



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Câmpus de São José do Rio Preto

Renato Tadeu Guerreiro

Tolerância do fitopatôgeno *Fusarium oxysporum* e *Fusarium solani*
aos fungicidas na cultura do *Eucalyptus grandis*

São José do Rio Preto
2018

Renato Tadeu Guerreiro

Tolerância do fitopatôgeno *Fusarium oxysporum* e *Fusarium solani* aos fungicidas na cultura do *Eucalyptus grandis*

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus São José do Rio Preto.

Orientadora: Prof.^a. Dr.^a. Eleni Gomes
Coorientador: Prof. Dr. Ronaldo da Silva Viana

São José do Rio Preto
2018

Catálogo na Publicação(CIP)
Serviço de Biblioteca e Documentação – FMVA/UNESP

Guerreiro, Renato Tadeu

G934t

Tolerância do fitopatôgeno *Fusarium oxysporum* e *Fusarium solani* aos fungicidas na cultura do *Eucalyptus grandis* / Renato Tadeu Guerreiro.

São José do Rio Preto : [s.n], 2018.
129 f. il.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, 2018

Orientador: Prof. Dra. Eleni Gomes

Coorientador: Prof. Dr. Ronaldo da Silva Viana

1. *Bacillus*. 2. Fitopatógenos. 3. Fungicida. 4. Germinação. I. T.

CDD 583.733

Renato Tadeu Guerreiro

Tolerância do fitopatôgeno *Fusarium oxysporum* e *Fusarium solani* aos fungicidas na cultura do *Eucalyptus grandis*

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus São José do Rio Preto.

Comissão Examinadora

Prof.^a Dr^a. Eleni Gomes
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto
Orientadora

Prof.^a Dr^a. Ana Lucia Ferrarezi Duarte
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto

Prof.^o Dr Marcos Eustáquio de Sá, Título
UNESP – Câmpus de Ilha Solteira

Prof.^a Dr^a. Mayra Kassawara Martins
UNIP – Câmpus de Araçatuba

Prof.^a Dr^a. Valéria Garcia Pereira
FATEC- Câmpus de Araçatuba

São José do Rio Preto
15 de março de 2018

*Dedico este trabalho a minha mãe,
ao meu companheiro, demais familiares e
amigos que sempre me apoiaram e
contribuíram para realização desta
etapa. Obrigado a todos!*

AGRADECIMENTOS

A Deus, a fé que me move, por encher minha vida de bênçãos, iluminar meu caminho e nunca deixar faltar força e coragem.

Aos meus orientadores Prof.^a Dra. Eleni Gomes e Prof. Dr. Ronaldo da Silva Viana, a confiança e a paciência, por todos os ensinamentos e a amizade construída.

A Fábio Henrique Mazocato, por me apoiar, pelo incentivo, paciência e o esforço na realização dos meus projetos.

A Prof.^a. Dra. Deuvânia Carvalho. Silva pela incrível ajuda e disposição em ajudar e contribuir para a conclusão de importantes etapas desta pesquisa.

Aos professores Dr. Giuliano Pierre Estevam, e a Dr.^a Daniela Russo Leite que permitiram meu afastamento parcial das aulas da Fatec Araçatuba para o meu crescimento pessoal e profissional, a Sandra Marcia Faria Rillo pela paciência enorme de realizar todo o processo.

A professora Dr.^a Valéria Garcia Pereira a professora Ana Maria Panho do Nascimento e o mestre Hildo Costa de Sena pela convivência, os conselhos e a colaboração. A incrível Taíse de Souza Romualdo que sempre colaborou e apoio em tudo que eu precisava para o desenvolver do experimento acreditando e me apoiando

A EMBRAPA MEIO AMBIENTE (Jaguariúna/SP) que concedeu cepas de *Fusarium oxysporum* da sua coleção de microrganismos de importância agrícola e ambiental (CMAA) e ao INSTITUTO OSVALDO CRUZ (Rio de Janeiro/RJ) que gentilmente

também concedeu cepas da sua Coleção de Culturas de Fungos Filamentosos (CCFF) de *Fusarium oxysporum* Schlecht. var. *oxysporum* Gerlach Et Nirenberg.

A Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Campus de São José do Rio Preto, e ao Departamento de Biologia pela oportunidade de realização do doutorado.

A Fatec Araçatuba, pela infraestrutura disponibilizada.

A todos os amigos e familiares que tornaram meus dias mais felizes e contribuíram para o meu crescimento pessoal, principalmente aos meus sobrinhos Guilherme Guerreiro de Souza, que colaborou muito nas buscas e entregas de materiais acadêmicos e moradia e a Michelle Guerreiro Bordin por tomar conta das minhas meninas nas minhas viagens.

Aos membros da banca de defesa por terem aceitado o convite, pela leitura e discussão crítica que colaboram com o meu crescimento profissional e aperfeiçoamento do trabalho.

Muito obrigado!

RESUMO

A presença de fungos fitopatógenos nas culturas têm ocasionado sérios problemas fitossanitários, com o objetivo de avaliar o efeito de *Fusarium oxysporum* e *Fusarium solani* na taxa de germinação e desenvolvimento de *Eucalyptus grandis* e a ação do tratamento químico com fungicidas comerciais no controle da incidência dos mesmos, que foram tratadas com os seguintes fungicidas nas respectivas doses de i.a./ 100 kg de sementes: Azoxystrobina + Difenconazol (45,0 mL), Captana (150,0 g), Carbendazim (500,0 g), Clorotalonil + Tiofanato metílico (500,0 mL), Fludioxonil (5,0 mL), Iprodiona (500 mL), Tebuconazole (5,0 mL), Thiabendazole (30,0 mL), Tiofanato metílico (75,0 mL) e Tolyfluanida (75,0 g). Nenhuma planta infectada sobreviveu por mais de 3 meses com a infecção. A altura das plântulas foi significativa com a infecção em relação ao controle, mas não diferem entre os patógenos. O fungicida Tebuconazole não afetou a presença de *Bacillus* no substrato fato que não ocorre com os outros testados. O fungicida triticonazole reduziu significativamente a incidência de *F. oxysporum* e *F. solani* nas sementes tratadas. O fungicida Iprodiona foi inferior aos demais fungicidas comportando-se de maneira negativa ao controle dos patógenos e as taxas de germinação. Houve influência dos fungicidas na germinação das sementes em relação ao controle. Na estufa agrícola a emergência e velocidade de emergência de plântulas, também não foram afetadas. A presença dos patógenos no substrato testado não foi detectada após 180 dias de tratamento. Os fungicidas fludioxinol, Thiabendazole, Tiofanato metílico e triticonazole controlaram os patógenos nos primeiros dias de tratamento, sem reincidências. Algumas doenças acometeram as mudas saudáveis tratadas no decorrer do desenvolvimento.

Palavras chaves: Fitopatógenos, *Bacillus*, fungicida, germinação

ABSTRACT

The presence of phytopathogenic fungi in crops has caused serious phytosanitary problems, in order to evaluate the effect of Fusarium oxysporum and Fusarium solani on the germination rate and development of Eucalyptus grandis and the chemical treatment with commercial fungicides in the control of the same, were treated with the following fungicides in the respective doses of 100 Kg of seeds: : Azoxistrobina + Difenconazol (45,0 mL), Captana (150,0 g), Carbendazim (500,0 g), Clorotalonil + Tiofanato metílico (500,0 mL), Fludioxonil (5,0 mL), Iprodiona (500 mL) , Tebuconazole (5,0 mL), Thiabendazole (30,0 mL), Tiofanato metílico (75,0 mL) and Tolyfluanida (75,0 g) No infected plant has survived for more than 3 months with the infection. The height of the seedlings was significant with the infection related to the control, but did not differ among the pathogens. The presence of Bacillus in the substrate was not affected by the Tebuconazole fact that does not occur with the others tested. The fungicide triticonazole significantly reduced the incidence of F. oxysporum and F. solani in the treated seeds. The fungicide Iprodiona was inferior to the other fungicides behaving in a negative way to control the pathogens and the germination rates. There was influence of the fungicides on the germination of the seeds related to the control. In the greenhouse the emergence and emergence speed of seedlings were also not affected. The presence of the pathogens in the substrate tested was not detected after 180 days of treatment, the fungicides Fludioxonil, Thiabendazole, methyl thiophanate and triticonazole controlled the pathogens in the first days of treatment, without relapses. Some diseases affected the healthy seedlings treated during the development.

Key words: Phytopathogens, Bacillus, fungicide, germination

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Formas de macroconídios.....	35
Figura 2. Formas dos microconídios.....	36
Figura 3. Cepas de <i>Fusarium oxysporum</i> (IOC 4065) e <i>Fusarium solani</i> (IOC 3900)	54
Figura 4. Inoculações de <i>Fusarium oxysporum</i> em folhas de <i>Eucalyptus</i> “in vitro”	55
Figura 5. Inoculações de <i>Fusarium solani</i> em folhas de <i>Eucalyptus</i> “in vitro”	56
Figura 6. Morte de plântulas Infectado com cepas <i>F. solani</i> com 10 dias de plantio.....	58
Figura 7. Inoculações de <i>Fusarium oxysporum</i> em folhas de <i>Eucalyptus</i> “in vitro” com 7 dias.....	72
Figura 8. Inoculações de <i>Fusarium solani</i> em folhas de <i>Eucalyptus</i> “in vitro” com 7 dias	73
Figura 9. Inoculações de <i>Fusarium oxysporum</i> em folhas de <i>Eucalyptus</i> “in vitro” com 14 dias.....	74
Figura 10. Mudanças de <i>E. grandis</i> saudáveis com 10 dias de emergência	74
Figura 11. Mudanças de <i>E. grandis</i> infectada pelo <i>Fusarium solani</i> com 30 dias após contágio.....	75
Figura 12. Mudanças de <i>E. grandis</i> com sintomas do ataque pelo <i>Fusarium oxysporum</i> com 60 dias após contágio.....	77
Figura 13. Mudanças de <i>E. grandis</i> infectada pelo <i>Fusarium solani</i> após 90 dias do contágio.....	78
Figura 14. Mudanças de <i>E. grandis</i> infectada pelo <i>Fusarium oxysporum</i> após 180 dias do contágio.....	79

Figura 15. <i>E. grandis</i> , com 30 dias após plantio.....	81
Figura 16. Não emergência de sementes Infectadas com cepas <i>F. oxysporum</i> com 10 dias de plantio	81
Figura 17. Necrose da base da planta e das folhas decorrente a infecção de cepas <i>F. solani</i> aos 90 dias do experimento.....	83
Figura 18. Colonias de <i>Bacillus</i> extridas do tratamento com fungicida Tebuconazole aos 90 dias	92
Figura 19. Análise da presença ou ausência de <i>Bacillus</i> sp. e <i>Fusarium</i> sp. por meio da técnica molecular de PCR <i>nested</i> , em amostras de solo para o preparo do cultivo de Eucalipto.....	94
Figura 20. Resultado da análise molecular por meio de PCR <i>nested</i> para detecção de <i>Fusarium solani</i> e <i>Fusarium oxysporum</i> após 10 dias, em amostras de solo tratadas com fungicidas.....	96
Figura 21. Resultado da análise molecular por meio de PCR <i>nested</i> para detecção de <i>Fusarium solani</i> e <i>Fusarium oxysporum</i> após 30 dias, em amostras de solo tratadas com fungicidas.....	98
Figura 22. Resultado da análise molecular por meio de PCR <i>nested</i> para detecção de <i>Fusarium solani</i> e <i>Fusarium oxysporum</i> após 90 dias, em amostras de solo tratadas com fungicidas.....	100
Figura 23. Resultado da análise molecular por meio de PCR <i>nested</i> para detecção de <i>Fusarium solani</i> e <i>Fusarium oxysporum</i> após 180 dias, em amostras de solo tratado com fungicidas.....	102

Figura 24. Resultado da análise molecular por meio de PCR nested para detecção de <i>Fusarium solani</i> e <i>Fusarium oxysporum</i> após 360 dias, em amostras de solo tratadas com fungicidas.....	104
Figura 25. Muda de <i>Eucalyptus grandis</i> com cerca de 180 dias, infectadas por <i>F. oxysporum</i> tratadas com fungicidas do grupo químico Benzimidazol de com manchas foliares.....	111
Figura 26. Muda de <i>Eucalyptus grandis</i> com cerca de 180 dias, infectadas por <i>F. solani</i> e tratadas com fungicidas do grupo químico Benzimidazol de com manchas foliares.....	112
Figura 27. Muda de <i>Eucalyptus grandis</i> com cerca de 180 dias, infectadas por <i>F. solani</i> e tratadas com fungicidas do grupo químico Triazol com manchas foliares	113
Figura 28. Muda de <i>Eucalyptus grandis</i> com cerca de 180 dias, infectadas por <i>F. solani</i> e tratadas com fungicidas do grupo químico Triazol com manchas foliares	113
Figura 29. Folha de Eucalipto necrosada.....	114

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Espécies de <i>Fusarium</i> e teleomórficos relatadas no Brasil e seus hospedeiros	37
Quadro 2. Fungicidas utilizados nos bioensaios do controle <i>in vitro</i> de <i>Fusarium</i> spp.....	40
Quadro 3. Fungicidas utilizados nos bioensaios do controle <i>in vitro</i> de <i>Fusarium</i>	71
Quadro 4. Número de plântulas do <i>E. grandis</i> com 30 dias e 90 dias.....	82
Quadro 5. Alturas médias do <i>E. grandis</i> , em cm das mudas com 30 dias e 90 dias após plantio.....	87
Quadro 6. Amostras de solo tratados com fungicidas para o controle de <i>Fusarium</i> , a marca x indica a presença do patógeno decorrente da análise do DNA da amostra.....	88
Quadro 7. Análise da presença do gênero <i>Bacillus</i> e, amostras de solo tratados com fungicidas comerciais por um período de 10, 30, 90, 180 e 360 dias.....	90
Quadro 8. Relação dos tratamentos com fungicidas comerciais na análise molecular por meio de PCR nested um período de 10 dias.....	95
Quadro 9. Relação dos tratamentos com fungicidas comerciais na análise molecular por meio de PCR nested um período de 30 dias.....	97
Quadro 10. Relação dos tratamentos com fungicidas comerciais na análise molecular por meio de PCR nested um período de 90 dias.....	99
Quadro 11. Relação dos tratamentos com fungicidas comerciais na análise molecular por meio de PCR nested um período de 180 dias.....	101

Quadro 12. Relação dos tratamentos com fungicidas comerciais na análise molecular por meio de PCR nested um período de 360 dias.....103

Quadro 13. Fungicidas utilizados nos bioensaios do controle *in vitro* de *Fusarium*105

LISTA DE GRAFICO

Gráfico 1. Altura média das plântulas de eucalipto sem fungicidas (controle) e com fungicidas no controle de patógenos (*F. oxysporum* e *F.solani*) segundo a semana mensurada e seu respectivo erro padrão da média.....85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Os meios de culturas utilizados na identificação de *Fusarium oxysporum* e *Fusarium solani* e suas características.....42

Tabela 2. Altura média das plântulas de eucalipto sem fungicidas (Controle) e com fungicidas no controle de patógenos (*F. oxysporum* e *F.solani*) em diferentes semanas e seu respectivo desvio padrão e o coeficiente de variação.....86

Tabela 3. Porcentagem de fungos e de germinação de sementes de *E. grandis* infectadas com *F. oxysporum* e *F. solani*, tratadas ou não com fungicidas.....108

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA = ágar-água

ADE = água destilada estéril

AN = ágar nutritivo

AS = solo-ágar

ASF = ágar seletivo de *Fusarium*

BDA = meio batata-dextrose-ágar

CLA = carnation-leaf-ágar

DBO = (demanda bioquímica de oxigênio) ou BOD (biochemical oxygen demand)

DCPA = dicloran cloronfenicol peptona ágar

EC = concentrado emulsionável

EMBRAPA = Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

FCA = folha de cravo-ágar

FDA = food and drug administration

MA = metodo de Komada

NSA = nutriente sintético ágar

PCR = polymerase chain reaction (reação de polimerização em cadeia)

PPA = peptona ágar

SC = suspensão concentrada

TWEEN 20 = polyoxyethylene sorbitan monolaurate (monolaurato de polioxietileno sorbitano)

UV = ultravioleta

VMA = verde malaquita ágar

V8-A = V8-ágar

WP = pó molhável

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – REFERENCIAL TEÓRICO

1 INTRODUÇÃO.....	20
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	23
2.1 Aspectos gerais do Eucalipto.....	23
2.2 Doenças da cultura.....	25
2.2.1 Tombamento de mudas.....	26
2.2.2 A podridão da raiz	26
2.2.3 Mofo cinzento.....	27
2.2.4 Podridão de Estacas.....	27
2.2.5 Esporotricose	28
2.2.6 Odio.....	28
2.2.7 Enfermidade rosada ou rubelose.....	29
2.2.8 Cancro	29
2.2.9 Ferrugem.....	30
2.2.10 Manchas foliares de <i>Cylindrocladium</i>	30
2.2.11 Podridação do cerne.....	31
2.2.12 Doenças foliculares secundárias.....	32
3. O Gênero <i>Fusarium</i>	33
4. SUBSTRATO SUPRESSIVO.....	44
4.1 Mecanismos de supressividade.....	46
4.2 Mecanismos bióticos envolvidos na supressão de fitopatógenos.....	46
4.3 Organismos do substrato envolvidos na supressão de fitopatógenos.....	47

4.4 Fungos.....	47
4.5. Mecanismos abióticos atuantes na supressão de fitopatógenos.....	48
4.6 Formação de supressividade em solo.....	50
4.7 Técnica da solarização	51
5 OBJETIVOS.....	53
5.1 Objetivo geral.....	53
5.2 Objetivos específicos.....	53
6 MATERIAL E MÉTODOS.....	53
6.1 Locais do experimento.....	53
6.2 Inoculações em folhas de <i>Eucalyptus</i> “in vitro”	56
6.3 Obtenção de isolados de <i>Fusarium</i>	58
6.4 Análises Realizadas nas Plantas e nos Substratos	60
6.5 Obtenção de culturas monospóricas e conservação dos isolados.....	61
6.6 Atividade Microbiana.....	63
6.7 Extração de DNA e análise dos isolados.....	64
6.7.1 PCR (reação em cadeia de polimerase) e sequenciamento.....	67
6.8 Inoculação Em Sementes e Avaliação Na Taxa De Germinação.....	69
6.9 Fungicidas Comerciais Testado “in vitro”	70
6.10 Análise estatística.....	71
7.RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	71
8 CONCLUSÃO.....	116
9 CONSIDERAÇÕES FINAIS	117
REFERÊNCIAS	118

1 – Introdução

A rizosfera é uma região do solo onde está localizado o sistema radicular das plantas o qual libera para o solo de 50 a 100 mg.g⁻¹ de raiz/dia de vários produtos orgânicos, tais como o mucigel e exsudatos, permitindo o desenvolvimento de um ecossistema microbiano muito especializado, que abriga populações de 10 a 100 vezes maiores ao solo adjacente (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Há no solo ainda a região da termitosfera e drilosfera, aonde pode ser encontrada uma diversidade de microorganismo tão vasta quanto desconhecida (ZILLI et al., 2003).

A presença de matéria orgânica no solo em decomposição representa a principal fonte de carbono para estes microrganismos de solo, a qual sofre influência direta do metabolismo das raízes. Quando é analisada a presença de patógenos microbianos e fungos fitopatogênicos, estes podem apresentar uma maior quantidade devido a sua intensa complexidade sendo que nestes ambientes apresentam uma vasta quantidade de matéria orgânica, fundamental para seu desenvolvimento (GRAYSTON; JONES, 1996).

Neste conjunto de informações os fungos do gênero *Fusarium* spp., demonstram excepcional grupo de agentes patógenos, ocasionando múltiplas perdas em cultivares diversos em todos os continentes, devido ao fato de possuírem diversos hospedeiros e apresentar várias especializações.

Para o controle destes fungos são utilizados fungicidas que são produtos químicos capazes de prevenir a infecção de tecidos de plantas. O conceito para

fungicidas corresponde a compostos químicos empregados no controle de doenças causadas por fungos (EMBRAPA, 1999).

Pode ocorrer a interrupção da doença por um período e a mesma retornar, pois alguns fungicidas, apenas inibem, temporariamente, a germinação dos esporos. Processo denominado "Fungistase" sendo os compostos químicos com esta ação classificados como "Fungistáticos". Há outros fungicidas denominados "Anti-esporulantes" com ação fungitóxica, os quais inibem ou previnem a produção de esporos, sem alterar o crescimento vegetativo do micélio do fungo.

É necessário conhecer a propriedade química dos fungicidas que são constituídos de duas partes: seu princípio ativo, que atua na ação do composto e o princípio inerte que atua como veículo e diluente para o princípio ativo (EMBRAPA, 1999).

Novas estratégias na área de biotecnologia estão em desenvolvimento, mas ainda há um crescente aumento no uso de pesticidas como forma de controle de pragas e doenças. Entretanto, alguns pesticidas, são persistentes no ambiente possuindo grande mobilidade e capacidade de se acumular nos tecidos animais e assim provocar sérias alterações, entre elas mutações decorrentes deste efeito acumulativo.

A degradação destes compostos tem sido trabalhada de modo natural através de microrganismos capazes de realizar processos de biorremediação. Um exemplo é a capacidade de alguns fungos da podridão branca em degradar vários poluentes xenobióticos e recalcitrantes despertarem grande interesse nas pesquisas das áreas de Microbiologia Industrial e Ambiental (COELHO et al., 2010).

Entretanto tem se observado um aumento crescente da tolerância aos fungicidas, relatado em diversos gêneros de fungos patogênicos, tanto de interesse médico como agrícola fato que vem despertado a criação de novas estratégias para o controle desses patógenos.

Tendo em vista essas considerações, o objetivo deste trabalho foi avaliar a ação infectante de *Fusarium oxysporum* e *Fusarium solani* na cultura do *Eucalyptus grandis*, e tolerância deles aos fungicidas utilizados no controle, verificando sua capacidade de interferência nas taxas de germinação e desenvolvimento de mudas, para possíveis aplicações em processos de biotecnologia e biorremediação.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Aspectos gerais do Eucalipto

A cultura do eucalipto (*Eucalyptus spp*) apresenta uma intensa distribuição mundial, pois se adapta as mais diversas condições edafoclimáticas, tendo suas origens na Austrália, Indonésia e ilhas próximas, tais como Flores, Alor e Wetar (COTTERILL; BROLIN, 1997). Nestas ilhas o gênero *Eucalyptus* desenvolveu a maior diversidade de espécies e estratégias de adaptação às diferentes condições geoecológicas regionais, proveniente do processo de isolamento geográfico insular.

Pertencente à família das Myrtaceas, da classe das angiospermas dicotiledonêas foi descoberto pelos ingleses na Austrália, em 1788 e inserida na ordem Myrtales, família com aproximadamente 150 gêneros com cerca de 3600 espécies, sendo a segunda maior família desta ordem (CRONQUIST, 1981). Com uma imensa variedade de espécies, mas apenas duas, *Eucalyptus urophylla* e *Eucalyptus deglupta*, não são originárias da Austrália (BERTOLA, 2005).

O gênero *Eucalyptus* caracteriza-se pela produção de madeira, entretanto há também a extração de óleos essenciais, inclusive espécies ornamentais de folhas vermelhas como o *E. citriodora* (JOLY, 1966).

