuí-SP	08/07/2014
F30	RRIM 600	Pirajuí-SP	08/07/2014
F31	RRIM 600	Pirajuí-SP	08/07/2014
F32	RRIM 600	Pirajuí-SP	08/07/2014
F33	RRIM 600	Pirajuí-SP	08/07/2014
F34	RRIM 600	Pirajuí-SP	08/07/2014
F35	RRIM 600	Pirajuí-SP	08/07/2014
F36	GT 1	Pirajuí-SP	08/07/2014
F37	GT 1	Pirajuí-SP	08/07/2014
F38	GT 1	Pirajuí-SP	08/07/2014
F39	GT 1	Pirajuí-SP	08/07/2014
F40	GT 1	Pirajuí-SP	08/07/2014
F41	GT 1	Pirajuí-SP	08/07/2014
F42	GT 1	Pirajuí-SP	08/07/2014
F43	GT 1	Pirajuí-SP	08/07/2014
F44	PB 235	Pirajuí-SP	08/07/2014
F45	PB 235	Pirajuí-SP	08/07/2014
F46	PB 235	Pirajuí-SP	08/07/2014
F47	PB 235	Pirajuí-SP	08/07/2014
F48	PB 235	Pirajuí-SP	08/07/2014
F49	PB 235	Pirajuí-SP	08/07/2014
F50	PB 235	Pirajuí-SP	08/07/2014
F51	PB 235	Pirajuí-SP	08/07/2014

Os fragmentos esterilizados foram depositados em meio de cultura BDA (Batata Dextrose Ágar) e mantidos sob condições controladas de temperatura e fotoperíodo

( $25 \pm 1^\circ \text{C}$  em fotoperíodo alternado de 12 horas) para o crescimento das colônias. Após a observação do crescimento micelial de *Fusarium* spp., a partir dos fragmentos, foram repicados para o meio BDA para purificação e preservados pelo método Castellani.

### **1.2.2 Obtenção dos isolados monospóricos**

Os isolados mantidos em meio de cultura BDA foram purificados, de acordo com a técnica de cultivo monospórico de Fernandez (1993). Foram transferidas fragmentos de micélio de *Fusarium* spp. para o meio de cultura BDA e decorridos 10 dias de incubação dos isolados e presença de esporulação, adicionaram-se 5 mL de água destilada autoclavada, agitando-se com o auxílio de uma alça de Drigalski e plaqueando-as para placas de Petri contendo meio de cultura ágar. As placas foram vedadas e acondicionadas em câmara de incubação BOD a  $25^\circ \text{C}$ . Após 24 horas, os esporos que germinaram isoladamente foram observados em microscópio óptico, sendo selecionados e repicados para três placas de Petri contendo meio de cultura BDA com o auxílio de agulhas descartáveis. As placas foram mantidas sob incubação a  $25^\circ \text{C}$  e fotoperíodo de 12 horas.

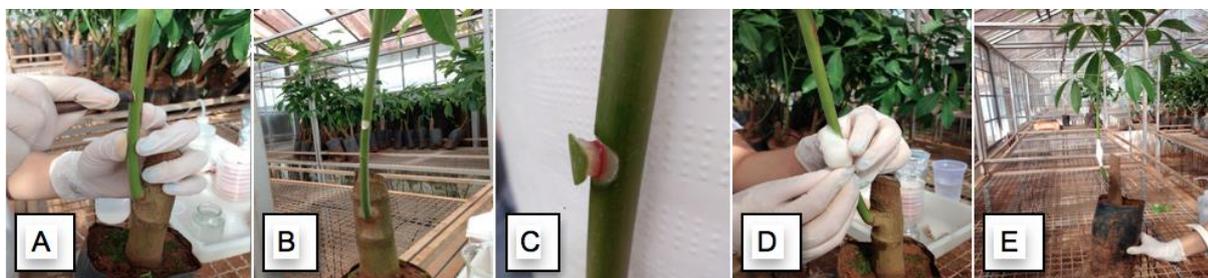
Os isolados monospóricos e multispóricos obtidos foram preservados pelo método Castellani e método de criopreservação e encontram-se armazenados na Micoteca do Departamento de Proteção de Plantas, da Faculdade de Ciências Agrônômicas, FCA/Unesp, Campus Botucatu e na Micoteca “Mário Barreto Figueiredo”, do Instituto Biológico de São Paulo (ID micoteca de 01/17 a 51/17 para todos os isolados).

### **1.2.3 Caracterização patogênica dos isolados**

Os isolados obtidos nas coletas foram submetidos aos testes de patogenicidade em mudas de seringueira a fim de confirmar a agressividade destes às plantas. A metodologia utilizada para o teste consistiu em realizar uma incisão no caule da planta, entre a casca e o lenho, com o auxílio de um furador de 7 mm de diâmetro (Fig. 1A e B), depositando-se um disco de micélio do fungo com sete dias de idade e 0,5 cm de diâmetro (Fig. 1C), totalizando uma inoculação por planta. O local inoculado foi coberto com algodão umedecido com água destilada autoclavada (Fig. 1D) e envolto por uma fita adesiva com o intuito de proteger contra a dessecação (Fig. 1E), permanecendo coberto até o momento da leitura dos dados (Figura 1).

O material clonal utilizado para as inoculações foi o RRIM 600 (clone padrão), sendo utilizadas cinco plantas de seringueira para cada isolado de *Fusarium* spp.. A inoculação procedeu-se em plantas enxertadas com sete meses de idade (com um ou dois lançamentos foliares). A testemunha absoluta foi inoculada apenas com o disco contendo o meio de cultura BDA sem o fungo e as testemunhas utilizadas como controles negativos consistiram de dois isolados de *Fusarium oxysporum*, sendo um não patogênico (Fo304) e um patogênico (F880621a-1) à tomate.

Figura 1 - Procedimentos utilizados para o teste de patogenicidade em mudas de seringueira do clone RRIM 600. A e B. Abertura no caule com o auxílio de um furador de 7 mm de diâmetro; C. Deposição do disco com meio de cultura BDA de 5 mm de diâmetro contendo o fungo; D. Local inoculado envolto por algodão umedecido e E. Planta inoculada.



As plantas inoculadas foram mantidas em casa de vegetação, sob condições controladas de temperatura (25°C) e foram avaliadas 60 dias após as inoculações. A avaliação foi do tipo destrutiva, ou seja, cortou-se o caule no sentido longitudinal para verificar a ocorrência de lesões e a leitura dos dados foi obtida através de uma régua milimetrada. Sintomas não foram observados na parte aérea durante o experimento. Em seguida, os fragmentos vegetais contendo lesões de cada isolado foram reisolados em meio de cultura BDA a fim de confirmar a patogenicidade dos isolados fúngicos. As análises estatísticas foram realizadas através do Teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

#### 1.2.4 Caracterização morfológica e cultural dos isolados

A caracterização morfológica dos isolados baseou-se na taxonomia de *Fusarium* spp. de Leslie e Summerell (2006) e ilustrações de Komada, Ogawa e Aoki (2011). Os caracteres avaliados foram: a taxa de crescimento micelial, presença ou ausência de esporodóquio e clamidósporos, formação das fialides e conidiogênese e a forma, tamanho e número de septos dos macroconídios e microconídios ou mesoconídios (Figura 2). A coloração das colônias foi observada como um caractere complementar.

O experimento para obtenção da taxa de crescimento micelial dos isolados consistiu em repicar discos de ágar contendo micélios de 7 mm de diâmetro para o centro das placas de Petri contendo o meio de cultura BDA a fim de observar o crescimento do patógeno. As placas foram mantidas sob incubação a 25° C no escuro. Foram utilizadas quatro repetições para cada isolado e as medidas foram obtidas diariamente nos sentidos longitudinal e transversal até o fechamento da primeira placa de cada fungo. Com estes dados, foram obtidos os diâmetros médios diários de crescimento das colônias, sendo base para calcular a taxa de crescimento médio. O Índice de Velocidade de Crescimento Micelial (IVCM) foi obtido pela fórmula de  $IVCM = \sum (D - D_a)/N$ , sendo D: o diâmetro médio atual da colônia;  $D_a$ : o diâmetro médio da colônia do dia anterior; N: número de dias após a incubação (OLIVEIRA, 1991).

Para a avaliação do esporodóquio, clamidósporos, fialides, macroconídios e microconídios ou mesoconídios, foram utilizados o meio de cultura Synthetic Nutrient Low Agar (SNA) e as placas foram mantidas sob incubação a 25° C no escuro.

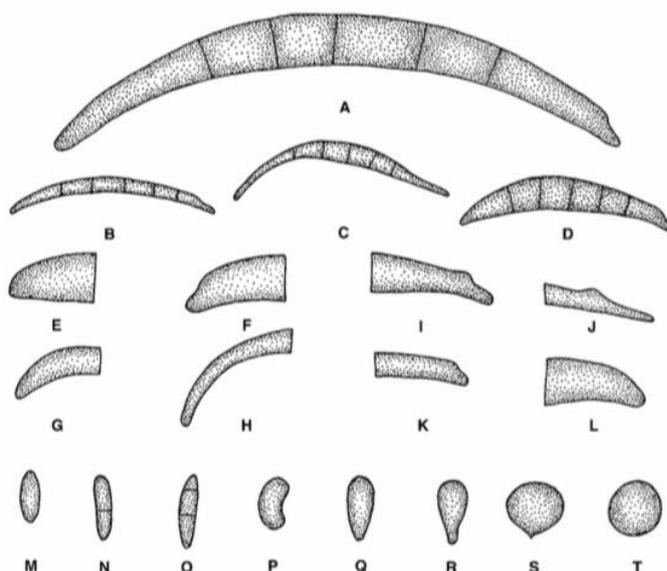
A presença ou ausência de esporodóquio e clamidósporos foram observadas semanalmente até as colônias completarem 21 dias. Foi considerado esporodóquio presente, aqueles isolados que produziram esta estrutura, que quando isolada e observada em microscópio óptico, continha uma grande massa de macroconídios.

Os clamidósporos foram observados em microscópio óptico, considerados presentes aqueles isolados que continham a produção destes esporos de resistência nas hifas, sendo classificados em únicos, em pares ou em cadeia.

A formação de fialides e conidiogênese das colônias foi observada entre 21 e 25 dias após a incubação e o experimento consistiu em recortar pedaços do meio de cultura SNA contendo a formação micelial, depositados sob uma lâmina de vidro para observação em microscópio óptico. As fialides foram classificadas em monofialides ou polifialides e a conidiogênese em falsa-cabeça, único ou em cadeia.

As avaliações do formato (Figura 2), tamanho e número de septos dos macroconídios e microconídios ou mesoconídios foram realizadas em colônias com 7 a 10 dias de idade, em meio de cultura SNA. Os macroconídios, quando formados em esporodóquio, e os microconídios ou mesoconídios foram observados em microscópio óptico BIOREVO BZ-9000, sendo medidos o comprimento e largura em micrômetro ( $\mu\text{m}$ ) de 100 esporos para cada isolado (50 macroconídios e 50 microconídios ou mesoconídios).

Figura 2 - Morfologia dos esporos utilizada na identificação de espécies de *Fusarium*. A-D: Forma macroconidial. A. Típico macroconídio de *Fusarium*. Célula apical a esquerda, célula basal a direita. B. Macroconídio delgado, reto, quase em forma de agulha, p. ex., *F. avenaceum*. C. Macroconídio com curvatura dorsiventral, p. ex., *F. equiseti*. D. Macroconídio com lado dorsal mais curvado que o ventral, p. ex., *F. crookwellense*. E-H: Formas das células apicais dos macroconídios. E. Abrupto, p. ex., *F. culmorum*. F. Papilar, p. ex., *F. sambucinum*. G. Curvado, p. ex., *F. lateritium*. H. Afunilado, p. ex., *F. equiseti*. I-L: Formas das células basais dos macroconídios. I. Formato de pé, p. ex., *F. crookwellense*. J. Formato de pé alongado, p. ex., *F. longipes*. K. Distintamente entalhado, p. ex., *F. avenaceum*. L. Mal entalhado, p. ex., *F. solani*. M-T: Forma microconidial. M. Oval. N. Oval de duas células. O. Oval de três células. P. Reniforme. Q. Obovóide com a base truncada. R. Piriforme. S. Napiforme. T. Globoso. Ilustração de Leslie e Summerell (2006).



### 1.2.5 Caracterização molecular dos isolados

A extração de DNA dos isolados monospóricos foi realizada através do Protocolo de Saitoh et al. (2006) que consistiu em extrair fragmentos miceliais dos isolados, mantidos em meio de cultura BDA com 10 dias de idade, com auxílio de um palito, depositando-os na parede de eppendorf contendo 500  $\mu$ L de tampão de lise (400 mM Tris-HCL pH 8.0; 60 nM EDTA pH 8.0; 150 nM NaCl; 1% SDS). Os fragmentos foram homogeneizados através de um pistilo cônico esterilizado e ficaram em descanso por dez minutos.

Decorrido o tempo de espera, adicionou-se ao eppendorf 150  $\mu$ L de Acetato de Potássio pH 4.8 (60 nM 5M acetato de potássio; 11,5 mL acetato; 100 mL água esterilizada), seguindo-se homogeneização vigorosa em vortex. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 15.000 força g por cinco minutos a 4°C. Removeu-se apenas a parte líquida e acrescentou-se 750  $\mu$ L de etanol 99,5%, homogeneizando levemente para purificar as amostras. Estas foram submetidas à centrifugação a 15.000 força g por dez minutos a 4°C. Removeu-se o sobrenadante

e acrescentou-se 1.000 µL de etanol 70% para a limpeza das amostras. Novamente, foram centrifugadas a 15.000 força g por cinco minutos a 4°C e, em seguida, removeu-se todo o sobrenadante.

As amostras foram secas no secador Eyla Centrifugal Evaporator CVE-2000 por 15 minutos e, posteriormente, adicionou-se 50 µL de água MilliQ em cada amostra. A quantidade de DNA de cada isolado foi quantificada em Nanodrop e as amostras foram mantidas em freezer a -30°C.

A análise PCR consistiu em preparar as amostras utilizando a enzima Ex Taq polimerase (0,05 µL), tampão 10x (1 µL), dNTP (0,2 µL), 7,35 µL de água MilliQ e os *primers* ITS1 e ITS4, FIGS 11 e FIGS 12 (*F. oxysporum* e *F. incarnatum*), CNL12 e CNS1 (*F. decemcellulare*), Ef-1 e Ef-2 e H3-1a e H3-1b (0,2 µL/forward e 0,2 µL/reverse), valores para cada amostra de 1µL DNA.

Para a amplificação do DNA, utilizou-se o termociclador Takara PCR Thermal Cycler Dice e as condições termais foram ajustadas para cada *primer* e para cada espécie de *Fusarium* spp. (Tabela 2).

Em seguida, 1 µL do produto PCR de cada isolado foi adicionado em gel de agarose (0,8%), juntamente com 4 µL de TAE e 1 µL do corante 6x Dye Phenol Blue, a amostra negativa consistiu apenas do produto PCR contendo água MilliQ e os marcadores Ladder 100 bp e 1 kb foram utilizados. A reação ocorreu em cuba eletroforética a 135 V por 20 minutos, sendo em seguida, o gel mergulhado em brometo de etídio por 15 minutos para a visualização das bandas.

O preparo das amostras para sequenciamento consistiu em duas etapas: ExoSAP (a fim de eliminar a presença dos *primers* e dNTP) e Big Dye. O preparo para a fase ExoSAP consistiu em utilizar 5 µL do produto PCR para 2 µL da ExoSAP com um ciclo, em termociclador, de 37°C por quinze minutos e 80°C por quinze minutos. O preparo para a fase Big Dye utilizou 1 µL da amostra DNA, Ready Reaction Premix Big Dye (0,5 µL), Big Dye Sequencing Buffer (2 µL), *primers* (1 µL) e água MilliQ (5,5 µL), preparados para cada *primer* forward e reverse e a fase no termociclador consistiu em um ciclo de 96°C por um minuto, seguido de 25 ciclos de 96°C por dez segundos, 50°C por cinco segundos e 60°C por quatro minutos.

Após a fase Big Dye, as amostras foram submetidas à fase etanol que consiste em purificar e limpar o DNA para o sequenciamento. Portanto, em tubos eppendorf, para cada amostra foram adicionados 2,5 µL de EDTA, 30 µL de etanol 99,5% e 10 µL de DNA, as amostras ficaram em descanso por quinze minutos e foram

centrifugadas a 15.000 força g por 20 minutos a 4°C. Removeram-se os sobrenadantes e adicionaram-se 100 µL de etanol 70% procedendo-se novamente a centrifugação das amostras a 15.000 força g por 15 minutos a 4°C. Removeram-se os sobrenadantes. As amostras foram secas em secador por 15 minutos, sendo adicionados, em seguida, 10 µL de HiDi formamide. As amostras foram homogeneizadas em vortex por cinco minutos e mantidas em refrigerador a 4°C.

Na literatura, não foram encontrados *primers* da região rDNA IGS desenhados para a espécie *F. decemcellulare*. Por isso, foi realizada a clonagem do DNA dos isolados, utilizando os *primers* universais para *Fusarium* (CNL12 e CNS1). Para a clonagem, foi utilizado o kit pGEM-T Easy Vector Systems, Promega, EUA e para purificação o kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System, Promega, EUA. Após este passo, foi desenhado os *primers* para os isolados de *F. decemcellulare* (IGS\_Fd\_f e IGS\_Fd\_r). Para prosseguir as análises de PCR e sequenciamento, alguns isolados precisaram ser combinados com os primers universais, sendo que a combinação utilizada foi CNL12 e IGS\_Fd\_r. Ainda utilizando essa combinação, alguns isolados precisaram ser purificados. A metodologia consistiu na utilização do kit de purificação Wizard® SV Gel e PCR Clean-Up System, Promega, EUA que após a extração das bandas de interesse e purificação, essas amostras foram submetidas ao sequenciamento. O mesmo aconteceu para quatro isolados de *F. decemcellulare* para a região H3, que também foram purificados.

Para o sequenciamento, as amostras em eppendorf foram homogeneizadas e o DNA foi submetido à desnaturação a 95° C por dois minutos. Em seguida, alíquotas de 10 µL foram depositadas em placa para PCR e centrifugadas cuidadosamente para não formar bolhas de ar ou gotículas nas paredes dos poços, prejudicando a leitura dos dados através dos capilares. Em seguida, as amostras foram submetidas às análises pelo sequenciador 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems) para a obtenção das sequências genéticas.

Tabela 2 - Os nucleotídeos *primers* utilizados neste estudo.

<b>Primers</b>	<b>Sequência (5'- 3')</b>	<b>Gene alvo / região</b>	<b>Condições térmicas</b>	<b>Tamanho dos amplicons</b>	<b>Referências</b>
ITS1	5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3'	rDNA ITS	94°C 2 min; 32 x (94°C 1 min; 55°C 30 s; 72°C 1 min); 72°C 7 min	550 bp	WHITE et al. (1990)
ITS4	5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3'	rDNA ITS			
FIGS11	5' GTAAGCCGTCCTTCGCCTCG 3'	rDNA IGS	94°C 2 min; 25 x (94°C 30 s; 56°C 30 s; 72°C 30 s); 72°C 7 min	700 bp	KASHIWA et al. (2013)
FIGS12	5' GCAAAATTCAATAGTATGGC 3'	rDNA IGS			
CNL12	5' CTGAACGCCTCTAAGTCAG 3'	rDNA IGS	94°C 2 min; 25 x (94°C 30 s; 56 - 60°C 30 s; 72°C 30 s); 72°C 7 min	2,6 kb	APPEL e GORDON (1996)
CNS1	5' GAGACAAGCATATGACTACTG 3'	rDNA IGS			
IGS_Fd_f	5' CAGTCTGGCTATAGGGTAAGCTAG 3'	rDNA IGS	94°C 2 min; 25 x (94°C 30 s; 56 - 60°C 30 s; 72°C 30 s); 72°C 7 min	500 bp	-
IGS_Fd_r	5' GACCTAGACTGACTAAACCGACC 3'	rDNA IGS			
Ef-1	5' ATGGGTAAGGA(A/G)GACAAGAC 3'	TEF1- $\alpha$	94°C 2 min; 25 x (94°C 30 s; 60°C 30 s; 72°C 30 s); 72°C 7 min	750 bp	O'DONNELL et al. (1998)
Ef-2	5' GGA(G/A)GTACCAGT(C/G)ATCATGTT 3'	TEF1- $\alpha$			
H3-1a	5' ACTAAGCAGACCGCCCGCAGG 3'	Histona H3	94°C 2 min; 30 x (94°C 30 s; 60-64°C 30 s; 72°C 30 s); 72°C 7 min	500 bp	GLASS e DONALDSON (1995)
H3-1b	5' GCGGGCGAGCTGGATGTCCTT 3'	Histona H3			

As sequências obtidas foram trabalhadas no Programa Genetyx-MAC ver.10.1/13 a fim de selecionar a região genômica de interesse de cada isolado abrangida pelos *primers*. As sequências finais foram alinhadas pelo Programa ClustalX e a construção da árvore filogenética, através do Programa Mega, foi realizada pelo método estatístico Neighbor-Joining Tree, com 1.000 repetições de bootstrap utilizando o Método Kimura-2 parameter para a região rDNA ITS, região rDNA IGS, gene TEF-1 $\alpha$  e gene H3. Para a construção da árvore filogenética com os dados combinados, utilizaram-se as sequências genéticas das regiões rDNA IGS, gene TEF-1 $\alpha$  e gene H3, respectivamente.

### 1.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 1.3.1 Caracterização patogênica, morfológica e cultural dos isolados

Todos os isolados de *Fusarium* spp. foram patogênicos às mudas de seringueiras do clone RRIM 600. Os resultados para os caracteres morfológicos forma, tamanho e número de septos dos macroconídios e microconídios ou mesoconídios encontram-se na Figura 3 e Tabelas 3 e 4, taxa de crescimento micelial, presença ou ausência de esporodóquios e clamidósporos e formação das fialides e conidiogênese encontram-se nas Figuras 7, 8, 9 e 10 e Tabela 5, sendo que a coloração das colônias foi observada como caractere complementar (Figuras 4, 5 e 6).

De acordo com o manual de identificação de *Fusarium* de Leslie e Summerell (2006), os isolados F1, F2, F3, F4, F5, F6, F7, F8, F10, F11, F12, F14 e F22 foram classificados como *Fusarium oxysporum* e a forma do macroconídio da espécie foi classificada como “A” (macroconídio em formato típico de *Fusarium*), “B” (macroconídio delgado, reto, em formato de agulha) e “D” (macroconídio com o lado dorsal mais curvado que o ventral) (Figura 3-A). O tamanho médio dos macroconídios variou entre 20,14 – 35,12 – 44,99  $\mu\text{m}$  de comprimento e 3,83 – 4,24 – 5,10  $\mu\text{m}$  de largura, a média do número de septos foi 3 (variando de 1 a 6). As células apicais classificaram-se como abrupta, papilar ou curva e as células basais como mal entalhada, distintamente entalhada ou em formato de pé. A forma do microconídio variou entre oval, ovoide ou reniforme, o número de septos, quando presentes, variou de 0 a 1 e o tamanho médio dos microconídios variou entre 8,38 – 10,35 – 12,61  $\mu\text{m}$  de comprimento e 2,78 – 3,38 – 3,86  $\mu\text{m}$  de largura. Os caracteres

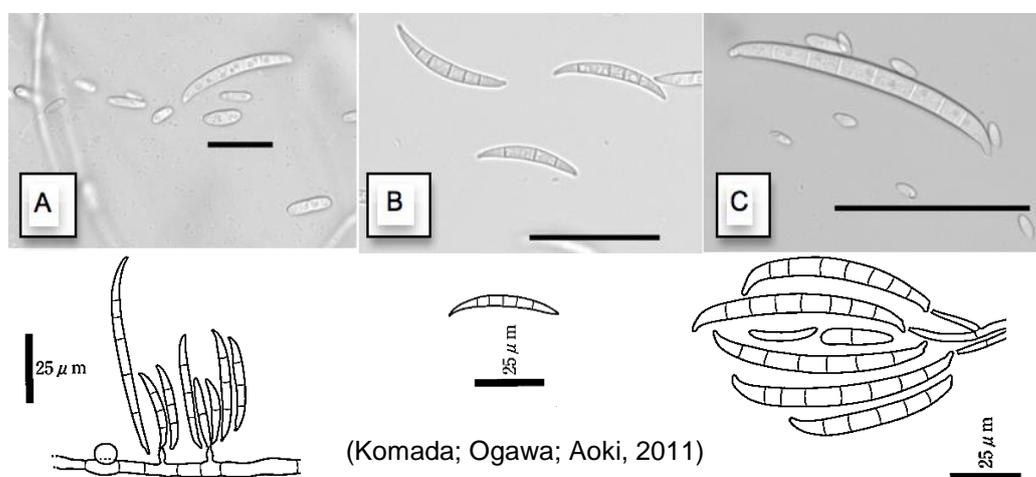
morfológicos quanto a forma, o tamanho e o número de septos dos conídios para a espécie *Fusarium oxysporum* corroboram os dados morfológicos para esta espécie encontrados em cereja doce (ÚRBEZ-TORRES et al., 2016), em feijão-caupi (VELOSO, 2013), em goiaba (HUSSAIN et al., 2012), em dendezeiro (SUWANDI; AKINO; KONDO, 2012) e em papoula da Islândia (GARIBALDI et al., 2012).

Os isolados F9, F13, F18 e F19 foram classificados como pertencentes a espécie *Fusarium incarnatum*. A forma do macroconídio foi classificada como “A” (macroconídio em formato típico de *Fusarium*), “B” (macroconídio delgado, reto, em formato de agulha) e “D” (macroconídio com o lado dorsal mais curvado que o ventral) (Figura 3-B). O tamanho médio dos macroconídios variou entre 24,92 – 37,34 – 52,95 µm de comprimento e 3,55 – 3,92 – 4,17 µm de largura, a média do número de septos foi 3 (variando de 3 a 6). As células apicais classificaram-se como abrupta, papilar ou curva e as células basais como mal entalhada, distintamente entalhada ou em formato de pé. A forma do mesoconídio é fusóide, o número de septos variou de 1 a 3 e o tamanho médio dos mesoconídios variou entre 18,32 – 19,48 – 20,79 µm de comprimento e 3,07 – 3,37 – 3,68 µm de largura. Para a espécie *Fusarium incarnatum* (sin.: *Fusarium semitectum*), as literaturas apresentaram resultados similares a estes caracteres, como em dendezeiro (SUWANDI; AKINO; KONDO, 2012), em noqueira comum (BELISARIO et al., 2010) e em pitaia (HAWA; SALLEH; LATIFFAH, 2010). Esta espécie pode apresentar microconídios ou mesoconídios. Neste trabalho foram observados, apenas, a presença dos mesoconídios de *F. incarnatum*, em conformidade com demais trabalhos que observaram a ausência dos microconídios para essa espécie (sin.: *Fusarium semitectum*) (RODRIGUES; MENEZES, 2005; ELMER; MARRA, 2011; LEZCANO; MARTÍNEZ; ALONSO, 2012; GARRO, 2013; MALI et al., 2016).