Seu cultivo tem várias aplicações dependendo da espécie e região, entre eles a produção de aglomerados, carvão, lenha, papel, óleos para fins farmacêuticos e quebra-vento. No Brasil a cultura do eucalipto tem grande movimentação economia, pois está diretamente associada ao setor florestal, apoiado pelo governo com incentivos fiscais relacionados ao reflorestamento, e pelos Programas

Nacionais de Siderurgia a Carvão Vegetal, de Celulose e Papel. O setor responde cerca de 4% do PIB (produto interno bruto), proporcionando centenas de empregos diretos e indiretos (SILVA, 1997).

Com uma tendência mundial de diminuir a exploração das florestas nativas, ocasionando uma diminuição do desmatamento, ocorrerá um aumento na plantação de florestas de rápido crescimento, para fins de exploração econômico, necessitando maiores conhecimentos tecnológico na implantação das mesmas (FREITAS et al., 2009).

Há aproximadamente 600 espécies e dezenas de subespécies, menos de 1% destas tem sido utilizada com finalidades industriais, sendo que as mais utilizadas mundialmente para fins industriais são *E. globulus*, e *E. grandis* e seus híbridos como *E. urophylla* (COTTERILL; BROLIN, 1997) *E. viminalis* e *E. dunnii*, que predominam na região sul do Brasil.

Pesquisas na área da genética visando melhorar a qualidade e quantidade da produtividade no setor florestal, levando ao desenvolvimento de exemplares capazes de adaptar as mais diversas condições ambientais têm recebido grandes investimentos e veem crescendo muito ao longo dos anos (VELLINI et al., 2008).

Com a melhoria dos cultivares o *Eucalyptus* tem sua area de plantio em pleno crescimento, fato que se deve pela facilidade do seu manejo, ampla adaptação às diversas condições climáticas (SCHUTLZ, 2012).

Geralmente as sementes não germinam de forma espontânea em campo, em florestas naturais ou em florestas plantadas, fato que se deve ao pequeno tamanho das sementes e a sua sensibilidade ao ambiente; inclusive a sua pouca reserva energética e resistência.

O Brasil possui condições propícias ao gênero *Eucalyptus* o que permitiu uma facilidade no seu crescimento e desenvolvimento. Sua produtividade no território brasileiro apresenta uma superioridade de cerca de 10 vezes comparada a outros países tais como: Estados Unidos, Finlândia e Portugal (CIB, 2008). No Brasil as espécies mais cultivadas são: *Eucalyptus grandis*, *Eucalyptus camaldulensis*, *Eucalyptus saligna* e *Eucalyptus urophylla*, entre outras (PAIVA, 2011).

Em 2012, de acordo com a Associação Brasileira de Produtores de Florestas Plantadas (ABRAF, 2013), a área plantada de eucalipto no Brasil chegou a 5.102 milhões de hectares, demonstrando um crescimento de 4,5% em relação ao ano anterior. Na região Sudeste do país encontram-se cerca de 53% desta plantação. Fato que está relacionada à necessidade de suprir a demanda dos projetos futuros nas indústrias do segmento de papel e celulose, necessitando de novos plantios.

2.2 Doenças da Cultura

A cultura do eucalipto sofre o ataque de inúmeros patógenos principalmente fungos, ocorrendo sua emergência em viveiros até na fase adulta em florestas de cultivos e nos campos.

As doenças podem ocasionar inúmeros impactos econômicos, de acordo com a espécie e período do ataque, levando a danificar quantitativamente e qualitativamente a produção de madeira e de outros substratos. Estes ataques são observados nas plantações em todas as espécies, em qualquer época do ano nos mais diversos locais (EMBRAPA, 2003). Entre as principais doenças destacam-se:

2.2.1 Tombamento de mudas

Esta doença acomete as mudas de eucalipto tendo como origem espécies de fungos presentes no solo, sendo os principais patógenos os fungos das espécies: *Cylindrocladium candelabrum*, *Fusarium* sp., *Phytophthora* sp., *Pythium* sp. e *Rhizoctonia solani* Kuhn (SANTOS; AUER; GRIGOLETTI JÚNIOR, 2001).

Os patógenos iniciam o ataque na fase inicial do cultivar, na germinação e formação de plântulas, provocando a morte de diversas mudas (KRÜGNER; CARVALHO, 1971). Uma possível solução para evitar o tombamento de mudas seria evitar que as mudas tenham contato com o solo, como por exemplo suspender os tubetes (SILVEIRA et al., 2001). Preventivamente para evitar é necessário utilizar um substrato sadio, tratamento das sementes

2.2.2 Podridão das raízes

O excesso de umidade e precária aeração do substrato proporcionam uma condição ideal para a infecção de fungos patógenos que ocasionam uma doença denominada podridão das raízes, entre estes fungos as principais espécies são: *Phytophthora* sp., *Pythium* sp. e *Fusarium* sp. (SILVEIRA et al., 2001).

O ataque dos fungos ocorre até mesmo em mudas que apresentam um sistema radicular bem desenvolvido, provocando lesões necróticas nos tecidos das raízes, que acarretam em escurecimento e apodrecimento do sistema radicular, levando à necrose das mudas (DIAS, 2010; SANTOS; AUER; GRIGOLETTI JÚNIOR, 2001).

Os patógenos *Fusarium oxysporum f.sp. ciceris* e *F. solani*; são exemplos de fungos que ocasionam a podridão da raiz e a murcha da plantas. Sobrevivem nos solos por anos e são difíceis de serem erradicados por métodos convencionais, fato verificado na cultura do grão de bico (MOHAMMADI; BANIHASHEMI, 2006; SINGH et al., 2007).

2.2.3 Mofo cinzento

Ambientes com condições climáticas específicas apresentando alto índice de umidade e temperaturas ambientais abaixo de 20° C proporcionam um local ideal para o desenvolvimento do fungo fitopatôgeno *Botrytis cinerea*, provocando o enrolamento das folhas, que posteriormente secam e caem, tornando às áreas afetadas com um tom acinzentado (SILVEIRA et al., 2001).

2.2.4 Podridão de estacas

O manejo inadequado das mudas em condições de não higienização, com o aumento da temperatura e alta taxa de umidade criam um ambiente propício para o desenvolvimento de um grupo de fungos entre eles o *Cylindrocladium* spp. *Rhizoctonia solani*, *Fusarium* spp., *Botryosphaeria ribis* e *Colletotrichum* sp. Desenvolvendo na base da planta lesões escuras, as quais se propagam para ápice, impedindo o enraizamento e provocando a morte das estacas (AUER; SANTOS, 2010; SILVEIRA et al., 2001).

Uma tentativa de evitar a doença seria a descontaminação de brotações e recipientes com hipoclorito de sódio e/ou fungicidas e a pulverização de estufas com sulfato de cobre.

2.2.5 Esporotricose

Esta doença é provocada pelo fungo *Sporothrix eucalypti* que teve seu primeiro registro no Brasil na região de Barra Ribeiro – RS, no mês de março de 2000, os sintomas desta doença caracterizam-se pelo surgimento na região superior da haste principal e na parte foliar.

Na região foliar as folhas desenvolvem manchas arroxeadas e no caule e pecíolo os fungos ocasionam a formação de calos ao redor da lesão (anelamento), ocasionando sua morte, as áreas lesadas tornam-se retorcidas e as lesões necróticas escuras com pústulas esbranquiçadas (ALFENAS et al., 2001).

2.2.6 Oídio

Esta infecção é cosmopolita, pois atinge inúmeras espécies do gênero *Eucalyptus*, sendo ocasionada pelo fungo patógeno *Oidium eucalypti*. Caracteriza-se por apresentar um crescimento do micélio na superfície dos vegetais, o qual absorve intensamente os nutrientes do seu hospedeiro, formando uma película pulverulenta e esbranquiçada que se manifesta na lamina foliar e nos ramos.

Os vários sintomas visíveis são o enrugamento e deformação das folhas na fase jovem e o acamamento das folhas adultas, tanto quanto provoca a redução de crescimento, atrofia, necrose e queda das folhas (GRIGOLETTI JÚNIOR; BIZI; AUER, 2005).

2.2.7 Enfermidade rosada ou rubelose

A doença ocasiona no início do seu estágio lesões de coloração rosa-salmão na parte da copa das árvores, em seus galhos e hastes, ocasionando posteriormente a necrose dos tecidos, o agente causador desta infecção é o fungo *Corticium salmonicolor* (AUER; SANTOS; GRIGOLETTI, 2003).

2.2.8 Cancro

Uma das principais doenças do eucalipto ocasionada por diversas espécies de fungos entre eles *Cryphonectria cubensis*, *Valsa ceratosperma*, *Cytospora* spp., *Botryosphaeria* (SILVEIRA et al., 2001). Em qualquer região onde for cultivado o eucalipto a incidência desta doença é prevista provocando perdas quantitativas e qualitativas (SANTOS; AUER; GRIGOLETTI JÚNIOR, 2001).

Entre os danos causados ao cultivar são lesões na base das mudas, anelamento, destruição da casca, do cambio e lenho e a formação de nova casca abaixo da região (intumescimento), além do rápido murchamento das folhas são seus principais sintomas (WILCKEN et al., 2008).

2.2.9 Ferrugem

Um dos principais fatores abióticos para a propagação do fungo *Puccinia psidii* em cultivares de eucalipto é a alta intensidade de umidade por mais de oito horas noturnas e a elevação da temperatura levando a manifestação da doença que ocasiona esporulação pulverulenta e amarelada na parte foliar, nos ramos jovens, agravando com deformidades, encarquilhamento, desidratação e necrose das áreas infectadas, atacam mudas jovens em viveiros com até dois anos de idade de modo acentuado (WILCKEN et.al., 2008).

Entre as espécies mais afetadas de eucaliptos pela ferrugem destaca-se a *E. citriodora*, *E. cloeziana*, *E. grandis*, *E. obliqua*, *E. pilularise* e *E. saligna* (SANTOS; AUER; GRIGOLETTI JÚNIOR, 2001).

2.2.10 Manchas foliares de *Cylindrocladium*

Um dos sintomas desta doença na parte foliar são manchas que variam de coloração e tamanho, conforme o grupo de patógenos infecciosos e da espécie parasitada do eucalipto e das condições climáticas do local (SILVEIRA et al., 2001; APARECIDO; FINATTI, 2012).

Os principais patógenos que ocasionam esta enfermidade são os fungos *Cylindrocladium candelabrum*, *C. ilicicola*, *C. parasiticum*, *C. pteridise*, *C. quinqueseptatum*, observada em plantas de qualquer idade (SILVEIRA et al., 2001) e as principais espécies de eucaliptos parasitados são *E. acmenioides*, *E. alba*, *E.*

camaldulensis, *E. citriodora*, *E. dunnii*, *E. paniculata*, *E. pellita*, *E. saligna*, *E. cloeziana*, *E. grandise* e *E. urophylla* (APARECIDO; FINATTI, 2012).

Com o propagar da doença pode-se observar nas plantas e mudas afetadas uma acentuada desfolhação e nos ramos a presença de lesões necróticas (AUER; SANTOS, 2010).

2.2.11 Podridão de cerne

Esta enfermidade ocorre pois os galhos quebrados ou mortos, permitem a entrada de fungos dos grupos dos himenomicetos, deuteromicetos ou ascomicetos para o interior da planta (FOELKEL; BUSNARDO; RECH, 1986).

Os sintomas não são visíveis, pois a ação dos patógenos ocorre na região do cerne, aparecendo no corte do caule, observa-se a podridão do mesmo com uma coloração esbranquiçada ou parda, na área medular, ocasionando uma madeira com pouca densidade e sem resistência (SANTOS; AUER; GRIGOLETTI JÚNIOR, 2001).

2.2.12 Doenças foliculares secundárias

São difíceis de serem diagnosticadas, pois causam poucos danos as plantações em comparação as demais, devido ao fato de não terem condições ambientais adequadas para sua manifestação, as espécies cultivadas possuem resistência aos principais patógenos, entre eles os das espécies de *Coniella* spp., *Mycosphaerella* sp., *Phaeoseptoria* sp., *Cladosporium* sp., *Phomopsis* sp. Quando ocorre o ataque,

os principais sintomas são diversas lesões necróticas foliares, a queima de folhas em ramos e na copa das árvores (SANTOS; AUER; GRIGOLETTI JÚNIOR, 2001).

As principais doenças que afetam o *Eucalyptus* spp são abordadas na fase de mudas em viveiros e algumas na fase adulta. Inexistem informações mais precisas sobre a ação causada pela ação de *Fusarium* spp em arvores adultas e da ação de fungicidas sobre estas.

Fato semelhante ocorreu com Furtado e colaboradores (2001), quando tentavam obter o agente do mofo cinzento da seringueira, o fungo *Ceratocystis fimbriata*, utilizando o método de isca de cenoura, a partir de amostras com sintomas característicos, coletadas no ano de 2000, das regiões do Vale do Ribeira-SP, Rio Branco e Bujari-AC e Ituberá e Camamu-BA. Obtiveram em praticamente todas as amostras contaminadas fungo *Fusarium solani* ao invés de *C. fimbriata*.

3. O Gênero *Fusarium*

Representante do filo Ascomycota, ordem Hypocreales e família Nectriaceae, sendo a sua fase teleomórfica não registrada, é um fungo anamórfico (LESLIE; SUMMERELL, 2006).

Pertencente a classe Hyphomycetes da subdivisão Deuteromycotina, a qual produz conídios hialinos, septados em forma de “canoa” denominados macroconídios, os quais são produzidos em esporodóquios, estruturas de frutificação na fase assexuada. Há nesta classe representantes que produzem conídios em micélio aéreo, denominados de microconídios.

A produção de macro e micronídios é variável, em função das condições ambientais. Outras espécies produzem ainda os clamidósporos, que são as estruturas de resistência deste fungo. Sendo uma informação importante nesta classe e de grande interesse econômico é a presença de um gênero mitosporico de fungos o *Fusarium* spp. (HAWKSWORTH et al., 1995; WINDELS, 1992).

Em regiões temperadas e tropicais há uma grande quantidade de espécies de *Fusarium*, atuando como saprófitas no solo e em material vegetal sendo esses os maiores patógenos de plantas há representantes capazes de produzir toxinas ocasionando doenças em animais e em humanos (BOOTH, 1971; LESLIE; SUMMEREL, 2006;).

Na região da microbiota da rizosfera das raízes dos vegetais é possível encontrar uma das mais importantes espécies do gênero *Fusarium* o *F. oxysporum* o qual tem uma imensa importância econômica (LESLIE; SUMMERELL, 2006).

Essa espécie provoca a murcha ou podridão radicular em diversas espécies de plantas, mesmo quando algumas cepas não sejam classificadas como patogênicas (FRAVEL et al., 2003).

O mecanismo de ação envolve a liberação de enzimas que degradam a parede celular dos vasos, impedindo o transporte da seiva bruta, resultando no fechamento dos estômatos, levando a murcha e morte de folhas e consequentemente a morte da planta (LESLIE; SAMMERELL, 2006; SINGH et al., 2007).

Seus sintomas ocorrem cerca de 3 semanas após a semeadura, podendo aparecer antes em cultivares suscetíveis com solos arenosos, temperaturas em torno de 25° C e úmidos para o desenvolvimento da doença (SINGH et al., 2007).

Entre os principais indícios da doença está a queda de pecíolos, raques e folíolos, aparecimento de clorose nas folhas inferiores, perdendo a coloração até secarem (SINGH et al., 2007). Na fase jovem as plântulas contaminadas tendem a inclinar as folhas e posteriormente queda.

Externamente as partes subterrâneas da planta parecem saudáveis, entretanto quando separadas verticalmente os tecidos vasculares apresentam descoloração de marrom à preta (GAUR, 2010). Processo que avança em direção aos caules e ramos.

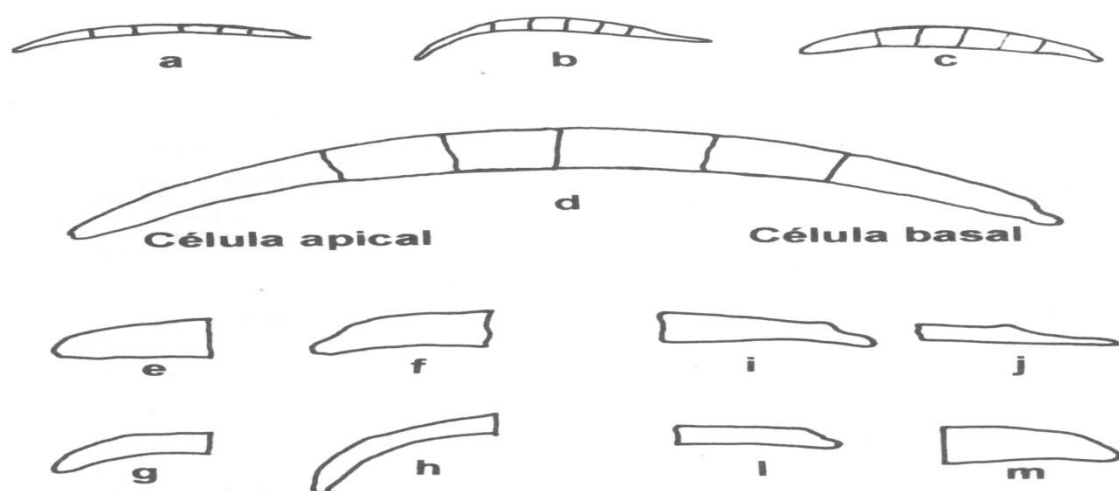
A coinfeção associada a outros patógenos de solo também proporcionam a descoloração da raiz externa (SINGH et al., 2007).

Mesmo após a morte do vegetal infectado o fungo atinge a superfície do tecido vegetal, realizando uma imensa esporulação fúngica. A dispersão dos esporos ocorre por diversos mecanismo tanto abiótico como o vento, água, o movimento do solo e ou por mecanismo biótico sendo então pelos restos de plantas.

Este gênero apresenta uma ampla distribuição geográfica, possuindo espécies cosmopolitas, tendo ocorrência principalmente a certos ambientes, prevalecendo às regiões tropicais e subtropicais ou em áreas com condições de clima frio, principalmente nas regiões temperadas, ocasionalmente há alguns representantes que apresentam uma íntima associação com os hospedeiros (BURGESS et al., 1994).

Para se classificar, é necessária a utilização de meios de cultura específicos, com avaliações das condições de cultura (crescimento micelial, pigmentação, estruturas e esporulação), observando se ocorre a formação dos macroconídios (Figura 1), analisando o formato e o modo de produção dos microconídios (Figura

2), acompanhando o processo de formação de clamidósporos, sendo estes critérios consistentes e que precisam de meios especiais de cultura e instrumentos que serão utilizados na sua identificação, na morfologia das culturas e nas suas taxas de crescimento (BURGESS et al., 1994; NELSON et al., 1983).

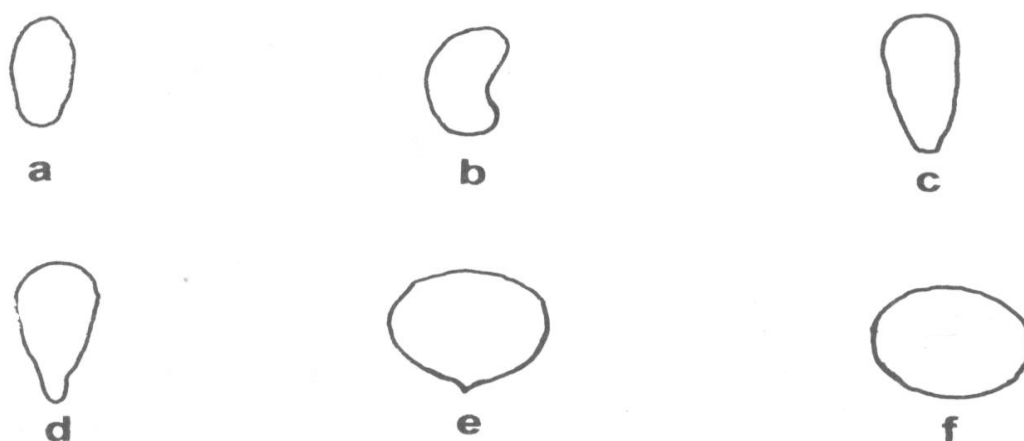


- a) Delgado, com aspecto de agulha;
- b) Com curvatura dorsal e ventral;
- c) Curvatura do lado dorsal mais pronunciada que no lado ventral;
- d) Macroconídio típico de *Fusarium*, com as células apicais (lado esquerdo) e basal (lado direito);
- e) Grossa (sem corte);
- f) Papilada;
- g) Em forma de gancho;
- h) Afilada;
- i) Em forma de pé;
- j) Pé alongado;
- l) Distintamente entalhada (chanfrada)
- m) Escassamente entalhada.

FIGURA 1. Formas de macroconídios

Fonte: Burgess et al., 1994.

Em sua pesquisa Link em 1809 classificou o gênero *Fusarium*, taxonomia a qual segue os mesmos princípios e ainda é utilizado no sistema de taxonomias com certas adaptações sugeridas na publicação de Wollenweber e Reinking (1935), combinando as informações complementares de outros sistemas (TOUSSOUN; NELSON, 1975; NELSON et al., 1983; BURGUESS et al., 1994).



- a) Oval;
- b) Reniforme ou alantoide;
- c) Obovoides com a base truncada;
- d) Piriforme;
- e) Napiforme;
- f) Globoso

FIGURA 2. Formas dos microconídios

Fonte: Burgess et al., 1994.

Mais especificamente no Brasil as espécies de *Fusarium* que foram identificadas entre 1993 e 1996 apresentam um significativo papel na agricultura, devido a sua capacidade de parasitar diversos cultivares, sendo estas fitopatógenos de grande interesse econômico, conforme representados no Quadro 1.

Quadro 1. Espécies de *Fusarium* e teleomórficos relatadas no Brasil e seus hospedeiros (adaptado de Mendes et al., 1998 e Liberato et al., 1996).

Espécies de <i>Fusarium</i>	Hospedeiros
<i>F. acuminatum</i>	<i>Capsicum annum</i> (pimentão), <i>Hordeum vulgare</i> (cevada) e <i>Triticum aestivum</i> (trigo)
<i>F. anthophilum</i>	<i>Bactris gasipaes</i> (pupunha)
<i>F. aquaeductuum</i>	<i>Glycine max</i> (soja) e <i>Manihot utilissima</i> (mandioca)
<i>F. avenaceum</i>	<i>Solanum tuberosum</i> (batata) <i>Triticum aestivum</i> (trigo) e <i>Hordeum vulgare</i> (cevada)
<i>F. caeruleum</i>	<i>Solanum tuberosum</i> (batata)
<i>F. clamydosporum</i>	<i>Ficus carica</i> (figo), <i>Chrysanthemum sp</i> (crisântemo) e <i>Lactuca sativa</i> (alface)
<i>F. coffeicola</i>	<i>Coffea arabica</i> (café)
<i>F. concolor</i>	<i>Gossypium hirsutum</i> (algodão), <i>Glycine max</i> (soja) e <i>Coffea arabica</i> (café)
<i>F. culmorum</i>	<i>Asparagus officinalis</i> (aspargo), <i>Gossypium hirsutum</i> (algodão) e <i>Glycine max</i> (soja)
<i>F. decemcellulare</i>	<i>Cordia alliodora</i> (louro), <i>Paullinia cupana</i> (guaraná), <i>Psidium guajava</i> (goiaba)
<i>F. equiseti</i>	<i>Allium cepa</i> (cebola), <i>Beta vulgaris</i> (beterraba) e <i>Crotalaria juncea</i> (crotália)
<i>F. eumartii</i>	<i>Solanum tuberosum</i> (batata)
<i>F. graminearum</i>	<i>Avena sp</i> (aveia), <i>Oryza sativa</i> (arroz) e <i>Zea mays</i> (milho)
<i>F. heterosporum</i>	<i>Paspalum sp</i> (capim-amoroso), <i>Glycine max</i> (soja) e <i>Triticum aestivum</i> (trigo)
<i>F. javanicum</i>	<i>Crotalaria juncea</i> (crotália) e <i>Cucurbita sp</i> (abóbora)
<i>F. larvarum</i>	<i>Glycine max</i> (soja) e <i>Gossypium hirsutum</i> (algodão)
<i>F. lateritium</i>	<i>Ipomoea batatas</i> (batata doce), <i>Urena lobata</i> (guaxima) e <i>Glycine max</i> (soja)
subsp. <i>lateritium</i>	<i>Coffea arabica</i> (café)
var. <i>buxi</i>	<i>Glycine max</i> (soja)
var. <i>mori</i>	<i>Morus sp</i> (amora)
<i>F. merismoides</i>	<i>Lycopersicon esculentum</i> (tomate)
<i>F. moniliforme</i>	<i>Ananas comosus</i> (abacaxi), <i>Arachis hypogaea</i> (amendoim) e <i>Zea mays</i> (milho)
var. <i>anthophilum</i>	<i>Tabebuia impetiginosa</i> (ipê roxo) e <i>Vitis vinifera</i> (vinha)
var. <i>intermedium</i>	<i>Chrysanthemum sp</i> (crisântemo)
<i>F. orthoceras</i>	<i>Ricinus communis</i> (mamona)
<i>F. oxysporium</i>	<i>Allium cep</i> (cebola), <i>Baccharis sp</i> e <i>Phaseolus vulgaris</i> (feijão)
f.sp. <i>batatas</i>	<i>Ipomoea batatas</i> (batata doce)
f.sp. <i>cattleyae</i>	<i>Orchidaceae</i> (orquídea)
f.sp. <i>cepae</i>	<i>Allium cep</i> (cebola), <i>Allium fitulosum</i> (cebolinha) e <i>Allium sativum</i> (alho)
f.sp. <i>ciceris</i>	<i>Cicer arietinum</i> (grão de bico)

<i>f.sp. coffea</i>	<i>Coffea arabica</i> (café)
<i>f.sp. conglutinans</i>	<i>Brassica oleracea</i> (couve manteiga) e <i>Brassica</i> sp (couve)
<i>f.sp. cubense</i>	<i>Musa paradisiaca</i> (banana da terra) e <i>Musa cvs.</i> (AAB; AAA; AAAB) (banana)
<i>f.sp. cucumerinum</i>	<i>Cucumis sativus</i> (pepino) e <i>Curcubita</i> sp (abóbora)
<i>f.sp. cyclaminis</i>	<i>Cyclamem persicum</i> (ciclame)
<i>f.sp. dianthi</i>	<i>Dianthus caryophyllus</i> (cravo)
<i>f.sp. elaeidis</i>	<i>Elaeis guineenses</i> (dendezeiro)
<i>f.sp. herbemonthis</i>	<i>Vittis</i> sp (uva) e <i>Vitis vinífera</i> (vinha)
<i>f.sp. lupini</i>	<i>Lupinus</i> sp (tremoço)
<i>f.sp. lycopersici</i>	<i>Capsicum annum</i> (pimentão)
<i>f.sp. medicaginis</i>	<i>Medicago sativa</i> (alfafa)
<i>f.sp. melonis</i>	<i>Cucumis melo</i> (melão) e <i>Curcubita</i> sp (abóbora)
<i>f.sp. nicotianae</i>	<i>Nicotina tabacum</i> (tabaco)
<i>f.sp. niveum</i>	<i>Citrullus lanatus</i> , (melancia), <i>Cucumis melo</i> (melão) e <i>Curcubita</i> sp (abóbora)
<i>f.sp. passiflorae</i>	<i>Passiflora edulis</i> (maracujá)
<i>f.sp. phaseoli</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i> (feijão) e <i>Vigna unguiculata</i> (feijão de corda)
<i>f.sp. pisi</i>	<i>Pisum sativum</i> (ervilha)
<i>f.sp. raphani</i>	<i>Raphanus sativus</i> (rabanete)
<i>f.sp. ricini</i>	<i>Ricinus communis</i> (mamona)
<i>f.sp. tracheiphilum</i>	<i>Vigna unguiculata</i> (feijão de corda)
<i>f.sp. vasinfectum</i>	<i>Capsicum</i> sp (pimenta), <i>Dolichos lab-lab</i> (orelha de padre) e <i>Gossypium hirsutum</i> (algodão), <i>Sesamum indicum</i> (gergelim)
<i>F. pallidoroseum</i>	<i>Capsicum annum</i> (pimentão), <i>Coffea arabica</i> (café) e <i>Sorghum</i> sp (sorgo)
<i>F. poae</i>	<i>Glycine max</i> (soja), <i>Gossypium hirsutum</i> (algodão), e <i>Hordeum vulgare</i> (cevada)
<i>F. roseum</i>	<i>Ananas</i> sp (abacaxi), <i>Cucumis melo</i> (melão) e <i>Zea mays</i> (milho)
<i>var. arthrosporioides</i>	<i>Vigna unguiculata</i> (feijão de corda)
<i>F. sacchari</i>	<i>Ananas comosus</i> (abacaxi) e <i>Mangifera indica</i> (manga)
<i>F. sambucinum subspcoeruleum</i>	<i>Glycine max</i> (soja) e <i>Gossypium hirsutum</i> (algodão)
<i>F. simitectum</i>	<i>Glycine max</i> (soja)
<i>F. setosum</i>	<i>Palmae</i> (<i>Arecaceae</i>)(palmeira)
<i>F. solani</i>	<i>Ananas comosus</i> (abacaxi) <i>Beta vulgaris</i> (beterraba) e <i>Solanum tuberosum</i> (batata)
<i>f.sp. curcubitae</i>	<i>Citrullus lanatus</i> (melancia), <i>Cucumis melo</i> (melão) e <i>Curcubita</i> sp (abóbora)
<i>f.sp. eumartii</i>	<i>Solanum tuberosum</i> (batata)
<i>f.sp. hibisci</i>	<i>Abelmoschus esculentus</i> (quiabo)
<i>f.sp. glycines</i>	<i>Glycine max</i> (soja)
<i>f.sp. lycopersici</i>	<i>Lycopersicon esculentum</i> (quiabo)
<i>f.sp. phaseoli</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i> (feijão)
<i>f.sp. piperis</i>	<i>Piper attenuatum</i> (pimenta) e <i>Piper nigrum</i> (pimenta preta)
<i>f.sp. pisi</i>	<i>Pisum sativum</i> (ervilha) e <i>Vittis</i> sp (uva)
<i>var. anthophilum</i>	

<i>Fusarium sp</i>	<i>Abelmoschus esculents</i> (quiabo), <i>Allium cepa</i> (cebola), e <i>Anthurium</i> (antúrio)
<i>F. sporotrichioides</i>	<i>Baccharis sp</i> (alecrim do campo) e <i>Gossypium hirsutum</i> (algodão)
<i>Fusarium spp</i>	<i>Avena sativa</i> (aveia), <i>Bactris gasipaes</i> (pupunha) e <i>Zea mays</i> (milho)
<i>F. subglutinans</i>	<i>Ananas comosus</i> (abacaxi), <i>Mangifera indica</i> (manga) e <i>Saccharum officinarum</i> (cana-de-açúcar)
<i>F.sp. ananas</i>	<i>Ananas comosus</i> (abacaxi)
<i>F. sulphureum</i>	<i>Glycine max</i> (soja) e <i>Gossypium hirsutum</i> (algodão)
<i>F. tricinctum</i>	<i>Arachis hypogaea</i> (amendoim) <i>Musa cvs</i> (banana) e <i>Urena lobata</i> (guaxima)
<i>F. vetricosum</i>	<i>Glycine max</i> (soja)
<i>F. xylariodes</i>	<i>Glycine max</i> (soja) e <i>Gossypium hirsutum</i> (algodão)
<i>Gibberella avenacea</i>	<i>Triticum aestivum</i> (trigo)
<i>G. gossypina</i>	<i>Gossypium hirsutum</i> (algodão)
<i>G. moniliforme</i>	<i>Zea mays</i> (milho)
<i>Calonectria rigidiuscula</i>	<i>Theobroma cacao</i> (cacau)
<i>Gibberella subglutinans</i>	<i>Ananas comosus</i> (abacaxi)
<i>G. zeae</i>	<i>Andropogon bicornis</i> (Capim-rabo-de-burro), <i>Paspalum urville</i> (capim da roça) e <i>Zea mays</i> (milho)
<i>Nectria haematococca</i>	<i>Passiflora edulis</i> (maracujá) e <i>Piper nigrum</i> (pimenta preta)
<i>f.sp. piperis</i>	<i>Piper aduncum</i> (pimenta de macaco), <i>Piper hostmannianum</i> (pimenta) e <i>Piper nigrum</i> (pimenta preta)
<i>Nectria mauritiicola</i>	<i>Carica papaya</i> (mamão)
<i>Nectria setofusariae</i>	<i>Palmae</i> (<i>Arecaceae</i>)(palmeira)

Com o objetivo de controlar a ação dos fitopatógenos presentes no gênero *Fusarium* nos mais diversos cultivares, várias pesquisas estão sendo desenvolvidas, entre elas avaliando o uso de fungicidas para tentar encontrar uma resposta satisfatória para estas enfermidades ocasionadas por este grupo de fungos.

Os resultados obtidos por Von Pinho e colaboradores (1995) no controle dos patógenos *Fusarium moniliforme*, *Aspergillus spp.* e *Penicillium sp.* em sementes de milho, se basearam na análise da ação dos fungicidas relacionados nas respectivas proporções: Halt 50 (50g/100kg de sementes), TCMTB (130ml/100kg

de sementes), Captan (150g/100kg de sementes) e Metalaxyl (11,5g/100kg de sementes) + Thiabendazole (11,5g + 150g/100kg de sementes), os quais proporcionaram germinação e emergência de plântulas; quando as sementes não são tratadas os patógenos diminuem essa proporção no teste frio.

Quando avaliadas em campo as sementes de maior vigor não responderam ao tratamento químico em relação os resultados da emergência. Vários fungicidas são testados “in vitro” para o controle de *Fusarium*; alguns exemplos estão descritos no Quadro 2.

Quadro 2. Fungicidas utilizados nos bioensaios do controle *in vitro* de *Fusarium* spp. UNESP, Botucatu-SP, 2011.

Ingrediente ativo	Nome comercial	Grupo químico	Tipo	CIA¹
Fludioxonil	Maxim XL (SC)	Fenilpirrol	Contato	25g/L
Metalaxil -M		Acilalaninato	Sistêmico	10g/L
Iprodiona	Rovral(SC)	Dicarboximida	Contato	500g/Kg
Azoxystrobina	Amistar Top (SC)	Estrubirulina	Sistêmico	500g/Kg
Difenoconazol		Triazol		125g/L
Procidona	Sialex 500 (WP)	Dicarboximida	Sistêmico	500g/Kg
Trifloxistrobina	Nativo (SC)	Estrobirulina	Mesosistêmico	100g/L
Tebuconazol		Triazol	Sistêmico	200g/L
Propiconazol	Tilt (WP)	Triazol	Sistêmico	250g/L
Epoxiconazol	Ópera (SC)	Triazol	Sistêmico	50g/L
Piraclostrobina		Estrubirulina		133g/L
Clorotalonil	Cerconil (WP)	Isoftalonitrila	Sistêmico e de contato	500g/Kg
Tiofanato metílico		Benzimidazol		200g/Kg
Tebuconazole	Folicur 200 (EC)	Triazol	Sistêmico	200g/L
Captana	Captan (SC)	Dicarboximida	Preventivo	480g/L
Mancozebe	Dithane NT(WP)	Alquilenobis	Contato	800g/Kg
Azoxistrobina	Priori Xtra (SC)	Estrobirulina	Sistêmico	200g/L
Ciproconazol		Triazol		80g/L
Carbendazim	Derosal 500 (SC)	Benzimidazol	Sistêmico	500g/L
Flutriafol	Impact (SC)	Triazol	Sistêmico	125g/L

¹Concentração do ingrediente ativo

Fonte: AGROFIT (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2012)

Em seu experimento Juliatti e colaboradores (2012) testaram a aplicação de fungicidas em grão de milho (*Zea mays*) e concluíram que os mesmos não refletem em aumento de peso dos grãos (peso de mil grãos).

Entretanto, a aplicação influenciou significativamente para a redução na porcentagem dos grãos ardidos, sendo os melhores resultados encontrados para os tratamentos Tebuconazole + Kresoxim Metil (0,80 e 1,00L. ha⁻¹), Tetraconazole + Tiofanato Metílico (0,50 + 0,50 e 0,75 + 0,75L.ha⁻¹), Flutriafol (0,60L.ha⁻¹), Epoxiconazole (0,75L.ha⁻¹) e Tebuconazole (0,50L.ha⁻¹).

Estes mesmos tratamentos obtiveram os melhores resultados na análise dos fungos *Penicillium digitatum*, *Fusarium moniliforme* e *Fusarium graminearum* pela análise de “Blotter Test” (JULIATTI et al., 2012).

Em relação a espécie *Fusarium moniliforme*, alguns tratamentos realizados não foram significativos no controle do mesmo: Ciproconazole + Propiconazole (0,30L. ha⁻¹), Tebuconazole + Carbendazin (0,30 + 0,30L. ha⁻¹), Propiconazole (0,50L. ha⁻¹), Flutriafol + Tiofanato Metílico (0,80L. ha⁻¹) e Tetraconazole (0,75L. ha⁻¹), não sendo eficazes e que os melhores resultados obtiveram sobre o controle do fungo *Fusarium graminearum*, no qual foram obtidos com os tratamentos Tebuconazole + Kresoxim Metil (0,80L.ha⁻¹ e 1,00L. ha⁻¹), Tetraconazole + Tiofanato Metílico (0,50 + 0,50L. ha⁻¹ e 0,75 + 0,75L. ha⁻¹), Flutriafol (0,60L. ha⁻¹), Tebuconazole (0,50L.ha⁻¹), Epoxiconazole (0,75L. ha⁻¹), Ciproconazole + Trifloxistrobin (0,30L.ha ha⁻¹), Ciproconazole + Azoxistrobin (0,45L. ha⁻¹), Flutriafol + Tiofanato Metílico (0,60L. ha⁻¹) e Tetraconazole (0,50L. ha⁻¹) (JULIATTI et al., 2012).

Na tentativa de criar ambientes propícios para os experimentos in vitro vários meios de cultura e técnicas foram testadas, para isolar espécimes de *Fusarium*,

ocasionando seu crescimento e esporulação. Entre estes meios de culturas, os mais utilizados e padronizados são: Folha de Cravo-Ágar (FCA), Batata-Dextrose-Ágar (BDA), o Solo-Ágar (SA), o Ágar-Água (AA), KCl-Ágar, V8-Ágar (V8-A), Peptona PCNB Ágar (PPA), Ágar Seletivo de *Fusarium* (ASF), Verde Malaquita Ágar (VMA), Dicloran Cloronfenicol Peptona Ágar (DCPA), Nutriente Sintético Ágar (NSA) e Komada (MK) (Tabela 1).

Tabela 1 Os meios de culturas utilizados na identificação de *Fusarium* e suas características

Meios de Culturas	Características
(FCA)	Favorece a esporulação e a visualização dos clamidósporos
(BDA)	Uniformização da morfologia, pigmentação e da taxa de crescimento
(SA)	Estimula a formação de clamidósporos
(AA)	Substrato para a germinação de conídios e favorece o isolamento
KCl-Ágar	Realça a o número e comprimento das cadeias dos microconídios
(V8-A)	Estimular a produção de peritécios em <i>Netria</i> e <i>Gibberella</i>
(PPA)	Isolamento de <i>Fusarium</i> em grãos de cereais
(ASF)	Isolamento de <i>Fusarium</i> em resíduos e no solo
(VMA)	Isolamento e contagem de espécies de <i>Fusarium</i>
(DCPA)	Isolamento de <i>Fusarium</i>
(NSA)	Favorece as observações microscópicas das estruturas dos isolados
Komada (MK)	Isolamento seletivo de <i>Fusarium oxysporum</i> do solo

Fonte: JULIATTI et al., 2012

***Fusarium oxysporum* Schlecht.**

Teleomorfo: desconhecido

Características diagnósticas: Colônia de crescimento rápido, pigmentação variável, de rosa, roxa a lilás; micélio aéreo branco geralmente abundante; microconídios formados em fiálides curtas no micélio aéreo; macroconídios formados em esporodóquios, com geralmente 3 septos; clamidósporos formados em abundância,

solitários ou em pares. A espécie foi isolada várias vezes do sistema radicular de plantas com sintomas de murcha (BEDENDO, 2011).

***Fusarium solani* (Mart.) Sacc.**

Teleomorfo: *Nectria haematococca* Berk. & Br. var. *brevicona* (Wollenw.) Gerlach

Características diagnósticas: Colônia de crescimento rápido, pigmentação variável, frequentemente creme, mas ocorrem tons de rosa e lilás; micélio aéreo branco; microconídios formados em fiálides longas, conidióforos não ramificadas, no micélio aéreo; macroconídios formados em esporodóquios, com geralmente 3 septos; clamidósporos formados em abundância, solitários ou em pares (BEDENDO, 2011).

Para controlar esses fitopatógenos utilizam-se fungicidas. Porém, seu uso indiscriminado é proibido nos processos orgânicos de produção, conforme as normas das instituições certificadoras, sendo trocados por produtos alternativos (GARCIA et al., 2012).

4. SUBSTRATO SUPRESSIVO

O controle de doenças no solo é algo bem antigo, onde pesquisas datadas em 1889 relatam que Atkinson avaliava as consequências da murcha no algodoeiro (PINTO, 2008), mas o termo solo supressivo foi descrito por Menzies em 1959, que analisava solos com o ataque da sarna da batatinha na Califórnia.

Quando um solo apresenta a capacidade de bloquear a instauração de fitopatógenos ou de sua ação o mesmo passa a ter a supressividade ao mesmo, termo que veem substituir o antagonismo, a imunidade, intolerância, disputa, fungistático, resistente entre tantos outros adjetivos (BETTIOL; GHINI, 2005).

A supressividade do substrato pode ocorrer pelo fato de que o patógeno mesmo se estabelecido é incapaz de proliferar a doença ou a mesma é branda, ocorrendo situações em que este patógeno não consegue se estabelecer no substrato (BAKER; COOK,1974).

Essa supressividade é decorrente de fatores físicos do substrato, relativos à sua composição, entre eles os teores de areia e argila, o tamanho dos agregados, fatores químicos tais como a concentração de nutrientes, o pH, a condutividade elétrica e a ação macrobiótica a qual pode intervir na ação da patogenicidade, tornando-a mais branda (HOPER; ALABOUVETTE, 1996).

A ação de supressividade no substrato é decorrente de fatores físicos e químicos que podem ter ocorrido a longo prazo ou a curto prazo decorrente da ação humana com o uso de métodos agrícolas variados tais como a adubação orgânica e inorgânica, o controle de pH, incorporação de agentes antagônicos (HORNBY, 1983).

Naturalmente um substrato demora anos para estabelecer este clímax, estudos demostraram que um substrato estabelecido a anos possui grupos de bactérias e fungos em detrimento de outros com anelídeos e protozoários (BETTIOL; GHINI, 2005).

No início da década de 80 no Brasil o termo supressividade passou a ser usado para o solo e para substratos (MÜLLER, 2000).

A empresa EUCATEX foi pioneira em 1983, a vender uma mistura com propriedades de supressividade (MÜLLER, 2000) o que alavancou um novo segmento no mercado agrônômico, aonde as indústrias procuram novas formulas a

cada dia para atender as mais diversas demandas comerciais, com propriedades de supressividade aos mais diversos patógenos do solo (KÄMPF, 2002),

. 4.1 Mecanismos de supressividade

Fatores físicos e químicos que podem ocorrer no solo tais como a capacidade de armazenagem de água, compactação, tamanho e qualidade dos agregados, índice de pH, mudanças na concentração de nutrientes, condutividade elétrica, ocasionam o não estabelecimento do patógeno (BETTIOL; GHINI, 2005).

Caso este patógeno tenha se estabelecido no solo, seu desenvolvimento ou atenuação dependerá da presença do microbioma recrutar ou não aos fatores físicos e químicos presentes (PINTO, 2008; HORNBY, 1983; HOPER; ALABOUVETTE, 1986).

4.2 Mecanismos bióticos envolvidos na supressão de fitopatógenos

A adição de matéria orgânica que ocasiona liberação de substâncias fungitóxicas em sua decomposição, como por exemplo adição de lodo de esgoto, afetam o comportamento microbiano na obtenção da supressividade do solo de acordo com Hoitink e Fahy (1986), decorrente deste efeito é fundamental conhecer a qualidade e quantidade da matéria orgânica adicionada no solo, pois o mesmo vai influenciar diretamente a ação da população microbiana, sendo necessários estudos sobre estes compostos, além das alterações por eles ocasionadas nas

comunidades e nas ações microbianas do solo (BETTIOL; GHINI, 2005; BETTIOL; FERNANDES, 2004).

O antagonismo de microrganismos presentes no solo é decorrente a um conjunto de fatores que seleciona indivíduos em seu ambiente os tornando capazes de oferecer supressividade no solo a diversos patógenos de plantas (BETTIOL; GHINI, 2005). O uso de adubos orgânicos pode funcionar como forma preventiva ao desenvolvimento de um antagonismo microbiota ao patógenos *Phytophthora spp* (LEONI; GHINI, 2003).

Essa supressividade pode ocorrer pela produção de metabólitos prejudiciais ao outro indivíduo, pela competição de recursos vitais limitados no solo, nas relações de parasitismo e/ou predatismo, na antibiose (ação de antibióticos), pela indução de resistência, sendo que neste caso o patógeno não é afetado diretamente, ocasionando apenas a supressão da doença, sendo a ação direcionada à planta (BETTIOL; GHINI, 2005).

4.3 Organismos do substrato envolvidos na supressão de fitopatógenos

A respeito do microbioma endofítico presente no substrato com ação de supressividade, destacam-se os grupos de bactérias e de fungos, mas existem outros organismos que apresentam expressiva ação supressora sendo que pela pouca quantidade de estudos representam um menor grau de importância (BETTIOL; GHINI, 2005).

4.4 Fungos

Uma das áreas de interesse comercial é o seu uso como ação de supressividade, os quais utilizam os fungos como seu principal componente no combate a patógenos, entre os gêneros mais utilizados está o *Trichoderma* (BETTIOL; GHINI, 2005).

A ação antagonica e as relações interespecíficas de competição do gênero *Trichoderma*, demonstrou resultados eficientes no controle de patógenos vinculados ao substrato, além da produção de antibióticos, entretanto sua ação é mais eficaz no mecanismo de parasitismo, controlando vários fungos patogênicos, entre eles os dos gêneros *Rhizoctonia*, *Sclerotium*, *Pythium*, *Fusarium* e outros, além disto um complexo fúngico envolvendo vários gêneros pode ter uma ação antagonica no controle de patógenos (BETTIOL; GHINI, 2005).

Os fungos micorrízicos apresentam ação de supressividade, não inibindo a implantação do fitopatôgeno no solo, mas diminuindo a ação da doença na planta alterando as características morfológicas e fisiológicas da raiz (BETTIOL; GHINI, 2005).