Os demais isolados (F15, F16, F17, F20, F21, F23 ao F51), foram classificados como *Fusarium decemcellulare*, que apresentaram a forma do macroconídio classificada como “A” (macroconídio em formato típico de *Fusarium*) (Figura 3-C). O tamanho médio dos macroconídios variou entre 70,79 – 83,88 – 94,85 µm de comprimento e 5,70 – 6,45 – 7,47 µm de largura, o número de septos variou entre 6 a 10. As células apicais classificaram-se como abrupta, papilar ou curva e as células basais como mal entalhada, distintamente entalhada ou em formato de pé. A forma do microconídio variou entre oval e ovoide, com exceção do isolado F51, que apresentou além da forma oval, também piriforme e globoso, o número de septos,

quando presentes, variou de 0 a 1 e o tamanho médio dos microconídios variou entre 8,82 – 9,74 – 10,83  $\mu\text{m}$  de comprimento e 3,52 – 3,93 – 4,67  $\mu\text{m}$  de largura. Os caracteres morfológicos dos conídios encontrados para *Fusarium decemcellulare* foram equivalentes às fusarioses em pinheiro-budista (DUAN; GUO; DUAN, 2014), em cacauieiro (SFALSIN, 2012) e em mangueira (PLOETZ; VAZQUEZ; BENSCHER, 1996).

Figura 3 - Morfologia dos conídios. A. *Fusarium oxysporum* (barra: 20  $\mu\text{m}$ ); B. *Fusarium incarnatum* (barra: 40  $\mu\text{m}$ ); C. *Fusarium decemcellulare* (barra: 60  $\mu\text{m}$ ). Ilustrações de Komada; Ogawa e Aoki (2011).



A pigmentação ou coloração das colônias é observada como uma característica secundária ou complementar na identificação de espécies de *Fusarium*. As condições de cultivo e o meio de cultura são relevantes para a produção de pigmentos que, em geral, o meio de cultura BDA e o fotoperíodo de 12 horas são adotados para estes fins. Portanto, este caractere, geralmente, não é diagnosticável, salvo exceções de algumas espécies, como *F. thapsinum*, em que o pigmento amarelo é característico (LESLIE; SUMMERELL, 2006). Neste estudo, a coloração das colônias, observada aos 10 dias, em meio de cultura BDA, variou de branco a violeta claro e violeta escuro para os isolados de *F. oxysporum* (VELOSO, 2013), de bege a marrom claro, para *F. incarnatum* (GAI et al, 2016) e em magenta claro, magenta a magenta escuro para isolados de *F. decemcellulare* (SFALSIN, 2012) (Figuras 4, 5 e 6).

Figura 4 - Coloração das colônias dos isolados de *Fusarium oxysporum* (frente e verso) em meio de cultura BDA aos 10 dias.

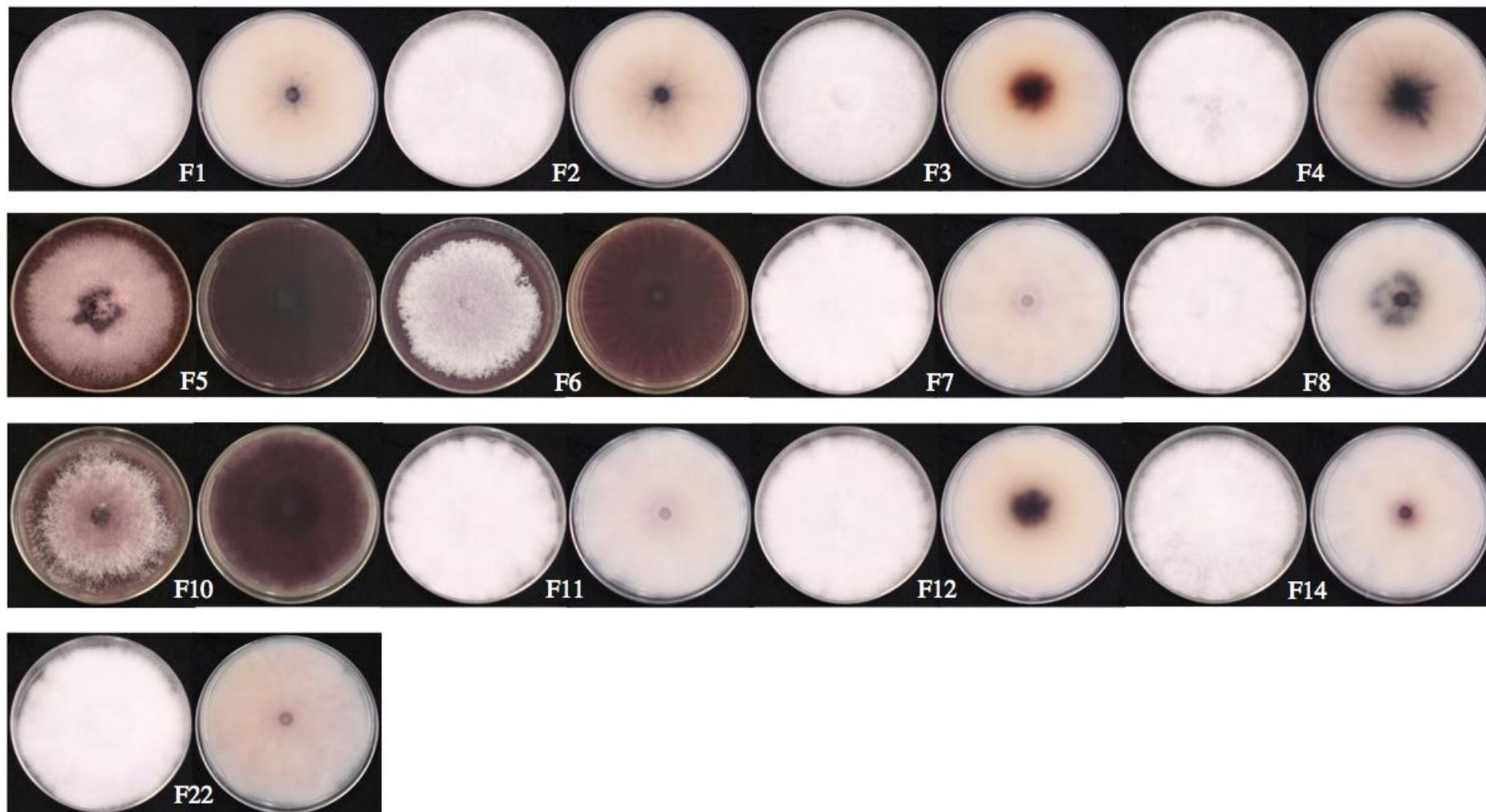


Figura 5 - Coloração das colônias dos isolados de *Fusarium incarnatum* (frente e verso) em meio de cultura BDA aos 10 dias.



Figura 6 - Coloração das colônias dos isolados de *Fusarium decemcellulare* (frente e verso) em meio de cultura BDA aos 10 dias. (Continua).

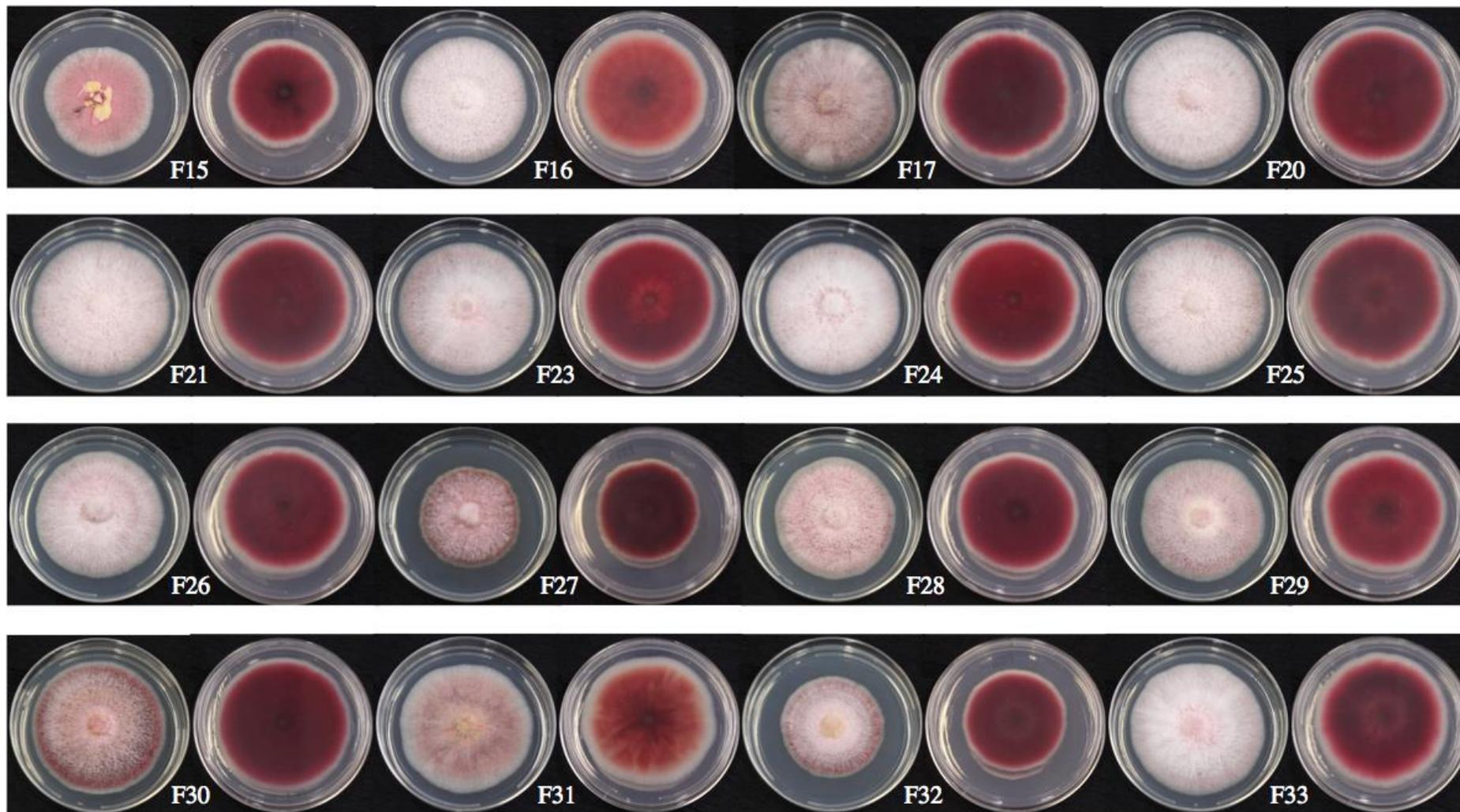


Figura 6 - Coloração das colônias dos isolados de *Fusarium decemcellulare* (frente e verso) em meio de cultura BDA aos 10 dias. (Continua).

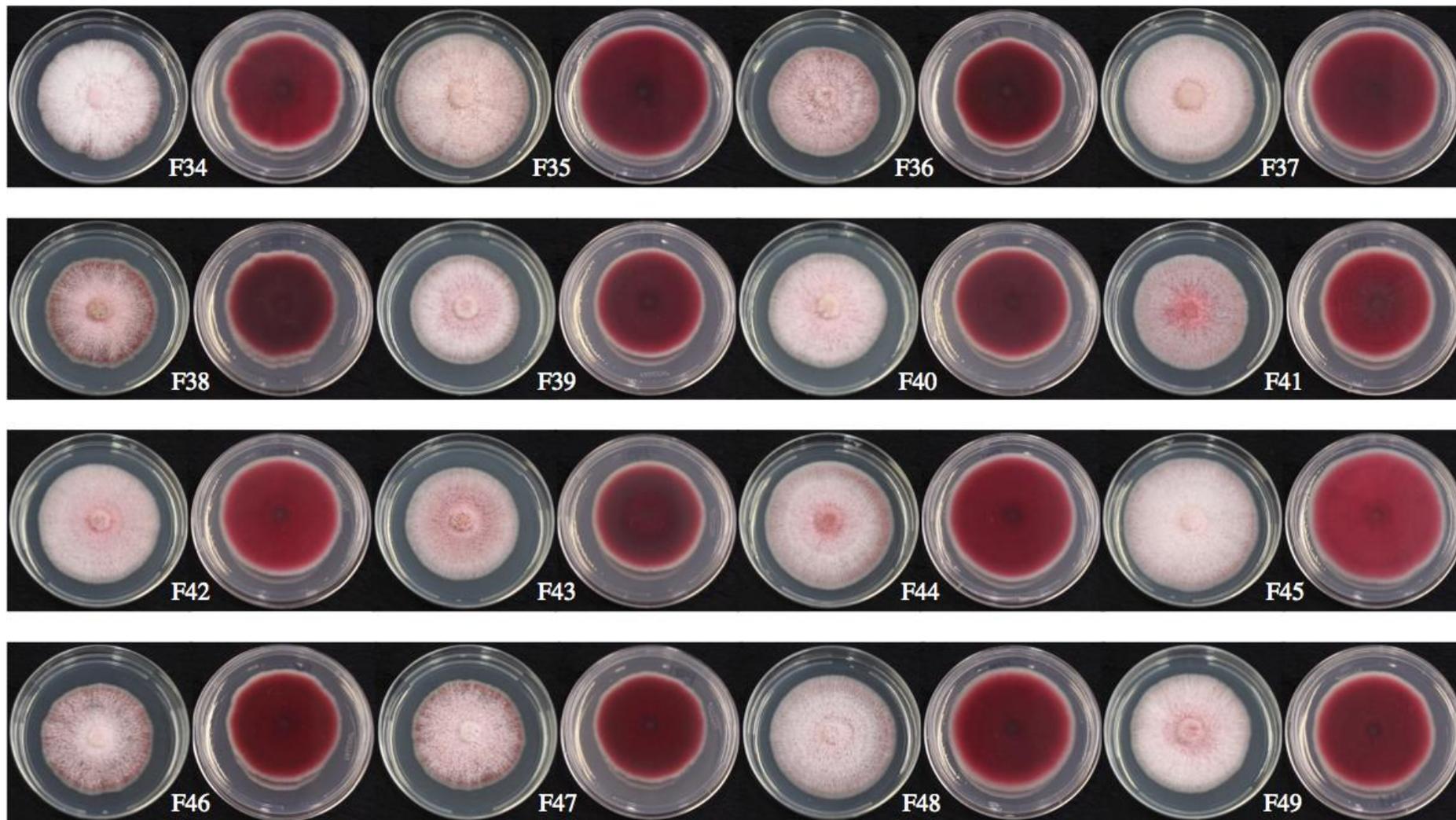


Figura 6 - Coloração das colônias dos isolados de *Fusarium decemcellulare* (frente e verso) em meio de cultura BDA aos 10 dias.

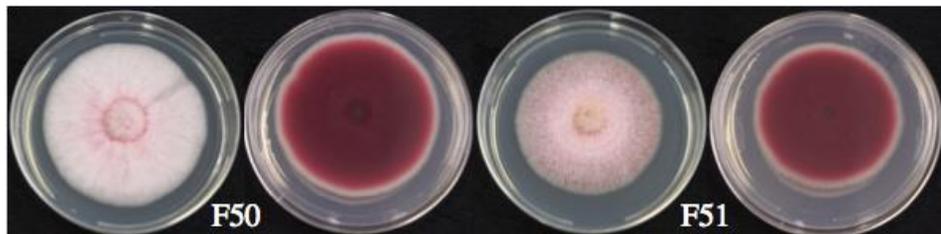


Tabela 3 - Tamanho, forma e número de septos dos macroconídios de 51 isolados de *Fusarium* spp. em colônias de 7 a 10 dias.

Isolados	Macroconídios							
	Comp. (µm) <sup>1</sup>	Larg. (µm) <sup>2</sup>	Forma	Septos	Célula Apical	Célula Basal		
F1	34,50	e	4,15	c	A	3 a 4	Abrupta - Papilar	Distintamente e Mal Entalhada
F2	34,37	e	4,21	c	A	3 a 4	Abrupta - Papilar	Distintamente e Mal Entalhada
F3	44,99	g	4,81	e	A e B	2 a 6	Abrupta - Papilar	Formato de Pé e Mal Entalhada
F4	42,97	g	4,15	c	A	3 a 5	Abrupta - Papilar	Distintamente e Mal Entalhada e Formato de Pé
F5	35,39	e	3,93	b	A	2 a 3	Abrupta - Papilar	Distintamente e Mal Entalhada
F6	38,93	f	4,12	c	A e D	3	Abrupta - Papilar - Curva	Distintamente e Mal Entalhada
F7	32,81	e	4,20	c	A e D	3	Abrupta - Papilar	Distintamente e Mal Entalhada
F8	40,95	f	5,10	f	A	3 a 5	Abrupta - Papilar - Curva	Formato de Pé e Mal Entalhada
F9	24,92	b	3,55	a	A e D	3	Abrupta - Papilar - Curva	Distintamente e Mal Entalhada
F10	40,53	f	3,83	b	A	3 a 4	Abrupta - Papilar	Distintamente e Mal Entalhada
F11	26,95	c	3,96	b	A	2 a 3	Abrupta - Papilar	Distintamente e Mal Entalhada
F12	31,23	d	3,98	b	A	3 a 4	Abrupta - Papilar	Distintamente e Mal Entalhada
F13	30,32	d	4,13	c	A e D	3 a 5	Abrupta - Papilar - Curva	Distintamente e Mal Entalhada e Formato de Pé
F14	32,80	e	4,21	c	A	3	Abrupta - Papilar	Distintamente e Mal Entalhada
F15	84,60	l	7,47	l	A	6 a 9	Papilar	Distintamente Entalhada e Formato de Pé
F16	85,93	l	7,40	l	A	7 a 10	Papilar	Distintamente Entalhada e Formato de Pé
F17	83,27	l	6,65	j	A	6 a 8	Papilar	Distintamente Entalhada e Formato de Pé
F18	41,18	f	4,17	c	A	4 a 5	Abrupta - Papilar	Distintamente Entalhada e Formato de Pé
F19	52,95	h	3,81	b	A e B	4 a 6	Abrupta - Papilar	Distintamente e Mal Entalhada e Formato de Pé
F20	79,45	j	6,47	i	A	6 a 8	Abrupta - Papilar	Distintamente e Mal Entalhada e Formato de Pé
F21	81,01	j	6,62	j	A	6 a 9	Papilar	Distintamente Entalhada e Formato de Pé
F22	20,14	a	4,46	d	D	1 a 3	Abrupta - Papilar	Mal Entalhada
F23	83,61	l	6,11	h	A	6 a 9	Papilar	Distintamente Entalhada e Formato de Pé
F24	83,48	l	6,45	i	A	7 a 9	Papilar	Distintamente Entalhada e Formato de Pé
F25	80,80	j	6,37	i	A	6 a 10	Papilar	Distintamente Entalhada e Formato de Pé
F26	76,35	i	6,16	h	A	6 a 8	Papilar	Distintamente Entalhada e Formato de Pé

Isolados	Macroconídios							
	Comp. (µm) <sup>1</sup>	Larg. (µm) <sup>2</sup>	Forma	Septos	Célula Apical	Célula Basal		
F27	89,13	m	6,00	h	A	6 a 9	Papilar	Distintamente Entalhada e Formato de Pé
F28	90,27	m	6,19	h	A	6 a 9	Papilar	Distintamente Entalhada e Formato de Pé
F29	89,44	m	6,21	i	A	7 a 10	Papilar	Distintamente Entalhada e Formato de Pé
F30	87,76	m	6,56	j	A	7 a 9	Papilar	Distintamente Entalhada e Formato de Pé
F31	86,28	l	6,86	j	A	6 a 10	Papilar - Curva	Distintamente Entalhada
F32	81,81	j	5,93	g	A	7 a 9	Papilar - Curva	Distintamente e Mal Entalhada
F33	72,70	i	6,29	i	A	6 a 9	Abrupta - Papilar	Distintamente e Mal Entalhada e Formato de Pé
F34	94,16	m	6,95	j	A	6 a 10	Papilar	Distintamente e Mal Entalhada e Formato de Pé
F35	86,47	l	6,53	j	A	7 a 9	Abrupta - Papilar	Distintamente e Mal Entalhada e Formato de Pé
F36	94,85	m	6,66	j	A	7 a 9	Papilar - Curva	Distintamente Entalhada e Formato de Pé
F37	92,62	m	6,29	i	A	7 a 9	Papilar - Curva	Distintamente Entalhada e Formato de Pé
F38	89,03	m	6,50	i	A	7 a 9	Abrupta - Papilar - Curva	Distintamente Entalhada e Formato de Pé
F39	84,98	l	6,45	i	A	6 a 9	Papilar - Curva	Distintamente Entalhada e Formato de Pé
F40	84,95	l	6,12	h	A	6 a 9	Papilar - Curva	Distintamente Entalhada e Formato de Pé
F41	89,43	m	6,49	i	A	7 a 10	Papilar - Curva	Distintamente Entalhada e Formato de Pé
F42	70,79	i	6,42	i	A	6 a 9	Abrupta - Papilar - Curva	Distintamente e Mal Entalhada e Formato de Pé
F43	84,74	l	6,20	h	A	7 a 10	Papilar - Curvo	Distintamente e Mal Entalhada e Formato de Pé
F44	79,02	j	6,44	i	A	6 a 9	Abrupta - Papilar - Curva	Distintamente e Mal Entalhada e Formato de Pé
F45	85,66	l	6,76	j	A	6 a 9	Abrupta - Papilar - Curva	Distintamente e Mal Entalhada e Formato de Pé
F46	84,19	l	6,61	j	A	7 a 10	Abrupta - Papilar - Curva	Distintamente e Mal Entalhada e Formato de Pé
F47	82,06	j	6,47	i	A	6 a 9	Papilar - Curva	Distintamente e Mal Entalhada e Formato de Pé
F48	80,50	j	6,29	i	A	7 a 9	Abrupta - Papilar - Curva	Distintamente Entalhada e Formato de Pé
F49	80,64	j	6,39	i	A	6 a 9	Papilar - Curva	Distintamente Entalhada e Formato de Pé
F50	74,44	i	6,19	h	A	6 a 9	Abrupta - Papilar - Curva	Distintamente e Mal Entalhada e Formato de Pé
F51	77,41	i	5,70	g	A	6 a 10	Abrupta - Papilar - Curva	Distintamente e Mal Entalhada e Formato de Pé

<sup>1,2</sup> Médias do comprimento e largura de 50 macroconídios. CV<sub>1</sub>: 6,43; CV<sub>2</sub>: 5,72. As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade (dados transformados em  $0,5 \sqrt{x}$ ).

Tabela 4 - Tamanho, forma e número de septos dos microconídios ou mesoconídios de 51 isolados de *Fusarium* spp. em colônias de 7 a 10 dias.

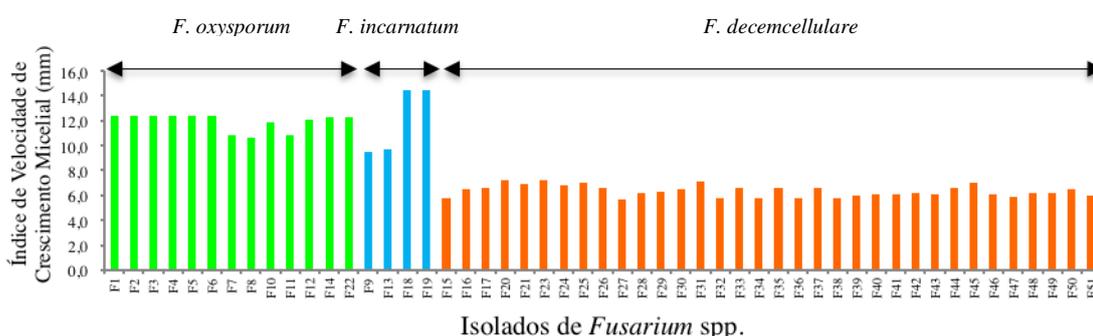
Isolados	Microconídios ou Mesoconídios					
	Comp. ( $\mu\text{m}$ ) <sup>1</sup>		Larg. ( $\mu\text{m}$ ) <sup>2</sup>		Forma	Septos
F1	8,38	a	2,80	a	Oval	0
F2	8,59	a	3,27	c	Oval	0 a 1
F3	9,71	c	3,33	c	Oval	0
F4	11,45	e	3,45	d	Oval	0
F5	11,62	e	3,84	e	Oval - Reniforme	0
F6	10,47	d	3,45	d	Oval - Ovoide - Reniforme	0
F7	9,40	b	3,24	c	Oval - Reniforme	0
F8	12,61	f	3,86	e	Oval	0 a 1
F9	18,64	g	3,07	b	Fusoide	1 a 3
F10	10,78	d	3,40	c	Oval	0
F11	10,46	c	3,39	c	Oval	0 a 1
F12	10,07	c	3,42	d	Oval - Ovoide	0
F13	18,32	g	3,17	c	Fusoide	1 a 3
F14	11,87	e	3,74	e	Oval	0 a 1
F15	10,52	d	4,67	i	Oval - Ovoide	0 a 1
F16	10,27	d	4,27	g	Oval	0 a 1
F17	9,91	c	4,16	g	Oval	0 a 1
F18	20,79	h	3,68	d	Fusoide	1 a 3
F19	20,15	h	3,54	d	Fusoide	1 a 3
F20	8,99	b	3,79	e	Oval	0
F21	9,28	b	3,99	f	Oval	0
F22	9,18	b	2,78	a	Oval	0
F23	10,43	d	3,95	f	Oval	0 a 1
F24	9,08	b	3,52	d	Oval	0
F25	9,16	b	3,66	e	Oval	0
F26	9,21	b	3,67	e	Oval	0
F27	9,70	c	3,84	f	Oval	0
F28	9,81	c	3,90	f	Oval	0 a 1
F29	9,70	c	3,86	f	Oval	0
F30	9,58	c	3,78	e	Oval	0 a 1
F31	8,82	a	3,60	e	Oval	0 a 1
F32	9,32	b	3,77	e	Oval	0 a 1
F33	9,15	b	3,73	e	Oval	0
F34	10,45	d	4,18	g	Oval - Ovoide	0 a 1
F35	9,77	c	4,04	g	Oval	0
F36	10,83	d	4,20	g	Oval	0 a 1
F37	10,41	d	3,99	f	Oval	0 a 1
F38	9,85	c	3,74	e	Oval	0
F39	9,96	c	3,96	f	Oval	0 a 1
F40	10,32	d	3,96	f	Oval	0 a 1
F41	9,99	c	4,02	g	Oval	0 a 1
F42	9,66	c	4,06	g	Oval	0
F43	9,79	c	3,93	f	Oval	0
F44	9,60	c	3,95	f	Oval	0 a 1

Isolados	Microconídios ou Mesoconídios					
	Comp. ( $\mu\text{m}$ ) <sup>1</sup>		Larg. ( $\mu\text{m}$ ) <sup>2</sup>		Forma	Septos
F45	10,05	c	4,35	h	Oval	0 a 1
F46	9,53	c	3,79	e	Oval	0
F47	9,63	c	3,96	f	Oval	0
F48	9,59	c	3,81	e	Oval	0
F49	9,98	c	3,84	f	Oval	0
F50	9,67	c	3,72	e	Oval	0 a 1
F51	9,10	b	3,79	e	Oval - Piriforme - Globoso	0 a 1

<sup>1,2</sup> Médias do comprimento e largura de 50 microconídios ou mesoconídios. CV<sub>1</sub>: 3,20; CV<sub>2</sub>: 6,97. As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade (dados transformados em  $0,5\sqrt{x}$ ).

Outro caractere secundário utilizado é a taxa de crescimento micelial ou IVCM (Índice de Velocidade de Crescimento Micelial), que consiste em medições diametrais diárias das colônias em placas de Petri com meio de cultura BDA a 25° ou 30°C. Apesar de secundário, esse caractere é importante para fins de comparação, pois têm-se espécies que crescem mais rápido ou devagar que outras (LESLIE; SUMMERELL, 2006). Neste trabalho, os índices de velocidade de crescimento micelial médios obtidos para cada isolado foram de 12,0 mm dia<sup>-1</sup> para isolados de *Fusarium oxysporum*, 14,5 mm dia<sup>-1</sup> e 9,6 mm dia<sup>-1</sup> para isolados de *Fusarium incarnatum* e 6,4 mm dia<sup>-1</sup> para isolados de *Fusarium decemcellulare* (Figura 7).