Assim não importando o mecanismo: competição, predação, antagonismo, produção de antibióticos, entre outros, os fungos têm ação eficaz no combate a fitopatógenos do solo (BETTIOL; GHINI, 2005; RODRÍGUES-KABANA; CALVET, 1994).

4.5. Mecanismos abióticos atuantes na supressão de fitopatógenos

O controle do pH demonstrou ser o fator abiótico principal responsável pela supressividade do solo especialmente estando o mesmo em faixas extremas, alcalinas ou ácidas, o solo tem ação de supressividade a patógenos.

Estando o pH entre 3,8 a 4,5, esta acidez atua como inibidora de alguns patógenos, como *Rhizoctonia solani* e *Verticillium spp.* Entre o pH 7,8 a 8,0, atua inibindo *Sclerotium spp.*, ***Fusarium oxysporum*** e outros (HÖPER; ALABOUVETTE, 1996).

Solos ácidos costumam apresentar uma elevada quantidade de Alumínio disponível para as plantas o que pode ser danoso por esta disponível em sua forma tóxica, o Alumínio livre (NOLLA; SCHLINDWEIN; ANGHINONI, 2007). De acordo com Bettiol e Ghini (2005), uma concentração alta de alumínio no solo pode ocasionar a supressão de fitopatógenos, sem ocasionar danos à planta.

O uso de matéria orgânica no solo para o fornecimento de macro e micronutrientes para favorecer o desenvolvimento da planta e a ação de fitopatógenos é um assunto bem pesquisado. Entre os resultados obtidos destacam-se os positivos, decorrentes da melhoria da umidade do solo, melhoria na aeração entre outros benefícios e ao mesmo tempo insignificante ou até mesmo negativo ao controle da veiculação de doenças nas plantas, pois esta matéria orgânica pode atuar como fonte de nutrientes para os fitopatógenos e/ou liberar toxinas em sua decomposição ocasionando danos as plantas (BETTIOL; GHINI, 2005).

As modificações químicas, físicas do solo e da rizosfera podem atuar de modo direto na supressividade aos patógenos ou hospedeiro decorrente da liberação de exsudados da planta e da reação dos antagonistas (BETTIOL; GHINI, 2005).

A composição física das estruturas do solo e suas texturas atuam também na supressividade aos patógenos de acordo com Consoante Bettiol e Ghini (2005), a disposição e o tamanho das partículas tais como a sílica, argila e a areia influenciam a porosidade ocasionado diretamente na retenção de umidade e aeração, influenciando diretamente a parte viva do solo.

Uma maior concentração de argila geralmente não é favorável ao solo, está diretamente correlacionada ao desenvolvimento de doenças em plantas, oposto quando a concentração de areia é elevada (BETTIOL; GHINI, 2005).

4.6 Formação de supressividade em solo

Eventualmente um solo pode não apresentar supressividade, mas é possível reverter este quadro por meio de mecanismos bióticos e abióticos.

A transferência de porções de solos supressivos para o não supressivo pode induzir a supressividade Ghini (2011) que observou a transferência de porções de 5% e 10% de solo supressivo a solos não supressivos ocasionando a transferência de supressividade de *R. solani*, comprovando a eficácia do componente biótico sobre os patógenos.

O uso do lodo de esgoto pode auxiliar o desenvolvimento da supressividade desejada. A interação das propriedades físicas, biológicas e químicas são os mecanismos que ocasionam a supressividade no solo (BETTIOL; GHINI, 2005).

Este processo pode ser dependente de outros fatores entre eles a rotação de culturas, o uso de matéria orgânica como adubo, o controle do pH, a melhoria da textura do solo, épocas do ano para o plantio e a inclusão de antagonistas (BETTIOL; GHINI, 2005; HORNBY, 1983).

Diversas espécies vegetais sofrem o ataque de patógenos, sendo que as doenças fungicas podem lesar diversas áreas das plantas em vários estágios ocasionando a morte da mesma. São patógenos que possuem formas de resistência em meios não propícios (BUENO, 2004).

Os mais encontrados em estudados são os fungos: *Fusarium sp.*, *Macrophomina phaseolina*, *Sclerotium sp.*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Verticillium dahliae*, *Rhizoctonia sp.*, *Phytophthora sp.*, *Pythium sp.* e *Plasmodiophora brassicae* (BUENO; FISCHER, 2006; BETTIOL; SANTOS, 2001).

4.7 Técnica da solarização

Na última década do século XX, o controle de patógenos em solos de canteiros destinados a produção de mudas, plantas ornamentais, hortaliças e afins era preparado pela técnica de fumigação do solo, usando um gás toxico com efeito biocida, o brometo de metila, ocasionando o extermínio de qualquer forma de vida, tornando o solo esterilizado.

Este composto está entre os principais responsáveis pela degradação da camada de ozônio do planeta, mesmo sendo extremamente eficaz no seu proposito agrícola, algo discutido no ano de 1985 na Convenção de Viena para Proteção da Camada de Ozônio, o que resultou em acordos realizado entre vários países, o

banimento do brometo de metila pelos países industrializados até o ano de 2005 e o mesmo para os países em desenvolvimento até 2015, no Protocolo de Montreal em 1997 (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2013).

A restrição do brometo de metila ocasionou a busca de outras alternativas para o controle de patógenos no solo, reavaliando técnicas antigas e testando novos fumigantes, os quais não eram utilizados, tais como o metam sódio e dazomet (não afetam a camada de ozônio) e consequentemente sua produção pela indústria química retornou, do mesmo modo ocorreu com os fungicidas erradicantes, entre eles o quintozene e etridiazol.

Uma técnica antiga denominada solarização, relatada em 1970, que apresenta baixo custo e eficiência satisfatória sem afetar o meio ambiente, começou a ser utilizada (KATAN *et al.*, 1976). O controle de patógenos por esta técnica consiste na cobertura do solo umedecido com um filme plástico transparente por no mínimo de 30 dias, na época do verão, utilizando a energia solar como fonte seletiva, pois o efeito estufa ocasionado pelo plástico aquece o solo, sendo letal a alguns patógenos (KATAN *et al.*, 1976; GHINI, 2004; BEDENDO *et al.*, 2011).

A umidade do solo deve estar no limite da capacidade de campo, e os processos mecânicos de irrigação como naturais como a chuva atuarão no fornecimento de água, a qual atuará como estímulo na germinação de propágulos dos fitopatógenos, eliminando aqueles que não suportarem as altas temperaturas atingidas pelo solo (PATRÍCIO *et al.*, 2005).

Por se tratar de uma técnica que utiliza diretamente a energia solar seria ideal utiliza-la em períodos com maior incidência solar, ganhando tempo no período de

espera e com maior taxa de sucesso, indicada para as regiões tropicais (RICCI et al., 2006).

Diante do relatado, este trabalho teve como objetivos os seguintes aspectos:

5 – OBJETIVOS

5.1 – Objetivo Geral

Caracterizar a ação dos fitopatógenos *Fusarium oxysporum* e *Fusarium solani* em infecções ao cultivar *Eucalyptus grandis* cultivados em estufa agrícola e a ação de fungicidas comerciais ao controle destes.

5.2 – Objetivos específicos

- Testar as cepas de *Fusarium oxysporum* (IOC 4065) e *Fusarium solani* (IOC 3900), a infecção de mudas de *Eucalyptus grandis* em estufa agrícola.
- Determinar a periodicidade de eliminação de cepas de *Fusarium oxysporum* e *Fusarium solani* após infecção induzida com o uso de 10 tipos de fungicidas;
- Avaliar “in vitro” a degradação do fungicida por cepa selecionada;

.

6 - MATERIAL E MÉTODOS

6.1 – Locais do experimento

O experimento foi conduzido em 3 etapas:

1ª etapa: Foram cultivadas mudas de *Eucalyptus grandis*, todas no mesmo tipo de solo que foi coletado a 0–20 cm de profundidade do tipo Latossolo Vermelho distroférico (EMBRAPA, 2006) da região de Araçatuba/SP, devidamente peneirado, com antecedência de 10 dias na estufa Agrícola da Faculdade de Tecnologia de São Paulo – Araçatuba – FATEC, onde parcelas do mesmo foram infectadas com cepas de *Fusarium oxysporum* Schlecht. var. *oxysporum* Gerlach Et Nirenberg, concedidas pela EMBRAPA MEIO AMBIENTE (Jaguariúna/SP) da sua coleção de microrganismos de importância agrícola e ambiental (CMAA) e cepas de *Fusarium solani* provenientes do INSTITUTO OSVALDO CRUZ (Rio de Janeiro/RJ) que gentilmente também concedeu cepas da sua Coleção de Culturas de Fungos Filamentosos (CCFF).

A semeadura inicial ocorreu diretamente nas bandejas de isopor, em igualdade de condições. As bandejas depois preparadas receberam individualmente cerca de 6 a 8 sementes por cédula de *E. grandis*.

A distribuição foi feita com o auxílio de uma pequena espátula cheia de sementes. Após a distribuição, as sementes foram cobertas com fina camada de terra peneirada e protegida com casca de arroz em camada de mais ou menos 1 cm de espessura.

Ocorreu o desbaste, isto é, a eliminação e/ou utilização das mudas excedentes, restando em cada recipiente apenas a muda mais vigorosa. Isso ocorreu entre os 45 e 60 dias após a semeadura.

Amostras foliares, caulinares e de raiz foram coletadas após formação de mudas, em intervalos de tempos de 10 dias, 1 mês, 3 meses, 6 meses e 12 meses e encaminhadas para o laboratório de microbiologia do CENTRO PAULA SOUZA (FATEC - Araçatuba) para análise.

2ª etapa: Foram utilizados 10 tipos de fungicidas obtidos comercialmente nas mudas desenvolvidas de *Eucalyptus grandis* nos quais foram anteriormente infectadas com cepas de *Fusarium oxysporum* e *Fusarium solani* (Figura 3), com 2 mL de suspensões ($2,5 \times 10^8$ conídios mL^{-1}) para cada 100 g de sementes, amostras do solo foram coletadas em intervalos de tempos de 10 dias, 1 mês, 3 meses, 6 meses e 12 meses e encaminhadas para o laboratório de microbiologia para análise.



FIGURA 3. Cepas de *Fusarium oxysporum* (IOC 4065) e *Fusarium solani* (IOC 3900)

Fonte: Autor

3ª etapa: Foram cultivadas sementes de *Eucalyptus grandis* "in vitro", obtidas comercialmente onde as mesmas foram infectadas com cepas de *Fusarium oxysporum* e *Fusarium solani*. A semeadura ocorreu diretamente nas bandejas de germinação, em igualdade de condições.

As sementes foram tratadas com fungicidas e avaliada a taxa de germinação no laboratório de microbiologia.

6.2 - Inoculações em folhas de *Eucalyptus* "in vitro"

Com o objetivo de produzir esporos, os isolados foram transferidos para placas de Petri contendo meio folha de eucalipto-ágar e incubados a 28 °C, sob iluminação fluorescente constante. A partir do acompanhamento semanal, ocorrer a avaliação do crescimento e tipo de esporulação dos fungos testados.

Para a elaboração do meio folha de eucalipto-ágar, folhas saudáveis de *Eucalyptus* foram extraídas de plantas jovens (4 a 6 meses) e colocadas inteiras ou em tiras em placas de Petri de vidro (Figuras 4 e 5).



FIGURA 4. Inoculações de *Fusarium oxysporum* em folhas de *Eucalyptus* “in vitro”

Fonte: Autor



FIGURA 5. Inoculações de *Fusarium solani* em folhas de *Eucalyptus* “in vitro”

Fonte: Autor

As placas com folhas foram autoclavadas conforme recomendações de Dhingra e Sinclair (1995) por 15 minutos a 120°C e posteriormente recobertas com meio ágar-água (AA; ágar comercial, 20 g; água destilada 1.000 mL), antes da solidificação.

Quando não há a necessidade de selecionar um ponto de coleta na planta o meio mais utilizado para o isolamento indireto e purificação de fungos patogênicos é o meio batata-dextrose-ágar (BDA) (FERREIRA, 1989). Entretanto devido sua riqueza de nutrientes, este estimula muito mais o crescimento vegetativo do fungo não favorecendo a esporulação, perdendo a virulência.

De acordo com Fisher et al. (1982) quando o patógeno testado for foliar o ideal seria o uso do meio carnation-leaf-ágar (CLA) preparado com folhas de cravo (FCA), por ser pobre em nutrientes, fato que estimula a esporulação, visando auxiliar a identificação taxonômica, entretanto há a necessidade de obter folhas de cravo frescas para este fim, dificultando esta prática.

Todos os testes com a inoculação de cepas em mudas de eucalipto foram conduzidos no laboratório de microbiologia.

6.3 Obtenção de isolados de *Fusarium*

As amostragens foram realizadas de setembro de 2015 a setembro de 2016, na Estufa Agrícola do CENTRO PAUZA SOUZA de Araçatuba (FATEC).

Cerca de 600 sementes de *Eucalyptus grandis* de diferentes genótipos foram cultivadas, e as mesmas foram contaminadas com *F. oxysporum* e *F. solani*, em intervalos de tempos de 30, 60, 90, 180 e 360 dias as mudas com sintomas semelhantes da doença murcha de *Fusarium* (amarelecimento, murcha e descoloração nos tecidos vasculares) foram coletadas (Figura 6), armazenadas em sacos de papel e sob refrigeração de 4 °C até serem utilizadas no processo de isolamento.



FIGURA 6. Morte de plântulas Infectado com cepas *F. solani* com 10 dias de plantio

Fonte: Autor

Os isolamentos foram conduzidos no Laboratório de Microbiologia para o isolamento seguiu-se a metodologia descrita por Leslie e Summerell (2006) com adaptações.

Foram coletadas amostras do caule e das raízes com sintomas da doença, foram desinfetados externamente com álcool 70 % por 1 minuto, hipoclorito de sódio 1 % por 1 minuto e 3 lavagens consecutivas em água destilada esterilizada e cortados longitudinalmente.

Destacaram-se porções do tecido interno localizado na área de transição, entre uma área não afetada e uma área necrose visível, que foram transferidos para placas de Petri com meio de cultura Batata Dextrose Ágar (BDA).

As placas ficaram incubadas a 25°C por um período de 7 dias, na ausência de luz. Os cultivos foram estriados e repicados até se obterem culturas puras, e foram preservados em meio BDA a 4°C.

6.4 - Análises Realizadas nas Plantas e nos Substratos

De acordo com Kämpf, (2000^a) o termo “substrato para plantas” trata-se de um meio no qual ocorre o desenvolvimento de raízes das plantas cultivadas fora do solo *in situ*. O principal objetivo deste substrato é permitir subsídios suporte ao cultivar plantado (FERMINO, 1996; RÖBER 2000) chegando até a mediar a disponibilidade de nutrientes (KÄMPF, 2000a) e de água (FONTENO, 1996).

A supressividade a *Fusarium oxysporum* e *Fusarium solani* foram avaliadas pela colonização de amostras de solo pelo patógeno. Os solos, coletados nos períodos de 10 dias, 1 mês, 3 meses, 6 meses e 12 meses, foram colocados em cilindros metálicos autoclavados, com 4,5 cm de diâmetro e 4 cm de altura, e cobertos com parafilme M P7793 4" x 125". Um disco de meio de cultura (1,5 cm de diâmetro) com micélio do fungo, retirado da borda de cada uma das colônias, foram transferidos para a superfície dos solos.

A incubação foi efetuada a 25°C, sem a presença de luz. Após 15 dias, o solo foi retirado dos cilindros, homogeneizado, sendo a avaliação da colonização pelo patógeno feita por meio de contagem das colônias desenvolvidas após plaqueamento em meio de cultura de Komada (MK).

Pelo meio de plaqueamento de fragmentos de hastes em meio de Komada (KOMADA, 1975), foram avaliadas a presença ou não dos patógenos nas mudas em observação das estruturas do fungicas em microscópio óptico. As avaliações da presença e ação destrutivas foram executadas após 10, 30, 90 e 180 dias do transplântio, sendo avaliados 5 mudas anteriormente plantadas de cada tratamento por período.

Foi realizada a avaliação da presença de rizobacterias nos tratamentos, para o mesmo, pesou-se 10g de amostra de solo em balança de precisão e transferiu-a para um erlenmeyer contendo 250 ml de água destilada, sendo a solução homogeneizada. Vedou-se o erlenmeyer e colocou-o em banho-maria de 70°C por 10 minutos.

Simultaneamente adicionou-se 9 ml de água destilada em 5 tubos de ensaio. Ao retirar o erlenmeyer do banho-maria pipetou-se 1 ml da solução, e foi efetuada uma diluição em série visando selecionar os microrganismos resistentes a este tratamento, onde se enquadra o gênero *Bacillus* (BUCHANAN; GIBBONS, 1975). Posteriormente, foi efetuado o plaqueamento em meio AN (ágar nutritivo) e a incubação por 48 horas, em estufa a 28°C.

As bactérias formadoras de colônias foram, então, isoladas e caracterizadas como pertencente ao gênero *Bacillus*, de acordo com a metodologia descrita por Li e Alexander (1988), ou seja, pela produção de endósporos resistentes ao calor, células gram positivas em forma de bastão e pela hidrólise do amido. O gênero *Bacillus* apresenta uma serie de enzimas com aplicações industriais que podem ter ações antagônicas (MARUTHIAH *et al.*, 2013).

6.5 Obtenção de culturas monospóricas e conservação dos isolados

De cada amostra coletada dos tratamentos, com presença de colônias, foi extraído um disco de micélio de 4 mm de diâmetro, contendo conídios e transferido para um tubo de ensaio contendo 10 mL de água destilada estéril (ADE). Esse disco sofreu agitação dentro do tubo afim de provocar em suspensão os conídios.

Ocorreu a extração de 100 µL da suspensão de conídios com uma micropipeta, plaqueadas em placas de 9 cm de diâmetro contendo meio AA (ágar-água) 2 % e homogeneizada em sua superfície. As placas foram colocadas em estufa durante 12 horas em BOD a 25°C. Sob microscópio estereoscópico, os conídios germinados foram coletados com uma agulha flambada e armazenados em placas contendo meio BDA, as quais foram levadas em câmara BOD, para o desenvolvimento das colônias monoconidiais.

Os isolados obtidos foram mantidos em água destilada esterilizada (CASTELLANI, 1939) e em tubos de ensaio contendo meio BDA a uma temperatura de 4°C para posterior análise

O pH do solo foi determinado em intervalos de tempos de 10 dias, 1 mês, 3 meses, 6 meses e 12 meses. Amostras dos substratos foram coletadas de cinco repetições de cada tratamento.

Para obter o pH foram pesadas 10g de substrato em pote plástico com tampa, em duplicata e adicionadas 25 mL de água bidestilada. A suspensão foi agitada por 15 minutos a 120 rpm. Após um intervalo de 3 horas foi efetuada a leitura em pHmetro Digimed.

6.6 Atividade Microbiana

A avaliação total da atividade microbiana do substrato foi realizada pelo método da hidrólise de diacetato de fluoresceína (FDA) descrito por Boehm e Hoitink (1992). Para a hidrólise de FDA foram adicionadas 5g de cada amostra de substrato, em triplicata, em Erlenmeyer de 250 mL, com 20 mL de tampão fosfato de potássio 60mM (8,7g de K_2HPO_4 , 1,3g de KH_2PO_4 ; 1000mL de água destilada; pH 7,6).

A reação de hidrólise de FDA começou com a incorporação de 0,2 mL da solução estoque de FDA (Sigma Chemical Co.). As soluções foram agitadas a 160 rpm e incubadas a temperatura ambiente, cerca de 20 minutos.

O processo foi paralisado com a adição de 20 mL de acetona P.A. por recipiente. Posteriormente as amostras foram filtradas, utilizando-se papel de filtro Watman nº 1, sendo os filtrados recolhidos em tubo de cultura e tampados para que não ocorra a evaporação da acetona.

Em seguida, em espectrofotômetro, foi determinada a absorbância dos filtrados a 490 nm. A concentração de FDA hidrolisado (μg de FDA hidrolisado g^{-1} de substrato seco por minuto) foi determinada com auxílio da curva padrão por meio da correlação com a absorbância lida na amostra e o FDA hidrolisado.

A curva foi obtida adicionando-se FDA nas concentrações de 0, 100, 200, 300 e 400 μg , em 5 mL de solução tampão fosfato de potássio, presentes no tubo de ensaio. Os tubos foram vedados e postos em banho-maria a 100° C por uma hora para a hidrólise total do FDA. Após a hidrólise, o FDA foi adicionado a

Erlenmeyer de 250 mL contendo 5g de substrato em 10 mL de tampão fosfato de potássio, com três repetições.

Em um agitador a 160 rpm os Erlenmeyers foram adicionados à temperatura ambiente, durante 20 minutos, após a agitação foi adicionado imediatamente 20 mL de acetona em cada frasco para bloquear a reação. Depois, as amostras foram filtradas e recolhidas para determinação da absorbância em espectrofotometria a 490 nm.

As análises dos atributos químicos dos substratos foram realizadas no Laboratório de Química da Fatec / Araçatuba pelo método holandês com extração 1:1,5 (substrato: água), segundo Sonneveld et al. (1974) e Sonneveld e van Elderen (1994).

6.7 Extração de DNA e análise dos isolados

A extração direta de DNA do substrato, bem como sua imediata amplificação pela reação em cadeia da polimerase (PCR) com o uso de técnicas que formam perfis de comunidades (fingerprinting) favorecem um meio para estudar as características taxonômicas e funcionais dos fungos.

Há várias técnicas moleculares que proporcionam a criação de perfis de comunidades fungicas do solo. Em seu trabalho Kennedy e Clipson (2003), descrevem como principais a de eletroforese em gel com gradiente desnaturante ou denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE), eletroforese em gel com gradiente temperatura ou temperature gradient gel electrophoresis (TGGE),

polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição terminais ou terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP), polimorfismo de conformação de fita simples (single strand conformation polymorphism (SSCP)) e análise de espaçadores intergênicos ribossomais automatizados ou automated ribosomal intergenic spacer analysis (ARISA).

Para a extração do DNA do solo utilizou-se o kit FastDNA Spin for Soil seguindo recomendações do fabricante (Bio 101, Vista, Califórnia). Em microtubos contendo granada finamente moída, foram adicionados cerca de 0,6 g de solo, 978 µL de tampão fosfato e 122 µL de tampão MT. Os tubos foram agitados horizontalmente por 30 segundos a velocidade de 5.5, em um FP120 Fast Prep Cell Disruptor (Bio 101, Vista, Califórnia).

O DNA purificado foi recolhido em um tubo limpo e sua quantificação feita por comparação com padrão de massa, após eletroforese em gel de agarose 1,0 % - 0,5x TBE (1x TBE: 44 mM de Tris-borato e 1 mM de EDTA pH 8,0), utilizando-se um densitômetro laser FluorImagem (Amersham Biosciences) e o programa Fragment Analysis (Amersham Biosciences). Como padrão de tamanho e quantidade de DNA foi utilizado o marcador de massa DNA Mass Ladder (Invitrogen).

Do substrato aonde as amostras foram cultivadas, ocorreu a extração do DNA dos isolados antes e após a inoculação com as cepas de *Fusarium oxysporum* e *Fusarium solani* e posteriormente com a aplicação dos fungicidas comerciais analisados. Para a extração de DNA, os isolados fúngicos foram cultivados em meio de cultura BDA e foram incubados a 25 °C por uma semana.