Figura 7 - Índice de Velocidade de Crescimento Micelial de *Fusarium* spp. em meio de cultura BDA (batata dextrose ágar).

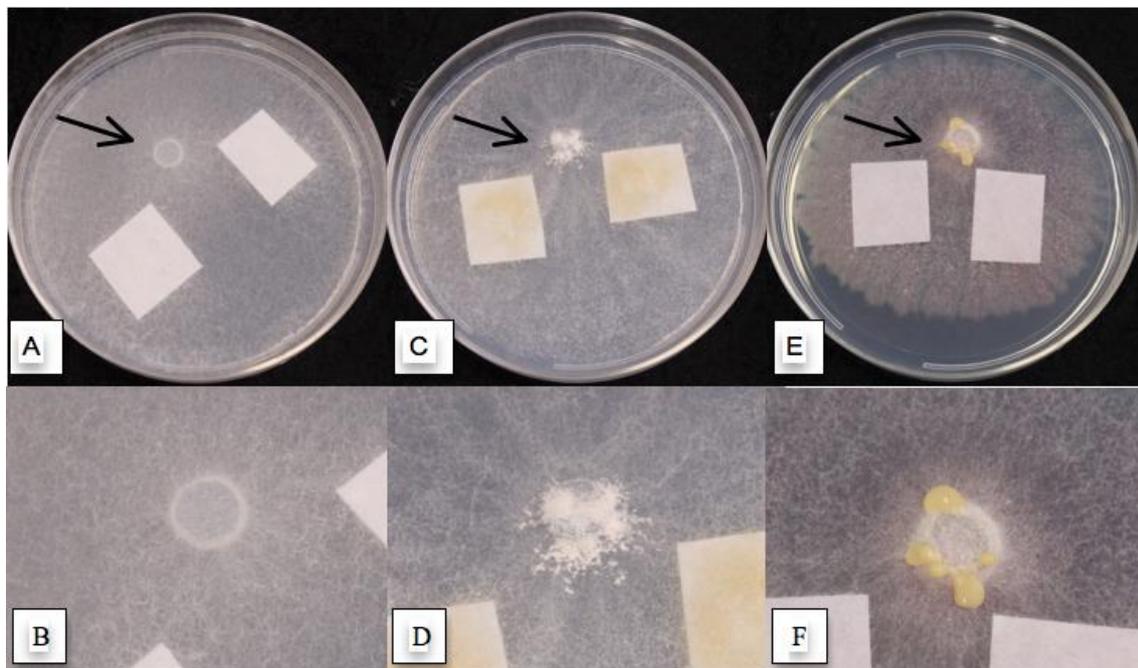


Valor de IVCM próximo foi encontrado para *F. oxysporum* em feijão, 11 mm dia<sup>-1</sup> (VELOSO, 2013). A espécie *F. incarnatum* apresenta duas variantes de IVCM de 14,5 mm dia<sup>-1</sup> para dois isolados coletados em Barretos-SP (F9 e F13) e de 9,6 mm dia<sup>-1</sup> para dois isolados coletados em Botucatu-SP (F18 e F19). Resultado semelhante foi encontrado para *Fusarium semitectum*, em cereais, em que

dividiram-se os isolados em dois morfotipos (A: 6 a 10 mm dia<sup>-1</sup> e B: 10 a 14 mm dia<sup>-1</sup>) (EBADI; RIAHI, 2013), estes resultados podem ser visualizados nas análises filogenéticas que diferenciaram os dois morfotipos encontrados para esta espécie. Já a espécie *F. decemcellulare* apresentou a menor velocidade de crescimento dentre os isolados. Resultado semelhante foi observado para *F. decemcellulare* em cacaueteiro com ICVM médio de 5 mm dia<sup>-1</sup> (POLETTTO et al., 2006).

Para os isolados de *Fusarium oxysporum*, não foram observados os esporodóquios. Em *Fusarium incarnatum*, os esporodóquios, quando presentes, eram formados por uma coloração branca. Os isolados de *Fusarium decemcellulare* apresentaram esporodóquio amarelo (com exceção do isolado F51, que foi ausente) (Figura 8). Os mesmos resultados foram encontrados para ausência de esporodóquios em *Fusarium oxysporum* em feijão (VELOSO, 2013) e presença destas estruturas em *Fusarium incarnatum* em cereais e em *Fusarium decemcellulare* em mangueira (EBADI; RIAHI, 2013; PLOETZ; VAZQUEZ; BENSCHER, 1996).

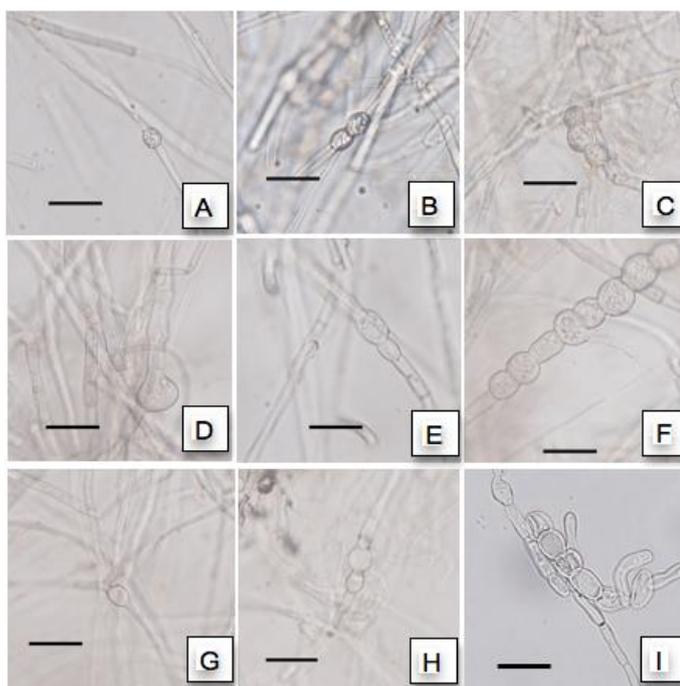
Figura 8 - Esporodóquios ausentes em A e B. *Fusarium oxysporum* e presentes em C e D. *Fusarium incarnatum* e E e F. *Fusarium decemcellulare* em meio de cultura SNA aos 21 dias.



Os clamidósporos encontrados para *F. oxysporum*, *F. incarnatum* e *F. decemcellulare* foram do tipo único, duplo ou em cadeia, sendo o tipo único, o mais comumente encontrado para a última espécie (Figura 9). Os tipos de clamidósporos único, duplo e em cadeia são característicos para *F. oxysporum* e *F. incarnatum*

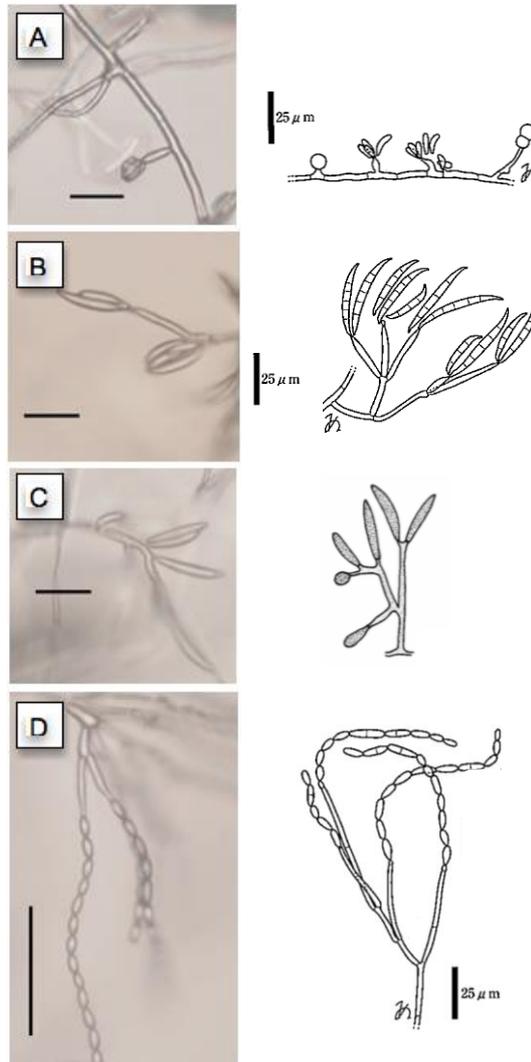
(VELOSO, 2013; EBADI; RIAHI, 2013). Para *F. decemcellulare*, é mais comumente encontrado clamidósporos do tipo único (POLETTTO et al., 2006), porém, também podem ser observados clamidósporos do tipo duplo (DÓRIA, 2012) e, mais raramente, em cadeia, como foi observado neste trabalho.

Figura 9 - Tipos de clamidósporos dos isolados de *Fusarium* spp. em meio de cultura SNA aos 21 dias. A – C: Clamidósporos tipo único, duplo e em cadeia em *Fusarium oxysporum*; D – F: Clamidósporos tipo único, duplo e em cadeia em *Fusarium incarnatum*; G – I: Clamidósporos tipo único, duplo e em cadeia em *Fusarium decemcellulare*. Barras: 20 µm.



A formação conidiogênica dos microconídios (fialides e conidiogênese) de *F. oxysporum* deu-se em monofialides em falsa-cabeças. Já para *F. incarnatum*, a conidiogênese deu-se em conídios únicos em monofialides e polifialides, com uma aparência de “orelha de coelho”, típica desta espécie. Em *F. decemcellulare*, a conidiogênese deu-se em monofialides em cadeia. Estes resultados corroboram os dados encontrados na literatura (PLOETZ; VAZQUEZ; BENSCHER, 1996; HAWA; SALLEH; LATIFFAH, 2010; KOMADA; OGAWA; AOKI, 2011; SFALSIN, 2012; SUWANDI; AKINO; KONDO, 2012; VELOSO, 2013; EBADI; RIAHI, 2013). Foram acrescentados ao meio de cultura SNA, pedaços de papel de filtro (1 cm<sup>2</sup>) a fim de estimular o crescimento das fialides e conidiogênese (Figura 10).

Figura 10 - Fialides e conidiogêneses dos isolados de *Fusarium* spp. em meio de cultura SNA aos 21 dias. A: Monofialide curta em falsa-cabeça em *Fusarium oxysporum*; B e C: conídios únicos em mono e polifialide em *Fusarium incarnatum*; D: Monofialide em cadeia em *Fusarium decemcellulare*. (A, B e C. barras: 20  $\mu\text{m}$ , D. barra: 50  $\mu\text{m}$ ). Ilustrações de Leslie e Summerell, 2006 e Komada; Ogawa e Aoki, 2011.



(Leslie; Summerell, 2006; Komada; Ogawa; Aoki, 2011)

Tabela 5 - Dados morfológicos de 51 isolados de *Fusarium* spp.. Presença ou ausência de esporodóquio, tipos de clamidósporos e tipos de fialides e formação conidiogênica dos microconídios em meio de cultura SNA (Sintetic Low Nutrient Agar) aos 21 dias.

Isolados	Meio de Cultura SNA			
	Esporodóquio <sup>1</sup>	Clamidósporos <sup>2</sup>	Fialides <sup>3</sup>	Conidiogênese <sup>3</sup>
F1	-	Único, duplo e em cadeia	Monofialide curta	Falsa-cabeça
F2	-	Único, duplo e em cadeia	Monofialide curta	Falsa-cabeça
F3	-	Único, duplo	Monofialide curta	Falsa-cabeça
F4	-	Único, duplo e em cadeia	Monofialide curta	Falsa-cabeça
F5	-	Único, duplo	Monofialide curta	Falsa-cabeça
F6	-	Único, duplo	Monofialide curta	Falsa-cabeça
F7	-	Único, duplo	Monofialide curta	Falsa-cabeça
F8	-	Único, duplo	Monofialide curta	Falsa-cabeça
F9	-	Único, em cadeia	Mono e Polifialide	Único
F10	-	Único	Monofialide curta	Falsa-cabeça
F11	-	Único, duplo	Monofialide curta	Falsa-cabeça
F12	-	Único, duplo e em cadeia	Monofialide curta	Falsa-cabeça
F13	branco	Duplo, em cadeia	Mono e Polifialide	Único
F14	-	Único, duplo	Monofialide curta	Falsa-cabeça
F15	amarelo	Único	Monofialide	Cadeia
F16	amarelo	Único	Monofialide	Cadeia
F17	amarelo	Único	Monofialide	Cadeia
F18	-	Único, duplo, em cadeia	Mono e Polifialide	Único
F19	branco	Único, duplo, em cadeia	Mono e Polifialide	Único
F20	amarelo	Único	Monofialide	Cadeia
F21	amarelo	Único	Monofialide	Cadeia
F22	-	Único, duplo	Monofialide curta	Falsa-cabeça
F23	amarelo	Único	Monofialide	Cadeia
F24	amarelo	Único	Monofialide	Cadeia
F25	amarelo	Único	Monofialide	Cadeia
F26	amarelo	Único	Monofialide	Cadeia
F27	amarelo	Único	Monofialide	Cadeia
F28	amarelo	Único	Monofialide	Cadeia
F29	amarelo	Único, duplo	Monofialide	Cadeia
F30	amarelo	Único	Monofialide	Cadeia
F31	amarelo	Único	Monofialide	Cadeia
F32	amarelo	Único	Monofialide	Cadeia
F33	amarelo	Único, em cadeia	Monofialide	Cadeia
F34	amarelo	Único, duplo	Monofialide	Cadeia
F35	amarelo	Único	Monofialide	Cadeia
F36	amarelo	Único	Monofialide	Cadeia
F37	amarelo	Único	Monofialide	Cadeia
F38	amarelo	Único	Monofialide	Cadeia
F39	amarelo	Único, duplo	Monofialide	Cadeia
F40	amarelo	Único, duplo e em cadeia	Monofialide	Cadeia
F41	amarelo	Único	Monofialide	Cadeia
F42	amarelo	Único	Monofialide	Cadeia
F43	amarelo	Único, em cadeia	Monofialide	Cadeia
F44	amarelo	Único	Monofialide	Cadeia
F45	amarelo	Único	Monofialide	Cadeia
F46	amarelo	Único, duplo	Monofialide	Cadeia
F47	amarelo	Único	Monofialide	Cadeia
F48	amarelo	Único, duplo	Monofialide	Cadeia
F49	amarelo	Único, duplo	Monofialide	Cadeia
F50	amarelo	Único	Monofialide	Cadeia
F51	-	Único, em cadeia	Monofialide	Cadeia

<sup>1,2,3</sup> Resultados encontrados utilizando-se 4 repetições para cada variável estudada em meio de cultura SNA.

### 1.3.2 Caracterização molecular dos isolados

As análises filogenéticas da região rDNA ITS (Figura 11), região rDNA IGS (Figura 12), gene TEF-1 $\alpha$  (Figura 13) e gene H3 (Figura 14) e a construção da árvore filogenética com os dados combinados, utilizando-se as sequências genéticas das regiões rDNA IGS, gene TEF-1 $\alpha$  e gene H3, respectivamente (Figura 15), ratificaram os dados morfológicos e culturais. As similaridades dos isolados de *Fusarium* spp. com as sequências nucleotídicas encontradas no GenBank variou de 97 a 100% para a região rDNA ITS, de 94 a 100% para a região rDNA IGS apenas para *F. oxysporum* e *F. incarnatum*, de 98 a 100% para o gene TEF-1 $\alpha$  e de 95 a 100% para o gene H3 (Tabela 6).

Os 51 isolados de *Fusarium* spp. foram agrupados em três clados e comparados às mesmas espécies encontradas no GenBank com as sequências nucleotídicas conhecidas para cada região ou gene. Com exceção da espécie *Fusarium decemcellulare*, região rDNA IGS, que não foi encontrada alguma sequência de nucleotídeos na referida base de dados. As análises moleculares tornam-se imprescindíveis para a correta identificação de patógenos de plantas. Além do marcador universal utilizado para identificação de fungos, rDNA ITS, juntamente com a especiação recorrente em espécies deste gênero, há a necessidade de utilizar-se outras regiões e genes, a fim de aprimorar os resultados das análises em níveis taxonômicos. Os genes codificadores de proteínas são, geralmente, superiores aos genes rRNA, amplificando uma gama taxonômica estreita, como exemplo, o gene TEF-1 $\alpha$  para *Fusarium* (SCHOCH et al., 2012; O'DONNELL et al., 2010). A técnica molecular corroborou os resultados morfológicos e culturais deste trabalho, confirmando a presença de três espécies de *Fusarium* ocorrendo em seringais paulistas: *F. oxysporum*, *F. incarnatum* e *F. decemcellulare*. Até o momento, foram registradas na literatura algumas espécies de *Fusarium* spp. ocorrendo em seringueiras nas principais regiões produtoras do mundo, tais como: *Fusarium oxysporum* na Malásia e na China, *Fusarium solani* no Brasil, Malásia, Sri Lanka e China, *Fusarium tumidum* na Malásia, *Fusarium javanicum* na China, Sri Lanka e Índia, *Fusarium incarnatum* na Malásia, *Fusarium decemcellulare* no Brasil e no Congo, *Fusarium moniliforme* e *Fusarium verticillioides* no Brasil (FURTADO et al., 2001; BETELONI et al., 2009; DÓRIA, 2012; LI et al., 2014; HUANG et al., 2016; USDA, 2017). Portanto, as espécies *F. oxysporum* e *F. incarnatum* são relatadas pela primeira vez ocorrendo em seringais no estado de São Paulo, Brasil.

Figura 11 - Árvore filogenética construída pelo método Neighbor-Joining Tree com base nas sequências genéticas de DNA da região rDNA ITS dos 51 isolados de *Fusarium* spp.. A espécie *Colletotrichum gloeosporioides* foi escolhida como outgroup.

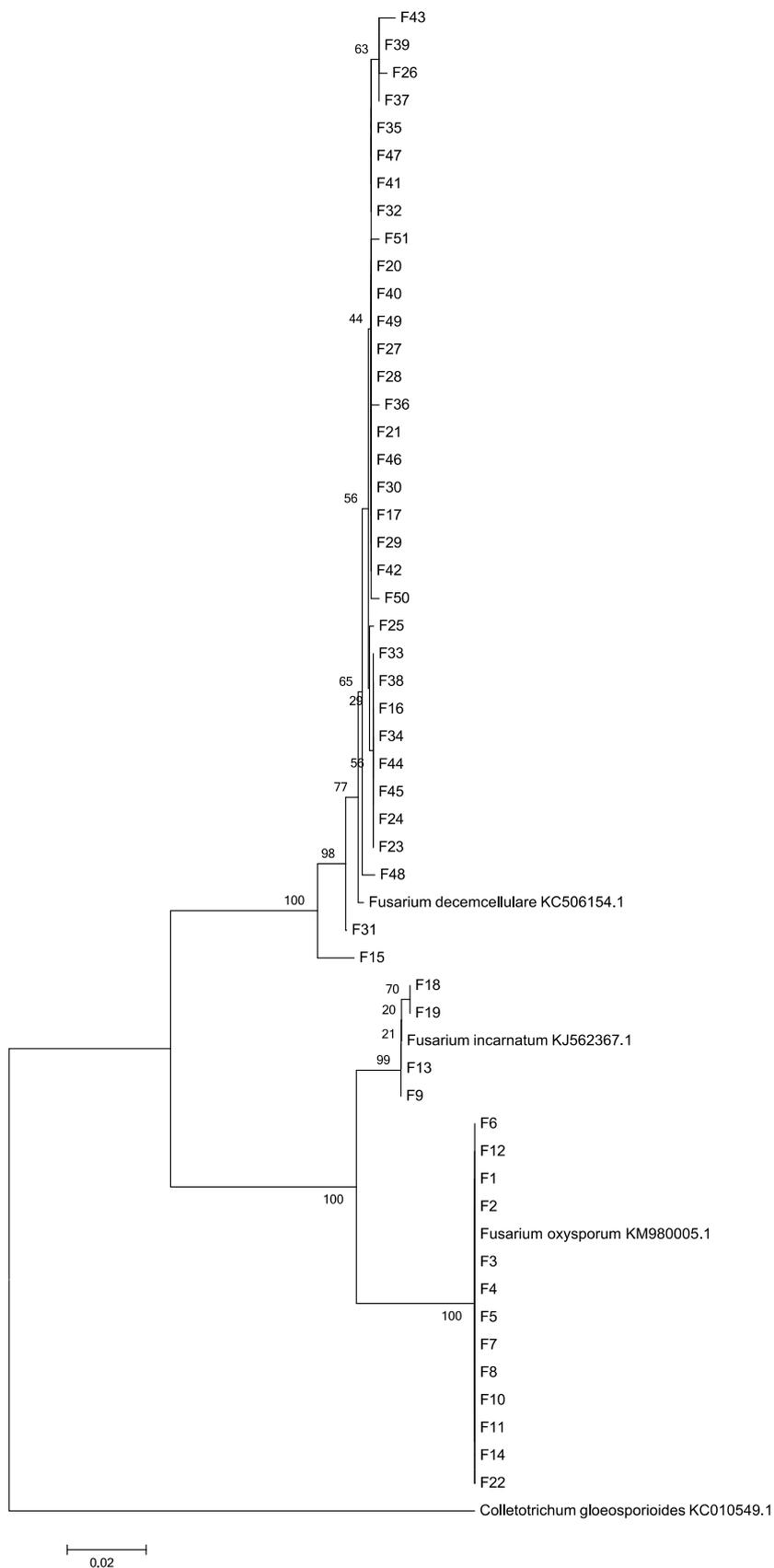






Figura 14 - Árvore filogenética construída pelo método Neighbor-Joining Tree com base nas sequências genéticas de DNA do gene H3 dos 51 isolados de *Fusarium* spp.. A espécie *Colletotrichum gloeosporioides* foi escolhida como outgroup.

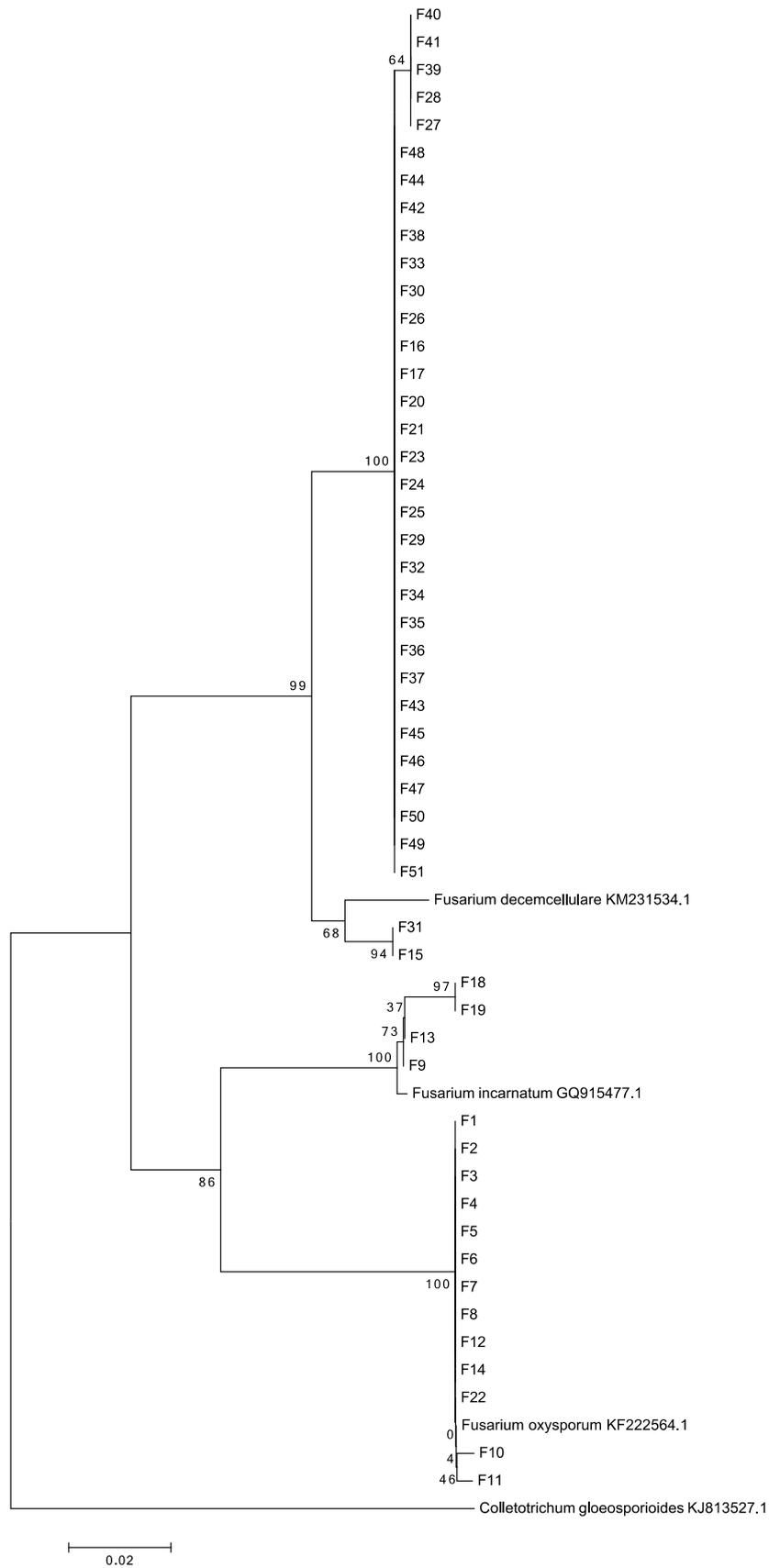


Figura 15 - Árvore filogenética construída pelo método Neighbor-Joining Tree com base nas sequências genéticas combinadas de DNA (rDNA IGS, gene TEF-1 $\alpha$  e gene H3) dos 51 isolados de *Fusarium* spp.. A espécie *Colletotrichum gloeosporioides* foi escolhida como outgroup.