O micélio dos fungos presentes em discos de BDA foram colocados em 60 ml de meio líquido extrato de levedura (10 g de extrato de levedura, 10 g de dextrose, 10^{-1} M de ampicilina, 1 l de H₂O destilada), incubados a 27 °C, agitados a 120 rpm por uma semana.

Após este período ocorreu a lavagem do micélio em água destilada estéril, coletado por filtração a vácuo e liofilizado. As extrações dos DNAs foram efetuadas pelo método CTAB (cetil-trimetil brometo de amônio) (ZOLAN; PUKILLA, 1986).

Finalizada a etapa de extração, quantificou-se os DNAs em fluorímetro, procedendo-se as diluições para a concentração final de 10 ng/μl. Para a amplificação, foram utilizados os primers específicos.

Em seguida começou a etapa de desnaturação com ciclos de amplificação a 95 °C por cerca de 4 min, em sequência começou a etapa de anelamento a 55 °C por 1 min e uma etapa de extensão a 72 °C por 2 min.

Após 40 ciclos, finalizando com a etapa de extensão a 72 °C por 5 min.

Em seguida, foi realizada a amplificação da sequência do gene 5.8S rDNA, do patógeno *Fusarium sp.*, utilizando os *Primers* (ITS1/ITS4) de aproximadamente 570 bp, ITS1 F 5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG e 3' ITS4 R 5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3'.

A etapa efetuada antes do plantio e após o plantio em um período de 10 dias, 30 dias, 90 dias, 180 dias e 360 dias foi realizado o procedimento com *Primers* RAPD (Polimorfismo de DNA Amplificado) F (5' CATACCACTTGTTGCCTC 3') e R (5' ATTAACGCGAGTCCCACC 3'), para detecção de *Fusarium oxysporum* e *Fusarium solani* de aproximadamente 450 bp por meio do PCR *nested* em amostras de solo, para testar a eficiência química dos fungicidas.

Para determinar a presença de rizobactérias do gênero *Bacillus sp* foram utilizados os *primers* do gene 16S rRNA, F 5' TGA AAA CTG AAC GAA ACA AAC 3' e R 5' CTC TCA AAA CTG AAC AAA ACG AAA 3', para amplificação de aproximadamente 800 bp. O material obtido pela PCR foi purificado por meio do kit Wizard®SV Gel and PCR Clean-up System (Promega).

Posteriormente, os eletroferogramas foram analisados visualmente com o auxílio do software SeqAssem. Em seguida, as sequências editadas foram comparadas com a base de dados GenBank, do National Center for Biotechnological Information – NCBI, por meio do programa AlignmentSearch Tool Basic Local – BLAST (<http://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST/>).

Para a extração do DNA genômico, os patógenos dos isolados fúngico estavam cultivados em meio de cultura BDA e foram incubados a 27 °C por uma semana. O micélio dos fungos presente em disco de BDA foram colocados em 60 ml de meio líquido extrato de levedura (10 g de extrato de levedura, 10 g de dextrose, 10 –1 M de ampicilina, 1 l de H₂O destilada), incubados a 27 °C, agitados a 120 rpm por uma semana. Após este período ocorreu a lavagem do micélio em água destilada estéril, coletado por filtração a vácuo e liofilizado. A extração dos DNAs genômico dos gêneros *Bacillus* e *Fusarium* foram efetuadas pelo método CTAB (cetil-trimetil brometo de amônio) (ZOLAN; PUKILLA, 1986). Finalizada a etapa de extração, quantificou-se os DNAs em fluorímetro, procedendo-se as diluições para a concentração final de 10 ng/μl.

6.7.1 PCR (reação em cadeia de polimerase) e sequenciamento

Para a amplificação dos fragmentos do gene da subunidade 16S do rRNA e 5.8S do rDNA foram utilizados os primers específicos para os gêneros de *Bacillus sp.* e *Fusarium sp.*, respectivamente. Em seguida, começou a etapa de desnaturação com ciclos de amplificação a 95 °C por cerca de 4 min, em sequência se iniciou a etapa de anelamento a 55 °C por 1 min e uma etapa de extensão a 72 °C por 2 min. Após 40 ciclos, finalizando com a etapa de extensão a 72 °C por 5 min. O fragmento amplificado, resultante da PCR, foi purificado utilizando-se o kit “GFX PCR DNA band purification®” (GE Health Sciences, Champain, Illinois, USA) e seqüenciado com utilização do DYEnamic®ET dye terminator Cycle Sequencing Kit® (GE Health Sciences, Champain, Illinois, USA) no MegaBACE® (GE Health Sciences, Champain, Illinois, USA) e sequenciado com utilização do DYEnamic®ET dye terminator Cycle Sequencing Kit® (GE Health Sciences, Champain, Illinois, USA) no MegaBACE® (GE Health Sciences, Champain, Illinois, USA).

O alinhamento e tradução das sequências de nucleotídeos e edição final A determinação das sequências consenso foi realizada utilizando-se o programa CodonCode Aligner v. 2.0.4 (CodonCode Corporation, Dedham, Massachusetts, USA). Foram considerados somente os nucleotídeos com valor de qualidade de sequenciamento maior ou igual a 20.

Para a extração do DNA genômico, os patógenos dos isolados fúngicos estavam cultivados em meio de cultura BDA e foram incubados a 27 °C por uma semana. O micélio dos fungos presente em disco de BDA foram colocados em 60 ml de meio líquido extrato de levedura (10 g de extrato de levedura, 10 g de

dextrose, 10 –1 M de ampicilina, 1 l de H₂O destilada), incubados a 27 °C, agitados a 120 rpm por uma semana.

Após este período ocorreu a lavagem do micélio em água destilada estéril, coletado por filtração a vácuo e liofilizado. A extração dos DNAs genômico dos gêneros *Bacillus* e *Fusarium* foram efetuadas pelo método CTAB (cetil-trimetil brometo de amônio) (ZOLAN & PUKILLA, 1986). Finalizada a etapa de extração, quantificou-se os DNAs em fluorímetro, procedendo-se as diluições para a concentração final de 10 ng/μl.

Para a amplificação dos fragmentos do gene da subunidade 16S do rRNA e 5.8S do rDNA foram utilizados os primers específicos para os gêneros de *Bacillus* sp. e *Fusarium* sp, respectivamente. Em seguida, começou a etapa de desnaturação com ciclos de amplificação a 95 °C por cerca de 4 min, em sequência se iniciou a etapa de anelamento a 55 °C por 1 min e uma etapa de extensão a 72 °C por 2 min.

Após 40 ciclos, finalizando com a etapa de extensão a 72 °C por 5 min. O fragmento amplificado, resultante da PCR, foi purificado utilizando-se o kit “GFX PCR DNA band purification®” (GE Health Sciences, Champain, Illinois, USA) e seqüenciado com utilização do DYEnamic®ET dye terminator Cycle Sequencing Kit® (GE Health Sciences, Champain, Illinois, USA) no MegaBACE® (GE Health Sciences, Champain, Illinois, USA) e sequenciado com utilização do DYEnamic®ET dye terminator Cycle Sequencing Kit® (GE Health Sciences, Champain, Illinois, USA) no MegaBACE® (GE Health Sciences, Champain, Illinois, USA).

O alinhamento e tradução das sequências de nucleotídeos e edição final A determinação das sequências consenso foi realizada utilizando-se o programa

CodonCode Aligner v. 2.0.4 (CodonCode Corporation, Dedham, Massachusetts, USA). Foram considerados somente os nucleotídeos com valor de qualidade de sequenciamento maior ou igual a 20.

Após determinação das sequências consenso, elas foram alinhadas com sequências homólogas disponíveis no GenBank, com auxílio dos programas Clustal W (THOMPSON et al., 1997) e Bioedit Sequence Alignment Editor (HALL, 1999).

O fragmento amplificado pela PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 1,4% com 0,5 mg/ml de brometo de etídeo, imerso em tampão TBE (Tris Borato 90,0 mM, EDTA 1,0 mM, pH 8,0) a 80 V. Pela comparação com um marcador molecular de 100 pb (Gibco-BRL, Gaithersburg, MD, USA) foi estimado o tamanho do produto amplificado.

6.8 Inoculação Em Sementes e Avaliação da Taxa De Germinação

O contágio do patógeno com as sementes ocorreu em meio de cultura com restrição hídrica em discos com 7 mm de diâmetro, contendo micélio e esporos de *F. oxysporum* e *F. solani* que foram transferidos para placas de Petri contendo meio de cultura BDA modificado (restrição hídrica) com sacarose no potencial hídrico - 0,6 MPa (COSTA et al., 2003).

As placas foram colocadas em câmara crescimento por quinze dias a temperatura de $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ e com fotoperíodo de 12 h.

Em seguida foram utilizadas quarenta placas (20 para cada patógeno) que apresentavam colônia fungicas com crescimento completo no diâmetro total de 9 cm, 4 placas livres de patógenos para o uso do controle, totalizado quarenta e

quatro placas. Nelas foram depositadas cerca de cinquenta sementes em cada placa, distribuídas em grupos de 10 sementes, levemente prensadas sobre o meio.

A incidência de *Fusarium oxysporum* e *Fusarium solani* nas sementes testadas foi realizada por meio do método do papel de filtro, sendo que estas foram retiradas após 48h e postas para secar sobre papel filtro em temperatura ambiente (COSTA et al., 2003). Foi empregado um delineamento inteiramente casualizado, com 11 tratamentos e quatro repetições de 50 sementes.

Após o período de incubação, as sementes foram examinadas, com o auxílio de microscópio estereoscópio determinando-se a incidência dos fungos presentes nas sementes.

A germinação das sementes foi avaliada empregando-se o método do rolo de papel. O delineamento estatístico utilizado foi o inteiramente casualizado com quatro repetições de 50 sementes cada. A germinação foi determinada contando-se o número de plântulas não afetadas, dez dias após a incubação, sendo o resultado expresso em porcentagem.

Os resultados obtidos, tanto nos experimentos de laboratório quanto os de estufa agrícola foram submetidos à análise de variância e submetidos ao teste de Tukey, com o auxílio "software" STAT®.

6. 9 Fungicidas Comerciais Testados *in vitro*

Os fungicidas testados nos tratamentos com as respectivas doses de i.a./ 100 kg de sementes: Azoxystrobina + Ciproconazol (45,0 mL), Captana (150,0 g), Carbendazim (500,0 g), Clorotalonil + Tiofanato metílico (500,0 mL), Fludioxonil (5,0

mL), Iprodiona (500 mL), Tebuconazole (5,0 mL), Thiabendazole (30,0 mL), Tiofanato metílico (75,0 mL) e Triticonazole (75,0 g), conforme descritos no Quadro 3 abaixo.

Quadro 3. Fungicidas utilizados nos bioensaios do controle *in vitro* de *Fusarium*.

Ingrediente ativo	Nome comercial	Grupo químico	Tipo	CIA ¹
Azoxistrobina + Ciproconazol	Priori Xtra (SC)*	Estrobirulina Triazol	Sistêmico	200g/Kg 80g/L
Captana	Captan (SC)	Dicarboximida	Preventivo	480g/L
Carbendazim	Derosal 500 (SC)	Benzimidazol	Sistêmico	500g/L
Clorotalonil + Tiofanato metílico	Cerconil (WP)*	Isoftalonitrila Benzimidazol	Sistêmico	500g/Kg 200g/Kg
Fludioxonil	Maxim XL (SC)	Acilalaninato Fenilpirrol	Contato Sistêmico	10g/L 25g/L
Iprodiona	Rovral(SC)*	Dicarboximida	Contato	500g/Kg
Tebuconazole	Folicur 200 (EC)	Triazol	Sistêmico	200g/L
Thiabendazole	Tecto(SC)	Benzimidazol	Sistêmico	500 g/L
Tiofanato metílico	Cercobin 700 (WP)	Benzimidazol	Sistêmico	700g/L
Triticonazole	Comet (EC)	Estrobirulina	Sistêmico	250 g/L

¹Concentração do ingrediente ativo, * fungicidas não específicos para o gênero *Fusarium*

Fonte: <http://www.agro.basf.com.br>

6.10 Análise estatística

Os dados referentes à taxa de crescimento de *F. solani* e *F. oxysporum* foram submetidos à análise de variância e as médias agrupadas pelo teste Scott-Knott a 5 % de probabilidade, utilizando-se o programa estatístico SAEG 9.1.

7. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As esporulações das espécies testadas desenvolveram na região da superfície exposta da folha é pouco ou ausente no meio de cultura. Para ambos os fungos, *Fusarium oxysporum* e *Fusarium solani*, o micélio e os corpos de frutificação formados no meio começaram a ser observados a partir do 10º dia de incubação (Figuras 7 e 8).

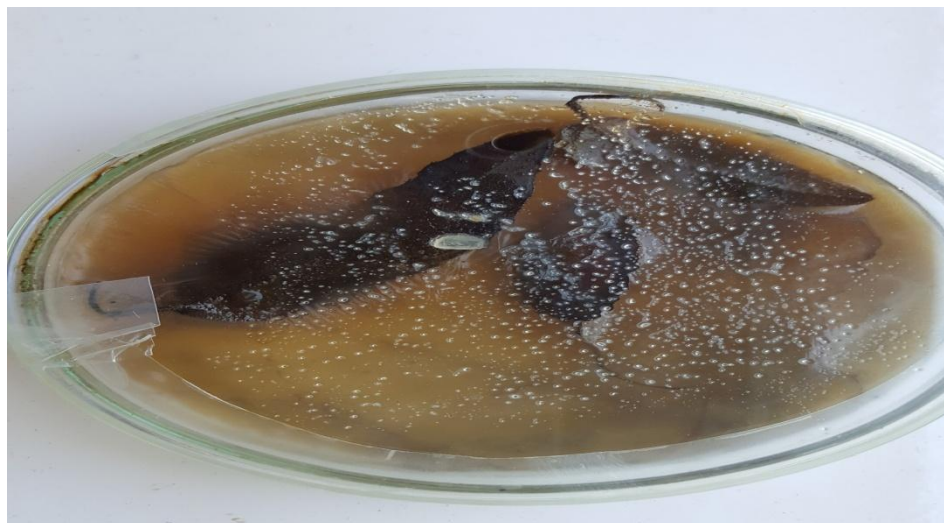


FIGURA 7. Inoculações de *Fusarium oxysporum* em folhas de *Eucalyptus* “in vitro” com 7 dias.

Fonte: Autor



FIGURA 8. Inoculações de *Fusarium solani* em folhas de *Eucalyptus* “in vitro” com 7 dias.

Fonte: Autor

Quanto maior a área inoculada, maior foi a produção de micélio e esporulação, fato observado nas folhas inteiras, provavelmente por abrigar uma maior quantidade de nutrientes comparado as folhas picadas separadas de eucaliptos. Em folhas picadas a esporulação também ocorreu, mas não de forma acentuada. A temperatura não foi alterada na estufa microbiológica durante o tratamento, ficando em torno de 28° C, Gupta e colaboradores (2010) avaliaram que *F. oxysporum* f. sp. *psidii* e *F. solani*, apresentavam as maiores taxas de crescimento da colônia quando mantidos a 28° C.

Todos os isolados de *Fusarium oxysporum* e *Fusarium solani* mostraram se virulentos ao eucalipto pela metodologia empregada, não havendo diferença quanto a agressividade, todos apresentaram um efetivo ataque e possível esporulação, quando inoculados em folhas jovens e saudáveis de eucalipto (Figura 9).



FIGURA 9. Inoculações de *Fusarium oxysporum* em folhas de *Eucalyptus* “in vitro” com 14 dias.

Fonte: Autor

Para a obtenção de isolados de *F. oxysporum* e *F. solani* em mudas saudáveis com inoculação dos mesmos durante intervalo de tempo, foram utilizadas cerca de 600 plântulas de *Eucalyptus grandis* com 10 dias de emergência (Figuras 10) que não foram tratadas com nenhum tipo de fungicida utilizadas em cada tratamento (300 por bandeja) com a infecção por *F. oxysporum* e *F. solani*.



FIGURA 10. Mudanças de *E. grandi* saudáveis com 10 dias de emergência.

Fonte: Autor

Decorrentes 10 dias após a infecção os tratamentos que apresentavam sintomas semelhantes da doença murcha de *Fusarium* (amarelecimento e murcha) foram coletadas nos períodos preestabelecidos de 10, 30 e 90 dias (Figuras 11, 12, 13 e 14), estava previsto para serem coletadas aos 180 e 360 dias, mas neste período não havia mais mudas pois todas já haviam morrido.



FIGURA 11. Mudanças de *E. grandis* infectada pelo *Fusarium solani* com 30 dias após contágio.

Fonte: Autor

A coleta foi ao acaso em cada um dos tratamentos, coletando cinco exemplares de cada, que visualmente não apresentava diferença entre os sintomas visíveis.



FIGURA 12. Mudanças de *E. grandis* com sintomas do ataque pelo *Fusarium oxysporum* com 60 dias após contágio.

Fonte: Autor

A coleta também ocorreu ao acaso em cada um dos tratamentos, coletando cinco exemplares de cada, os quais visualmente não aparentavam diferenças entre os sintomas visíveis, porém houve perda de exemplares entre o período de 30 dias de 38% para *F. oxysporum* e de 34% para *F. solani*.



FIGURA 13 Mudas de *E. grandis* infectada pelo *Fusarium solani* após 90 dias do contágio.

Fonte: Autor

A coleta sempre ao acaso em cada um dos tratamentos, coletando cinco exemplares de cada, os mesmos visualmente não aparentavam diferença entre os sintomas, porem a perda de exemplares entre o período de 60 dias foi de 22% para *F. oxysporum* e de 25% para *F. solani*



FIGURA 14. Mudanças de *E. grandis* infectada pelo *Fusarium oxysporum* após 180 dias do contágio.

Fonte: Autor

A coleta também ocorreu ao acaso em cada um dos tratamentos, coletando cinco exemplares de cada, visualmente não aparentava diferença entre os sintomas visíveis, porém a perda de exemplares entre o período de 90 dias foi de 82% para *F. oxysporum* e de 74% para *F. solani*.

Não ocorreram mais coletas previstas pois nenhuma das mudas contaminadas por ambos fungos sobreviveu. Todos os isolados coletados neste período conferem aos respectivos agentes infectantes.

Todas as partes coletadas foram armazenadas conforme descrição e realizada a análise do DNA conferindo os patógenos *Fusarium oxysporum* e *Fusarium solani*, os quais demonstram efeitos danosos ao cultivar, não sobrando nenhum exemplar para as análises previstas posteriores.

A germinação ocorreu dentro dos primeiros seis dias após a semeadura, em média foram 600 sementes para cada bandeja de tratamento, totalizando cerca de 6600 sementes. Na primeira semana após o plantio não foi possível realizar a mensuração do número de plântulas devido ao pequeno porte das mesmas, mas pode-se observar que o número de sementes germinadas do tratamento com fungicidas foi maior do que tratamento sem fungicidas.

Na segunda semana após a semeadura observou-se que tanto a germinação como a altura das plântulas foi maior no tratamento com fungicidas, com altura máxima de 2,6 cm para o tratamento com fungicidas e 2,5 cm para o tratamento sem fungicidas.

Durante a terceira semana após a semeadura, ocorreu uma queda na quantidade de sementes germinadas no tratamento sem fungicidas, provavelmente pela ação de ambos patógenos, ocasionando a morte de algumas delas, resultados apresentaram uma variação significativa.

Durante a quarta semana de análise, aumentou a queda na quantidade de plântulas germinadas no tratamento sem fungicidas e ocorreram novas germinações (provavelmente em dormência e/ou carga genética diferente) no tratamento com fungicidas (Figura 15) .



FIGURA 15. *E. grandis*, com 30 dias após plantio .

Fonte: Autor

Não ocorreram muita germinação (Figura 16) nos tratamentos infectados, cujos resultados refletem na redução do número de mudas.



FIGURA 16. Não emergência de sementes Infectadas com cepas *F. oxysporum* sem fungicidas com 10 dias de plantio .

Fonte: Autor

Este tipo de perda na quantidade de germinação (Quadro 4) é esperada pela ação dos patógenos inoculados no solo, o que na prática iria requerer uma maior área de canteiros, para suprir às necessidades de plantio, tornando inviável a prática agrícola, pelo gasto obtido.

Quadro 4 – Número de plântulas do *E. grandis* com 30 dias e 90 dias..

	30 dias	90 dias
Controle (sem infecção)	476	432
Infectado com cepas <i>F. oxysporum</i>	183	147
Infectado com cepas <i>F. solani</i>	169	044

Fonte: Autor

Entre os principais sintomas observados foram o apodrecimento das raízes secundárias da planta, necrose da base da planta e clorose interneval das folhas.

Fato observado nas principais regiões produtoras de sementes do Sul e das regiões altas dos cerrados, podendo exterminar até 100% da plantação (FERREIRA et al., 1981; GAZZONI et al., 1995) e nas folhas desenvolveu-se um intenso amarelecimento (Figura 17), inicialmente nas folhas mais velhas, expandindo para as mais novas, podendo estar presente em apenas um lado da planta ou metade da folha.



FIGURA 17. Necrose da base da planta e das folhas decorrente a infecção de cepas *F. oxysporum* aos 90 dias do experimento.

Fonte: Autor

Observou que plântulas emergidas das sementes não inoculadas (controle) tiveram uma maior emergência avaliada aos 90 dias, porém não diferindo estatisticamente dos métodos de inoculação com os patógenos. Para a emergência aos 30 dias os diferentes tratamentos não demonstraram influência no desempenho das plântulas.

Esse amarelamento vai secando e murchando os folículos mas as folhas permanecem no caule. A região do xilema foliar e caulinar apresenta uma coloração parda de aparência seca (FURTADO, 2005).

O tratamento com inoculação de cepas *F. solani* apresentou uma perda de cerca de 90% da produção de mudas, enquanto o tratamento com a infecção de

cepas *F. oxysporum* apresentou uma perda de cerca 66% da produção de mudas aos 90 dias do experimento.

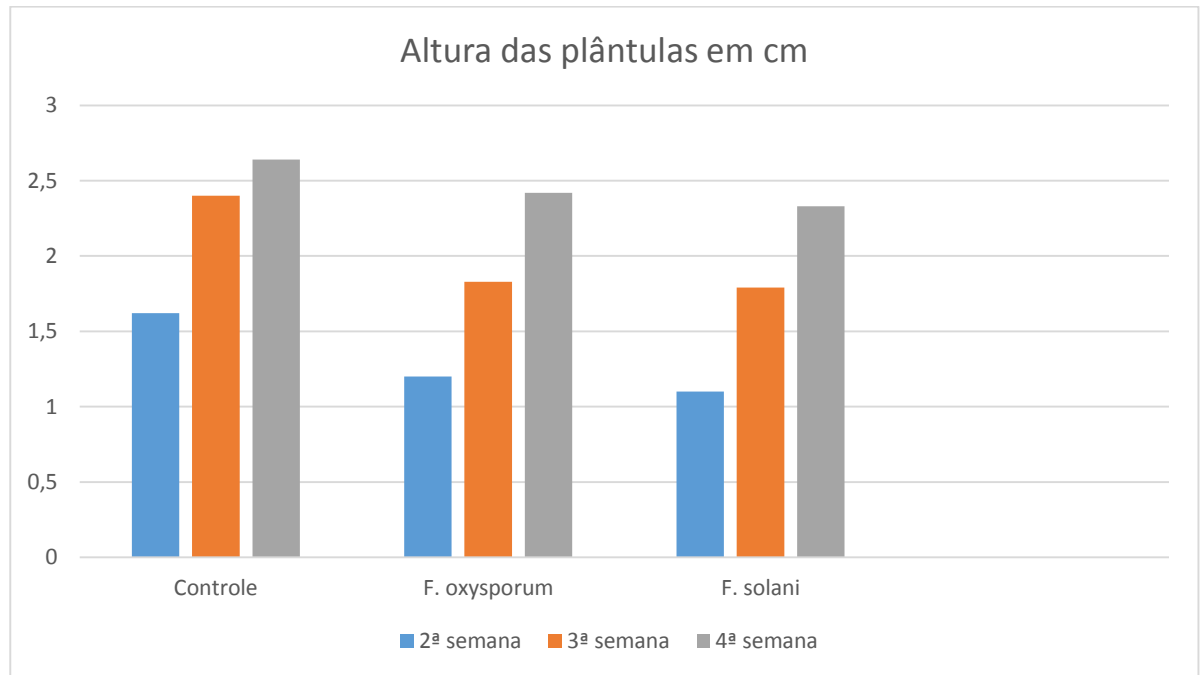
Não ocorreram mais análises nos intervalos de 180 e 360 dias pois não houve sobrevivência das mudas contaminadas pelos fungos. Todos os isolados coletados neste período conferem aos respectivos agentes infectantes.

Na análise dos resultados das taxas de germinação, altura das plântulas com Inoculação de *F. oxysporum* e *F. solani* e diretamente no solo com o plantio de sementes e uso de fungicidas comerciais para combate aos patógenos ocorreram por meio da germinação que ocorreu dentro dos primeiros seis dias após a semeadura, em média foram 600 sementes para cada bandeja de tratamento, totalizando cerca de 6600 sementes .

Na primeira semana após o plantio não foi possível realizar a mensuração do número de plântulas devido ao pequeno porte das mesmas, mas pode-se observar que o número de sementes germinadas do tratamento com fungicidas foi maior do que tratamento sem fungicidas.

O **Gráfico 1** demonstra o número médio de plântulas desenvolvidas ao longo do experimento, podendo ser evidenciado que o tratamento com fungicidas sem distinção entre eles, apresentou uma taxa de crescimento inferior ao tratamento sem fungicidas na segunda semana, sendo que no decorrer do experimento houve um crescimento, representando um resultado não significativo neste item.

Gráfico 1. Altura média das plântulas de eucalipto sem fungicidas (controle) e com fungicidas no controle de patógenos (*F. oxysporum* e *F. solani*) segundo a semana mensurada e seu respectivo erro padrão da média.



Fonte: Autor

De acordo com os testes estatísticos representados na Tabela 2, em relação à altura das plântulas desenvolvidas durante as quatro semanas do experimento, verificou-se que na primeira semana não foi possível calcular altura, pois as germinações estariam iniciando sua etapa, e nas semanas seguintes a altura média das plântulas dentro de cada tratamento não sofreu variação significativa. Entretanto entre eles ocorreu um coeficiente de variação significativo, sendo que o tratamento com fungicidas apresentou uma variação maior.

Tabela 2. Altura média em cm das plântulas de eucalipto sem fungicidas (Controle) e com fungicidas no controle de patógenos (*F. oxysporum* e *F. solani*) em diferentes semanas e seu respectivo desvio padrão e o coeficiente de variação.

Semana	TRATAMENTOS		
	Controle	<i>F. oxysporum</i>	<i>F. solani</i>
2 ^a	1,62 ± 0,50a	1,20 ± 0,54b	1,10 ± 0,44b
3 ^a	2,40 ± 0,53a	1,83 ± 0,62b	1,79 ± 0,57b
4 ^a	2,64 ± 0,61a	2,42 ± 0,84b	2,33 ± 0,80b
CV %	21,65	46,48	42,47

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si (p<0,05).

Fonte: Autor

As temperaturas medidas durante o experimento ficaram em torno de 28 ° C, tendo a mínima de 22 ° C e a máxima de 41° C fator que pode ter favorecido a alta patogenicidade nos primeiro meses, pois não ocorreram periodos chuvosos em variações drásticas na temperatura.

A estufa agrícola onde o experimento foi desenvolvido conta com um sistema de irrigação automatizado, programado a cada 6 horas 5 minutos de irrigação, mantendo boa umidade do ar, o que pode ser relativamente favorável ao desenvolvimento de patogenicidade de solo, associada às altas temperaturas, podendo agravar a ação fungica nos tratamentos, fato não observado mas já relatado por Landa *et al.*, (2004) em seu experimento utilizando o cultivar grão de bico, infectado com a murcha do *Fusarium*. As altas temperaturas afetam com

severidade a taxa de desenvolvimento dos sintomas da doença, bem como a expressão de resistência ou suscetibilidade de certos genótipos de grão-de-bico.

Fato semelhante foi constatado por Navas-Cortés *et al.* (2007) que em uma correlação positiva entre a temperatura do substrato e a severidade da murcha-de-fusarium, ressaltando que não somente temperaturas elevadas mas a umidade alta aceleram o processo infeccioso .

Quando analisada a média da altura dos tratamentos no intervalo de tempo entre 30 e 90 dias, demonstrado no Quadro 5, não há variação significativa entre as médias por tratamentos no período, sendo que ambos patógenos não diferem entre si .

Quadro 5. Alturas médias do *E. grandis*, em cm das mudas com 30 dias e 90 dias após plantio

Tratamento	30 dias	90 dias
Controle	4,10	28,07
Infectado com cepas <i>F. oxysporum</i>	2,96	21,47
Infectado com cepas <i>F. solani</i>	2,84	20,91

Fonte: Autor

Ocorreram a coleta de solo aos 10 dias, 30 dias, 90 dias, 180 dias e 360 dias após infecção com cepas de *F. oxysporum* e *F. solani* em ambos tratamentos os quais estavam sendo tratados com 10 tipos de diferentes fungicidas, conforme esta descrito no Quadro 6, cada amostra do substrato extraída neste período de tempo foi submetida ao teste de DNA para identificação dos patógenos.

Quadro 6. Amostras de solo tratados com fungicidas para o controle de *Fusarium oxysporum* e *Fusarium solani*, a marca” x “indica a presença do patógeno decorrente da análise do DNA

Tratamento		<i>F. oxysporum</i>					<i>F. solani</i>				
Fungicida	Dias	10	30	90	180	360	10	30	90	180	360
Azoxistrobina + Ciproconazol		x	x				x	x			
Captana		x	x	x	x		x	x	x		
Carbendazim							x	x			
Clorotalonil Tiofanato metílico		x	x				x	x	x		
Fludioxonil											
Iprodiona		x	x	x	x		x	x	x	x	
Tebuconazole		x	x								
Thiabendazole											
Tiofanato Metílico											
Triticonazole											

Fonte: Autor

O substrato orgânico natural é um ecossistema com muitas associações microbianas, tanto benéficas como patogênicas em relação aos cultivo agrícola.

Essas associações são muitos sensíveis a fatores químicos e/ou físicos do ambiente.

Em seu trabalho Anismisha e colaboradores (2012) descrevem que o uso de fungicidas químicos sistêmicos em culturas agrícolas não é viável, e pode ocasionar problemas ambientais, sendo incapazes de bloquear a infecção e colonização nas raízes pelo patógeno, entretanto deve-se sempre estar atendo as recomendações do fabricante quanto ao uso dos produtos e condições realmente necessárias de sua aplicação, fato não observado quando ao uso destes fungicidas neste trabalho.

Fatores como a estrutura química do pesticidas, as condições abióticas e bióticas, estabelecem a permanência do mesmo no meio ambiente (SILVA *et al.*, 2011). Os fungicidas sistêmicos testados são compostos extremamente seletivos, capazes de penetrar no cultivar e serem tóxicos com processos vitais inerentes aos patógenos, já os fungicidas preventivos e os de contato não atuam desta forma.

A degradação dos defensivos agrícolas no substrato deve-se a vários processos entre eles a volatilização, degradação química(hidrólise) ou fotodegradação. Porém observa-se que a perda da atividade biológica de ampla variedade de pesticidas é comprometida pela atividade da comunidade microbiana (CARDOSO; TSAI; NEVES, 1992; ALEXANDER, 1981).

O fungicida a base de Benzimidazol como o carbendazim demonstra pouca ação sob comunidade microbiana do solo, entretanto foi letal para oligoquetos. É extremamente tóxico para a comunidade aquática: anfíbios (efeitos genéticos e mortalidade), plantas aquáticas (reprodução), crustáceos (letalidade), peixes (bioacumulação e letalidade), fungos, (desenvolvimento e reprodução), moluscos (intoxicação e mortalidade) e plâncton (intoxicação, crescimento, reprodução e mortalidade) (PAN, 2006). Pouca ação para aves e atóxico para o gênero *Apis*.

No Quadro 7 esta descrito os fungicidas testados por um periodo de 10, 30, 90, 180 e 360 dias quanto a presença do gênero *Bacillus* no substrato, cada amostra do substrato extraída neste periodo de tempo foi submetida ao teste de DNA .

Quadro 7. Análise da presença do gênero *Bacillus* em amostras de solo tratados com fungicidas comerciais por um periodo de 10, 30, 90, 180 e 360 dias, “x” indica a presença do gênero .

Tratamento		<i>Bacillus</i>				
Fungicida	Dias	10	30	90	180	360
Controle		x	x	x	x	x
Azoxistrobina +Ciproconazol					x	x
Captana						
Carbendazim						
Clorotalonil +Tiofanato metílico						
Fludioxonil						
Iprodiona						
Tebuconazole		x	x	x	x	x
Thiabendazole						
Tiofanato Metílico						
Triticonazole		x	x	x	x	x

Fonte: Autor

Os tratamentos com os fungicidas Captana e Iprodina que possuem o grupo químico Diacarboximida não apresentavam mais a presença de bactérias do gênero

Bacillus após 10 dias de aplicação no substrato, já o tratamento com fungicida Clorotalonil + Tiofanato metílico (não penetra facilmente na cutícula da planta, insolúvel em água, menos sistêmico que os demais, recomendado para tratamento de solos) não apresentava mais após 90 dias do experimento podendo as mesmas terem anteriormente a este período terem sido eliminadas.

O fungicida Fludioxonil que apresenta dois grupos químicos o fenilpirool, que atua no ciclo da proteína quinase no processo de transdução de sinal, e o acilalaninato que atuam na síntese de ácidos nucleicos, na ação da enzima RNA polimerase, demonstrando uma taxa de germinação de 75% e mesma ação contra ambos patógenos.

Os tratamentos com o fungicida Ipodiona que possui dicarboximida como grupo químico, atua na síntese de lipídios e membrana inibindo a ação da coenzima NADH, do citocromo c na redutase e peroxidação, não teve efeito significativo neste experimento com taxas de germinação de 48,5 %. Não atuando de modo significativo no controle de ambos patógenos, fato que não foi evidenciado com o fungicida Captana que possui o mesmo princípio ativo e resultou em uma taxa de germinação baixa (65,5%) comparada aos demais tratamentos, mas não divergindo deles.

Os tratamentos que utilizaram o fungicida Clorotalonil (associado ao Tiofanato Metílico) que agem sobre funções múltiplas celulares, nas atividades multi-sítios, apresentaram taxas de germinação em torno de 70% com controle mediano nos patógenos .

A presença de rizobactérias na região da rizoesfera pode atuar como ação antagonica no desenvolvimento de patógenos, auxiliando a ação química.

A presença de microrganismos com ação antagonica a patógenos nos solos tem crescendo , porém um número limitado vêm sendo usado em escala comercial (HARMAN *et al.*, 2004).

O tratamento com o fungicida Tebuconazole que possuem o grupo químico Triazol não afetou a presença de bactérias do gênero *Bacillos* (Figura 18) durante todo o experimento, fato que não ocorreu com o tratamento Azoxistrobina + Ciproconazol, que apresentam também o composto Triazol na sua formulação, juntamente com a Estrobilutina, sendo que neste a presença de *Bacillus* manifestou-se nos 180 dias posterior a aplicação, permanecendo até o final do experimento. Provavelmente ocorreu a forma de resistência na presença do produto químico, o qual na degradação permitiu sua posterior manifestação.

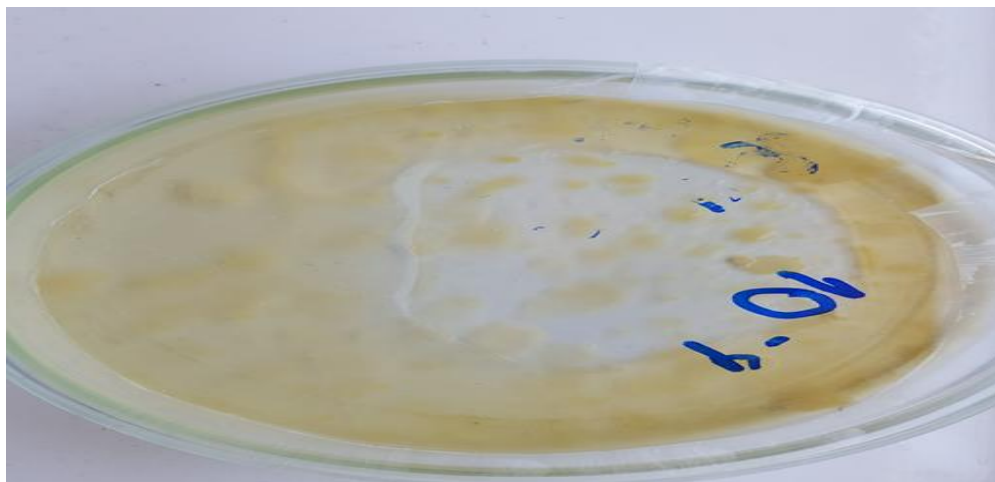


FIGURA 18. Colônias de *Bacillus* extraídas do tratamento com fungicida Tebuconazole aos 90 dias.

Fonte: Autor

Nos demais tratamentos avaliados a presença do gênero *Bacillus* não foi verificada, provavelmente não sobreviveram a aplicação dos fungicidas a base de Benzimidazo, Isoftalonitrila, Fenilpirrol e Acilalaninato .

Sob a ação de luz ultravioleta foram visualizadas as bandas de DNA e fotografadas pelo sistema de foto documentação Eagle Eye II (Stratagene).

O DNA dos isolados de *Fusarium* foram extraídos e amplificados eficientemente. O tamanho dos fragmentos amplificados foi de aproximadamente 600 pares de bases (pb) para o isolado de *Fusarium oxysporum* e *Fusarium solani*. Os fragmentos amplificados visualizados na mesma posição no gel de agarose foram considerados de mesmo tamanho.

Quando efetuada análise da presença de rizobactérias do gênero *Bacillus* no substrato onde serão inoculados os patógenos e os fungicidas comerciais a serem analisados obteve-se a presença de colônias das mesmas, conforme a Figura 19.

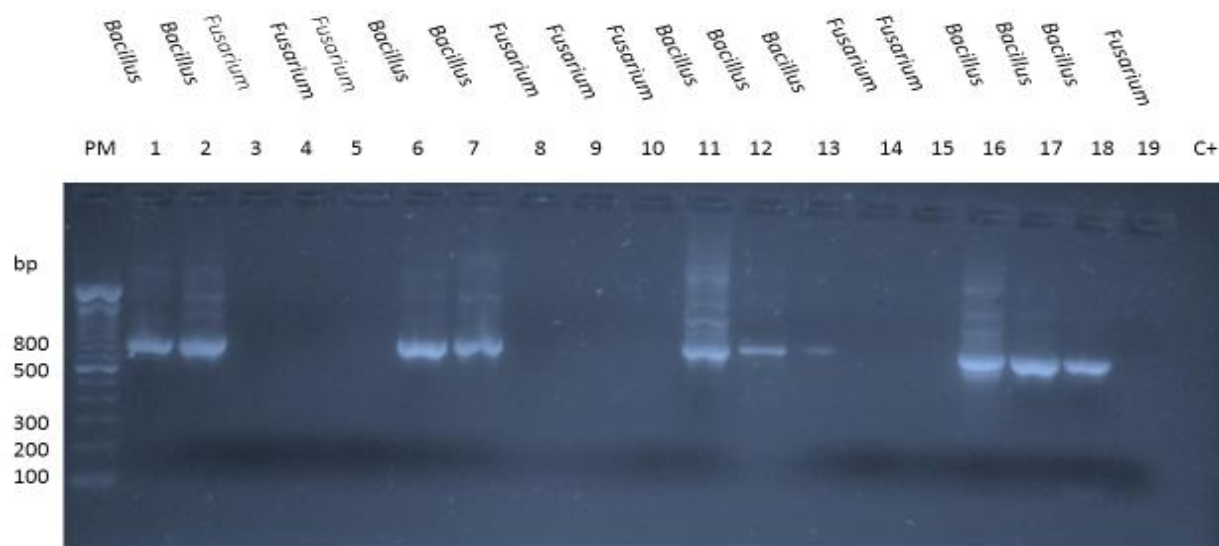


FIGURA 19. Análise da presença ou ausência de *Bacillus* sp (B). e *Fusarium* sp. (F) por meio da técnica molecular de PCR *nested*, em amostras de solo para o preparo do cultivo de Eucalipto. Amplificação de aproximadamente 800 bp do gene 16S rRNA de *Bacillus* sp. e amplificação do gene 5.8S rDNA do *Fusarium*. sp. de aproximadamente 570 bp.

Fonte: Autor

Após 10 dias da aplicação de fungicidas nos tratamentos, foi analisada a presença dos patógenos nos mesmos, sendo que as amostras testadas correspondem aos respectivos tratamentos conforme Quadro 8 abaixo

Quadro 8. Relação dos tratamentos com fungicidas comerciais na análise molecular por meio de PCR nested um período de 10 dias.

Tratamento	Número das amostras testadas	
	<i>F. oxysporum</i>	<i>F. solani</i>
Azoxistrobina +Ciproconazol	7	17
Captana	1	11
Carbendazim	14	12
Clorotalonil +Tiofanato metílico	6	13
Fludioxonil	3	10
Iprodiona	16	18
Tebuconazole	2	15
Thiabendazole	4	20
Tiofanato metílico	5	9
Triticonazole	8	19

Fonte: Autor

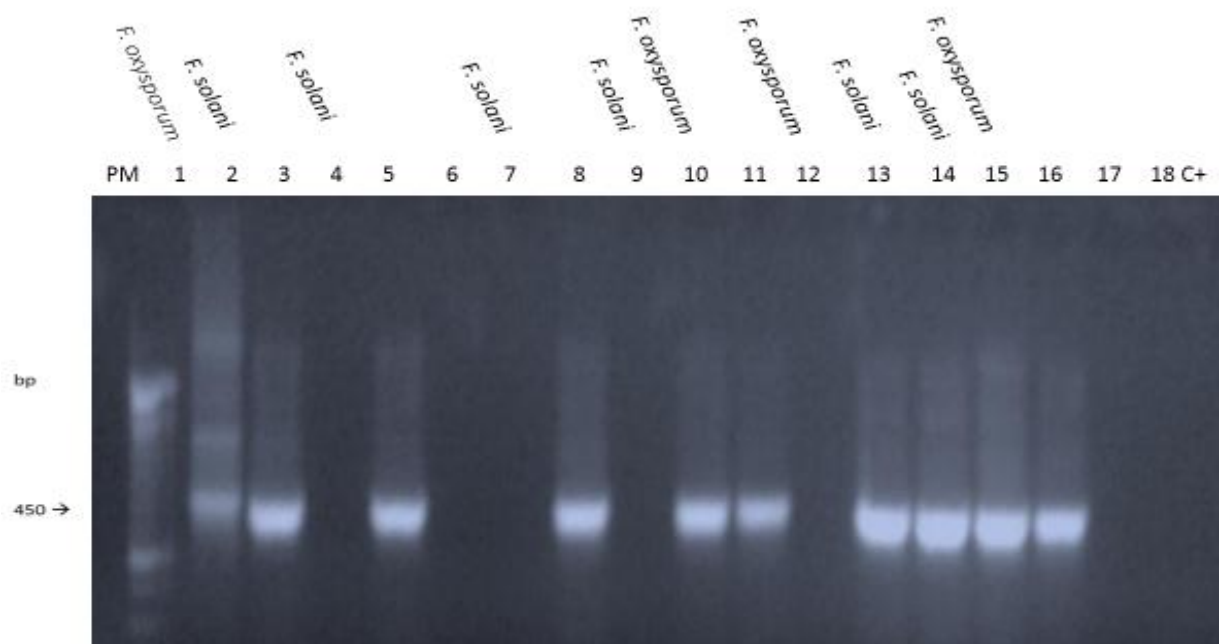


FIGURA 20. Resultado da análise molecular por meio de PCR nested para detecção de *Fusarium solani* e *Fusarium oxysporum* após 10 dias, em amostras de solo tratadas com fungicidas.

Fonte: Autor

Após 30 dias da aplicação de fungicidas nos tratamentos, foi analisada a presença dos patógenos nos mesmos, sendo que as amostras testadas correspondem aos respectivos tratamentos conforme Quadro 9 abaixo

Quadro 9. Relação dos tratamentos com fungicidas comerciais na análise molecular por meio de PCR nested um período de 30 dias.

Tratamento	Número das amostras testadas	
	<i>F. oxysporum</i>	<i>F. solani</i>
Azoxistrobina +Ciproconazol	15	13
Captana	1	14
Carbendazim	6	9
Clorotalonil +Tiofanato metílico	10	4
Fludioxonil	5	17
Iprodiona	12	2
Tebuconazole	7	11
Thiabendazole	3	16
Tiofanato metílico	Não testada	Não testada
Triticonazole	8	18

Fonte: Autor

As amostras coletadas dos tratamentos com o fungicida Tiofanato Metílico não foram testadas, conforme descrito na Figura 21, pois ocorreu uma perda do material armazenado, acreditando que não causou efeito significativo no resultado final, pois as mesmas amostras anteriormente não apresentavam os patógenos quando analisadas aos 30 dias.

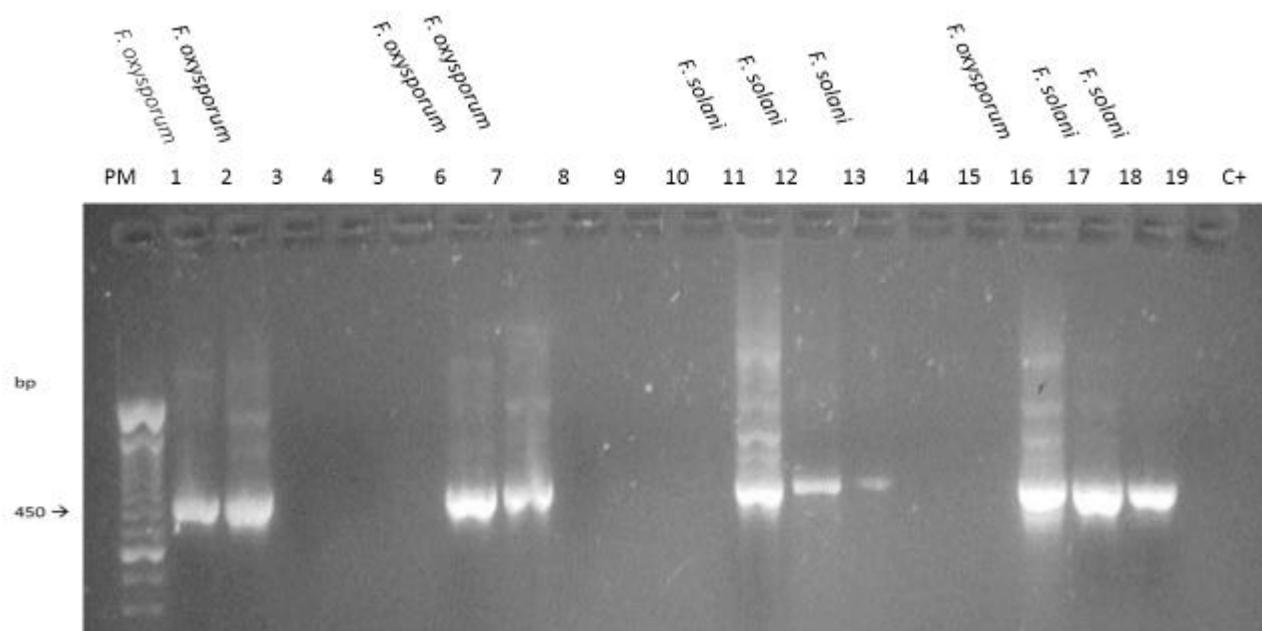


FIGURA 21. Resultado da análise molecular por meio de PCR nested para detecção de *Fusarium solani* e *Fusarium oxysporum* após 30 dias, em amostras de solo tratadas com fungicidas.