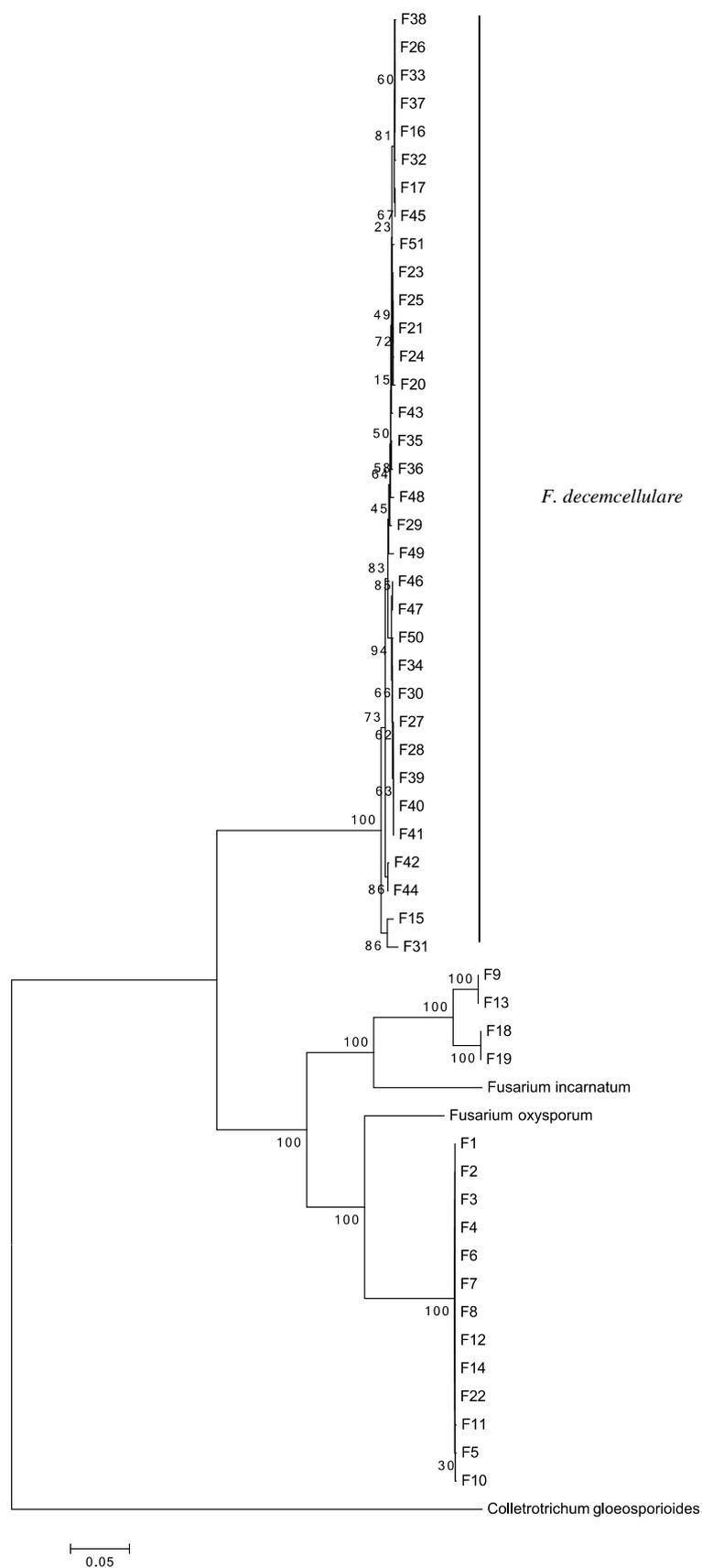


Tabela 6 - Identificação molecular dos isolados de *Fusarium* spp. em diferentes regiões genômicas.

Isolados	Espécies	Região rDNA ITS		Região rDNA IGS		Gene TEF-1 $\alpha$		Gene H3	
		Id. (%)	N. acesso	Id. (%)	N. acesso	Id. (%)	N. acesso	Id. (%)	N. acesso
F1	<i>Fusarium oxysporum</i>	100	KM980005.1	100	KF703754.1	99	KF574861.1	100	KF222564.1
F2	<i>Fusarium oxysporum</i>	100	KM980005.1	100	KF703754.1	99	KF574861.1	100	KF222564.1
F3	<i>Fusarium oxysporum</i>	100	KM980005.1	100	KF703754.1	99	KF574861.1	100	KF222564.1
F4	<i>Fusarium oxysporum</i>	100	KM980005.1	100	KF703754.1	99	KF574861.1	100	KF222564.1
F5	<i>Fusarium oxysporum</i>	100	KM980005.1	100	KF703754.1	99	KF574861.1	100	KF222564.1
F6	<i>Fusarium oxysporum</i>	100	KF857541.1	100	KF703754.1	99	KF574861.1	100	KF222564.1
F7	<i>Fusarium oxysporum</i>	100	KM980005.1	100	KF703754.1	99	KF574861.1	100	KF222564.1
F8	<i>Fusarium oxysporum</i>	100	KM980005.1	100	KF703754.1	99	KF574861.1	100	KF222564.1
F9	<i>Fusarium incarnatum</i>	100	KJ572780.1	96	HQ165897.1	100	JX268996.1	99	GQ915477.1
F10	<i>Fusarium oxysporum</i>	100	KM980005.1	100	KF703754.1	99	DQ220110.1	99	KF222564.1
F11	<i>Fusarium oxysporum</i>	100	KM980005.1	100	KF703754.1	99	KF574861.1	99	KF222564.1
F12	<i>Fusarium oxysporum</i>	97	HF566400.1	100	KF703754.1	99	KF574861.1	100	KF222564.1
F13	<i>Fusarium incarnatum</i>	100	KJ572780.1	96	HQ165897.1	100	JX268996.1	99	GQ915477.1
F14	<i>Fusarium oxysporum</i>	100	KM980005.1	100	KF703754.1	99	KF574861.1	100	KF222564.1
F15	<i>Fusarium decemcellulare</i>	98	GU797410.2	-	-	98	KC491872.1	97	KM231534.1
F16	<i>Fusarium decemcellulare</i>	99	GU797410.2	-	-	98	KC491872.1	95	KM231534.1
F17	<i>Fusarium decemcellulare</i>	99	GU797410.2	-	-	98	KC491872.1	95	KM231534.1
F18	<i>Fusarium incarnatum</i>	99	KJ562367.1	94	HQ165897.1	98	JF715935.1	97	GQ915477.1
F19	<i>Fusarium incarnatum</i>	99	KJ562367.1	94	HQ165897.1	98	JF715935.1	97	GQ915477.1
F20	<i>Fusarium decemcellulare</i>	99	GU797410.2	-	-	98	KC491872.1	95	KM231534.1
F21	<i>Fusarium decemcellulare</i>	99	GU797410.2	-	-	98	KC491872.1	95	KM231534.1
F22	<i>Fusarium oxysporum</i>	100	KM980005.1	100	KF703754.1	99	KF574861.1	100	KF222564.1
F23	<i>Fusarium decemcellulare</i>	99	GU797410.2	-	-	98	KC491872.1	95	KM231534.1
F24	<i>Fusarium decemcellulare</i>	99	GU797410.2	-	-	98	KC491872.1	95	KM231534.1
F25	<i>Fusarium decemcellulare</i>	99	GU797410.2	-	-	98	KC491872.1	95	KM231534.1
F26	<i>Fusarium decemcellulare</i>	99	GU797410.2	-	-	98	KC491872.1	95	KM231534.1
F27	<i>Fusarium decemcellulare</i>	99	GU797410.2	-	-	98	KC491872.1	95	KM231534.1
F28	<i>Fusarium decemcellulare</i>	99	GU797410.2	-	-	98	KC491872.1	95	KM231534.1
F29	<i>Fusarium decemcellulare</i>	99	GU797410.2	-	-	98	KC491872.1	95	KM231534.1
F30	<i>Fusarium decemcellulare</i>	99	GU797410.2	-	-	98	KC491872.1	95	KM231534.1
F31	<i>Fusarium decemcellulare</i>	99	GU797410.2	-	-	98	KC491872.1	95	KM231534.1
F32	<i>Fusarium decemcellulare</i>	99	GU797410.2	-	-	98	KC491872.1	95	KM231534.1
F33	<i>Fusarium decemcellulare</i>	99	GU797410.2	-	-	98	KC491872.1	95	KM231534.1

Isolados	Espécies	Região rDNA ITS		Região rDNA IGS		Gene TEF-1 $\alpha$		Gene H3	
		Id. (%)	N. acesso	Id. (%)	N. acesso	Id. (%)	N. acesso	Id. (%)	N. acesso
F34	<i>Fusarium decemcellulare</i>	99	GU797410.2	-	-	98	KC491872.1	95	KM231534.1
F35	<i>Fusarium decemcellulare</i>	99	GU797410.2	-	-	98	KF918541.1	95	KM231534.1
F36	<i>Fusarium decemcellulare</i>	99	GU797410.2	-	-	98	KC491872.1	95	KM231534.1
F37	<i>Fusarium decemcellulare</i>	99	GU797410.2	-	-	98	KC491872.1	95	KM231534.1
F38	<i>Fusarium decemcellulare</i>	99	GU797410.2	-	-	98	KC491872.1	95	KM231534.1
F39	<i>Fusarium decemcellulare</i>	99	GU797410.2	-	-	98	KC491872.1	95	KM231534.1
F40	<i>Fusarium decemcellulare</i>	99	GU797410.2	-	-	98	KC491872.1	95	KM231534.1
F41	<i>Fusarium decemcellulare</i>	99	GU797410.2	-	-	98	KC491872.1	95	KM231534.1
F42	<i>Fusarium decemcellulare</i>	99	GU797410.2	-	-	98	KF918541.1	95	KM231534.1
F43	<i>Fusarium decemcellulare</i>	98	GU797410.2	-	-	98	KF918541.1	95	KM231534.1
F44	<i>Fusarium decemcellulare</i>	99	GU797410.2	-	-	98	KF918541.1	95	KM231534.1
F45	<i>Fusarium decemcellulare</i>	99	GU797410.2	-	-	98	KF918541.1	95	KM231534.1
F46	<i>Fusarium decemcellulare</i>	99	GU797410.2	-	-	98	KC491872.1	95	KM231534.1
F47	<i>Fusarium decemcellulare</i>	99	GU797410.2	-	-	98	KC491872.1	95	KM231534.1
F48	<i>Fusarium decemcellulare</i>	99	GU797410.2	-	-	98	KC491872.1	95	KM231534.1
F49	<i>Fusarium decemcellulare</i>	99	GU797410.2	-	-	98	KC491872.1	95	KM231534.1
F50	<i>Fusarium decemcellulare</i>	99	GU797410.2	-	-	98	KC491872.1	95	KM231534.1
F51	<i>Fusarium decemcellulare</i>	99	KJ412511.1	-	-	98	KC491872.1	95	KM231534.1

## REFERÊNCIAS

- APPEL, D.J.; GORDON, T.R. Relationships among pathogenic and nonpathogenic isolates of *Fusarium oxysporum* based on the partial sequence of the intergenic spacer region of the ribosomal DNA. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 9, n. 2, p. 125-138, 1996.
- BELISARIO, A. et al. First report of *Fusarium semitectum* as the agent of twig cankers on Persian (English) Walnut in Italy. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 94, n. 6, p.791-791, 2010.
- BETELONI, F.G. et al. *Fusarium moniliforme*, novo patógeno no painel da seringueira, no estado de São Paulo. In: XXXII CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA, 2009, São Pedro. **Anais do XXXII Congresso Paulista de Fitopatologia**. São Pedro: Summa Phytopathologica, 2009. v. 35, p. 35 - 35.
- DÓRIA, K.M.A.B.V.S. **Caracterização morfológica, cultural, molecular e enzimática de isolados de *Fusarium* spp. de seringueira**. 2012. 115f. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2012.
- DUAN, W.; GUO, L.; DUAN, L. Interception and identification of *Albonectria rigidiuscula* on Buddhist pine imported from Japan. **Acta Phytopathologica Sinica**, [s.l.], v. 44, n. 3, p. 309-312, 2014.
- EBADI, M.; RIAHI, H. Morphological and genetic variation of the *Fusarium semitectum* isolates associated with cereal grains using RAPD markers. **International Journal of Agriculture and Biosciences**, [s.l.], v. 2, n. 6, p. 327-332, 2013.
- ELMER, W.H.; MARRA, R.E. New species of *Fusarium* associated with dieback of *Spartina alterniflora* in Atlantic salt marshes. **Mycologia**, Lawrence, v. 103, n. 4, p. 806–819, 2011.
- FERNANDEZ, M.R. **Manual para laboratório de fitopatologia**. Passo Fundo: EMATER – CNPT, 1993. 128p.
- FURTADO, E.L. et al. *Fusarium solani*, novo patógeno causando mofo cinzento em painel de seringueira, no Estado de São Paulo. In: XXXIV CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 2001, São Pedro. **Anais do XXXIV Congresso Brasileiro de Fitopatologia**. São Pedro: Fitopatologia Brasileira, 2001, v. 26, p. 439-439.
- GAI, X.T. et al. First Report of *Fusarium incarnatum* causing stalk rot on maize in China. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 100, n. 5, p. 1010-1010, May. 2016.
- GARIBALDI, A. et al. First report of *Fusarium oxysporum* causing wilt on Iceland poppy (*Papaver nudicaule*) in Italy. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 96, n. 12, p.1823-1823, 2012.

GARRO, J. Fusariosis, a complex infection caused by a high diversity of fungal species refractory to treatment. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, Wiesbaden, v. 32, p. 1491-1500, 2013.

GLASS, N.L.; DONALDSON, G.C. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous Ascomycetes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.61, n.4, p. 1323-1330, 1995.

GOMES, J.J. **Estudo anatômico do xilema secundário das espécies de Hevea da Amazônia brasileira**. 1981. 205p. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1981.

GONÇALVES, P.S. et al. Desempenho de clones de seringueira da série IAC 300 na região do planalto de São Paulo, **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, n. 2, p. 131-138, Fev. 2002.

HAWA, M.M.; SALLEH, B.; LATIFFAH, Z. Characterization and intraspecific variation of *Fusarium semitectum* (Berkeley and Ravenel) associated with red-fleshed dragon fruit (*Hylocereus polyrhizus* [Weber] Britton and Rose) in Malaysia. **African Journal of Biotechnology**, [s.l.], v. 9, p. 273-284, 2010.

HUANG, G.X. et al. First report of rubber tree gummosis disease caused by *Fusarium solani* in China. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 100, n. 8, p. 1788-1788, ago. 2016.

HUSSAIN, M.Z. et al. Morphological and molecular identification of *Fusarium oxysporum* Sch. isolated from guava wilt in Bangladesh. **Bangladesh Journal of Botany**, [s.l.], v. 41, n. 1, p. 49-54, 2012.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção Agrícola Municipal**. 2017. Disponível em: <[http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/pam/2015/default\\_xls.shtm](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/pam/2015/default_xls.shtm)>. Acesso em: 10 mar. 2017.

IRSG. INTERNATIONAL RUBBER STUDY GROUP. **Quarterly Statistics**. 2017. Disponível em: [http://www.rubberstudy.com/documents/WebSiteData\\_Feb2017New.pdf](http://www.rubberstudy.com/documents/WebSiteData_Feb2017New.pdf). Acesso em: 10 mar. 2017.

JIANG, G. et al. Isolation and identification of fungus causing collar rot disease of rubber tree. **Agricultural Science & Technology**, [s.l.], v. 16, n. 3, p. 529-529, 2015.

KASHIWA, T. et al. An avirulence gene homologue in the tomato wilt fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 1 functions as a virulence gene in the cabbage yellows fungus *F. oxysporum* f. sp. *conglutinans*. **Journal of General Plant Pathology**, [s.l.], v. 79, n. 6, p. 412-421, 24 jul. 2013.

KOMADA, H; OGAWA, K; AOKI, T. **Fusarium**. Tokyo: Zenkoku Nousei Kyoiku Kyokai. 2011 (em japonês).

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

LEZCANO, J.C.; MARTÍNEZ, B.; ALONSO, O. Cultural and morphological characterization and identification of ten *Fusarium* isolates from stored *Leucaena leucocephala* cv. Peru seeds. **Pastos y Forrajes**, [s.l.], v. 35, n. 2, p. 187-196, 2012.

LI, B.X. et al. First report of rubber tree stem rot caused by *Fusarium oxysporum* in China. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 98, n. 7, p.1008-1008, 2014.

MALI, A.M. et al. First report of leaf spot caused by *Fusarium* sp. NFCCI 2882 on *Angiopteris evecta*: A King Fern From Western Ghats, India. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 100, n. 3, p. 646, 2016.

O'DONNELL, K. et al. Internet-accessible DNA sequence database for identifying fusaria from human and animal infections. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 48, n. 10, p. 3708-3718, 2010.

O'DONNELL, K. et al. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: Concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, Washington, v. 95, p. 2044–2049, 1998.

OLIVEIRA, J.A. **Efeito do tratamento fungicida em sementes no controle de tombamento de plântulas de pepino (*Cucumis sativus* L.) e pimentão (*Capsicum annum* L.)**. 1991. 111p. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1991.

PLOETZ, R.; VAZQUEZ, A.; BENSCHER, D. First report of *Fusarium decemcellulare* as a pathogen of mango in the United States. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 80, n. 10, p. 1207, Oct. 1996.

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

RODRIGUES, A.A.C.; MENEZES, M. Identification and pathogenic characterization of endophytic *Fusarium* species from cowpea seeds. **Mycopathologia**, Dean Haag, v. 159, p. 79-85, 2005.

SAITOH, K. et al. A simple method for a mini-preparation of fungal DNA, **Journal of General Plant Pathology**, [s.l.], v. 72, p. 348-350, 2006.

SCHOCH, C.L. et al. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s.l.], v. 109, n. 16, p. 6241-6246, 2012.

SFALSIN, E. **Caracterização morfológica e molecular de *Fusarium decemcellulare* agente etiológico da galha-floral do cacauero**. 2012. 37f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

SUWANDI; AKINO, S.; KONDO, N. Common Spear Rot of Oil Palm in Indonesia. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 96, n. 4, p.537-543, 2012.

ÚRBEZ-TORRES, J.R. et al. First report of root and crown rot caused by *Fusarium oxysporum* on Sweet Cherry (*Prunus avium*) in British Columbia. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 100, n. 4, p. 855-855, 2016.

USDA. United States Department of Agriculture. **Fungal Database**. Disponível em: <<https://nt.ars-grin.gov/fungalatabases/fungushost/fungushost.cfm>>. Acesso em: 10 mar. 2017.

VELOSO, J.S. **Diversidade genética, morfológica e patogênica de isolados de *Fusarium oxysporum* associados à murcha em feijão-caupi**. 2013. 49f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2013.

WHITE, T.J. et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: **PCR Protocols: a guide to methods and applications**. INNIS, M.A.; GELFAND, D.H.; SNINSKY, J.J.; WHITE, T.J. eds. New York: Academic Press, 1990. p. 315–322.



## CAPÍTULO 2

### AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA DE CLONES DE SERINGUEIRA A *Fusarium* spp.

Marília Pizetta, Caroline Geraldí Pierozzi, Maria Márcia Pereira Sartori, Edson Luiz Furtado

**Resumo:** *Fusarium* spp. é um fungo patogênico de diferentes espécies vegetais, algumas espécies causam danos na casca das plantas de seringueira em campo, provocando trincas na mesma direção do painel de sangria. O objetivo do trabalho foi realizar testes de resistência clonal utilizando clones comerciais de seringueira inoculados com três espécies de *Fusarium* spp. patogênicas à seringueira. Foram utilizados os clones RRIM 600 (produzido em substrato), RRIM 600, PR 255, IAC 511, IAC 502, RRIM 937, IRCA 111 e PB 350 (produzidos em solo) e as espécies de *Fusarium* (*F. oxysporum*, *F. incarnatum*, *F. decemcellulare*). Em casa de vegetação, mudas enxertadas com um ou dois lançamentos foliares maduros foram inoculadas com um disco de micélio do fungo depositado entre a casca e o lenho, 10 cm acima do enxerto. Foram utilizadas quatro repetições para cada isolado de cada genótipo, sendo a testemunha absoluta inoculada apenas com um disco de meio de cultura BDA sem a presença do fungo. A avaliação foi realizada após 60 dias da inoculação, medindo-se o tamanho da lesão provocada pelo patógeno no interior do caule com o auxílio de uma régua milimetrada. As análises estatísticas dos dados foram realizadas através do Teste de Dunnett, para comparações entre o controle e os tratamentos e pelo Teste de Tukey, a 5% de probabilidade, para a comparação das médias. Os resultados incipientes permitiram concluir que as três espécies são patogênicas aos clones testados, IAC 502 e PR 255 foram clones mais suscetíveis a infecção de *F. oxysporum* e *F. incarnatum*, respectivamente. Já os clones IRCA 111 e IAC 511 apresentaram-se resistentes à colonização de *F. oxysporum* e *F. incarnatum*, respectivamente. Para a espécie *F. decemcellulare* os resultados não foram significativos entre os clones testados. São necessários mais estudos a fim de elucidar a resistência destes clones de seringueira às diferentes espécies de *Fusarium*.

**Palavras-chave:** *Hevea brasiliensis*, genótipos, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium incarnatum*, *Fusarium decemcellulare*, resistência clonal.

**Abstract:** *Fusarium* spp. is a pathogen of different plant species, some species cause damage to the bark of the rubber trees in the field, causing cracks in the same direction as the tapping panel. The objective of this study was to perform clonal resistance test using rubber tree commercial clones inoculated with three species of *Fusarium* spp. pathogenic to rubber trees. Were used the clones RRIM 600 (produced in substrate), IAC 502, IAC 511, IRCA 111, PB 350, PR 255, RRIM 600 and RRIM 937 (produced in soil) and the species of *Fusarium* (*F. oxysporum*, *F. incarnatum*, *F. decemcellulare*). In a greenhouse, budded plants with one or two leaf whorls were inoculated with a mycelium disc of the fungus deposited between the bark and the wood, 10 cm above the budded region. There were four replicates for each isolated of each genotype, and the absolute control was inoculated with only one disc of PDA culture medium without the presence of the fungus. The evaluation was performed after 60 days post inoculation, measuring the size of the lesion caused by the pathogen inside the stem with the aid of a millimeter ruler. Statistical analysis of the data were performed using the Dunnett Test, for comparisons between the control and the treatments and by the Tukey Test, at 5% probability, for the comparison of the means. The incipient results allowed to conclude that the three species are pathogenic to tested clones, IAC 502 and PR 255 clones were more susceptible to infection of *F. oxysporum* and *F. incarnatum*, respectively. IRCA 111 and IAC 511 clones were resistant to the colonization of *F. oxysporum* and *F. incarnatum*, respectively. For *F. decemcellulare* the results were not significant among the clones. Further studies are needed to elucidate the resistance of these rubber tree clones to the different *Fusarium* species.

**Keywords:** *Hevea brasiliensis*, genotypes, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium incarnatum*, *Fusarium decemcellulare*, clonal resistance.

## 2.1 INTRODUÇÃO

A fusariose, causada pelo fungo do gênero *Fusarium*, é uma doença do painel de sangria da seringueira, que causa danos e interfere na produtividade do látex pelas trincas, consequentemente, secando a região laticífera. Seu relato recente, no estado de São Paulo, em áreas produtoras, gerou uma preocupação aos produtores por estar associada diretamente à produtividade (DÓRIA, 2012).

O melhoramento da cultura da seringueira visa obter materiais genéticos altamente produtivos, uniformes no crescimento e resistentes ao vento e às doenças. A técnica de melhoramento utilizada para a seringueira é a seleção das melhores plantas seminais e enxertia dos materiais através de borbulhas em porta-enxertos vigorosos. Os enxertos são escolhidos em virtude de sua produtividade e da adaptabilidade ao local de plantio. Com relação aos porta-enxertos, os materiais devem ser escolhidos quanto a sua procedência a fim de obter uma seleção de materiais apropriada para o plantio, visando o aumento da produtividade e vigor do clone e resistência às doenças (MARTINS et al, 2000).

No Planalto Paulista, os porta-enxertos recomendados para produção de sementes devido aos altos rendimentos e a compatibilidade com os principais clones enxertados são: GT 1, IAN 873 e PB 235 (CARDINAL; GONÇALVES; MARTINS, 2007). E os clones recomendados para enxertia são: GT 1, IAC 35, IAC 40, IAC 300, IAC 302, IAC 500, IAC 502, IAC 505, IAC 511, IRCA 111, PB 217, PB 252, PB 350, PC 119, PR 255, PR 261, RRIM 600, RRIM 713, RRIM 937 e RRIM 938. O clone RRIM 600 ainda é o mais plantado no estado de São Paulo, por apresentar alta produtividade, vigor e ampla adaptação (IAC, 2013).

Dentro da escala de recomendação de materiais vegetais para plantios de seringueira no estado de São Paulo, pesquisadores do IAC propuseram uma estratégia para seleção de clones baseando-se no desempenho obtido em experimento em pequena escala e os melhores são relatados em experimentos em grande escala no estado e nos estados vizinhos e, por último, a recomendação ao plantio, dividindo-os em três classes. Os clones citados acima, RRIM 600 e PR 255, enquadram-se na Classe I, ou seja, estes materiais podem ser recomendados para plantios em grande escala, não excedendo 50% da área, por apresentarem bom desempenho em diversos locais. Na Classe II enquadram-se: IRCA 111, PB 350, RRIM 937, IAC 502 e IAC 511, recomendados para 35% da área. Já para os clones pertencentes a Classe III, a recomendação de plantio permite até 15% da área total em blocos agregados (IAC, 2013).

Estudos sobre o melhoramento genético de seringueira estão em constante progresso nas pesquisas. O Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) e a Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (Apta) vêm estudando novos materiais, da série IAC 500, capazes de produzirem látex mais precocemente comparado ao clone padrão, RRIM 600, reduzindo o início da sangria de sete para cinco anos e

aumentando a produtividade de látex por hectare em mais de 40%, destaque para o clone IAC 502, cuja produtividade média em 10 anos de sangria, chega a ser superior a 70% em relação ao clone padrão. Esses resultados promissores trazem uma alternativa para diminuir a dependência dos produtores ao clone RRIM 600 nos plantios paulistas e minimizar problemas sanitários (GONÇALVES et al., 2011; GONÇALVES; SCALOPPI JUNIOR; FREITAS, 2017).

Devido às recentes mudanças na produção de mudas de seringueira no estado, a Resolução SAA 23/2015 estabeleceu algumas exigências e normas técnicas de Defesa Sanitária Vegetal para a produção, comércio e o transporte de mudas, borbulhas e sementes de seringueira (*Hevea* spp.) no estado de São Paulo. Quanto a questão sanitária, os porta-enxertos e as mudas enxertadas deverão ser produzidos em recipientes plásticos, com substrato, sobre bancadas, sem contato com o solo e águas invasoras, devendo estar livres de pragas limitantes à cultura como *Meloidogyne* spp e *Pratylenchus* spp., condição comprovada através de laudos laboratoriais e obtenção de CFO (Certificado Fitossanitário de Origem), fiscalizados pela Coordenadoria de Defesa Agropecuária (SÃO PAULO, 2015).

Pelo fato do ciclo para avaliação de um material e posterior recomendação para plantio ser a longo prazo, os estudos visam, principalmente, a alta produtividade de borracha do material e resistência e tolerância às principais doenças e fatores abióticos. Portanto, testes de resistência clonal a doenças tornam-se importantes para auxiliarem os programas de melhoramento de seringueira, a fim de conciliar materiais altamente produtivos e resistentes às doenças, permitindo estratégias de manejo. Além disso e diante do atual cenário de produção de mudas de seringueira, torna-se interessante verificar a resistência às doenças de materiais produzidos, também, em substrato. Desse modo, o objetivo do trabalho foi realizar teste de resistência clonal de sete materiais provenientes de enxertia produzidos em solo e um material produzido por substrato expostos a três espécies de *Fusarium* (*F. oxysporum*, *F. incarnatum* e *F. decemcellulare*).

## 2.2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Patologia Florestal localizado no Departamento de Proteção Vegetal, na Fazenda Experimental Lageado, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu – São Paulo.

### 2.2.1 Avaliação de resistência de clones de seringueira a *Fusarium* spp.

Para o estudo da resistência clonal, foram testados diferentes materiais clonais de seringueira: clones RRIM 600 (mudas produzidas a partir de substrato) e RRIM 600 (controle), PR 255, IAC 511, IAC 502, RRIM 937, IRCA 111, PB 350, produzidos em solo, sendo todos provenientes de enxertia (Tabela 1).

Tabela 1 - Características dos genótipos, classes, parentais e origem dos clones utilizados neste experimento.

Genótipos	Classe	Parentais	Origem
RRIM 600	I	Tjir 1 x PB 86	Malásia
PR 255	I	Tjir 1 x PR 107	Indonésia
IAC 511	II	IAC 15 [RRIM 504 (Pil A 44 x Lun N)] ill.	Brasil
IAC 502	II	IAC 41 [RRIM 608 (Tjir 33 x Tjir 1) x AVROS 1279 (AVROS 256 x AVROS 374)] ill.	Brasil
RRIM 937	II	PB 5/51 x RRIM 703	Malásia
IRCA 111	II	RRIM 507 x Fx 25	Costa do Marfim
PB 350	II	RRIM 600 x PB 235	Malásia

IAC: Instituto Agrônômico de Campinas; Fx: Cruzamento Ford; Tjir: Tjirandji; PB: Prang Besar; PR: Proefstation voor Rubber; RRIM: Rubber Research Institute of Malaysia; IRCA: Institute des Recherches sur le Caoutchouc (FAO, 2017), ill.: Clone ilegítimo resultante de polinização aberta.

Os isolados fúngicos utilizados foram escolhidos mediante os resultados prévios do teste de patogenicidade utilizando-se como controle o clone RRIM 600, sendo separados um isolado patogênico para cada espécie estudada (F9: *F. incarnatum*, F11: *F. oxysporum* e F21: *F. decemcellulare*). A inoculação foi realizada em casa de vegetação utilizando-se mudas de seringueira com um ou dois lançamentos foliares maduros. A metodologia consistiu em uma incisão no caule da planta, onde foi depositado um disco de meio de cultura BDA com o micélio do fungo (incubado a 25°C por sete dias), entre a casca e o lenho, sendo colocado um algodão umedecido com água destilada autoclavada para manter a umidade do local e vedado com fita adesiva.

O experimento contou com cinco repetições de cada genótipo para cada isolado, sendo as testemunhas, de cada material, inoculadas apenas com um disco de meio de cultura BDA sem a presença do fungo. A avaliação foi realizada após 60 dias da inoculação, medindo-se o tamanho da lesão provocada pelo patógeno no interior do caule com o auxílio de uma régua milimetrada. Sintomas não foram observados na parte aérea durante o experimento. As análises estatísticas dos resultados foram realizadas através do Teste de Dunnett para comparação da testemunha com os

tratamentos e Teste de Tukey, em esquema fatorial duplo (clone x fungo), a 5% de probabilidade.

## 2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Comparando-se as lesões causadas pelos patógenos nos diferentes clones com a testemunha (lesões provocadas pelo procedimento de corte), pode-se observar que todos os resultados para o tamanho das lesões dos materiais clonais diferiram do controle em pelo menos um patógeno testado.

Para os clones RRIM 600, PR 255, RRIM 937, as três espécies de *Fusarium* (*F. incarnatum*, *F. oxysporum* e *F. decemcellulare*) foram patogênicas e não diferiram entre si pela agressividade. Já para os materiais RRIM 600 substrato e IAC 511, as espécies *F. oxysporum* e *F. decemcellulare* foram patogênicas e a espécie *F. incarnatum* não diferiu do controle, não sendo relevante na colonização desses dois últimos materiais (Tabela 2).

Tabela 2 - Comprimentos das lesões, em milímetros, resultantes do teste de resistência clonal em sete genótipos de seringueira para três espécies de *Fusarium*.

Clones	Comprimento das lesões (milímetros)			
	Testemunha	<i>F. oxysporum</i> (FO)	<i>F. incarnatum</i> (FI)	<i>F. decemcellulare</i> (FD)
RRIM 600	30 <sup>ns</sup>	168,0*aAB	138,0*aABC	133,6*aA
RRIM 600 sub.	37 <sup>ns</sup>	166,0*aAB	94,8 <sup>ns</sup> bBC	112,0*abA
PR 255	63,2 <sup>ns</sup>	177,8*aAB	189,0*aA	154,6*aA
IAC 511	20,6 <sup>ns</sup>	173,0*aAB	81,8 <sup>ns</sup> bC	105,0*bA
IAC 502	22,7 <sup>ns</sup>	289,7*aA	104,3 <sup>ns</sup> cABC	176,0 <sup>ns</sup> bA
RRIM 937	33,2 <sup>ns</sup>	167,0*aAB	114,8*aABC	109,4*aA
IRCA 111	18,3 <sup>ns</sup>	96,0*bB	171,8*aAB	79,3 <sup>ns</sup> bA
PB 350	37,7 <sup>ns</sup>	126,7 <sup>ns</sup> aAB	145,3*aABC	141,0*aA

As médias rotuladas pelo asterisco (\*), na mesma linha, são significativamente diferentes da média do nível de controle, a 5% de probabilidade, pelo Teste de Dunnett.

As médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Informações científicas sobre resistência de materiais clonais de seringueira a pragas e doenças ainda são pouco encontradas na literatura. Além dos clones RRIM 600 e PR 255, amplamente conhecidos e utilizados, os clones IAC 502, IAC 511, RRIM 937, IRCA 111 e PB 350, são materiais de uso recente no país, devido aos resultados promissores encontrados em campo em diferentes localidades, sendo de grande interesse comercial (GONÇALVES, 2013; IAC, 2013).

O clone RRIM 600, utilizado como padrão nos testes de resistência clonal, é um clone altamente produtivo e vigoroso, sendo os pontos favoráveis para o seu cultivo no estado de São Paulo. Possui tolerância à seca do painel de sangria e a ocorrência de oídio, porém é muito suscetível a *Phytophthora* sp., a rubelose e a quebra pelo vento (GONÇALVES, 2013; IAC, 2013; RRIM, 2017).

O clone RRIM 600 também foi intolerante e suscetível a colonização dos nematoides *Meloidogyne exigua* e *Pratylenchus brachyurus* (PAES-TAKAHASHI et al., 2015). Em outro experimento, avaliando a influência dos processos fisiológicos nas folhas, causada por *Calacarus heveae*, mudas do clone RRIM 600 apresentaram menor tolerância fisiológica ao ácaro, quando comparado ao clone GT 1 (DAUD; CONFORTO; FERES, 2012). Outros estudos apontaram o clone RRIM 600 como favorável ao desenvolvimento do ácaro *Tenuipalpus heveae* (FERES; DEL'ARCO; DAUD, 2010) e não resistente ao ácaro *C. heveae* (DAUD; FERES; HERNANDES, 2011). No noroeste paulista, um estudo avaliando doze gentótipos de seringueira expostos aos ácaros *C. heveae* e *T. heveae*, em condições de campo, corroborou a não resistência do clone RRIM 600 a essas espécies (VIEIRA et al., 2017). Neste experimento, o clone RRIM 600 também apresentou valores intermediários para os comprimentos de lesões provocadas pelas três espécies patogênicas de *Fusarium*.

Entre os clones RRIM 600, produzidos em solo e substrato, as lesões foram semelhantes entre as espécies estudadas, destacando-se alguma diferença para *F. incarnatum*, no material produzido em substrato. Estatisticamente, as lesões provocadas por *F. oxysporum* e *F. decemcellulare* foram próximas e não diferiram entre os dois tipos de mudas do clone, porém, para *F. incarnatum*, o material produzido em substrato apresentou colonização parcialmente menor pelo fungo quando comparado ao clone RRIM 600 produzido em solo.

As espécies *F. oxysporum* e *F. decemcellulare* foram mais agressivas ao clone RRIM 600, em substrato, e a espécie *F. incarnatum* apresentou menores valores de lesões para esse material quando comparados ao mesmo clone produzido em solo, cuja agressividade não diferiu entre as três espécies testadas. Diante dos resultados encontrados para as lesões provocadas por *F. incarnatum* nos dois tipos de mudas do clone RRIM 600, este fungo não se mostrou relevante na colonização do material produzido em substrato. Segundo Hartmann et al. (2002), o uso de substrato inerte conjuntamente com o controle ambiental na propagação e cultivo em viveiro pode

potencializar a resposta das plantas aos fatores edáficos e microclimáticos que influenciam no crescimento e desenvolvimento, permitindo, dentre outros atributos, o controle fitossanitário. Desse modo, a muda produzida em substrato pode se tornar mais vigorosa e, conseqüentemente, responder com certa tolerância a presença de invasores.

Na literatura, o clone PR 255 apresenta bom incremento médio no caule na fase adulta o que indica crescimento após a sangria. É um clone produtivo e apresenta ocorrência moderada de antracnose, seca do painel, rubelose e queda anormal das folhas e sintomas mais severos para oídio (GONÇALVES, 2013; IAC, 2013; RRIL, 2017). Em um teste de resistência clonal, utilizando-se três clones (RRIM 600, GT 1 e PR 255) e duas espécies de *Fusarium* (*F. decemcellulare* e *F. verticillioides*), foi possível observar maiores lesões internas no caule do clone GT 1, causadas pelas duas espécies, lesões intermediárias no clone PR 255 e menores lesões no clone RRIM 600, sendo este, o mais resistente a ocorrência da fusariose, mesmo sendo o clone com maior incidência da doença em campo (DÓRIA, 2012).

Esta suscetibilidade a algumas espécies de *Fusarium* foi verificada, também, neste estudo, em que o clone PR 255 obteve maiores valores de lesões provocadas por um patógeno comparado ao clone padrão. Estes resultados mostraram que para a espécie *F. incarnatum*, o clone PR 255 foi mais suscetível (189,0 mm,  $p < 0,05$ ). Apesar das infecções moderadas provocadas por *F. oxysporum* e valores altos de lesões encontrados para *F. decemcellulare*, mesmo não sendo significativo para o último, a intensidade da infecção não diferiu entre os fungos testados, sendo este material vulnerável à presença das três espécies de *Fusarium*, dentre os sete materiais analisados.

Outras situações foram observadas para os demais clones estudados. IRCA 111 apresentou lesões maiores quando colonizado por *F. incarnatum* e a espécie *F. decemcellulare* não diferiu da testemunha. Originário da Costa do Marfim, o clone IRCA 111 apresenta bons resultados quanto a produção comparado ao clone RRIM 600 (24% a mais que o padrão – 2.268 kg ha<sup>-1</sup> ano<sup>-1</sup> de borracha seca), sendo recomendado para plantio em pequena escala (ALEM et al., 2015). Quando submetido ao teste de resistência clonal, este material foi considerado promissor por ser o mais resistente, dentre os materiais testados, a duas espécies patogênicas (*F. oxysporum* e *F. decemcellulare*), apresentando os menores valores de colonização (96,0 mm,  $p < 0,05$  e 79,3 mm,  $p > 0,05$ , respectivamente). Resultado interessante

para a resistência desse clone foi encontrado em um trabalho cujo objetivo foi avaliar dez genótipos de seringueira quanto à resistência aos ácaros *C. heveae* e *T. heveae*, em que o clone IRCA 111 foi considerado tolerante à *C. heveae*, em dois períodos distintos de avaliações (SILVA et al. 2011).

Para o clone PB 350 as três espécies de *Fusarium* não diferiram quanto a agressividade, porém, o comprimento de lesão provocada por *F. oxysporum* não diferiu do controle, mesmo apresentando lesões similares às demais espécies. Com parentais RRIM 600 x PB 235, o clone malaio PB 350 possui adaptabilidade para diversas regiões produtoras de látex. Além do vigor, o material apresenta alta resistência a oídio e antracnose (duas das principais doenças na cultura da seringueira no estado de São Paulo) e tolerância ao vento e a seca do painel (GONÇALVES, 2013; IAC, 2013), porém alta suscetibilidade ao fungo *Neofusicoccum ribis* (teleomorfo: *Botryosphaeria ribis*), em folhas, na Península da Malásia (NGOBISA et al., 2013). Estas características de resistência e suscetibilidade a fatores bióticos e abióticos, também foram encontradas neste experimento. O material apresentou valores intermediários para os isolados *F. oxysporum* e *F. incarnatum* (126,7 mm e 145,3 mm,  $p < 0,05$ , respectivamente) e a agressividade das espécies não diferiram para este clone. Um estudo, avaliando dezoito genótipos de seringueira (incluindo RRIM 600 e PB 350) quanto à infestação por ácaros, indicou que o clone PB 350 não diferiu do clone padrão (RRIM 600) ao desfolhamento provocado por estes aracnídeos (VIEIRA; MARTINS; SCALOPPI JUNIOR, 2013).

As características do clone IAC 502 são superiores ao clone RRIM 600 e aos demais clones da série IAC 500 quanto ao desempenho produtivo e vigor. O clone IAC 511 também apresenta produtividade superior ao clone padrão. Esses dois materiais são promissores para a produção de borracha em terras paulistas e, atualmente, encontram-se na terceira etapa de avaliação para recomendação dos clones para plantios em larga escala (GONÇALVES, 2013; IAC, 2013).

O clone IAC 502 apresentou os maiores valores de comprimento de lesões para as espécies *F. oxysporum* (289,7 mm,  $p < 0,05$ ) e *F. decemcellulare* (176,0 mm,  $p > 0,05$ ) dentre todos os clones testados. Já para a espécie *F. incarnatum*, as lesões foram intermediárias entre os clones estudados. *F. oxysporum* foi o isolado mais agressivo para o material, seguido de *F. decemcellulare* e, posteriormente, de *F. incarnatum*. Apesar do clone IAC 502 ter apresentado maiores valores de lesões

para duas espécies, este material genético possui casca virgem espessa, uma característica importante para o processo de sangria, a qual diminui a incidência de danos no painel (GONÇALVES; FONTES, 2009; GONÇALVES; SCALOPPI JUNIOR; FREITAS, 2017) e tem sido recomendado para plantios em pequena escala devido ao potencial de crescimento e rendimento em campo (GONÇALVES et al., 2011). O presente experimento foi realizado em plantas jovens, com um ou dois lançamentos foliares, condições que podem diferir em plantas adultas em campo.

Outros resultados foram encontrados para o clone IAC 511. Foi considerado o material clonal mais resistente a *F. incarnatum* comparado aos demais, com 81,8 mm de lesão, não diferindo estatisticamente da testemunha. A espécie *F. oxysporum* também foi a mais agressiva para o clone IAC 511. Este clone é considerado precoce para abertura do painel (cinco anos e seis meses) apresentando rendimentos similares ao clone padrão (RRIM 600), está sendo recomendado para plantio pelo seu rápido crescimento e rendimento em campo, além de poder ser utilizado como parental para futuros programas de melhoramento (GONÇALVES et al., 2011).

Com ótimo vigor na pré-sangria, o clone RRIM 937 supera o clone padrão em produtividade, porém após a abertura do painel o crescimento torna-se lento, sendo superado pelo RRIM 600 na pós-sangria (GONÇALVES, 2013; IAC, 2013). Quanto ao teste de resistência clonal, o clone encaixou-se como moderadamente resistente aos três patógenos. Apesar dos valores diferentes, a agressividade dos isolados não diferiram entre si.

Visualizando o comportamento da espécie *F. oxysporum*, foi considerada a mais agressiva comparada às demais, para a maioria dos materiais clonais de seringueira analisados. O clone IRCA 111 obteve a menor lesão (96,0 mm) dentro os materiais testados. Além de sua ocorrência em *H. brasiliensis* na Malásia e na cultivar de seringueira Yunyan 77-4 na China (USDA, 2017; LI et al., 2014), esta espécie é a mais importante do gênero, estando amplamente dispersa, causando perdas e injúrias em numerosos hospedeiros (LESLIE; SUMMERELL, 2006). Os mais recentes relatos de *F. oxysporum* causando murcha foram registrados para madeira amarela 'Yellowwood' (*Cladrastis kentukea*) nos EUA (GRANEY; ELMER; LOYD, 2017), em flores de *Limonium sinuatum* no Reino Unido (TAYLOR et al., 2017) e em

*Dendrobium officinale*, orquídea muito utilizada na medicina tradicional chinesa (ZHANG et al., 2017).

Quando comparados os materiais clonais à espécie *F. incarnatum* (sin.: *F. semitectum*), esta apresentou agressividade moderada entre os clones estudados. Destaque para o clone IAC 511 que apresentou a menor lesão dentre os materiais analisados (81,8 mm). Embora, tenha vários relatos na literatura em diversas plantas, *F. incarnatum* não é considerado um importante patógeno de plantas (LESLIE; SUMMERELL, 2006). Em seringueira, há registro desta espécie em plantios de *H. brasiliensis* na Malásia (USDA, 2017). Constatações mais recentes da ocorrência de *F. incarnatum*, foram encontradas causando podridão em milho (GAI et al., 2016) e em frutos de jujuba chinesa (*Ziziphus jujuba*) (GUO et al., 2016), ambos na China.

O tamanho das lesões encontrados para a espécie *F. decemcellulare* não foram significativamente diferentes entre os materiais testados. Algumas possibilidades para isso ocorrer, devem-se aos valores discrepantes medidos dentro dos mesmos materiais (alto coeficiente de variação), podendo ter influenciado os resultados e, pelo fato do experimento ter sido realizado apenas uma vez. Porém, mesmo sem obter diferença estatística, pode-se observar, novamente, o clone IRCA 111 apresentando o menor valor para comprimento de lesão encontrado (79,3 mm). *F. decemcellulare*, estágio assexual de *Albonectria rigidiuscula*, geralmente, é relatado causando danos em plantas de áreas tropicais e subtropicais, associado aos sintomas de cancro (LESLIE; SUMMERELL, 2006). Foi relatado ocorrendo em seringais no Congo e no Brasil (USDA, 2017; DÓRIA, 2012). Os últimos apontamentos para *F. decemcellulare* foram em manga na República Dominicana (GARCÍA-LÓPEZ et al., 2017), em *Magnolia denudata* na China (WANG et al., 2015) e, em rambutã, longan e manga em Porto Rico (SERRATO-DIAZ et al., 2015).

Através dos resultados incipientes obtidos, pode-se concluir que o clone IRCA 111 foi resistente para *Fusarium oxysporum* e o clone IAC 511 foi resistente para *F. incarnatum*. Essas informações prévias complementares são relevantes para a repetibilidade do experimento a fim de integrar o programa de estudos do melhoramento da cultura da seringueira.

## REFERÊNCIAS

- ALEM, H.M. et al. Avaliação de clones de seringueira para a região noroeste do Estado de São Paulo. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 62, n. 5, p.430-437, out. 2015.
- CARDINAL, A.B.B.; GONÇALVES, P.S.; MARTINS, A.L.M. Influência de seis porta-enxertos sobre a produção de clones superiores de seringueira. **Bragantia**, Campinas, v. 66, n. 2, p. 277-284, 2007.
- DAUD, R.D.; CONFORTO, E.C.; FERES, R.J.F. Changes in leaf physiology caused by *Calacarus heveae* (Acari, Eriophyidae) on rubber tree. **Experimental and Applied Acarology**, Amsterdam, v. 57, n. 2, p. 127-137, abr. 2012.
- DAUD, R.D.; FERES, R.J.F.; HERNANDES, F.A. Seasonal suitability of three rubber tree clones to *Calacarus heveae* (Acari, Eriophyidae). **Experimental and Applied Acarology**, Amsterdam, v. 56, n. 1, p. 57-68, 2011.
- DÓRIA, K.M.A.B.V.S. **Caracterização morfológica, cultural, molecular e enzimática de isolados de *Fusarium* spp. de seringueira**. 2012. 115f. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2012.
- FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/003/Y0153E/Y0153E10.htm>>. Acesso em: 10 mar. 2017.
- FERES, R.J.F.; DEL'ARCO, M.; DAUD, R.D. Biological cycle of *Tenuipalpus heveae* Baker (Acari, Tenuipalpidae) on leaflets of three rubber tree clones. **Revista Brasileira de Entomologia**, Curitiba, v. 54, n. 2, p. 298-303, jun. 2010.
- GAI, X.T. et al. First report of *Fusarium incarnatum* causing stalk rot on maize in China. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 100, n. 5, p.1010-1010, maio. 2016.
- GARCÍA-LÓPEZ, E. et al. First report of gall disease in mango trees caused by *Fusarium decemcellulare* in Dominican Republic. **Journal of Plant Pathology**, [s.l.], v. 99, n. 1, 2017.
- GRANEY, L.; ELMER, W.H.; LOYD, A.L.. First report of *Fusarium* wilt of yellowwood (*Cladrastis kentukea*) caused by *Fusarium oxysporum* in the United States. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 101, n. 1, p.258-258, jan. 2017.
- GUO, K.F. et al. Black spot disease of Chinese Jujube (*Ziziphus jujuba*) caused by *Fusarium incarnatum* in China. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 100, n. 2, p. 529-529, fev. 2016.
- GONÇALVES, P.S. **Novos clones de seringueira para o Estado de São Paulo**. Disponível em: <<http://www.cda.sp.gov.br/www/gdsv/conteudoPalestras/III-Encontro-2013/01-RecomendacaoNovosClonesSeringueiraEstSP-Paulo-de-Souza-Goncalves.pdf>>. Acesso em: 10 mar. 2017.

GONÇALVES, P.S.; FONTES, J.R.A. Domesticação e melhoramento da seringueira. In. BOREM, A.; LOPES, M.T.G.; CLEMENT, C.R. **Domesticação e Melhoramento: Espécies da Amazônia**. 1 ed. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2009, v.1, p.395-423.

GONÇALVES, P.S.; SCALOPPI JUNIOR, E.J.; FREITAS, R.S. **Centro de Seringueira e Sistemas Agroflorestais**. Votuporanga: IAC, 2017, 1 folder.

GONÇALVES, P.S. et al. Assessment of growth and yield performance of rubber tree clones of the IAC 500 series. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 46, n. 12, p. 1643-1649, dez. 2011.

HARTMANN, H.T. et al. Hartmann and Kester's **Plant Propagation: Principles and Practices**. 7. ed. Upper Saddle River: Prentice Hall, 2002. 880 p.

IAC. Instituto Agrônomo de Campinas. **Centro de Seringueira e Sistemas Agroflorestais**. 2013. Disponível em: <<http://www.iac.sp.gov.br/areasdepesquisa/seringueira/>>. Acesso em: 10 mar. 2017.

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

LI, B.X. et al. First report of rubber tree stem rot caused by *Fusarium oxysporum* in China. **Plant Disease**, v. 98, n. 7, p.1008-1008, 2014.

MARTINS, A.L.M. et al. Influência de porta-enxertos no crescimento de clones de seringueira no Estado de São Paulo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, n. 9, p. 1743-1750, set. 2000.

NGOBISA, A.I.C.N et al. *Neofusicoccum ribis* associated with leaf blight on rubber (*Hevea brasiliensis*) in Peninsular Malaysia. **The Plant Pathology Journal**, [s.l.], v. 29, n. 1, p.10-16, 1 mar. 2013.

PAES-TAKAHASHI, V.S. Reaction of rubber tree rootstock to *Meloidogyne exigua* and *Pratylenchus brachyurus*. **Nematropica**, Brandenton, v. 45, p. 242-251, 2015.

RRII. Rubber Research Institute of India. Disponível em: <<http://rubberboard.org.in/ResearchTreeView.asp?selectedid=1&ld=0#Loc1>>. Acesso em: 10 mar. 2017.

SÃO PAULO (Estado). Coordenadoria de Defesa Agropecuária do Estado de São Paulo. Resolução SAA nº 23, de 26 de junho de 2015. **Estabelece exigências para cadastramento de viveiros, jardins clonais, plantas matrizes produtoras de sementes e normas técnicas de defesa sanitária vegetal, para a produção, comércio e o transporte de mudas, borbulhas e sementes de seringueira (*Hevea spp.*) no Estado de São Paulo**. Disponível em <<https://www.defesa.agricultura.sp.gov.br/legislacoes/resolucao-saa-23-de-26-06-2015,1035.html>>. Acesso em: 10 mar. 2017.

- SERRATO-DIAZ, L.M. et al. First report of *Fusarium decemcellulare* causing inflorescence wilt and vascular and flower necrosis of rambutan (*Nephelium lappaceum*), longan (*Dimocarpus longan*), and mango (*Mangifera indica*). **Plant Disease**, Saint Paul, v. 99, n. 8, p. 1187-1187, ago. 2015.
- SILVA, H.A.S. et al. Clones de seringueira com resistência a ácaros. **Bragantia**, Campinas, v. 70, n. 2, p. 383-388, 2011.
- TAYLOR, A. et al. First report of *Fusarium oxysporum* causing a vascular wilt of statice (*Limonium sinuatum*) in the UK. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 101, n. 6, p. 1040-1040, jun. 2017.
- USDA. United States Department of Agriculture. **Fungal Database**. Disponível em: <<https://nt.ars-grin.gov/fungalatabases/fungushost/fungushost.cfm>>. Acesso em: 10 mar. 2017.
- VIEIRA, M.R. et al. Resistência a ácaros de clones de seringueira nas condições do noroeste paulista. **Bragantia**, Campinas, v. 76, n. 1, p. 102-107, mar. 2017.
- VIEIRA, M.R.; MARTINS, G.L.M.; SCALOPPI JUNIOR, E.J. Resistência de clones de seringueira à infestação por ácaros. **Bragantia**, Campinas, v. 72, n. 4, p. 367-372, 2013.
- ZHANG, Yue Qin et al. First report of *Fusarium* wilt of *Dendrobium officinale* caused by *Fusarium oxysporum* in China. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 101, n. 6, p. 1039-1039, jun. 2017.
- WANG, Y.X. et al. First report of canker of *Magnolia denudata* caused by *Fusarium decemcellulare* in Hubei, China. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 99, n. 7, p. 1036-1036, jul. 2015.

### CAPÍTULO 3

## CONTROLE QUÍMICO EM DIFERENTES ESPÉCIES DE *Fusarium* DE SERINGUEIRA

Marília Pizetta, Caroline Geraldi Pierozzi, Maria Márcia Pereira Sartori, Edson Luiz Furtado

**Resumo:** A produção paulista de borracha natural é destaque no cenário nacional, respondendo por mais de 50% da produtividade. Porém, todo cultivo monoclonal está sujeito ao ataque de pragas e doenças devido a baixa variabilidade atual encontrada nos plantios florestais comerciais e, muitas vezes, a única alternativa para impedir o avanço dessas malezas, ocorre através do controle químico. Em seringueira, a fusariose, que ataca o painel de sangria, vem preocupando os produtores paulistas pelo fato da doença surgir na fase adulta da planta. Alguma solução para essa doença tem sido encontrada e o controle químico vem sendo empregado a fim de paralisar o avanço do patógeno, permitindo continuar o ciclo produtivo. A fusariose é causada por três espécies de *Fusarium* e, devido a essa variabilidade, tornou-se necessário estudar a eficácia de ingredientes ativos de fungicidas para o melhor controle, em conjunto, das espécies patogênicas encontradas. Para o teste de controle químico “*in vitro*” foram utilizados oito fungicidas (clorotalonil, tiofanato metílico, tiofanato metílico + clorotalonil, azoxistrobina + difenoconazol, tebuconazol, piraclostrobina + epoxiconazol, azoxistrobina + ciproconazol, trifloxistrobina + tebuconazol) e um ativador de resistência (acibenzolar-S-metílico) e três espécies de *Fusarium* (*F. oxysporum*, *F. incarnatum*, *F. decemcellulare*). A metodologia consistiu no preparo de soluções estoques de 1 g de ingrediente ativo para cada produto comercial e, as consequentes diluições em série, a fim de se obter as concentrações desejadas (1.000, 100, 10 e 1  $\mu\text{L L}^{-1}$ ), sendo incorporadas ao meio de cultura Batata Dextrose Ágar, compondo os tratamentos. As testemunhas constituíram de placas contendo apenas o meio de cultura BDA, com ausência de fungicida. Discos de 7 mm de diâmetro do micélio de cada fungo (crescidos por sete dias em B.O.D. a 25°C) foram depositados no centro das placas de Petri e as medições perpendiculares dos diâmetros das colônias foram realizadas diariamente até o fechamento da primeira placa de cada fungo. Foram calculados a porcentagem de inibição do crescimento

micelial e a dose efetiva necessária para inibir 50% do crescimento micelilal do isolado. As análises estatísticas, em fatorial triplo (9 produtos x 4 concentrações x 3 isolados), foram realizadas através do Teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade. Os fungicidas que melhor controlaram o crescimento das três espécies de *Fusarium* foram a base dos ingredientes ativos tebuconazol e trifloxistrobina + tebuconazol, podendo ser alternativas para o manejo da fusariose em seringueira.