Fonte: Autor

Decorridos 90 dias da aplicação de fungicidas nos tratamentos, foi novamente analisada a presença dos patógenos nos mesmos, sendo que as amostras testadas correspondem aos respectivos tratamentos conforme Quadro 10 a seguir.

Quadro 10. Relação dos tratamentos com fungicidas comerciais na análise molecular por meio de PCR nested um período de 90 dias.

Tratamento	Número das amostras testadas	
	<i>F. oxysporum</i>	<i>F. solani</i>
Azoxistrobina +Ciproconazol	11	4
Captana	1	6
Carbendazim	3	9
Clorotalonil +Tiofanato metílico	12	10
Fludioxonil	Não testada	Não testada
Iprodiona	8	7
Tebuconazole	2	5
Thiabendazole	Não testada	Não testada
Tiofanato metílico	Não testada	Não testada
Triticonazole	Não testada	Não testada

Fonte: Autor

As amostras coletadas dos tratamentos com o fungicida Fludioxonil e Thiabendazole, Tiofanato Metílico e Triticonazole não foram testadas para nenhum patógeno em questão, pois já não os apresentavam em análises anteriores, conforme descrito na Figura 22, pois as mesmas amostras anteriormente não apresentavam os patógenos quando analisadas aos 30 dias.

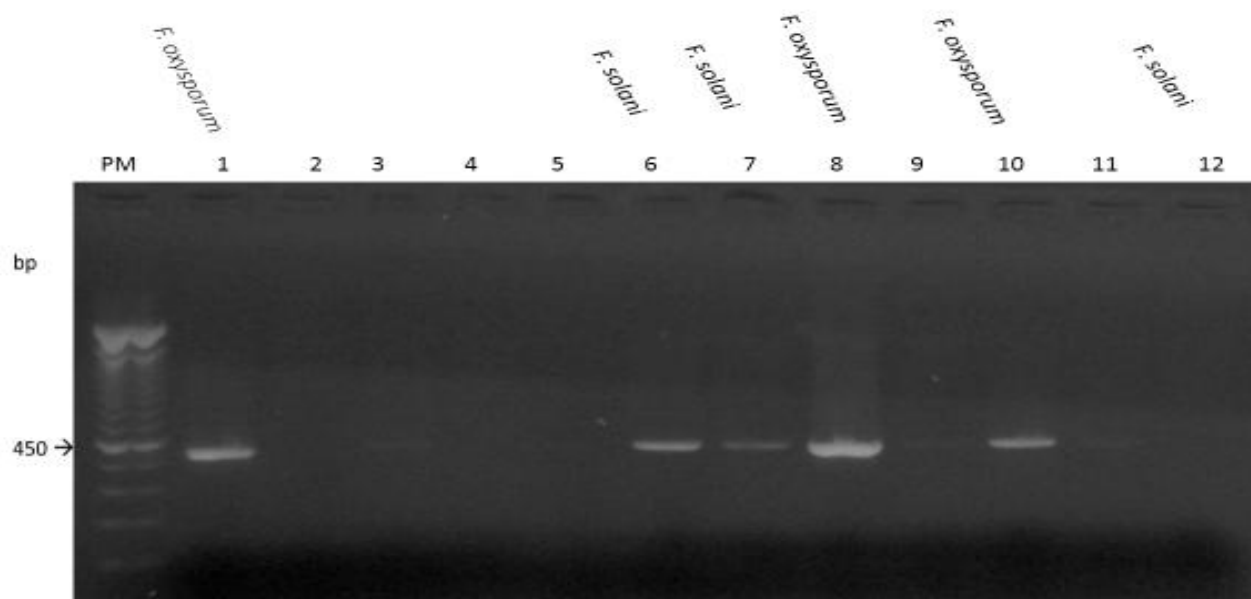


FIGURA 22. Resultado da análise molecular por meio de PCR nested para detecção de *Fusarium solani* e *Fusarium oxysporum* após 90 dias, em amostras de solo tratadas com fungicidas.

Fonte: Autor

Decorridos 180 dias da aplicação de fungicidas nos tratamentos, foi realizada nova análise da presença dos patógenos nos mesmos, sendo que as amostras testadas correspondem aos respectivos tratamentos conforme Quadro 11 abaixo.

Quadro 11. Relação dos tratamentos com fungicidas comerciais na análise molecular por meio de PCR nested um período de 180 dias.

Tratamento	Número das amostras testadas	
	<i>F. oxysporum</i>	<i>F. solani</i>
Azoxistrobina +Ciproconazol	1	19
Captana	9	8
Carbendazim	2	7
Clorotalonil +Tiofanato Metílico	3	10
Fludioxonil	4	20
Iprodiona	17	18
Tebuconazole	5	6
Thiabendazole	12	14
Tiofanato Metílico	11	13
Triticonazole	16	15

Fonte: Autor

Todas as amostras coletadas dos tratamentos foram testadas novamente e não ocorreu nenhuma divergência quanto aquelas que não possuíam mais os patógenos em análises anteriores, conforme descrito na Figura 23, pois as mesmas amostras anteriormente não apresentavam os patógenos quando analisadas aos 90 dias.

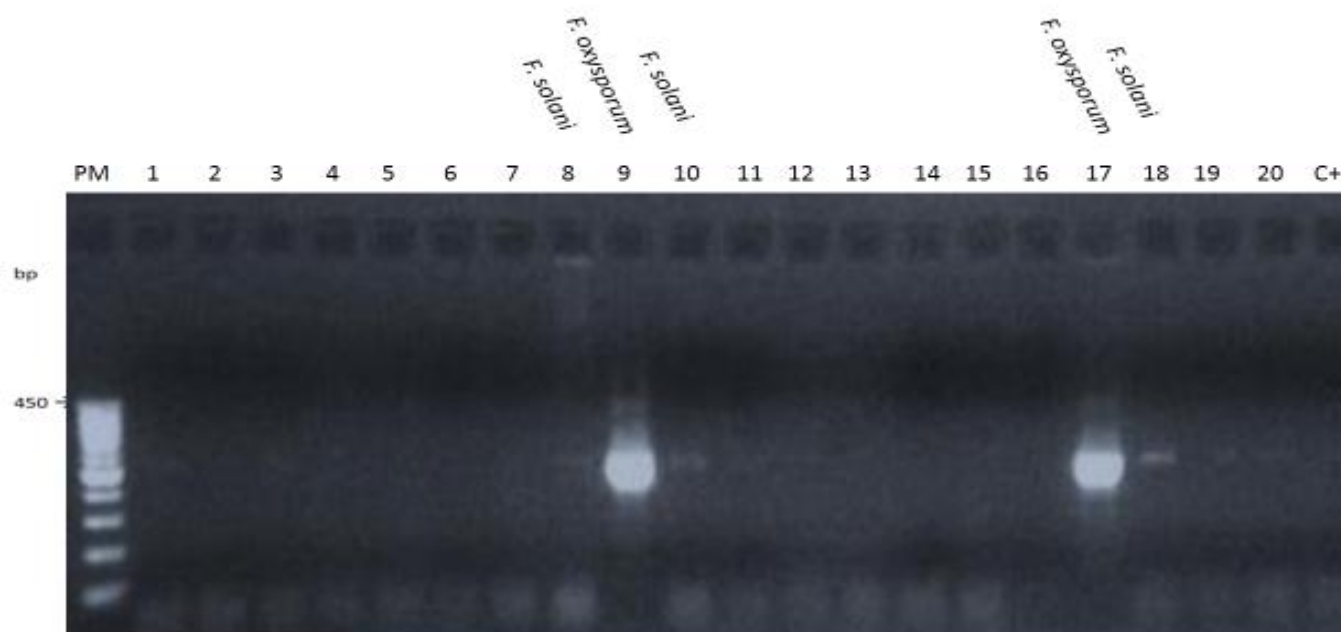


FIGURA 23. Resultado da análise molecular por meio de PCR nested para detecção de *Fusarium solani* e *Fusarium oxysporum* após 180 dias, em amostras de solo tratadas com fungicidas.

Fonte: Autor

Decorridos 360 dias da aplicação de fungicidas nos tratamentos, foi realizada nova análise a presença dos patógenos somente nos tratamentos que ocorriam reincidência, as amostras testadas correspondem aos respectivos tratamentos conforme Quadro 12 abaixo

Quadro 12. Relação dos tratamentos com fungicidas comerciais na análise molecular por meio de PCR nested um período de 360 dias.

Tratamento	Número das amostras testadas	
	<i>F. oxysporum</i>	<i>F. solani</i>
Azoxistrobina +Ciproconazol	Não testada	Não testada
Captana	1	5
Carbendazim	2	6
Clorotalonil +Tiofanato Metílico	3	7
Fludioxonil	Não testada	Não testada
Iprodiona	4	8
Tebuconazole	Não testada	Não testada
Thiabendazole	Não testada	Não testada
Tiofanato Metílico	Não testada	Não testada
Triticonazole	Não testada	Não testada

Fonte: Autor

Todas as amostras coletadas dos tratamentos com o foram testadas para novamente e não ocorreu nenhuma divergência quanto aquelas que não possuíam mais os patógenos em análises anteriores, conforme descrito na Figura 24.

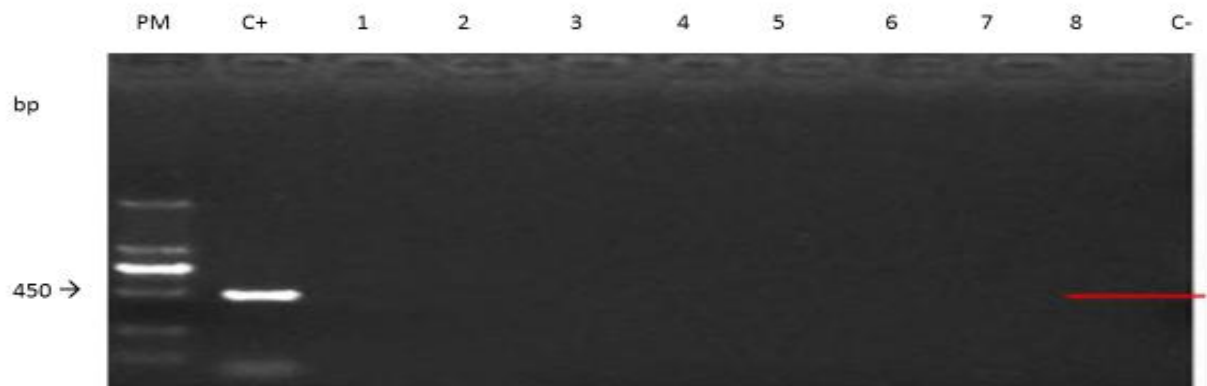


FIGURA 24 Resultado da análise molecular por meio de PCR nested para detecção de *Fusarium solani* e *Fusarium oxysporum* após 360 dias, em amostras de solo tratadas com fungicidas

Fonte: Autor

Nenhuma amostra possuía cepas de *Fusarium oxysporum* e *Fusarium solani*, aos 360 dias de análise, o que pode resultar em algumas hipóteses. Por se tratar de um ambiente controlado, restrito a nutrientes, os mesmos podem ter se esgotado, pode ter ocorrido a contaminação por outros agentes ocasionando uma competição e/ou predação dos patógenos, entre outros que necessitam de novas pesquisas para terem conclusões mais precisas.

Fungicidas e concentrações testadas *in vitro*

O uso do controle químico para combater doenças em plantas em muitos casos, é a única medida eficaz e financeiramente viável para assegurar alta produtividade e qualidade de produção, objetivadas pela agricultura moderna (AMORIM *et al.*, 2001).

Os fungicidas testados (Quadro 13) nos tratamentos com as respectivas doses de i.a./ 100 kg de sementes: Azoxystrobina + Difenconazol (45,0 mL), Captana (150,0 g), Carbendazim (500,0 g), Clorotalonil + Tiofanato metílico (500,0 mL), Fludioxonil (5,0 mL), Iprodiona (500 mL), Tebuconazole (5,0 mL), Thiabendazole (30,0 mL), Tiofanato metílico (75,0 mL), Tolyfluanida (75,0 g)

Quadro 13. Fungicidas utilizados nos bioensaios do controle *in vitro* de *Fusarium*.

Ingrediente ativo	Nome comercial	Grupo químico	Tipo	CIA ¹
Azoxistrobina + Ciproconazol	Priori Xtra (SC)*	Estrobirulina Triazol	Sistêmico	200g/Kg 80g/L
Captana	Captan (SC)	Dicarboximida	Preventivo	480g/L
Carbendazim	Derosal 500 (SC)	Benzimidazol	Sistêmico	500g/L
Clorotalonil + Tiofanato Metílico	Cerconil (WP)*	Isoftalonitrila Benzimidazol	Sistêmico	500g/Kg 200g/Kg
Fludioxonil	Maxim XL (SC)	Acilalaninato Fenilpirrol	Contato Sistêmico	10g/L 25g/L
Iprodiona	Rovral(SC)*	Dicarboximida	Contato	500g/Kg
Tebuconazole	Folicur 200 (EC)	Triazol	Sistêmico	200g/L
Thiabendazole	Tecto(SC)	Benzimidazol	Sistêmico	500 g/L
Tiofanato Metílico	Cercobin 700 (WP)	Benzimidazol	Sistêmico	700g/L
Triticonazole	Comet (EC)	Estrobilurina	Sistêmico	250 g/L

¹Concentração do ingrediente ativo, * fungicidas não específicos para o gênero *Fusarium*

Fonte: <http://www.agro.basf.com.br>

Entre estes controles químicos o uso de fungicidas sintéticos ou químicos (orgânicos e inorgânicos), de diversos grupos químicos veem aumento com princípios ativos gerais no controle de erradicar, proteger e/ou curativo até mesmo imunizante.

Os fungicidas testados no experimento atuam na mobilidade da planta de forma sistêmica (Azoxistrobina + Ciproconazol, Carbendazim, Clorotalonil + Tiofanato metílico, Fludioxonil, Tebuconazole, Thiabendazole, Tiofanato metílico e Triticonazole), por contato (Clorotalonil + Tiofanato, Fludioxonil e Iprodiona) e preventivo (Captana).

Os mais conhecidos pela eficácia de ação dentro das plantas são os de ação sistêmicos, sendo o mais conhecido o Benzimidazol, que agem na mitose dos patógenos, assim foram selecionados três tratamentos com este princípio, sendo estes o Carbendazim, o Thiabendazole e o Tiofanato Metílico, pois possuem alta seletividade, atuando pouco no metabolismo dos fungos.

Os resultados dos testes de laboratório apresentados na Tabela 16 mostram que os fungicidas Carbendazim, Thiabendazole e Tiofanato Metílico, Triticonazole controlaram *F. oxysporum* e *F. solani*, diminuindo significativamente a sua incidência nas sementes em comparação ao controle.

Os fungicidas Carbendazim, Thiabendazole e Tiofanato Metílico por se tratarem de fungicidas a base de benzimidazóis, bloqueiam a formação e a ação dos microtubulos, os quais atuam na formação do citoesqueleto, segregação cromossômica entre outros (SULLIVAN,1988).

O primeiro relato da atuação do fungicida Carbendazim foi nos microtubulos, mais precisamente na proteína tubulina, frelatado na década de 1970 em um

experimento com *Aspergillus nidulans* quando analisaram o fuso mitótico, o qual apresentou uma instabilidade nuclear durante o processo (HASTIE; GEORGOPOULOS, 1971).

Entre os fungicidas a base de triazol foi utilizado o Tebuconazole e o Ciproconazol (adicionada juntamente com o Azoxistrobina) os quais atuam impedindo a formação do lipídio ergosterol, importante na formação da membrana celular dos fungos, ocasionando um colapso do micélio e o bloqueio do crescimento do corpo fúngico, ambos apresentaram um rendimento satisfatório nas taxas de germinação das sementes sendo de 74% e 79% respectivamente no controle de ambos patógenos conforme descritos na Tabela 3.

Tabela 3. Porcentagem de fungos e de germinação de sementes de *E. grandis* infectadas com *F. oxysporum* e *F. solani*, tratadas ou não com fungicidas.

Tratamento	<i>F.oxysporum</i> %	<i>F. solani</i> %	Germinação %
Controle	42,0 A	41,0 A	89,0 A
Azoxistrobina + Ciproconazol	13,5 B	11,0 BC	79,0 AB
Captana	26,0 AB	21,0 AB	65,5 AB
Carbendazim	14,5 B	17,0 B	80,5 AB
Clorotalonil + Tiofanato Metílico	29,5 AB	24,5 AB	70,0 B
Fludioxonil	23,5 AB	20,0 AB	75,0 AB
Iprodiona	39,5 A	36,0 A	48,5 C
Tebuconazole	21,0 AB	22,5 AB	74,0 AB
Thiabendazole	16,5 B	10,0 BC	82,0 AB
Tiofanato Metílico	18,0 B	11,5 BC	86,5 AB
Triticonazole	6,0 C	10,5 BC	83,5 AB
F	11,3 **	11,0 **	1,2 **.
C.V.(%)	38,7	24,8	7,6

C.V: Coeficiente de variação; **: significativo pelo teste de F com 99% de confiança; n.s.: não significativo, valores acompanhados de letras diferentes (colunas) diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey com 95% de confiança.

Fonte: Autor

O fungicidas Azoxistrobina (adicionado juntamente com o Ciproconazol) interfere na ação mitocondrial, bloqueando a transferência de elétrons no complexo

citocromo-bc1, mais precisamente usando como fonte de ligação o sítio da enzima oxiredutase ubihidroquinona-citocromo-c, impedindo o uso do oxigênio, e a formação de moléculas de ATP, energia vital celular.

Com uma ação eficaz na produção de ATP celular, bloqueando a taxas respiratórias dos patógenos, as Estrobilurinas podem ser mais eficazes quando misturadas a outros compostos químicos, fato que não foi evidenciado no experimento pois o fungicida Triticonazole sem misturas teve um rendimento na taxa de germinação não significativo quando comparado a Azoxistrobina + Ciproconazol, com taxas de germinação de 83, 5% e 79 % respectivamente. Mas o Triticonazole foi significativo no controle do *F. oxysporum* em relação a Azoxistrobina + Ciproconazol, quanto ao *F. solani* ambos atuam de forma semelhante.

Os fungicidas Fludioxonil, Tebuconazole, Clorotalonil + Tiofanato foram superiores aos fungicidas Captana e Iprodiona. Os tratamentos que utilizaram os fungicidas Azoxistrobina + Ciproconazol, Carbendazim, Thiabendazole, Triticonazole e Tiofanato Metílico manifestaram-se de modo próximo ao controle.

Moraes *et al.*, (1997) em seu experimento utilizando sementes de trigo não obteve um resultado positivo, utilizando Fludioxonil no controle da *Fusarium graminearum* (Gibberella) nem melhoras no desempenho destas sementes utilizando este fungicida.

Resultado interessante foi obtido para o fungicida Azoxistrobina + Ciproconazol, mesmo que este fungicida não seja recomendado para o controle de *Fusarium* spp. o mesmo apresentou eficiência de cerca 83% na taxa de germinação em relação ao controle. Tal resultado induz a eficácia dessas moléculas na inibição

ou mesmo ação fungistática das moléculas sobre o desenvolvimento dos patógenos testados.

Os fungicidas Carbendazim, Thiabendazole e Tiofanato metílico que apresentam o mesmo grupo químico Benzimidazol juntamente com o fungicida Triticonazole que apresenta o grupo químico Estrobilurina apresentaram melhor eficiência no controle dos patógenos com taxas de germinação em torno de 85%, 86,5%, 91% e 87% quando comparados ao controle respectivamente.

O uso constante de Carbendazim no controle de *Fusarium* spp. pode ocasionar resistência ao mesmo.

Barreto e colaboradores (2003) avaliaram a ação de fungicidas sobre *Fusarium oxysporum* f. sp. gladioli e observaram que os tratamentos com fungicida Tiofanato metílico ocasionam a inibição do crescimento micelial deste patógeno em meio de cultura.

Tal resultado reforça a eficiência dessa molécula no controle de *Fusarium oxysporum* e também de *Fusarium solani*, já que ambos apresentam mesma ação no ataque ao eucalipto.

Os fungicidas Thiabendazole e Tiofanato metílico foram testados no controle do *Fusarium graminearum*, que ocasiona a fusariose em sementes de trigo por Teles Neto (2004) em seu experimento o que resultou em um controle da fusariose nas sementes, pelos mesmos, de modo significativo.

Os resultados apresentados evidenciam que houve diferenças significativas entre os tratamentos com fungicidas e o controle, indicando que houve influência dos produtos testados na germinação das sementes, caso observado com os fungicidas Clorotalonil + Tiofanato metílico, Captana e Iprodiona.

Tiofanato metílico é um fungicida instável no solo geralmente não permanece após uma semana da aplicação, gerando cerca de 1% do produto, mas apresentou uma ação eficaz no controle dos patógenos.

Ocorreram que muitas mudas apresentaram manchas foliares (Figuras 25, 26, 27 e 28), sintoma não típico ocasionado pelo patógenos utilizados, algo comum em viveiros e também observado em plantações de eucalipto, porem elas causam prejuízos sérios diminuindo a taxa fotossintética, resultando em menor biomassa vegetal.

Entre inúmeros fatores envolvidos no desenvolvimento desta mancha, está o fungo do gênero *Cylindrocladium*, o qual ocasiona uma doença típica de plantações, podendo ser encontrada em viveiros.

O aumento da temperatura e de precipitações pluviométricas são fatores abióticos que colaboram para a proliferação deste patógeno (MAFIA *et al.*, 2011).



FIGURA 25. Muda de *Eucalyptus grandis* com cerca de 180 dias, infectadas por *F. oxysporum* tratadas com fungicidas do grupo químico Benzimidazol com manchas foliares

Fonte: Autor

Em mais de 15 espécies de eucalipto foi detectada esta doença, sendo *E. urophylla*, *E. citriodora*, *E. cloeziana* e *E. grandis* as mais suscetíveis. Alguns estados como o de Minas Gerais, Bahia, Espírito Santo e região Amazônica, tem apresentado perdas mais agravantes como um desfolhamento intenso das plantas atacadas geralmente em épocas chuvosas.

Porém, não há dados que comprovem a morte das plantas, pois a mesma produz novas folhas e recuperam-se nos meses secos após o ataque (EMBRAPA, 2003).



FIGURA 26. Muda de *Eucalyptus grandis* com cerca de 180 dias, infectadas por *F. solani* e tratadas com fungicidas do grupo químico Benzimidazol com manchas foliares.