**Palavras-chave:** *Hevea brasiliensis*, ingredientes ativos, *F. oxysporum*, *F. incarnatum*, *F. decemcellulare*.

**Abstract:** The production of the natural rubber from São Paulo state is highlighted in the national scenario, accounting for more than 50% of the productivity. However, monoclonal cultivation is subject of the attack by pests and diseases due to low current variability found in commercial forest plantations and, often, the only alternative to prevent the advance of the disease, occurs through chemical control. In rubber tree, the fusariosis disease, which attacks the tapping panel, has been worrying to producers in São Paulo state because of the disease appears in the adult phase of the plant. Some solution for this disease has been found and the chemical control has been used in order to paralyze the progress fo the pathogen, allowing to continue the productive cycle. The fusariosis is caused by three *Fusarium* species and because of this variability, it has become necessary to study the efficacy of the active ingredients for better control, together, for the pathogenic species found. For the "*in vitro*" chemical control test, were used eight fungicides (chlorothalonil, methyl thiophanate, methyl thiophanate + chlorothalonil, azoxystrobin + difenoconazole, tebuconazole, pyraclostrobin + epoxiconazole, azoxystrobin + cyproconazole, trifloxystrobin + tebuconazole) and one resistance activator (acibenzolar -S-methyl) and three *Fusarium* species (*F. oxysporum*, *F. incarnatum*, *F. decemcellulare*). The methodology consisted in preparing stocks solutions of 1 g of active ingredient for each commercial product, and the consequent serial dilutions in order to obtain the desired concentrations (1.000, 100, 10 and 1  $\mu\text{L L}^{-1}$ ), incorporating to the PDA culture medium, composing the treatments. The controls consisted of Petri dishes containing only the PDA culture medium, with absence of fungicide. Mycelium discs of 7 mm of diameter of each fungus (grown for 7 days in BOD at 25°C) were deposited in the center of the Petri dishes and perpendicular measurements of the colonies diameters

were taken daily until the closure of the first Petri dish for each fungus. The percent inhibition of the mycelial growth and the effective dose required to inhibit 50% of the mycelial growth of the isolate were calculated. The statistical analyzes, in triple factorial (9 products x 4 concentrations x 3 isolates), were performed through the Scott-Knott Test, at 5% probability. The fungicides that presented the best control of the growth of three isolates of *Fusarium* were the basis of the active ingredients tebuconazole and trifloxystrobin + tebuconazole, and could be alternatives for the management of fusariosis in rubber tree.

**Keywords:** *Hevea brasiliensis*, active ingredients, *F. oxysporum*, *F. incarnatum*, *F. decemcellulare*.

### 3.1 INTRODUÇÃO

A heveicultura destaca-se no mercado mundial pela importância estratégica, ao lado do aço e do petróleo. A produção nacional de borracha natural (látex coagulado) ocupa apenas 2,6% da produção mundial, sendo o estado de São Paulo o maior produtor com 182,3 mil t (57,1% da produção brasileira), seguido pela Bahia com 47,6 mil t (14,9%), Minas Gerais com 23,8 mil t (7,47%) e Mato Grosso com 23,6 mil t (7,39%) (IBGE, 2017).

Plantios monoclonais, perenes e anuais, são alvos de pragas e doenças pelo fato da baixa variabilidade genética presente nos talhões. Uma das técnicas de manejo silvicultural a fim de minimizar tal efeito é o plantio em mosaico, que consiste em entremear talhões da cultura com áreas nativas, aumentando, assim, a biodiversidade.

Outro manejo empregado, que dentre uma das finalidades, é minimizar os efeitos dos plantios monoclonais ao ataque de pragas e doenças é o sistema agroflorestal (SAF), uma espécie de consórcio de uma cultura de interesse com culturas agrícolas ou arbóreas. Um exemplo de SAF encontrado para a cultura da seringueira, sem haver a redução da produtividade, foi através do consórcio com o cacauzeiro, utilizado por produtores no sul da Bahia (MARQUES et al., 2004).

Mesmo assim, incidências de pragas e doenças são inevitáveis nas plantações. Desse modo, o manejo deve auxiliar os produtores a fim de minimizar os danos causados por determinados agentes patogênicos. A ocorrência de fusariose em seringais paulistas preocupam os produtores, pelo fato dessa doença estar

associada à diminuição da produtividade de látex na planta, uma vez que incide no painel de sangria (DÓRIA, 2012).

O controle de doenças de plantas é o limiar da fitopatologia. Ausência de controle pode causar sérios prejuízos ao produtor (KIMATI; BERGAMIN FILHO; AMORIM, 2011). Após cumprir todas as exigências para o manejo de uma cultura, o uso de produtos químicos torna-se, na maioria das vezes, a única medida de controle eficiente para impedir o avanço do patógeno de modo a garantir a produtividade e a qualidade da produção (KIMATI, 2011). Para culturas perenes como a seringueira, que o ciclo pode chegar a 40 anos, é necessário utilizar materiais clonais resistentes a diversos fatores bióticos e abióticos para garantir a produtividade desejada. Durante o ciclo produtivo, podem surgir agentes infecciosos que, se não controlados, levam a uma diminuição da produção e, até mesmo, a morte da planta. Um exemplo de doença que incide em seringueiras adultas e necessita de controle é a fusariose, causada por *Fusarium* spp. (DÓRIA, 2012).

Pesquisadores desenvolveram uma fórmula para controlar o desenvolvimento da fusariose em seringueira. A fórmula consiste em uma combinação de 0,5 L de tinta látex branca, que protege a área dos raios do sol e auxilia na fixação do produto, 0,5 L de água e 5 mL de fungicida a base de tebuconazol. Após a retirada dos tecidos mortos no painel de sangria, a mistura de fungicida é aplicada na região doente. Considerando que a aplicação do fungicida é estritamente manual, o ganho para o produtor ainda é compensatório, permitindo prolongar a sangria de látex das plantas por mais tempo (GLOBO RURAL ONLINE, 2013).

De acordo com os produtos químicos registrados para a cultura da seringueira, das sete doenças causadoras de danos no painel de sangria da planta que estão registradas no Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários (Agrofit/Mapa), quatro delas possuem produtos para efetuar o controle curativo, sendo que três fungos (*Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium moniliforme* e *Lasiodiplodia theobromae*) apresentam o mesmo ingrediente ativo registrado (clorotalonil + tiofanato metílico). Na literatura, vários são os ingredientes ativos registrados para numerosas espécies de *Fusarium* em diferentes culturas (BRASIL, 2003).

O fungicida a base de clorotalonil + tiofanato metílico é uma mistura entre um princípio ativo de contato e outro sistêmico, tendo boa atividade contra oomicetos (*Phytophthora* spp.), ascomicetos (*Botryotinia*, *Mycosphaerella* e *Dydimella*),

basidiomicetos (ferrugens) e fungos anamórficos (*Alternaria solani* e *Colletotrichum gloeosporioides*) (KIMATI, 2011).

O controle de *F. decemcellulare*, “*in vitro*”, utilizando-se 14 ingredientes ativos de grupos químicos distintos, mostrou a eficiência de tebuconazol para três isolados testados em quatro concentrações (DÓRIA, 2012). Devido a variabilidade de espécies de *Fusarium* encontradas em seringueiras neste estudo, houve a necessidade de estudar, além do ingrediente ativo já registrado para *F. moniliforme* (clorotalonil + tiofanato metílico), outros produtos a fim de encontrar aquele que melhor proporcione o controle, “*in vitro*”, para as três espécies patogênicas relatadas (*F. oxysporum*, *F. incarnatum* e *F. decemcellulare*). Portanto, o objetivo do trabalho foi avaliar a eficiência do controle químico “*in vitro*” de oito fungicidas e um ativador de resistência a três espécies de *Fusarium* patogênicas à seringueira.

## 3.2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Patologia Florestal localizado no Departamento de Proteção Vegetal, na Fazenda Experimental Lageado, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu – São Paulo.

### 3.2.1 Controle “*in vitro*” de diferentes espécies de *Fusarium* de seringueira

Os isolados de *Fusarium* utilizados neste experimento foram selecionados de acordo com a agressividade avaliada em teste de patogenicidade prévio, sendo selecionado um representante para cada espécie patogênica (isolado F9: *F. incarnatum*, isolado F11: *F. oxysporum* e isolado F21: *F. decemcellulare*).

No total, foram testados oito produtos fungicidas e um ativador de resistência de plantas, utilizados comercialmente. Em geral, pertencem a diferentes grupos químicos, sendo alguns registrados para a cultura da seringueira (Tabela 1).

Discos de micélio dos isolados de *Fusarium* (F9, F11 e F21) foram depositados em placas de Petri contendo meio de cultura BDA (Batata Dextrose Ágar) e foram mantidos em condições controladas (25°C e fotoperíodo de 12 horas), por dez dias, para a obtenção do inóculo.

A metodologia utilizada para o teste de controle químico “*in vitro*” baseou-se nas técnicas apresentadas por Edgington, Khew e Barron (1971), modificada por Menten et al. (1976) e Chagas (2009). O ensaio consistiu em preparar as concentrações desejadas dos produtos incorporando-os ao meio de cultura BDA.

Tabela 1 - Fungicidas utilizados para o teste de eficiência “*in vitro*” no controle da fusariose em seringueira.

<b>Ingrediente ativo (i.a.)</b>	<b>CIA<sup>1</sup></b>	<b>Grupo químico</b>	<b>Formulação<sup>2</sup></b>	<b>Classe</b>	<b>Classe toxicológica<sup>3</sup></b>
Clorotalonil	750 g/Kg	Isoftalonitrila	PM	Contato	I
Tiofanato metílico	700 g/Kg	Benzimidazol	PM	Sistêmico	I
Tiofanato metílico + Clorotalonil	200 + 500 g/Kg	Benzimidazol e Isoftalonitrila	PM	Sistêmico e Contato	I
Azoxistrobina + Difenconazol	200 + 125 g/L	Estrobilurina e Triazol	SC	Sistêmico	III
Tebuconazol	200 g/L	Triazol	CE	Sistêmico	III
Piraclostrobina + Epoxiconazol	133 + 50 g/L	Estrobilurina e Triazol	SE	Sistêmico	II
Azoxistrobina + Ciproconazol	200 + 80 g/L	Estrobilurina e Triazol	SC	Sistêmico	III
Trifloxistrobina + Tebuconazol	100 + 200 g/L	Estrobilurina e Triazol	SC	Mesostêmico e Sistêmico	III
Acibenzolar-S-methyl	500 g/Kg	Benzothiadiazol	GD	Sistêmico	III

<sup>1</sup>CIA: Concentração do ingrediente ativo. <sup>2</sup>GD: granulado dispersível; PM: pó molhável; SC: suspensão concentrada; CE: concentrado emulsionável; SE: suspo/emulsão. <sup>3</sup>Classificação toxicológica (Classe I: extremamente tóxico; Classe II: altamente tóxico; Classe III: medianamente tóxico; Classe IV: pouco tóxico).

Para a obtenção da solução estoque (10.000 ppm), 1 g i.a. de cada produto foi diluído em 100 mL de água destilada autoclavada. Produtos com formulações pó molhável e granulado foram diluídos, primeiramente, em 5 mL de acetona e, após a completa diluição, adicionados a 95 mL de água destilada autoclavada. Os demais produtos foram diluídos, diretamente, em 100 mL de água destilada autoclavada. Esta etapa foi realizada dentro da câmara de fluxo laminar, a fim de garantir assepsia ao experimento.

Após o preparo da solução estoque, foram realizadas diluições em série, a fim de se obter as concentrações desejadas. Portanto, transferiram-se 10 mL da solução estoque para 90 mL de água destilada autoclavada, obtendo-se uma solução de 1.000 ppm. Este processo é repetido mais duas vezes, a fim de se obter as concentrações 100 ppm e 10 ppm. De cada solução preparada (10.000 ppm, 1.000 ppm, 100 ppm e 10 ppm), foram retirados 10 mL transferindo-os para 90 mL de meio de cultura BDA fundente, obtendo-se, assim, as concentrações utilizadas nesse estudo (1.000 ppm, 100 ppm, 10 ppm e 1 ppm) (CHAGAS, 2009). Para o controle, foram utilizados placas de Petri contendo apenas meio de cultura BDA.

Após o preparo dos meios de cultura, nos diferentes tratamentos, discos de micélio e conídios dos três fungos foram depositados no centro das placas de Petri.

As placas foram mantidas em condições controladas (25°C e fotoperíodo de 12 horas), durante a avaliação. Com o auxílio de uma régua milimetrada, foram realizadas medições diárias dos diâmetros perpendiculares das colônias e, prosseguiram-se até o fechamento da primeira placa de cada isolado testado (colônias atingindo o diâmetro total de 8,5 cm). O crescimento micelial dos tratamentos foi comparado à testemunha respectiva, calculando-se o índice de velocidade do crescimento micelial (IVCM) e a porcentagem de inibição do crescimento micelial (PIC) (MENTEN et al., 1976).

$$PIC = \frac{\text{crescimento testemunha} - \text{crescimento do tratamento}}{\text{crescimento da testemunha}} \times 100 \quad (1)$$

Com a porcentagem de inibição obtida, os dados foram analisados e, se significativos, foram submetidos à análise de regressão, calculando-se o ED<sub>50</sub> (concentração de ingrediente ativo capaz de inibir 50% do crescimento micelial do isolado). Após o cálculo do ED<sub>50</sub>, os isolados fúngicos foram classificados em quatro categorias de sensibilidade aos fungicidas e, os fungicidas foram classificados em quatro categorias de eficiência, de acordo com as escalas de Bollen e Fucks (1970), Edgington, Khew e Barron (1971) e Kataria e Grover (1978) citadas por Tavares e Souza (2005) e Chagas et al. (2014), sendo:

- a) ED<sub>50</sub> < 1 ppm: alta sensibilidade/eficiência (AS/AE);
- b) ED<sub>50</sub> 1 – 10 ppm: moderada sensibilidade/eficiência (MS/ME);
- c) ED<sub>50</sub> 10 – 50 ppm: baixa sensibilidade/eficiência (BS/BE);
- d) ED<sub>50</sub> > 50 ppm: insensibilidade/ineficiência (I/I)

O experimento contou com cinco repetições (placas) para cada tratamento, sendo quatro concentrações para cada produto avaliado mais as testemunhas de cada isolado. O delineamento foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial triplo (9 x 4 x 3), sendo 9 produtos, quatro concentrações (1.000 ppm, 100 ppm, 10 ppm e 1 ppm) e três isolados (F9, F11 e F21). As análises estatísticas foram realizadas através do Teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

### 3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados encontrados para cada produto comercial diferiram entre si. O i.a. clorotalonil apresentou resultados insatisfatórios para inibição do crescimento de *Fusarium* spp. Os melhores resultados foram encontrados para inibição de *F.*

*oxysporum* (60,2%) na maior concentração utilizada ( $1.000 \mu\text{L L}^{-1}$ ), já o pior desempenho do produto foi registrado para a espécie *F. incarnatum*, inibindo apenas 13,2% do crescimento micelial (Tabela 2; Figuras 1 a 6). De acordo com a dose efetiva, os três isolados mostraram-se insensíveis ao i.a. clorotalonil, sendo este produto considerado ineficiente para o controle da doença (Tabela 3).

O princípio ativo a base de clorotalonil é um produto de ação protetora (contato), com boa atividade contra oomicetos (*Phytophthora* spp.), ascomicetos (*Botryotinia*, *Mycosphaerella* e *Dydimella*), basidiomicetos (ferrugens) e fungos anamórficos (*Alternaria solani* e *Colletotrichum gloeosporioides*) (KIMATI, 2011). Encontra-se registrado para diversas doenças, incluindo *Microcyclus ulei* em seringueira (BRASIL, 2003). Para *Phytophthora palmivora*, em frutos de mamão, apresentou-se mais efetivo no controle dos frutos em campo comparado aos testes *in vitro* (VAWDREY; MALE; GRICE, 2015).

Por outro lado, em um experimento avaliando a efetividade de fungicidas sistêmicos e de contato contra *Phytophthora ramorum* causando podridão em azaléia, os fungicidas de contato foram menos efetivos que os sistêmicos, um dos motivos seria pelo fato da ação dos produtos ser protetora, visto que são ideais para a inibição da germinação dos esporos na superfície foliar. Portanto, em testes em plantas de azaléia, não conseguiram prevenir e reduzir a infecção do patógeno (ELLIOTT; SHAMOUN; SUMAMPONG, 2015).

O controle "*in vitro*" de fusariose em seringueira não foi evidente para o i.a. clorotalonil. Testes "*in vitro*" são pioneiros para a seleção dos produtos que controlaram com maior eficiência o crescimento micelial de um patógeno desejado a fim de prosseguir para os testes em plantas. Somando-se a ineficiência desse produto, aos três isolados de *Fusarium*, e o modo de ação protetor, pode-se inferir que o i.a. clorotalonil não é o produto mais indicado para o controle da doença.

O produto tiofanato metílico também não apresentou resultados interessantes quanto ao controle "*in vitro*" dos isolados quando comparado aos demais produtos. *F. oxysporum* obteve uma inibição do crescimento em 95,6% na concentração  $1.000 \mu\text{L L}^{-1}$ , resultados inferiores foram encontrados para *F. decemcellulare* e o pior desempenho, novamente, ocorreu para *F. incarnatum*, em que nenhuma inibição, em todas as concentrações, foi observada. Tiofanato metílico é um ingrediente ativo com propriedades preventivas e curativas registrado para dezenas de doenças em

várias culturas, sendo também indicado para o mal das folhas em seringueira (BRASIL, 2003).

Tabela 2 - Ingredientes ativos, dosagem e porcentagem de inibição do crescimento micelial de espécies de *Fusarium*.

Ingredientes ativos	Dosagem (g/Kg ou L) <sup>1</sup>	PIC (%) <sup>2</sup> – <i>Fusarium oxysporum</i>							
		Concentrações em ppm ( $\mu\text{L L}^{-1}$ ) <sup>3</sup>							
		1	10	100	1.000				
Clorotalonil	750	21,3	eD	34,3	dD	36,5	dD	60,2	aC
Tiofanato metílico	700	0,27	eE	66,1	bB	72,5	bC	95,6	aA
Tiofanato metílico + clorotalonil	200 + 500	27,7	fD	26,7	fE	90,7	bB	98,1	aA
Azoxistrobina + difenoconazol	200 + 125	58,2	cB	72,6	bB	90,3	aB	91,7	aB
Tebuconazol	200	72,5	dA	96,1	aA	99,4	aA	100	aA
Piraclostrobina + epoxiconazol	133 + 50	52,6	eB	67,9	dB	89,6	bB	97,2	aA
Azoxistrobina + ciproconazol	200 + 80	41,9	fC	55,3	eC	69,4	dC	88,9	bB
Trifloxistrobina + tebuconazol	100 + 200	67,6	cA	92,8	bA	99,0	aA	100	aA
Acibenzolar-S-metílico	500	5,5	cE	1,2	cF	5,5	cE	23,1	aD
<b>Médias</b>		38,6		57,0		72,5		83,9	
Ingredientes ativos	Dosagem (g/Kg ou L) <sup>1</sup>	PIC (%) <sup>2</sup> – <i>Fusarium incarnatum</i>							
		Concentrações em ppm ( $\mu\text{L L}^{-1}$ ) <sup>3</sup>							
		1	10	100	1.000				
Clorotalonil	750	44,6	cB	51,3	bD	22,8	eE	13,2	fD
Tiofanato metílico	700	-10,7	fD	-11,4	fF	-3,7	eG	-17,0	fF
Tiofanato metílico + clorotalonil	200 + 500	48,2	dB	53,0	dD	43,2	eD	21,0	gC
Azoxistrobina + difenoconazol	200 + 125	32,0	eC	62,1	cC	73,8	bC	76,2	bB
Tebuconazol	200	64,7	dA	81,9	cA	100	aA	100	aA
Piraclostrobina + epoxiconazol	133 + 50	40,8	fB	75,9	cB	82,1	cB	98,5	aA
Azoxistrobina + ciproconazol	200 + 80	35,3	fC	77,5	cB	100	aA	100	aA
Trifloxistrobina + tebuconazol	100 + 200	65,0	cA	87,8	bA	100	aA	100	aA
Acibenzolar-S-metílico	500	-6,4	dD	11,6	bE	10,2	bF	4,7	cE
<b>Médias</b>		34,8		54,4		58,7		55,2	
Ingredientes ativos	Dosagem (g/Kg ou L) <sup>1</sup>	PIC (%) <sup>2</sup> – <i>Fusarium decemcellulare</i>							
		Concentrações em ppm ( $\mu\text{L L}^{-1}$ ) <sup>3</sup>							
		1	10	100	1.000				
Clorotalonil	750	20,6	eB	26,0	eC	33,0	dD	53,5	bE
Tiofanato metílico	700	-3,5	eC	3,1	eD	29,8	dD	53,3	cE
Tiofanato metílico + clorotalonil	200 + 500	19,8	gB	27,1	fC	50,6	dC	76,9	cC
Azoxistrobina + difenoconazol	200 + 125	23,6	fB	41,7	dB	58,9	cB	63,2	cD
Tebuconazol	200	37,4	eA	68,6	dA	88,9	bA	100	aA
Piraclostrobina + epoxiconazol	133 + 50	23,0	gB	36,8	fB	57,1	eB	85,7	bB
Azoxistrobina + ciproconazol	200 + 80	23,9	hB	31,5	gC	60,0	eB	82,5	cB
Trifloxistrobina + tebuconazol	100 + 200	32,0	dA	70,6	cA	86,4	bA	87,9	bB
Acibenzolar-S-metílico	500	-1,2	dC	0,7	cD	12,7	bE	21,2	aF
<b>Médias</b>		19,5		34,0		53,0		69,4	
<b>CV (%)</b>						10,55			
<b>F</b>						27,62			

Médias seguidas da mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

<sup>1</sup>Dosagem: quantidade do ingrediente ativo em um produto químico formulado.

<sup>2</sup>PIC (%): Porcentagem de inibição do crescimento micelial.

<sup>3</sup>Resultados encontrados utilizando-se cinco repetições para cada variável estudada em meio de cultura BDA.

Tabela 3 - Dose efetiva ED<sub>50</sub>, sensibilidade dos isolados de *Fusarium* aos produtos e eficiência dos produtos sobre os isolados de *Fusarium*.

Ingredientes ativos	<i>F. oxysporum</i>			<i>F. incarnatum</i>			<i>F. decemcellulare</i>		
	ED <sub>50</sub>	S <sup>1</sup>	E <sup>2</sup>	ED <sub>50</sub>	S <sup>1</sup>	E <sup>2</sup>	ED <sub>50</sub>	S <sup>1</sup>	E <sup>2</sup>
Clorotalonil	> 100	I	I	> 1000	I	I	> 100	I	I
Tiofanato metílico	10 - 50	BS	BE	> 1000	I	I	> 100	I	I
Tiofanato metílico + clorotalonil	10 - 50	BS	BE	> 1000	I	I	> 100	I	I
Azoxistrobina + difenoconazol	< 1	AS	AE	1 - 10	MS	ME	> 50	I	I
Tebuconazol	< 1	AS	AE	< 1	AS	AE	1 - 10	MS	ME
Piraclostrobina + epoxiconazol	< 1	AS	AE	1 - 10	MS	ME	> 50	I	I
Azoxistrobina + ciproconazol	1 - 10	MS	ME	1 - 10	MS	ME	10 - 50	BS	BE
Trifloxistrobina + tebuconazol	< 1	AS	AE	< 1	AS	AE	1 - 10	MS	ME
Acibenzolar-S-metílico	> 1000	I	I	> 1000	I	I	> 1000	I	I

<sup>1</sup>Sensibilidade de isolados de *Fusarium* aos produtos. Escala de sensibilidade: AS: alta sensibilidade; MS: moderada sensibilidade; BS: baixa sensibilidade; I: insensibilidade.

<sup>2</sup>Eficiência dos produtos sobre os isolados de *Fusarium*. Escala de eficiência: AE: alta eficiência; ME: moderada eficiência; BE: baixa eficiência; I: ineficiência

Vários estudos apontam o uso de tiofanato metílico para o controle de doenças em frutas e outras, porém, devido ao seu uso intensivo, tem ocorrido pequenas mutações que conferem resistência, com o tempo, a alguns importantes patógenos, como pode ser visto para *Monilinia fructicola* em pêssego, ameixa e nectarina no Brasil (MAY-DE-MIO; LUO; MICHAILIDES, 2011), em pêssego, cereja doce e ameixa nos EUA (CHEN; LIU; SCHNABEL, 2013) e, em pêssegos na Espanha (EGÜEN; MELGAREJO; CAL, 2014). Outros patógenos conferem resistência ao tiofanato metílico, como em *Botrytis cinerea* em morango (FERNÁNDEZ-ORTUÑO; SCHNABEL, 2012), *Colletotrichum siamense* em pêssego e mirtilo (HU et al., 2015) e *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* em melancia (PETKAR et al., 2017). Este produto foi considerado de baixa eficiência para o controle de *F. oxysporum* em seringueira, porém ineficiente para as outras espécies estudadas. Apesar de ter ação sistêmica e considerando a ocorrência dos três patógenos em seringais paulistas, principalmente, *F. decemcellulare*, este produto não seria adequado para evitar a colonização dos diferentes patógenos.

Tiofanato metílico + clorotalonil obteve melhores resultados, em geral, quando comparado aos dois anteriores. A espécie *F. oxysporum* apresentou as maiores inibições (98,1% a 1.000 µL L<sup>-1</sup> e 90,7 a 100 µL L<sup>-1</sup>) e o menor controle foi obtido para *F. incarnatum* (21% a 1.000 µL L<sup>-1</sup>) e *F. decemcellulare* (19,8% a 1 µL L<sup>-1</sup>). Mesmo com bons resultados encontrados para *F. oxysporum*, em maiores concentrações, os i.a. tiofanato metílico e tiofanato metílico + clorotalonil apresentaram baixa eficiência para este isolado e foram ineficientes para os demais.

Figura 1 - Índice de velocidade de crescimento médio das colônias de *F. oxysporum*, em centímetros, para nove produtos químicos e controle, em quatro concentrações.

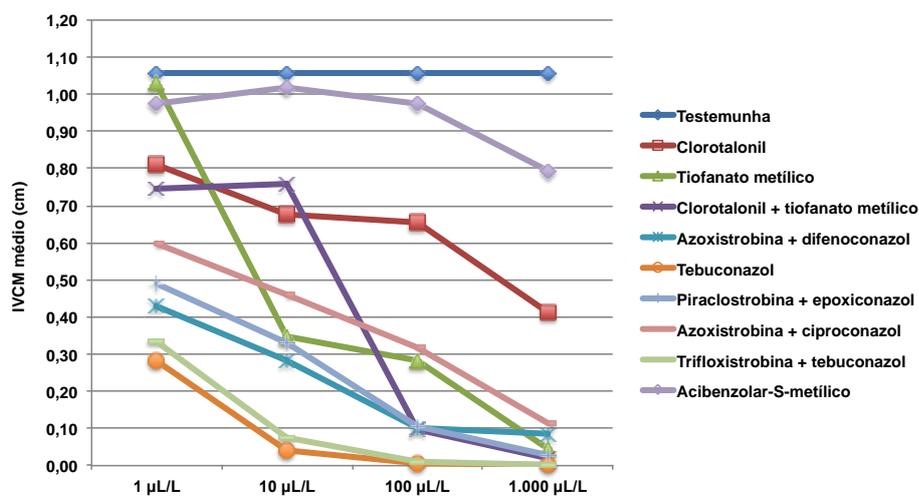


Figura 2 - Índice de velocidade de crescimento médio das colônias de *F. incarnatum*, em centímetros, para nove produtos químicos e controle, em quatro concentrações.

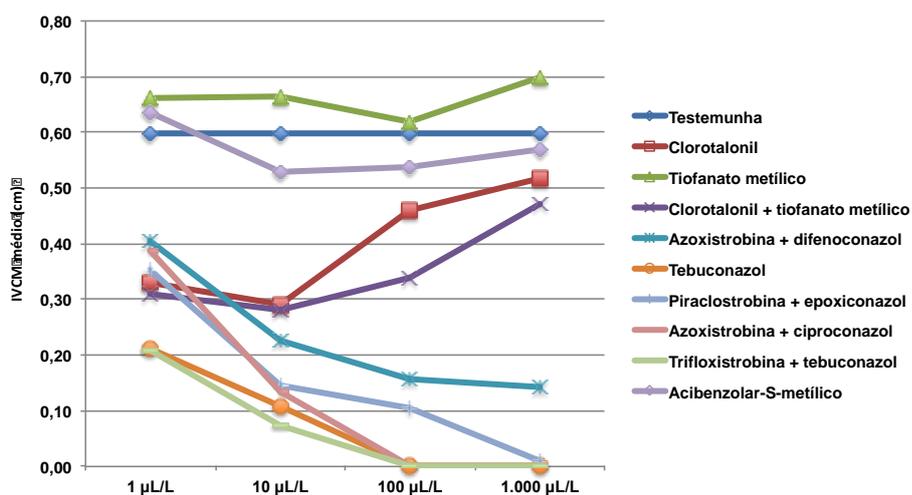


Figura 3 - Índice de velocidade de crescimento médio das colônias de *F. decemcellulare*, em centímetros, para nove produtos químicos e controle, em quatro concentrações.

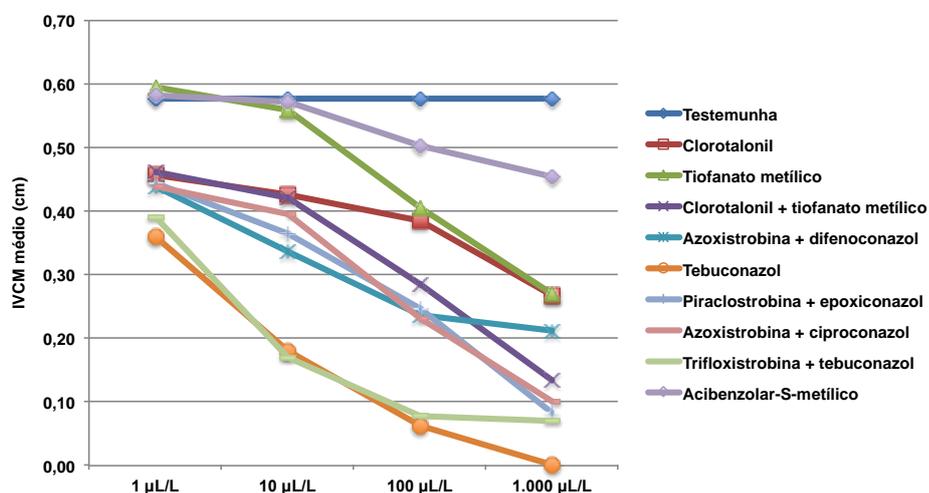


Figura 4 - Teste de controle químico “*in vitro*” de nove ingredientes ativos atuando sobre *Fusarium oxysporum*, em quatro concentrações em ( $\mu\text{L L}^{-1}$ ), em meio de cultura BDA.

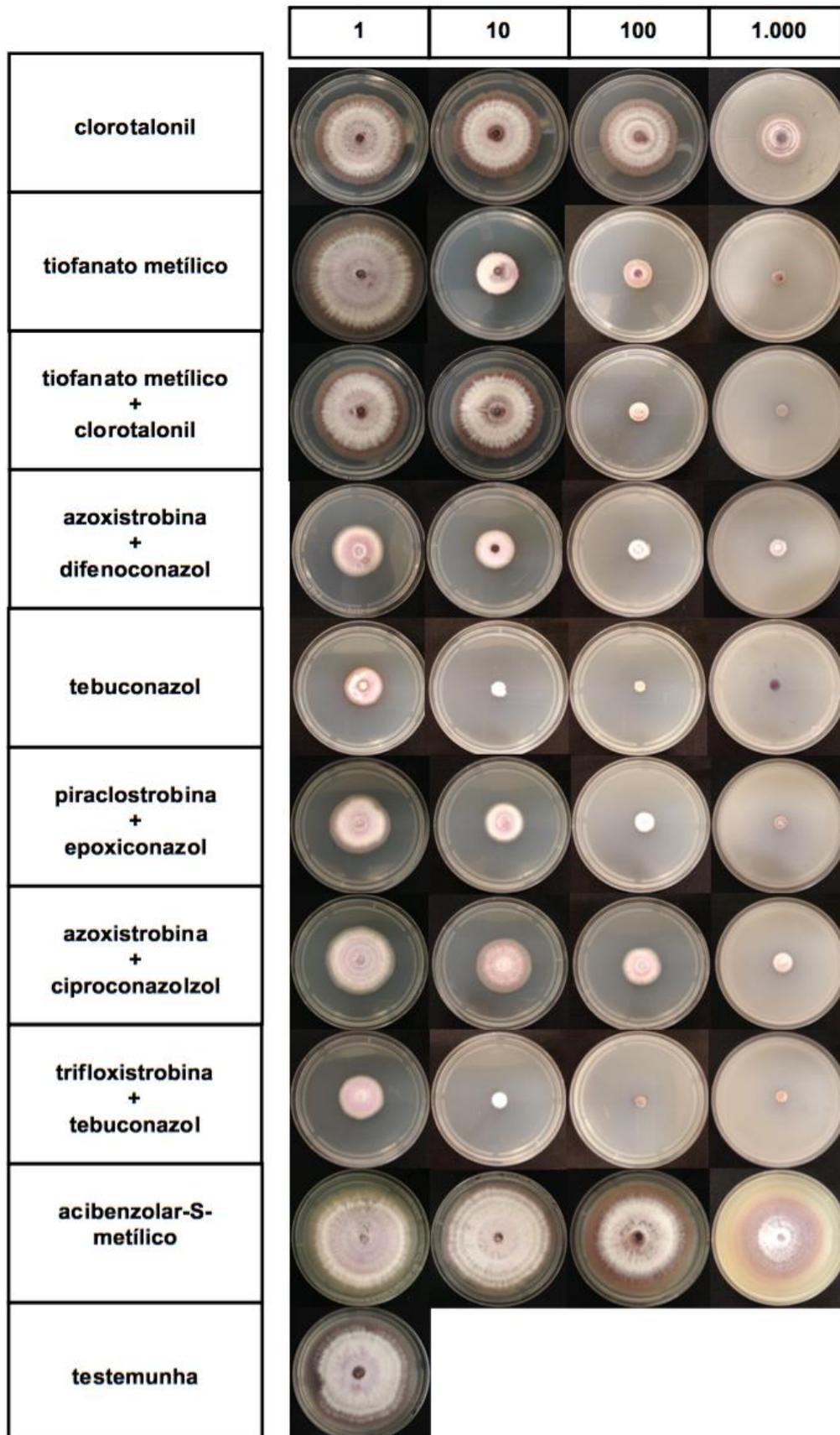


Figura 5 - Teste de controle químico “*in vitro*” de nove ingredientes ativos atuando sobre *Fusarium incarnatum*, em quatro concentrações em ( $\mu\text{L L}^{-1}$ ), em meio de cultura BDA.

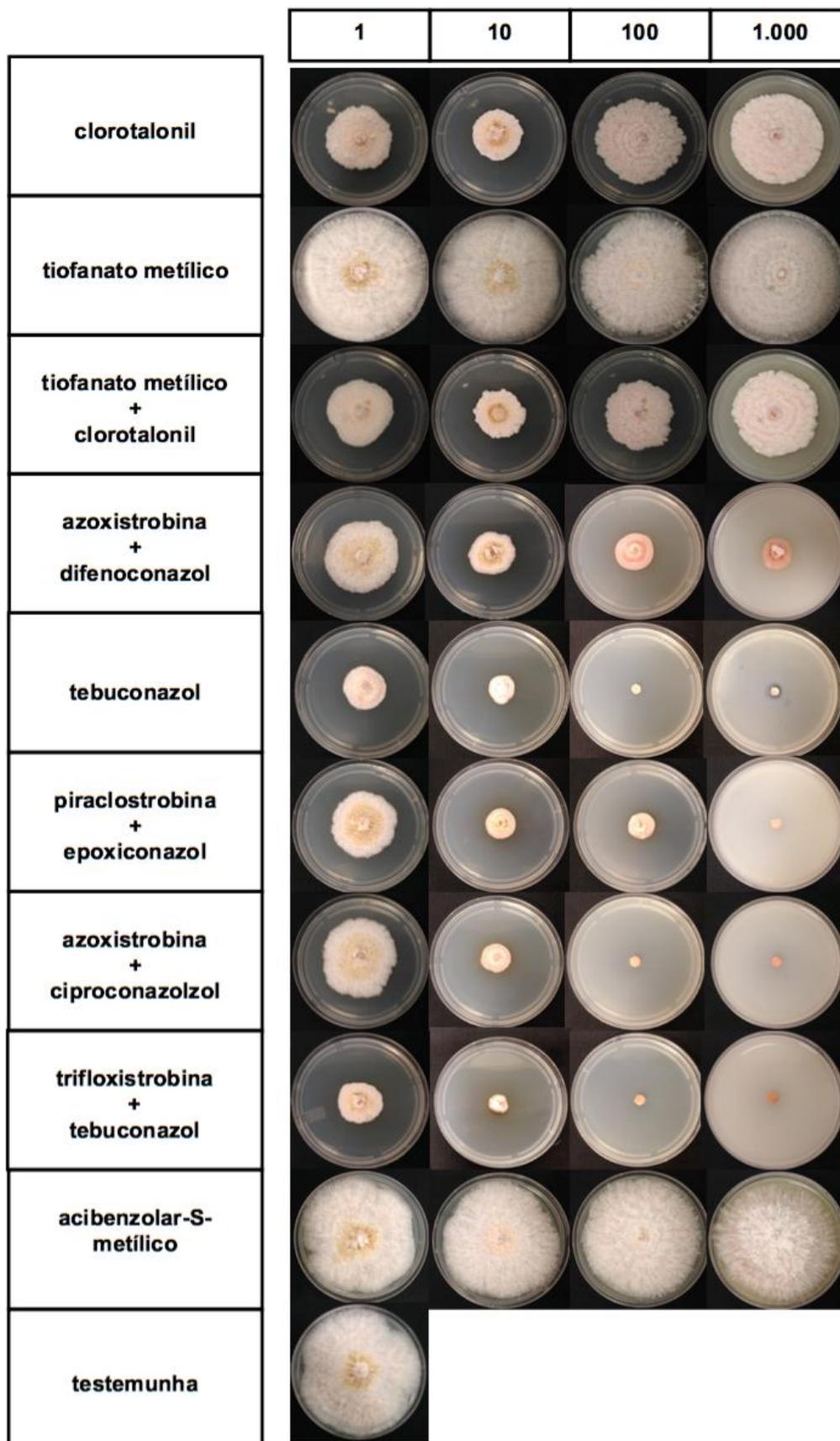
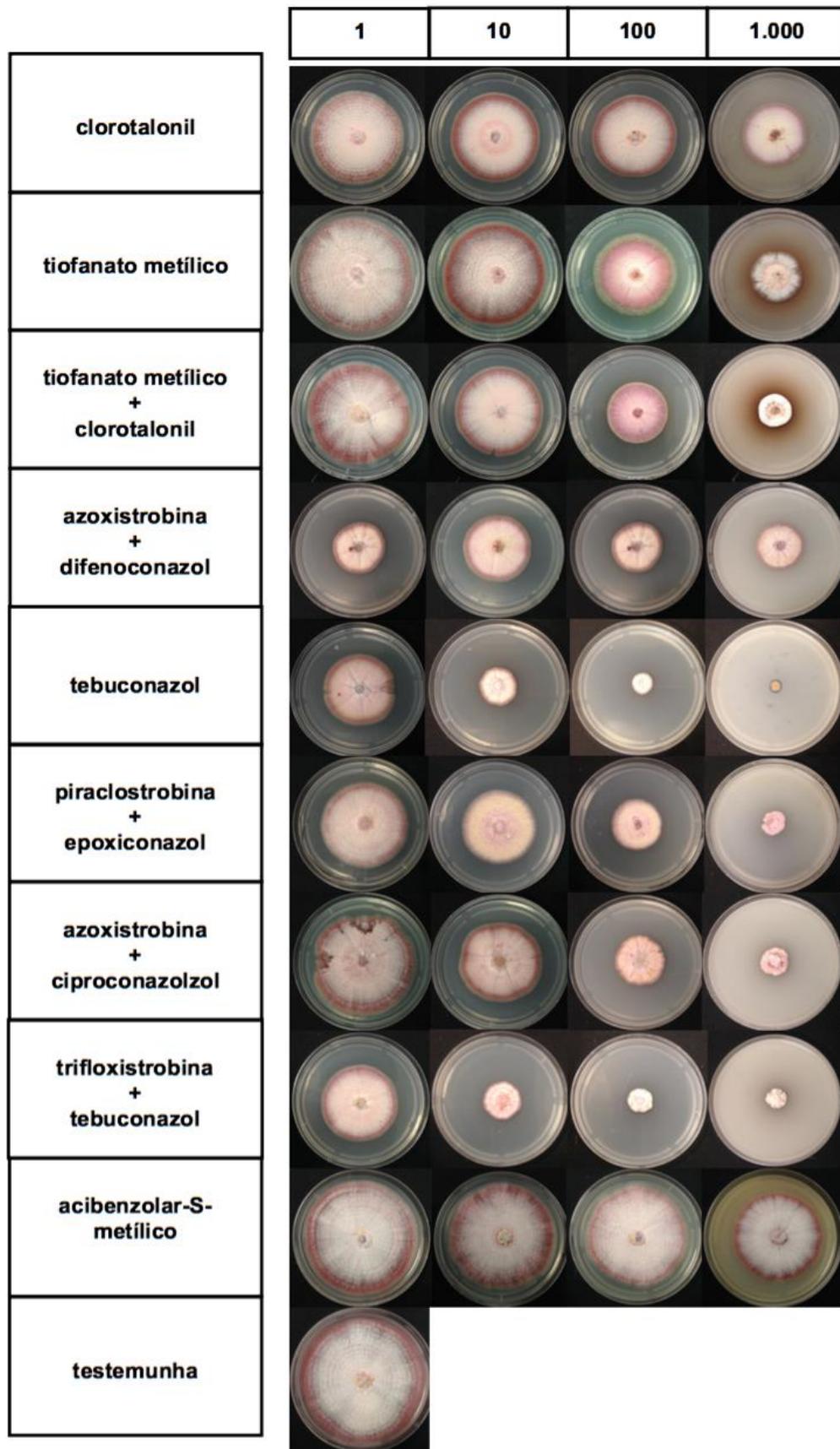


Figura 6 - Teste de controle químico “*in vitro*” de nove ingredientes ativos atuando sobre *Fusarium decemcellulare*, em quatro concentrações em ( $\mu\text{L L}^{-1}$ ), em meio de cultura BDA.



O ingrediente ativo ou princípio ativo de um produto é um agente químico, físico ou biológico com a finalidade de conferir eficácia aos agrotóxicos e afins (BRASIL, 2002). Segundo Gisi (1996), os produtos formulados em combinação de ingredientes ativos de diferentes modos de ação visam obter uma faixa mais ampla de atuação da atividade antifúngica para o controle de várias doenças que ocorrem simultaneamente em uma cultura, procuram obter interações aditivas e sinérgicas entre os fungicidas, que buscam aumentar a atividade protetora, diminuindo a concentração dos compostos, sem perder a ação e, retardam o processo de seleção para resistência de uma população patogênica para um componente da mistura.

Dessa maneira, a combinação de tiofanato metílico + clorotalonil poderia aumentar o espectro do controle da fusariose em seringueira, porém, os mesmos resultados foram encontrados comparados ao fungicida contendo apenas o ingrediente ativo tiofanato metílico, obtendo-se, portanto, baixa eficiência a *F. oxysporum* e ineficiência a *F. incarnatum* e *F. decemcellulare*. Dentre todos os produtos combinados testados, tiofanato metílico + clorotalonil apresentou o pior desempenho no controle da fusariose. Este resultado é preocupante, visto que este produto comercial é o único indicado para o controle da fusariose em seringueira no Brasil (BRASIL, 2003).

Resultados diferentes para a combinação tiofanato metílico + clorotalonil (TM + C) foram encontrados na literatura, até mesmo para a fusariose em seringueira. Segundo Dória (2012), os fungicidas a base de clorotalonil + tiofanato metílico e tebuconazol foram altamente eficientes no controle “*in vitro*” de *F. decemcellulare* em seringueira. Outros resultados promissores foram encontrados. O controle “*in vitro*” de *Colletotrichum lindemuthianum* em feijoeiro, foi superior utilizando-se a combinação TM + C comparado ao produto tiofanato metílico (SARTORATO, 2006). Em testes “*in vitro*”, o uso de TM + C controlou a germinação dos conídios e o crescimento micelial de *Myrothecium roridum*, agente causal da mancha-de-mirotécio em algodoeiro (SILVA et al., 2006).

Em condições de campo, pesquisadores observaram efeitos ainda superiores para a mistura TM + C no controle do crestamento gomoso do caule (*Didymella bryoniae*) da melancia, sendo que o efeito do tiofanato metílico isolado foi um dos piores dentre os nove fungicidas testados. Os autores destacaram, ainda, que essa mistura (TM + C) é importante devido aos relatos de resistência encontrada para o uso isolado de tiofanato metílico dentro desse patossistema (SANTOS; CAFÉ-

FILHO; SABOYA, 2005). Efeitos positivos da mistura TM + C foram encontrados para míldio do meloeiro na região de Fortaleza, podendo ser recomendado para o controle dessa doença (CARDOSO et al., 2001).

Com relação aos isolados, os três produtos (clorotalonil, tiofanato metílico, tiofanato metílico + clorotalonil) tiveram o mesmo comportamento. Para *F. oxysporum* e *F. decemcellulare*, mesmo alguns resultados não sendo expressivos, em geral, com o aumento das concentrações, a porcentagem de inibição do crescimento micelial também aumentava. O comportamento oposto ocorreu para *F. incarnatum*, em que a medida que aumentava a concentração dos produtos, a partir de 10 ppm, havia certo estímulo no crescimento da colônia e, portanto, a porcentagem de inibição diminuía.

Os resultados para azoxistrobina + difenoconazol para *F. oxysporum* foram os melhores, inibindo 91,7% e 90,3%, nas concentrações de 1.000 e 100  $\mu\text{L L}^{-1}$ , respectivamente. Resultados moderados foram encontrados para *F. incarnatum* e inferiores para *F. decemcellulare*, em todas as concentrações. Este fungicida mostrou-se altamente eficiente ao isolado de *F. oxysporum*, moderadamente eficiente ao isolado de *F. incarnatum*, porém, o isolado de *F. decemcellulare* foi insensível ao produto. Azoxistrobina + difenoconazol é um produto sistêmico registrado para diversas culturas, tem efeito preventivo, mas pode ser utilizado, também, para efeito curativo e anti-esporulante, sendo recomendado para doenças da parte aérea (BRASIL, 2003). Considerando o controle dos três agentes patogênicos responsáveis pela fusariose em seringueira, em geral, estes princípios ativos, mesmo que combinados, não se mostraram adequados. O efeito dessa combinação é válido para alguns relatos encontrados. Em ensaios, avaliando as atividades da azoxistrobina e difenoconazol no controle de *Alternaria alternata* em tabaco, apresentaram maior eficiência, tanto “*in vitro*” quanto “*in vivo*”, os produtos a base de azoxistrobina e azoxistrobina + difenoconazol, sendo recomendados para o manejo da doença (WANG et al., 2016). Outra pesquisa apontou que a combinação de ingredientes ativos de modos de ação diferentes, por exemplo, azoxistrobina (inibidor da respiração) + difenoconazol (inibidor da biossíntese de esterol), podem melhorar o desempenho no controle da ferrugem do gladiolo no México (VALENCIA-BOTÍN et al., 2013).

O fungicida a base do ingrediente ativo tebuconazol foi o único a inibir totalmente o crescimento dos isolados na concentração 1.000  $\mu\text{L L}^{-1}$ . O crescimento

de *F. incarnatum* também foi controlado a  $100 \mu\text{L L}^{-1}$  e *F. oxysporum* a 100 e a  $10 \mu\text{L L}^{-1}$ . A menor porcentagem foi encontrada para a concentração  $1 \mu\text{L L}^{-1}$  para *F. decemcellulare* com inibição de apenas 37,4% do crescimento micelial.

O princípio ativo tebuconazol pertence ao grupo dos triazóis sendo um produto sistêmico de ação preventiva e curativa, com bom desempenho contra diversos patógenos (ferrugens, helmintosporioses, septorioses, oídio, giberela e brusone) (KIMATI, 2011). Este i.a. é indicado para *Fusarium graminearum* em trigo (SPOLTI et al., 2014; SUN et al., 2014), *Puccinia porri* em alho (PRIA; ZAGONEL; FERNANDES, 2008), *Bipolaris oryzae* e *Monographella albescens* em arroz (CELMER et al., 2007), entre outras. Por outro lado, um estudo observou uma resistência de alguns isolados de *Lasiodiplodia theobromae*, doença que causa podridão em pós-colheita em mamoeiro, a fungicidas dos grupos MBC (metil benzimidazol carbamatos) e DMI (inibidores da desmetilação), incluindo o tebuconazol e, um dos motivos seria uma pressão de seleção para a resistência devido o uso intensivo desses fungicidas para o controle de outras doenças associadas à cultura (PEREIRA et al., 2011).

Neste estudo, o ingrediente ativo tebuconazol foi considerado altamente eficiente para *F. oxysporum* e *F. incarnatum* e moderadamente eficiente para *F. decemcellulare*, ou seja, a dose necessária para alcançar 50% de inibição do crescimento micelial fúngico foi  $< 1$  e entre  $1 - 10 \mu\text{L L}^{-1}$ , respectivamente. A espécie *F. decemcellulare* tem se espalhado rapidamente pelos seringais do centro-oeste paulista e uma pesquisa tem sugerido o uso de tebuconazol como forma de controlar o avanço do patógeno, permitindo a continuidade da exploração de látex da planta remediada (GLOBO RURAL ONLINE, 2013). Em testes “*in vitro*” anteriores utilizando-se quatorze fungicidas, este i.a. mostrou-se eficiente para o controle do crescimento micelial de *F. decemcellulare* em seringueira (DÓRIA, 2012). Neste experimento, os resultados indicaram um controle do crescimento micelial “*in vitro*” satisfatório para as três espécies de *Fusarium* estudadas.

Piraclostrobina + epoxiconazol inibiu o crescimento das colônias de *F. incarnatum* em 98,5%, *F. oxysporum* em 97,2% e *F. decemcellulare* em 85,7% a  $1.000 \mu\text{L L}^{-1}$ . O isolado de *F. oxysporum* teve 52,6% de inibição no crescimento na menor concentração ( $1 \mu\text{L L}^{-1}$ ), garantindo uma alta sensibilidade ao fungicida. Os resultados moderados de *F. incarnatum* sugerem uma moderada sensibilidade ao

produto e os valores inferiores encontrados para *F. decemcellulare* indicam uma insensibilidade do patógeno ao i.a. utilizado.

Os ingredientes ativos piraclostrobina + epoxiconazol (P + E) pertencem aos grupos das estrobilurinas e triazóis, sendo o primeiro recomendado para diversas doenças foliares como antracnoses, manchas de alternária, sarna, ferrugens e o segundo recomendado para o controle de ascomicetos, basidiomicetos e fungos mitospóricos em diversas culturas (KIMATI, 2011; RODRIGUES, 2006). Bons resultados para o controle de *Pyrenophora teres* em cevada, em condições de campo, foram conseguidos por esse produto combinado (STEPANOVIC et al., 2016). A podridão abacaxi da cana-de-açúcar (*Thievaliopsis paradoxa*) pode ser controlada por esse fungicida através de pulverizações em rebolos no sulco de plantio (CHAPOLA et al., 2014). Na China, devido o uso intensivo de carbendazim para o controle de *Fusarium asiaticum* e *Fusarium graminearum* em trigo, a aplicação da mistura P + E, ou isolados, mostraram-se como alternativas para o controle dessa fusariose (CHEN et al., 2012).

Os resultados obtidos para P + E divergiram entre as espécies estudadas nesse trabalho que, quando comparado aos demais fungicidas combinados, os resultados foram similares àqueles encontrados para a combinação azoxistrobina + difenoconazol. O fungicida P + E apresenta uma boa ação protetiva, inibindo a germinação dos esporos e penetração dos tubos germinativos, aliando-se a uma ação curativa e erradicante por conter princípio ativo sistêmico (BRASIL, 2003). Devido aos resultados moderados para as diferentes espécies de *Fusarium*, esse produto não apresentou um controle “*in vitro*” eficiente para uma das espécies.

O produto azoxistrobina + ciproconazol controlou totalmente o isolado *F. incarnatum*, a 1.000 e 100  $\mu\text{L L}^{-1}$  e apresentou valores moderados para as outras concentrações, o isolado *F. oxysporum* obteve valores menores comparados ao isolado anterior, porém ambos foram moderadamente sensíveis ao produto. A espécie *F. decemcellulare* teve as menores inibições do tratamento, sendo considerada de baixa sensibilidade ao fungicida.

O ingrediente ativo ciproconazol é recomendado para o controle da ferrugem do cafeeiro, aliando-se a azoxistrobina, o leque de atuação desse produto abre para outras doenças da parte aérea, sendo registrado para ferrugens, em culturas como o eucalipto, trigo, soja, cana-de-açúcar, oídios e manchas (BRASIL, 2003). Neste estudo, azoxistrobina + ciproconazol (A + C) mostraram-se moderadamente

eficientes para as espécies *F. oxysporum* e *F. incarnatum* e com baixa eficiência para *F. decemcellulare*. Resultados, em geral, moderados para o controle da fusariose, porém, não adequados para todas as espécies. Controle efetivo de doenças foliares podem ser observados pelo uso da combinação A + C, para a ferrugem asiática da soja (CARVALHO et al, 2013) e ferrugem e cercosporiose em cafeeiro (FERNANDES et al., 2013). Já para o controle de antracnose na soja, A + C reduziu a incidência da doença nas vagens, mas não proporcionou um controle eficiente da doença (DIAS; PINHEIRO; CAFÉ-FILHO, 2016).