Fonte: Autor



FIGURA 27 Muda de *Eucalyptus grandis* com cerca de 180 dias, infectadas por *F. oxysporum* e tratadas com fungicidas do grupo químico Triazol com manchas foliares

Fonte: Autor



FIGURA 28. Muda de *Eucalyptus grandis* com cerca de 180 dias, infectadas por *F. solani* e tratadas com fungicidas do grupo químico Triazol de com manchas foliares.

Fonte: Autor

Estas manchas apareceram em vários outros exemplares de *Eucalyptus* que estavam na estufa agrícola, levando posteriormente a morte foliar (Figura 37) porém até o término deste trabalho as mesmas não foram analisadas, mas pressupondo que o fungicida utilizado não tem ação permanente no solo, caso for comprovada um patógeno fúngico e/ou não tem ação sob o mesmo.

Mudanças climáticas podem ocasionar mudanças drásticas nos aspectos fitossanitários, favorecendo uma nova rota na distribuição geográfica e temporal dos patógenos (GHINI *et al.*, 2011), o que pode ter ocorrido, pois no final do experimento ocorreram períodos de chuvas intensas na região.



FIGURA 29. Folha de Eucalipto necrosada

Fonte: Autor

Na estufa agrícola, não foi possível verificar o potencial antagônico dos isolados de *Bacillus sp.* a *Fusarium solani* e *Fusarium oxysporum*, pois as plantas inoculadas com os patógenos desenvolveram os sintomas da doença e morreram, portando conclui-se que não ocorreu o mesmo. A ação do patógeno no ambiente pode influenciar no crescimento, multiplicação e disseminação do mesmo na planta hospedeira, até mesmo as cargas genéticas da mesma influem na suscetibilidade (GUINI *et al.*, 2011).

O Brasil está situado na região tropical, área aonde o número de pragas é elevado, fazendo um uso elevado de defensivos agrícolas, aumentando sua produção (RIGOTTO; VASCONCELOS; ROCHA, 2014). A utilização de fungicidas visa controlar fungos patogênicos, entretanto podem afetar uma vasta gama de microrganismos não alvos daquela substância (DA SILVEIRA *et al.*, 2012). Fato que pode permitir que outros patógenos se manifestem.

Os resultados mostram uma flutuação da população microbiana antagônica, no solo, e uma crescente fonte de inóculo de *F. solani f. sp. phaseoli* em função das diferentes densidades de inóculo artificial e dos tipos de solos utilizados, isto indica que para iniciar o processo de doença a quantidade de inóculo do patógeno varia de um solo para outro.

Este estudo inicial demonstra que a simples determinação da população dos microrganismos no solo, por meio do método de diluição em série, não é suficiente para monitorar estudos dessa natureza.

8 CONCLUSÃO

Foi comprovado que os isolados de *F. solani* e *F. oxysporum* foram patogênicos ao *E. grandis*, permitindo concluir também que: os fungicidas Triticonazole, Azoxistrobina + Ciproconazol, Carbendazim, Triabendazole e Tiofanato metílico reduziram a incidência de *F. oxysporum* e os fungicidas Triabendazole, Triticonazole, Azoxistrobina + Ciproconazol, Tiofanato Metílico e Carbendazim reduziram a incidência de *F. solani* em sementes de eucalipto.

Os fungicidas Iprodiona, Cloratalonil + Tiofanato Metílico avaliados influenciaram de modo negativo na germinação de plântulas.

Sempre é bom salientar que para um controle químico eficaz de patógenos é necessário utilizar a dose recomendada pelo fabricante, a frequência a ser aplicada e um monitoramento do cultivar entre outros cuidados de acordo com o patógeno em questão.

Esses resultados demonstraram alta sensibilidade dos isolados de *F. oxysporum* e *F. solani* aqui testados ao princípio ativo de fungicida Triticonazole sendo um produto capaz de inibir isolados que apresentaram alta sensibilidade aos fungicidas do grupo dos estrobilurinas.

Na avaliação do antagonismo *in vitro*, foi possível observar o efeito dos tratamentos com isolados de *Bacillus sp.* sobre o controle de *F. oxysporum* e *F. solani*, mas não foi determinada as espécies deste gênero, e sim que estas não são resistentes em solos com ação de fungicidas químicos, já na estufa agrícola não ocorreu este antagonismo.

9 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Além dos itens citados, o estudo da interação dos fungos/bactérias/fungicidas/solo com as plantas é muito amplo, não se tendo conhecimento de toda a relação desenvolvida entre as partes, ficando evidente a necessidade de outros estudos para ratificar a utilização de fungicidas químicos no controle de fungos para aumentar a produtividade agrícola.

REFERÊNCIAS

- BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. AGROFIT. Brasília, 2012. Disponível em: :<<http://www.agricultura.gov.br/servicos-e-sistemas/sistemas/agrofit>>. Acesso em: 18 set. 2015.
- ALEXANDER, M. Biodegradation of chemical of environmental concern. Science, Washington, v. 211, p. 132-138, 1981.
- ALFENAS, A. C. et al. *Sporothrix eucalypti*, um novo patógeno do eucalipto no Brasil. Fitopatologia Brasileira, Brasília, v. 26, n. 2, 2001.
- AMORIM, L. et al . Manual de fitopatologia. [S. l: s. n.], 2011.
- ANIMISHA, S. Z.; JAISWAL, K. K.; PANDEY, P. Integrated management of chickpea wilt incites by *Fusarium oxysporum f. sp. Ciceris*. International Journal of Agricultural Research, New York, v. 7, n. 5, p. 284-290, 2012.
- APARECIDO, C. C.; FINATTI, D. Impacto do gênero *Cylindrocladium* para seis diferentes culturas. São Paulo, Instituto Biológico, 2012. Disponível em:<http://www.biologico.sp.gov.br/artigos_ok.php?id_artigo=17 >. Acesso em: 10 jul. 2014.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PRODUTORES DE FLORESTAS PLANTADAS (ABRAF). Anuário estatístico da Abraf 2013 ano base 2012. Brasília, 2013.
- AUER, C. G.; SANTOS, A. F. Cultivo de eucalipto: doenças e outras desordens. Colombo, Embrapa Florestas, 2010. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Eucalipto/CultivodoEucalipto/index.htm> >. Acesso em: 10 jul. 2014.

AUER, C. G.; SANTOS, A. F.; GRIGOLETTI JÚNIOR, A. Cultivo de eucalipto. Colombo, Embrapa Florestas, 2003. Disponível em: <
http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Eucalipto/CultivodoEucalipto/07_doencas_de_eucalipto.htm >. Acesso em: 14 jul. 2014.

BARRETO, S. S.; RESENDE, M. L. V.; BOAS, C. V. Efeito de fungicidas sobre *Fusarium oxysporum f. sp. Gladioli*: (resumo). Fitopatologia Brasileira, Brasília, v. 28, supl., 2003.

BEDENDO, I. P. Damping off. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. (Ed.). Manual de fitopatologia: princípios e conceitos. 4 ed. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, 2011. v. 1, cap. 22.

BETTIOL, W.; & FERNANDES, S. A. P. Efeito do lodo de esgoto na comunidade microbiana e atributos químicos do solo. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2004. 5p. (Comunicado técnico, 24).

BETTIOL, W.; & GHINI, R. Solos supressivos. In: MICHEREFF, F.; ANDRADE, D. E. G. T.; & MENEZES, M. (Ed.s.). Ecologia e manejo de patógenos radiculares em solos tropicais. Recife: Imprensa Universitária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2005. pp. 125-152.

BERTOLA, A. Eucalipto: verdades e mentiras. 2005. Disponível em: <
http://www.celuloseonline.com.br/dr_celulose_files/dc009.pdf >. Acesso em: 13 jul. 2015.

BOOTH, C. The genus *Fusarium*. Kew: Commonwealth Mycological Institute, 1971. 327 p.

BRASIL. MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. Convenção de Viena e protocolo de Montreal. Brasília, Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/clima/protecao-da-camada-deozonio/convencao-de-viena-e-protocolo-de-montreal>>. Acesso em: 18 jun. 2016.

BURGESS, L. W. et al . Laboratory manual for *Fusarium* research. 3rd ed. Sydney: University of Sydney/Royal Botanic Gardens (p 4, 8, 9), 1994.

CARDOSO, E. J. B. N.; TSAI, S. M.; NEVES, M. C. P. Microbiologia do solo. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciências do Solo, 1992.

COELHO, J. S. et al . Effect of the herbicides bentazon and diuron on the production of ligninolytic enzymes by *Ganoderma lucidum*. International Biodeterioration & Biodegradation, London, v. 64, p. 156-161, 2010.

CONSELHO DE INFORMAÇÕES SOBRE BIOTECNOLOGIA (CIB), 2008. Disponível em: <http://cib.org.br/wp-content/uploads/2011/10/Guia_do_Eucalipto_junho_2008.pdf>. Acesso em: 12 jul. 2014.

COSTA, M. L. N. et al. Inoculação de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* em sementes de feijoeiro através de restrição hídrica. Ciência e Agrotecnologia, Lavras, v. 27, p. 1023-1030, 2003.

COTTERILL, P. P.; BROLIN, A. Improving Eucalyptus wood, pulp and paper quality by genetic selections. In: IUFRO CONFERENCE ON SILVICULTURE AND IMPROVEMENT OF EUCALYPT, 1997, Salvador. Proceedings... Colombo: EMBRAPA, Centro Nacional de Pesquisa de Florestas, 1997. p. 1- 13.

CRONQUIST, A. Na integrated system of classification of flowering plants. Columbia Univ. Press. New York. 1981 .

DA SILVEIRA, S. B.; Toxicidade do tebuconazol em quatro espécies fitoplanctônicas dulcícolas subtropicais. 2012. Dissertação (Mestrado em Biologia de Ambientes Aquáticos Continentais Instituto de Ciências Biológicas. Universidade Federal do Rio Grande, 2012. Disponível em: <<http://www.argo.furg.br/bdtd/0000010069.pdf>>. Acesso em: 13 nov. 2016.

DHINGRA, O. D.; SINCLAIR, J. B. Basic plant pathology methods. Boca Raton: CRC Press, 1995.

DIAS, A. C. R. Controle químico de doenças de *Eucalyptus spp.* em viveiros e seus efeitos morfo-fisiológicos. 2010. 112 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) - Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA(EMBRAPA). Fungicidas I: utilização no controle químico de doenças e sua ação contra os fitopatógenos. Brasília, 1999. Disponível em: <http://www.cpafo.embrapa.br/media/arquivos/publicacoes/FOL_5993_0001.pdf>. Acesso em: 08 de jul. 2014.

EMBRAPA FLORESTAS. Colombo, 2003. Disponível em:<<http://www.cnpf.embrapa.br/publica/publica.htm>>. Acesso em: 10 jul. 2014.

FERREIRA, F. A. Patologia florestal: principais doenças florestais no Brasil. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1989.

FERMINO, M. H. Aproveitamento de resíduos industriais e agrícolas como alternativas de substratos hortícolas. 1996. 90 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1996.

FISHER, N. L. et al. Carnation leaves as a substrate and for preserving cultures of *Fusarium* species. *Phytopathology*, Saint Paul, v. 72, n. 1, p. 151-153, 1982.

FOELKEL, C. E. B.; BUSNARDO, C. A.; RECH, B. O fenômeno de apodrecimento central do cerne de árvores vivas de *Eucalyptus*: qualidade da madeira. *IPEF*, Piracicaba, n. 33, p. 31-38, 1986.

FONTENO, W. C. Growing media: types and physical/chemical properties. In: REED, D. W. (Ed.). *A growers guide to water, media, and nutrition for greenhouse crops*. Batavia: Ball, 1996. p. 93-122.

FRAVEL, D.; OLIVAIN, C.; ALABOUVETTE, C. *Fusarium oxysporum* and its bio-control. *New Phytologist*, Cambridge, v. 157, p. 493-502, 2003.

FREITAS, T. A. S. et al. Efeito da poda de raízes sobre o crescimento das mudas de eucalipto. *Ciência Florestal*, Santa Maria, v. 19, p. 1-6, 2009.

FURTADO, E. L.; SAMBUGARO, R. Identificação de doenças do *Eucalyptus* spp. e coleta de materiais. Piracicaba: Equilíbrio Proteção Florestal, 28 p, 2005.

FURTADO, E. L.; et al. *Fusarium solani*, novo patógeno causando mofo cinzento em painel de seringueira, no Estado de São Paulo. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 26, p. 439, 2001.

GARCIA, E. S. Biodiversity, biotechnology and health. *Caderno de Saúde Pública*, Rio de Janeiro, v. 11, n. 3, p. 495-500, 1995.

GARCIA, R. et al. Atividade antifúngica de óleo e extratos vegetais sobre *Sclerotinia sclerotiorum*. *Bioscience Journal*, Uberlândia, v. 28, n. 1, p. 48-57, 2012.

GAUR, P. M et al. Chickpea seed production manual. India: International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics, 2010.

GHINI, R. Coletor solar para desinfestação de substratos para produção de mudas sadias. Circular Técnica/ Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, 4V. 2004.

GHINI, R.; BETTIOL, W.; HAMADA, E. Diseases in tropical and plantation crops as affected by climate changes: current knowledge and perspectives. Plant Pathology, -Nottingham, v. 60, p. 122-132, 2011.

GHINI, R. et al. Incubation period of *Hemileia vastatrix* in coffee plants in Brazil simulated under climate change. Summa Phytopathologica, Botucatu, v. 37, p. 85-93, 2011.

GRAYSTON, S. J.; JONES, D. V. D. Rhizosphere carbon flow in trees, in comparison with an annual plant: the importance of root exudation and its impact on microbial activity and nutrient availability. Applied Soil Ecology, Amsterdam, v. 5, n. 1, p. 29-56, 1996.

GRIGOLETTI JÚNIOR, A.; BIZI, R. M.; AUER, C. G. *Oidium* sp. em mudas de eucalipto. Comunicado Técnico/Embrapa Florestas, Colombo, n. 144, Colombo: Embrapa, 2005.

GHINI, R. Coletor solar para desinfestação de substratos para produção de mudas sadias. Circular Técnica/ Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, 4V. 2004.

GUPTA, V. K.; MISRA, A. K.; GAUR, R. K. Growth characteristics of *Fusarium* spp. causing wilt disease in *Psidium guajava* L. in Índia. Journal of Plant Protection Research, Cambridge, v. 50, p. 451-462, 2010.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symposium Series, Oxford, v. 41, p. 95-98, 1999.

HARMAN, G. E. et al. Trichoderma species-opportunistic, avirulent plant symbionts. Nature Reviews. Microbiology, London, v. 2, n. 1, p. 43-56, 2004.

HAWKSWORTH, D. L. et al. Ainsworth & Bisby's dictionary of the fungi. New York: CAB International, 1995. 616 p.

HOPER, H.; ALABOUVETTE, C. Importance of physical and chemical soil properties in the suppressiveness of soils to plant diseases. European Journal of Soil Biology, Oxford, v. 32, p. 41-58, 1996.

HORNBY, D. Suppressive soils. Annual Review of Phytopathology, Palo Alto, v. 21, p. 65- 85, 1983.

JOLY, A. B. Botânica, introdução à taxonomia vegetal. São Paulo: EDUSP, 1966. v.4, 634 p.

JULIATTI, F. C. et al. Avaliação de fungicidas na parte aérea na redução dos grãos ardidos e incidência de fungos, Horizonte Científico, Uberlândia, Disponível em: <
www.seer.ufu.br/index.php/horizontecientifico/article/viewFile/.../3004>. Acesso em: 14 jul. 2014.

KÄMPF, A. N. Substrato. In: KÄMPF, A. N. (Coord.). Produção comercial de plantas ornamentais. Guaíba: Agropecuária, 2000a.

KÄMPF, A.N. O uso de substrato em cultivo protegido no agronegócio brasileiro. Campinas: Instituto Agrônomo, 2002b. (IAC. Documentos, 70).

KATAN, J. et al. Solar heating by polyethylene mulching for the control of diseases caused by soil-borne pathogens. *Phytopathology*, Saint Paul, p. 683-688, 1976.

KENNEDY, N.; CLIPSON, N. Fingerprinting the fungal community. *Mycologist*, New York, v. 17, n. 2, p. 158-164, 2003.

KRÜGNER, T. L.; CARVALHO, P. C. L. Ensaios em condições de casa de vegetação para controle químico do "damping-off" em *Eucalyptus saligna*. *IPEF*, Piracicaba, n. 2/3, p. 97-113, 1971.

LANDA, B. B.; NAVAS-CORTÉS, J. A.; e JIMÉNEZ-DÍAZ, R. M. Integrated management of *Fusarium* wilt of chickpea with sowing date, host resistance, and biological control. *Phytopathology*, Saint Paul, v. 94, p. 946-960, 2006.

LEONI, C.; GHINI, R. Efeitos do lodo de esgoto na indução de supressividade de solos a *Phytophthora nicotianae* em citros. In: BETTIOL, W.; & CAMARGO, O. A. Lodo de esgoto: impactos ambientais na agricultura. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2006. p. 255-290.

LESLIE, J. F.; SUMMERELL, B. A. The *Fusarium* laboratory manual. Blackwell Publishing, 2006.

LIBERATO, J. R.; COSTA, H; VENTURA, J. A. Índice de doenças de plantas do Estado do Espírito Santo. Vitória: EMCAPA. 1996.

MARUTHIAH, T. et al. Purification and characterization of moderately halophilic alkaline serine protease from marine *Bacillus subtilis* AP-MSU 6. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, Amsterdam, v. 2, n. 2, p. 116–119, 2013.

MENDES, M. A. S.; et al. Fungos em plantas no Brasil. Brasília: EMBRAPA-SPI: EMBRAPA- CENARGEN, 1998.

MOHAMMADI, H; BANIHASHEMI, Z. Distribution, pathogenicity and survival of *Fusarium* sp. the causal agents of chickpea wilt and root rot in the fars province of Iran. *Journal of Plant Pathogen*, [S. l.], v. 41, p. 687-708, 2006.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. Microbiologia e bioquímica do solo. Lavras: UFLA, 2006.

MORAES, M. H. D. et al. Efeito do tratamento químico na qualidade sanitária e fisiológica de sementes de trigo. *Informativo Abrates*, Brasília, v. 7, n. 1/2, p. 141, 1997.

MÜLLER, J. J. V. Utilização de substrato na olericultura. In: KÄMPF, A. N.; FIRMINO, M. H. Substrato para plantas: a base da produção vegetal em recipientes. Porto Alegre: Editora Genesis, 2000. p. 159-162.

NELSON, P. E.; TOUSSOUN, T. A.; & MARASAS, W. F. O. *Fusarium species an illustrated manual for identification*. University Park: The Pennsylvania State University Press, 1983.

PAIVA, C. C. Crescimento inicial de eucalipto em Alegre, Espírito Santo. 2011. 48 f. Monografia (Graduação em Engenharia Florestal) - Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Espírito Santo. Alegre.

PATRICIO, F. R. A. et al. Avaliação da solarização do solo para o controle de *Ralstonia solanacearum*. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 30, n. 5, p. 475-481, 2005.

POTERCORVO, G. et al. The genetis of *Aspergillus nidulas*. Advances in Genetics, New York, v. 5, p. -140-148, 1953.

RICCI, M. S. F. et al. Produção da cenoura e efeito na fertilidade do solo e nutrição decorrente da solarização do solo para controle da tiririca. Bragantia, Campinas, v. 65, n. 4, p. 607- 614, 2006.

RIGOTTO, R. M.; VASCONCELOS, D. P.; ROCHA, M. M. Uso de agrotóxicos no Brasil e problemas para a saúde pública. Caderno de Saúde Pública, Rio de Janeiro, v. 30, p. 1-3, 2014.

RÖBER, R. Substratos hortícolas: possibilidades e limites de sua composição e uso: exemplos da pesquisa, da indústria e do consumo. In: KÄMPF, A. N.; FERMINO, M. H. (Ed.). Substratos para plantas: a base da produção vegetal em recipientes. Porto Alegre: Genesis, 2000. p 209-215.

SANTOS, A. F.; AUER, C. G.; GRIGOLETTI JÚNIOR, A. Doenças do eucalipto no sul do Brasil: identificação e controle. Circular Técnica/Embrapa Florestas, Colombo, 45V. 2001.

SCHULTZ, B. Levantamento de doenças bióticas e abióticas em *Eucalyptus benthamii* Maiden nos Estados do Paraná e Santa Catarina. 2012.101 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) - Universidade Federal do Paraná.

SILVA, R. E. Exsudação radicular e sua utilização por rizobactérias. 2011. 52 f. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical Instituto Agrônômico, Campinas.

SILVA, H. D. O Eucalyptus na silvicultura brasileira e no mundo. Folha da Floresta, Colombo, ago. 1997. Edição especial.

SILVEIRA, R. L. A. et al. Seja o doutor de seu eucalipto: nutrição e adubação. Arquivo do Agrônomo, [S. L.], n. 93. p. 1-23, 2001.

SINGH, G. et al. Diseases and their management. Chickpea breeding and management. CAB International, p. 497-519. 2007.

TELES NETO, F. X. B. Transmissão e controle de *Fusarium graminearum* em sementes e danos causados pela giberela em trigo. 2004. 113 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo.

THOMPSON, J. D. et al. The clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality tools. Nucleic Acids Research, Oxford, v. 24, p. 4876-4882, 1997.

TOUSSON, T.; & NELSON, P. E. Variation and specialization in the Fusaria. Annual Review of Phytopathology, Palo Alto v. 13, p. 71-82, 1975.

VELLINI, A. L. T. T. et al. Respostas fisiológicas de diferentes clones de eucalipto sob diferentes regimes de irrigação. Revista Árvore, Viçosa, v. 32, n. 4, p. 651-663, 2008.

VENTURA, J. A. Taxonomia de *Fusarium* e seus segregados: I: história, meios e procedimentos de cultivo. Revisão Anual de Patologia de Plantas, Passo Fundo, v. 7, 271-297, 1999.

VON PINHO, E. V. R. et al. Efeitos do tratamento fungicida sobre a qualidade sanitária e fisiológica de sementes de milho (*Zea mays* L.). Revista Brasileira de Sementes, Brasília, v. 17, n. 1, p. 23-28, 1995.

WILCKEN, C. F. Danos de cupins subterrâneos *Corniterme ssp.* (Isoptera Termitidae) em plantios de *Eucalyptus grandis* e controle com inseticidas no solo. In: BERTI FILHO, E. (Coord.). Manual de pragas em florestas: cupins e térmitas. Piracicaba: IPEF; Viçosa: SIF, 1992. v. 3.

WILCKEN, C. F. et al. Plagas exóticas de importância em *Eucalyptus* en Brasil. In: JORNADA FORESTALES DE ENTRE RIOS, 23, 2008, Concordia. Resumos... Concordia: 2008.

ZILLI, J. E. et al. Diversidade microbiana como indicador de qualidade do solo. Cadernos de Ciência & Tecnologia, Brasília, v. 20, n. 3, p. 391-411, 2003.

ZOLAN, M. E; PUKILLA. P. J. Inheritance of DNA methylation in *Coprinus cinereus*. Molecular and Cellular Biology, Washington, v. 6, p. 195-200, 1986.

TERMO DE REPRODUÇÃO XEROGRÁFICA

Autorizo a reprodução xerográfica do presente Trabalho de Conclusão, na íntegra ou em partes, para fins de pesquisa.

São José do Rio Preto, 16 /março/2018

Assinatura do autor