As espécies *F. oxysporum* e *F. incarnatum* foram inibidas pelo fungicida a base de trifloxistrobina + tebuconazol, a 1.000 e 100  $\mu\text{L L}^{-1}$ . Bons resultados foram observados para *F. decemcellulare* nessas mesmas concentrações. A combinação trifloxistrobina + tebuconazol (T + T) é registrada para diversas doenças, sendo que o primeiro i.a. tem distribuição mesostêmica na parte aérea e ambos possuem amplo espectro de ação como em ferrugens, manchas foliares, antracnoses, podridões (KIMATI, 2011; BRASIL, 2003). Nos testes realizados para controle da fusariose em seringueira, T + T mostrou-se altamente eficiente para as espécies *F. oxysporum* e *F. incarnatum* e moderadamente eficiente para *F. decemcellulare*. Os mesmos resultados foram alcançados para o i.a. tebuconazol isolado, sem diferirem estatisticamente dentre as concentrações utilizadas, exceto em 1.000  $\mu\text{L L}^{-1}$  para *F. decemcellulare*, sendo o i.a. isolado superior. Portanto, trifloxistrobina + tebuconazol é outro fungicida de destaque para o controle da fusariose em seringueira.

Resultados promissores foram encontrados, também, para o controle da ferrugem da folha do trigo, sendo que a mistura T + T obteve valores superiores àqueles encontrados para os i.a. isolados (ASSUNÇÃO; TORRES, 2013). Outro trabalho, buscando encontrar fungicidas que pudessem controlar as principais doenças do feijoeiro (antracnose, ferrugem e mancha angular), preservando os fungos micorrízicos naturais da cultura, observaram que trifloxistrobina + tebuconazol foi um dos i.a. que menos impactaram à simbiose destes com a cultura (CAMPOS et al., 2015). Essa combinação pode ser recomendada para o controle da pinta preta (*Alternaria solani*) da batata sem afetar a produtividade e a qualidade dos tubérculos (TÖFOLI et al., 2016).

O produto comercial a base de acibenzolar-S-metílico é um ativador de resistência de plantas, sem ação direta contra agentes patogênicos. Por ativar os mecanismos de defesa natural da planta, a aplicação desse produto é recomendada

de modo preventivo, associado a fungicidas, a fim de garantir a cobertura que a planta necessita para defender-se de fitopatógenos (BRASIL, 2003). Os resultados encontrados neste trabalho permitiram concluir que não houve ação inibidora desse produto diretamente nas três espécies de *Fusarium* utilizadas (inibição variou entre 10 a 20% nas maiores concentrações), sendo esse produto considerado ineficiente aos isolados. O ativador de plantas, cujo princípio ativo é o acibenzolar-S-metílico (ASM), é mundialmente conhecido, sendo o único i.a. registrado no Brasil associando seu uso a fungicidas para o manejo integrado de doenças (BRASIL, 2003). Na literatura, é possível observar várias pesquisas utilizando o produto, de forma preventiva, para avaliar seu efeito sobre os patógenos.

Em experimentos de laboratório, o ASM reduziu a germinação de esporos do carvão da cana-de-açúcar, porém, em condições de campo, não controlou a doença (BHUIYAN et al., 2012). Experimentos em campo, utilizando métodos de controle alternativo para míldio em videira, indicaram que ASM não apresentou boa eficiência no controle da doença (PEREIRA et al., 2010). Em ano de safra alta do cafeeiro, ASM não controlou eficientemente a ferrugem e a cercosporiose na cultura, mas pode ser indicado para o controle dessas doenças em ano de safra baixa (FERNANDES et al., 2013). Quando aplicado juntamente com antibióticos, ASM fornece adição modesta de supressão da doença causada pela bactéria *Erwinia amylovora* em pêras e maçãs, podendo limitar seu uso em situações mais severas de incidência da doença (JOHNSON et al., 2016).

O uso de ASM no controle de doenças nem sempre apresenta efeitos negativos. O ASM apresentou-se efetivo no controle da murcha de *Fusarium* em alface e rúcula, em baixas dosagens, com efeitos positivos nos rendimentos (GILARDI et al., 2016). Outro efeito positivo foi demonstrado para a resistência do maracujazeiro ao *Passionfruit woodiness virus* (PWV) na Austrália, resultado muito interessante em se tratando de vírus, podendo ser incluído no programa de manejo de doença da cultura (PARKINSON et al., 2015). Efeitos nematocidas em *Meloidogyne incognita* foram apresentados pelo uso dos elicitores ASM e metil jasmonato (SCHOUTEDEN et al., 2016). Neste trabalho, para o controle “*in vitro*” dos três isolados de *Fusarium* em seringueira, não foi possível observar efeito inibitório significativo no crescimento micelial das colônias, uma razão seria porque o ativador de plantas ASM não possui ação direta contra os fitopatógenos, sendo responsável por ativar os mecanismos de defesa da planta, sistemicamente, para que, assim, possa se defender de um

possível ataque. Para observar os efeitos do ativador de plantas sobre *Fusarium* spp. em seringueira, seria interessante estudos “*in vivo*” a fim de verificar interações entre o produto e a resposta de defesa da planta, além de estudos visando interações desse elicitor com fungicidas eficazes.

Diferentemente dos três primeiros produtos testados, os demais apresentaram, em geral, porcentagem do crescimento micelial crescente dos isolados com relação ao aumento da concentração incorporada ao meio de cultura. Avaliando as concentrações utilizadas para cada isolado, os maiores valores significativos foram encontrados para os produtos a base de tebuconazol e trifloxistrobina + tebuconazol a 100, 10 e 1  $\mu\text{L L}^{-1}$  para os três isolados e a 1.000  $\mu\text{L L}^{-1}$  para *F. oxysporum* e *F. incarnatum* e, apenas tebuconazol a 1.000  $\mu\text{L L}^{-1}$  para *F. decemcellulare*. Na maior concentração, 1.000  $\mu\text{L L}^{-1}$ , a espécie *F. oxysporum* foi sensível a cinco produtos químicos, *F. incarnatum* a quatro e *F. decemcellulare* a um, sendo esta última espécie a mais restritiva de todas para almejar uma alternativa de controle eficiente para essa doença. Em campo, o fungicida tebuconazol tem sido utilizado para impedir o avanço da fusariose (GLOBO RURAL ONLINE, 2013). Devido aos progressos conseguidos em conter o patógeno nos seringais, utilizando-se o i.a. tebuconazol e aos resultados promissores obtidos nesse trabalho, pode-se concluir que os fungicidas a base de tebuconazol isolado ou combinado com trifloxistrobina foram os tratamentos mais eficientes no controle de *Fusarium oxysporum*, *F. incarnatum* e *F. decemcellulare* “*in vitro*”, agentes causais da fusariose em seringueira.

Vale enfatizar que todo o uso intensivo de um produto químico sobre uma determinada cultura, ao longo do tempo, torna-o vulnerável a pressão de seleção do patógeno para a resistência. Dessa maneira, o FRAC (Fungicide Resistance Action Committee) recomenda o uso alternado dos produtos ou misturas de fungicidas que sejam eficazes no controle, evitando o desenvolvimento de patógenos resistentes (EGÜEN; MELGAREJO; CAL, 2014).

## REFERÊNCIAS

ASSUNÇÃO; M.; TORRES, A.L.. Eficácia versus viabilidade econômica do controle químico e genético da ferrugem da folha em trigo. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 43, n. 7, 2013.

BRASIL. Decreto nº 4074, de 04 de janeiro de 2002. **Dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências.** Disponível em: <[http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/decreto/2002/d4074.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/2002/d4074.htm)>. Acesso em: 10 mar. 2017.

BRASIL. **Sistemas de Agrotóxicos Fitossanitários.** Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2003. Disponível em: <[http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons)>. Acesso em: 10 mar. 2017.

BHUIYAN, S.A. et al. Laboratory and field evaluation of fungicides for the management of sugarcane smut caused by *Sporisorium scitamineum* in seedcane. **Australasian Plant Pathology**, [s.l.], v. 41, n. 6, p.591-599, 13 abr. 2012.

BOLLEN, J.; FUCKS, A. On the specificity of the *in vitro* and *in vivo* antifungal activity of benomyl. **Netherlands Journal of Plant Pathology**, Wageningen, v. 76, p.299-313, 1970.

CAMPOS, A.A.B. et al. Seleção de fungicidas visando à preservação de fungos micorrízicos arbusculares nativos no cultivo do feijoeiro. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 19, n. 9, p.898-902, set. 2015.

CARDOSO, J.E. et al. **Eficiência de tiofanato metílico e clorotalonil no controle do míldio do meloeiro.** Comunicado Técnico n. 55. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, p. 1-3, jun. 2001.

CARVALHO, B.O. et al. Action of defense activator and foliar fungicide on the control of Asiatic rust and on yield and quality of soybean seeds. **Journal Of Seed Science**, Londrina, v. 35, n. 2, p.198-206, 2013.

CELMER, A. et al. Controle químico de doenças foliares na cultura do arroz irrigado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, n. 6, p.901-904, jun. 2007.

CHAGAS, H.A. **Controle de mofo-cinzento (*Amphobotrys ricini*) da mamoneira (*Ricinus communis* L.) por métodos químico, biológico e com óleos essenciais.** Botucatu, 2009. 67p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2009.

CHAGAS, H.A. et al. Avaliação de fungicidas, óleos essenciais e agentes biológicos no controle de *Amphobotrys ricini* em mamoneira (*Ricinus communis* L.). **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 40, n. 1, p.42-48, mar. 2014.

CHAPOLA, R.G. et al. Controle da podridão abacaxi da cana-de-açúcar por meio da pulverização de fungicidas em rebolos no sulco de plantio. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 44, n. 2, p.197-202, fev. 2014.

CHEN, F.; LIU, X.; SCHNABEL, G. Field strains of *Monilinia fructicola* resistant to both MBC and DMI fungicides isolated from stone fruit orchards in the eastern United States. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 97, p. 1063-1068, 2013.

CHEN, Y. et al. Integrated Use of Pyraclostrobin and Epoxiconazole for the Control of *Fusarium* Head Blight of Wheat in Anhui Province of China. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 96, n. 10, p.1495-1500, out. 2012.

DIAS, M.D.; PINHEIRO, V.F.; CAFÉ-FILHO, A.C.. Impact of anthracnose on the yield of soybean subjected to chemical control in the north region of Brazil. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 42, n. 1, p.18-23, mar. 2016.

DÓRIA, K.M.A.B.V.S. **Caracterização morfológica, cultural, molecular e enzimática de isolados de *Fusarium* spp. de seringueira**. 2012. 115f. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2012.

EDGINGTON, L.V.; KHEW, K.L.; BARRON, G.L. Fungitoxic spectrum of benzimidazoles compounds. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 61, p. 42-44, 1971.

EGÜEN, B.; MELGAREJO, P.; CAL, A. de. Sensitivity of *Monilinia fructicola* from Spanish peach orchards to thiophanate-methyl, iprodione, and cyproconazole: fitness analysis and competitiveness. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 141, n. 4, p.789-801, 21 dez. 2014.

ELLIOTT, M.; SHAMOUN, S.F.; SUMAMPONG, G. Effects of systemic and contact fungicides on life stages and symptom expression of *Phytophthora ramorum* *in vitro* and *in planta*. **Crop Protection**, Guildford, v. 67, p.136-144, jan. 2015.

FERNANDES, L.H.M. et al. Acibenzolar-S-metil no controle da ferrugem e da cercosporiose do cafeeiro em condições de campo. **Coffee Science**, Lavras, v. 8, n. 1, p. 24-32, 2013.

FERNÁNDEZ-ORTUÑO, D.; SCHNABEL, G.. First Report of Thiophanate-Methyl Resistance in *Botrytis cinerea* on Strawberry from South Carolina. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 96, n. 11, p.1700-1700, nov. 2012.

GILARDI, G. et al. Evaluation of the short term effect of nursery treatments with phosphite-based products, acibenzolar-S-methyl, pelleted *Brassica carinata* and biocontrol agents, against lettuce and cultivated rocket fusarium wilt under artificial inoculation and greenhouse conditions. **Crop Protection**, Guildford, v. 85, p.23-32, jul. 2016.

GISI, U. Synergistic interaction of fungicides in mixtures. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 86, n. 11, p. 1273-1279, 1996.

GLOBO RURAL ONLINE. **Pesquisadores descobrem fórmula que combate fungo na seringueira**. 2013. Disponível em: <  
<http://g1.globo.com/economia/agronegocios/noticia/2013/06/pesquisadores->

apontam-formula-que-combate-fungo-na-seringueira.html>. Acesso em: 10 abr. 2017.

HU, M.-J. et al.. Resistance in *Colletotrichum siamense* from peach and blueberry to thiophanate-methyl and azoxystrobin. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 99, p. 806-814, 2015.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção Agrícola Municipal**. 2017. Disponível em: <[http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/pam/2015/default\\_xls.shtm](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/pam/2015/default_xls.shtm)>. Acesso em: 10 mar. 2017.

JOHNSON, K.B. et al. Integration of acibenzolar-S-methyl with antibiotics for protection of pear and apple from fire blight caused by *Erwinia amylovora*. **Crop Protection**, Guildford, v. 88, p.149-154, out. 2016.

KATARIA, H.R.; GROVER, R.K. Comparison of fungicides for the control of *Rhizoctonia solani* causing damping-off of mung bean (*Phaseolus aureus*). **Annual Applied Biology**, [s.l.], v. 88, p.257-263, 1978.

KIMATI, H. Controle químico. In. AMORIM, L., REZENDE, J.A.M., BERGAMIN FILHO, A. **Manual de Fitopatologia: Princípios e Conceitos**. 4 ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2011, v. 1, p. 343-366.

KIMATI, H.; BERGAMIN FILHO, A.; AMORIM, L. Princípios gerais de controle. In. AMORIM, L., REZENDE, J.A.M., BERGAMIN FILHO, A. **Manual de Fitopatologia: Princípios e Conceitos**. 4 ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2011, v. 1, p. 307-324.

MARQUES, J.R.B. et al. Avaliação do sistema agroflorestal zonal entre seringueira e cacaueteiro na região sudeste do Estado da Bahia. In: V CONGRESSO BRASILEIRO DE SISTEMAS AGROFLORESTAIS, 2004, Curitiba. **Anais**. Curitiba: Embrapa Florestas, 2004, v. 98, p. 365-367.

MAY-DE-MIO, L.L.; LUO, Y.; MICHAILIDES, T.J.. Sensitivity of *Monilinia fructicola* from Brazil to tebuconazole, azoxystrobin, and thio-phanate-methyl and implications for disease management. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 95, p. 821-827, 2011.

MENTEN, J.OM. et al. Efeito de alguns fungicidas no crescimento micelial de *Macrophomina phaseolina* (Tass.) Goid. "in vitro". **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 1, n. 2, p. 57-66, 1976.

PARKINSON, L.E. et al. Efficacy of acibenzolar-S-methyl (Bion®) treatment of Australian commercial passionfruit, *Passiflora edulis* f. sp. *flavicarpa*, on resistance to *Passionfruit woodiness virus* (PWV) and activities of chitinase &  $\beta$ -1,3-glucanase. **Australasian Plant Pathology**, [s.l.], v. 44, n. 3, p.311-318, 23 abr. 2015.

PETKAR, A. et al. Sensitivity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* to Prothioconazole and Thiophanate-Methyl and Gene Mutation Conferring Resistance to Thiophanate-Methyl. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 101, n. 2, p.366-371, fev. 2017.

PEREIRA, A.V.S. et al. Sensitivity of *Lasiodiplodia theobromae* from Brazilian papaya orchards to MBC and DMI fungicides. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 132, n. 4, p.489-498, 22 nov. 2011.

PEREIRA, V.F. et al. Produtos alternativos na proteção da videira contra o míldio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 45, n. 1, p. 25-31, 2010.

PRIA, M.D.; ZAGONEL, J.; FERNANDES, E.C. Controle de ferrugem na cultura do alho com uma nova mistura de fungicidas. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 26, n. 2, p.268-270, jun. 2008.

RODRIGUES, M.A.T. **Classificação de fungicidas de acordo com o mecanismo de ação proposto pelo FRAC**. Botucatu, 2006. 249f. Dissertação (Mestrado em Agronomia / Proteção de Plantas) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2006.

SANTOS, G.R.; CAFÉ-FILHO, A.C.; SABOYA, L.M.F. Controle químico do crestamento gomoso do caule na cultura da melancia. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, p. 155-163, 2005.

SARTORATO, A. Sensibilidade “*in vitro*” de isolados de *Colletotrichum lindemuthianum* a fungicidas. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 36, n. 3, p. 211-213, 2006.

SCHOUTEDEN, N. et al. Direct nematicidal effects of methyl jasmonate and acibenzolar-S-methyl against *Meloidogyne incognita*. **Natural Product Research**, Abingdon, v. 31, n. 10, p.1219-1222, 23 set. 2016.

SILVA, J.C. et al. Fungitoxicidade de grupos químicos sobre *Myrothecium roridum* *in vitro* e sobre a mancha-de-mirotécio em algodoeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 5, p.755-761, maio. 2006.

SPOLTI, P. et al. Triazole sensitivity in a contemporary population of *Fusarium graminearum* from New York wheat and competitiveness of a tebuconazole-resistant isolate. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 98, n. 5, p.607-613, maio 2014.

STEPANOVIC, M. et al. Field efficacy of different fungicide mixtures in control of net blotch on barley. **Pesticidi I Fitomedicina**, Belgrade, v. 31, n. 1-2, p.51-57, 2016.

SUN, H.Y. et al. Evaluation of tebuconazole for the management of *Fusarium* head blight in China. **Australasian Plant Pathology**, [s.l.], v. 43, n. 6, p.631-638, 14 ago. 2014.

TAVARES, G.M.; SOUZA, P.E. de. Efeito de fungicidas no controle *in vitro* de *Colletotrichum gloeosporioides*, agente etiológico da antracnose do mamoeiro (*Carica papaya* L.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 29, n. 1, p. 52-59, jan./fev. 2005.

TÖFOLI, J.G. et al. Controle da requeima e pinta preta da batata por fungicidas e seu reflexo sobre a produtividade e a qualidade de tubérculos. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 83, p.1-1, 2016.

VALENCIA-BOTÍN, A.J. et al. Fungicides used alone, in combinations, and in rotations for managing gladiolus rust in Mexico. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 97, p. 1491-1496, 2013.

VAWDREY, L.I.; MALE, M.; GRICE, K.R.E.. Field and laboratory evaluation of fungicides for the control of *Phytophthora* fruit rot of papaya in far north Queensland, Australia. **Crop Protection**, Guildford, v. 67, p.116-120, jan. 2015.

WANG, H. et al. Activities of azoxystrobin and difenoconazole against *Alternaria alternata* and their control efficacy. **Crop Protection**, Guildford, v. 90, p.54-58, dez. 2016.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

A pesquisa visou identificar agentes patogênicos responsáveis por causar a fusariose em seringueira no maior estado produtor dessa cultura, bem como, realizar estudos introdutórios sobre resistência clonal de materiais de seringueira utilizados comercialmente à fusariose e analisar diferentes princípios ativos através do controle químico “*in vitro*” dos agentes causais.

De acordo com os caracteres morfológicos, culturais, moleculares e patogenicidade foram identificadas três espécies de *Fusarium* ocorrendo em seringueira no estado de São Paulo: *Fusarium oxysporum*, *Fusarium incarnatum* e *Fusarium decemcellulare*, sendo que as espécies *F. oxysporum* e *F. incarnatum* ainda não foram relatadas em seringais no Brasil.

A fusariose é uma doença que ocorre em campo, sendo possível encontra-la em plantas adultas com mais de dez anos de sangria. Estudos voltados para a resistência de materiais genéticos tornam-se necessários a fim de proporcionar soluções para o estabelecimento da cultura. Nosso trabalho buscou testar alguns materiais clonais que estão disponíveis no mercado para os heveicultores quanto a resistência a três espécies de *Fusarium*, contudo, o teste de resistência clonal foi realizado em plantas jovens de seringueira (mudas com um ou dois lançamentos foliares). Diante dos resultados encontrados, destacam-se a resistência dos clones IRCA 111 e IAC 511 às espécies *F. oxysporum* e *F. incarnatum*, respectivamente. Com relação à espécie *F. decemcellulare*, IRCA 111 apresentou os menores valores de lesões, porém, não foram observadas diferenças estatísticas entre os clones para esse patógeno. Estes resultados incipientes são interessantes e necessitam ser mais detalhados, abrangendo outros materiais clonais para uma conclusão mais completa e precisa.

Uma das estratégias de manejo para o controle de pragas e doenças em campo é a utilização de produtos fitossanitários. Nosso trabalho visou testar diferentes princípios ativos capazes de controlar “*in vitro*” o crescimento micelial das três espécies de *Fusarium* encontradas em seringueira, trazendo algumas possibilidades para testes posteriores em campo. Os ingredientes ativos que proporcionaram um controle mais eficaz dos três agentes causais foram tebuconazol e trifloxistrobina + tebuconazol.



## REFERÊNCIAS

- AGRIANUAL. **Anuário da Agricultura Brasileira**. São Paulo: FNP – Informa Economics, 2015. 504 p.
- BETELONI, F.G. et al. *Fusarium moniliforme*, novo patógeno no painel da seringueira, no estado de São Paulo. In: XXXII CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA, 2009, São Pedro. **Anais do XXXII Congresso Paulista de Fitopatologia**. São Pedro: Summa Phytopathologica, 2009. v. 35, p. 35 - 35.
- CAMPELO JÚNIOR, J.H. Estimativa da transpiração em seringueira. **Revista Brasileira de Agrometeorologia**, Santa Maria, v. 8, n. 1, p. 35-42, 2000.
- CORDEIRO, I.; SECCO, R. **Hevea in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB22703>>. Acesso em: 14 dez. 2015.
- DÓRIA, K.M.A.B.V.S. **Caracterização morfológica, cultural, molecular e enzimática de isolados de *Fusarium spp.* de seringueira**. 2012. 115f. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2012.
- DUCKE, A. **Revisão do gênero *Hevea*, principalmente as espécies brasileiras**. Manaus, Departamento de Publicações do Estado do Amazonas, 1941. 42p. Cedido pelo: Governo do Estado do Amazonas. Secretaria de Estado de Cultura. Gerência de Acervos Digitais.
- DUCKE, A.; BLACK, G.A. Nota sobre a fitogeografia da Amazônia brasileira. Belém: Instituto Agrônômico do Norte. **Boletim Técnico do Instituto Agrônômico do Norte**, Belém, v. 29, 62 p., 1954.
- FRANCISCO, V.L.F.S.; BUENO, C.R.F.; BAPTISTELLA, C.S.L. A Cultura da Seringueira no Estado de São Paulo. São Paulo. **Informações Econômicas**, São Paulo, v. 34, n. 9, 2004.
- FURTADO, E.L.; TRINDADE, D.R. Doenças da Seringueira. In: KIMATI, H. et al. **Manual de Fitopatologia: Doenças das Plantas Cultivadas**. 4 ed. São Paulo: Agrônômica Ceres, 2005, v. 2, p. 559-567.
- FURTADO, E.L. et al. *Fusarium solani*, novo patógeno causando mofo cinzento em painel de seringueira, no Estado de São Paulo. In: XXXIV CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 2001, São Pedro. **Anais do XXXIV Congresso Brasileiro de Fitopatologia**. São Pedro: Fitopatologia Brasileira, 2001, v. 26, p. 439-439.
- GASPAROTTO, L.; PEREIRA, J.C.R. **Doenças da Seringueira no Brasil**. 2. ed. Brasília-DF: Embrapa, 2012, 255p.

GASPAROTTO, L.; PEREIRA, J.C.R.; FURTADO, E.L. Doenças das raízes. In: GASPAROTTO, L.; PEREIRA, J.C.R. **Doenças da Seringueira no Brasil**. 2. ed. Brasília-DF: Embrapa, 2012, p. 217-226.

GASPAROTTO, L. et al. Doenças das folhas. In: GASPAROTTO, L.; PEREIRA, J.C.R. **Doenças da Seringueira no Brasil**. 2. ed. Brasília-DF: Embrapa, 2012a, p. 35-176.

GASPAROTTO, L. et al. Doenças do caule. In: GASPAROTTO, L.; PEREIRA, J.C.R. **Doenças da Seringueira no Brasil**. 2. ed. Brasília-DF: Embrapa, 2012b, p. 177-215.

GLOBO RURAL ONLINE. **Pesquisadores descobrem fórmula que combate fungo na seringueira**. 2013. Disponível em: <<http://g1.globo.com/economia/agronegocios/noticia/2013/06/pesquisadores-apontam-formula-que-combate-fungo-na-seringueira.html>>. Acesso em: 10 abr. 2016.

GOMES, J.J. **Estudo anatômico do xilema secundário das espécies de *Hevea* da Amazônia brasileira**. 1981. 205p. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1981.

GONÇALVES, P.S. **Sub-produtos complementares da renda de um seringal**. 2002. Artigos APABOR Associação Paulista de Produtores e Beneficiadores de Borracha (Apabor). Disponível em: <<http://www.apabor.org.br>>. Acesso em: 14 dez. 2015.

GONÇALVES, P.S.; CARDOSO, M.; ORTOLANI, A.A. Origem, variabilidade e domesticação da *Hevea*: uma revisão. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 25, n. 2, p. 135-156, 1990.

GONÇALVES, P.S. et al. Desempenho de clones de seringueira da série IAC 300 na região do planalto de São Paulo, **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, n. 2, p. 131-138, fev. 2002.

HUANG, G.X. et al. First report of rubber tree gummosis disease caused by *Fusarium solani* in China. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 100, n. 8, p. 1788-1788, ago. 2016.

IAC. Instituto Agronômico de Campinas. **Centro de Seringueira e Sistemas Agroflorestais**. 2013. Disponível em: <<http://www.iac.sp.gov.br/areasdepesquisa/seringueira/>>. Acesso em: 14 dez. 2015.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção Agrícola Municipal**. 2017. Disponível em: <[http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/pam/2015/default\\_xls.shtm](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/pam/2015/default_xls.shtm)>. Acesso em: 10 mar. 2017.

IRSG. INTERNATIONAL RUBBER STUDY GROUP. **Quarterly Statistics**. 2017. Disponível em:

[http://www.rubberstudy.com/documents/WebSiteData\\_Feb2017New.pdf](http://www.rubberstudy.com/documents/WebSiteData_Feb2017New.pdf). Acesso em: 10 mar. 2017.

JIANG, G. et al. Isolation and identification of fungus causing collar rot disease of rubber tree. **Agricultural Science & Technology**, [s.l.], v. 16, n. 3, p. 529-529, 2015.

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

LI, B.X. et al. First report of rubber tree stem rot caused by *Fusarium oxysporum* in China. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 98, n. 7, p. 1008-1008, 2014.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras: Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil**. 6 ed. São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2014, v. 1, 384 p.

PLOETZ, R.C. *Fusarium* Wilt of Banana. **Phytopathology Review**, [s.l.], v. 105, n. 12, p. 1512-1521, 2015.

REZENDE, J.A.M. et al. Conceito de doença, sintomatologia e diagnose. In. AMORIM, L., REZENDE, J.A.M., BERGAMIN FILHO, A. **Manual de Fitopatologia: Princípios e Conceitos**. 4 ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2011, v. 1, p. 37-58.

USDA. United States Department of Agriculture. **Fungal Database**. Disponível em: <<https://nt.ars-grin.gov/fungal/databases/fungushost/fungushost.cfm>>. Acesso em: 10 mar. 2017.

WILCKEN, S.R.S. et al. Nematoides fitoparasitas em seringais no Estado de São Paulo. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 41, n. 1, p. 54-57, 2015.