UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU

"FUNGOS SAPRÓBIOS DO SEMIÁRIDO NORDESTINO: ASPECTOS FISIOLÓGICOS, AÇÃO NO CONTROLE DA FERRUGEM E INDUÇÃO DO ENRAIZAMENTO EM MUDAS DE EUCALIPTO"

CAROLINE GERALDI PIEROZZI

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agronômicas da Unesp – Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Ciência Florestal

BOTUCATU-SP
Outubro - 2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU

"FUNGOS SAPRÓBIOS DO SEMIÁRIDO NORDESTINO: ASPECTOS FISIOLÓGICOS, AÇÃO NO CONTROLE DA FERRUGEM E INDUÇÃO DO ENRAIZAMENTO EM MUDAS DE EUCALIPTO"

CAROLINE GERALDI PIEROZZI

Orientador: Prof. Dr. Edson Luiz Furtado
Co-orientador: Prof. Dr. Sérgio Florentino Pascholati

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agronômicas da Unesp – Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Ciência Florestal

BOTUCATU-SP
Outubro - 2013

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

Pierozzi, Caroline Geraldi, 1985-
P619f Fungos sapróbios do semiárido nordestino: aspectos fisiológicos, ação no controle da ferrugem e indução de enraizamento em mudas de eucalipto / Caroline Geraldi Pierozzi. – Botucatu : [s.n.], 2013
xi, 91 f. : tabs., grafs., fots. color.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agronômicas, Botucatu, 2013
Orientador: Edson Luiz Furtado
Coorientador: Sérgio Florentino Pascholati
Inclui bibliografia

1. *Eucalipytus grandis* – Doenças e pragas. 2. Plantas - Resistência a doenças e pragas. 3. Fungos da ferrugem. I. Furtado, Edson Luiz. II. Pascholati, Sérgio Florentino. III. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Campus de Botucatu). Faculdade de Ciências Agronômicas. IV. Título.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS

CAMPUS DE BOTUCATU

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: "**FUNGOS SAPRÓBIOS DO SEMIÁRIDO NORDESTINO: ASPECTOS FISIOLÓGICOS, AÇÃO NO CONTROLE DA FERRUGEM E INDUÇÃO DO ENRAIZAMENTO EM MUDAS DE EUCALIPTO**"

ALUNA: CAROLINE GERALDI PIEROZZI

ORIENTADOR: PROF. DR. EDSON LUIZ FURTADO
COORIENTADOR: PROF. DR. SÉRGIO FLORENTINO PASCHOLATI

Aprovado pela Comissão Examinadora

PROF. DR. EDSON LUIZ FURTADO

PROFA. DRA. MARTHA MARIA PASSADOR

PROF. DR. LUÍS FERNANDO PACHOLATI GUSMÃO

Data da Realização: 30 de outubro de 2013.

BIOGRAFIA DO AUTOR

CAROLINE GERALDI PIEROZZI, filha de José Marcos Pierozzi e Maria Benedita Geraldi Pierozzi, nasceu em Itapira-SP, no dia 01 de fevereiro de 1985.
Realizou curso de primeiro e segundo grau na cidade natal.

No primeiro semestre do ano de 2005, ingressou no curso de Engenharia Agronômica na Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Campus de Botucatu. Neste período foi bolsista de Iniciação Científica pela FAPESP e graduou-se em janeiro de 2010.

Iniciou o curso de Mestrado em Agronomia, área de concentração em Ciência Florestal, em agosto de 2011, na Faculdade de Ciências Agronômicas da Universidade Estadual Paulista, Campus de Botucatu.

Aos meus pais Benedita e Marcos, pelo amor incondicional...

A minha querida e amada irmã Aline, minha eterna admiração...

E ao meu namorado Efrain, pelo amor e companheirismo em todos os momentos.

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus por guiar todos meus passos, me dar força para sempre seguir o melhor caminho.

A minha linda família por todo apoio em minhas decisões, amor e carinho.

Ao meu namorado Efrain, pelo amor, carinho e toda apoio nessa fase de minha vida, minha eterna gratidão.

Ao meu orientador Prof. Dr. Edson Luiz Furtado por todo ensinamento e apoio.

Ao meu coorientador Prof. Dr. Sérgio F. Pascholati pelo apoio.

Aos meus amigos, mesmo que distantes fazem parte dessa minha trajetória.

Aos meus colegas de Laboratório do Departamento de Defesa Fitossanitária, pelos momentos agradáveis, meu muito obrigada Martha, Marília, Renato, Karina, Thiago, Gustavo, Cristiane, João e Ana Carolina.

Aos colegas da Unicamp e Esalq, pela ajuda e troca de informações.

Ao funcionário do Viveiro Florestal da FCA, Claudio Ribeiro da Silva, por todo auxílio.

Ao Viveiro Floresta, por ceder todas as mudas utilizadas no trabalho.

SUMÁRIO

Página

Lista de Tabelas..... VIII

Lista de Figuras..... X

RESUMO..... 1

SUMMARY……. 2

1 INTRODUÇÃO 3

2 REVISÃO DE BIBLIOGRÁFICA..... 5

2.1 Importância do eucalipto no Brasil..... 5

2.2 Ferrugem do eucalipto..... 7

2.3 Fungos sapróbios do Semiárido Nordestino..... 11

2.3.1 *Curvularia*..... 11

2.3.1.1 *Curvularia eragrostidis* (Henn.) J.A. Mey. 1959... 12

2.3.1.2 *Curvularia inaequalis* (Shear) Boedijn 1907..... 13

2.3.2 *Memnoniella levispora* (Subram, 1954)..... 14

2.3.3 *Myrothecium*..... 15

2.3.3.1 *Myrothecium leucotrichum* (Peck) M.C. Tulloch 1972…… 15

2.3.3.2 *Myrothecium roridum* (Tode), 1970..... 16

2.3.4 *Phialomyces macrospores* P.C. Misra e P.H.B. Talbot 1964…… 17

2.3.5 *Stachybotrys chartarum* (Ehrenb.) S. Hughes 1958…….. 17

2.4 Indução de resistência a patógenos..... 18

2.5 Enzimas associadas à indução de resistência..... 20

3 MATERIAL E MÉTODOS..... 24

3.1 Inibição da germinação *de P. psidii* por voláteis dos fungos sapróbios..... 24

3.2 Testes fisiológicos - Crescimento micelial e produção de conídios.. 27

3.2.1 Fungos utilizados..... 27

3.2.2 Crescimento micelial..... 27

3.2.3 Concentração de conídios..... 28

3.3 Indução do enraizamento..... 29

3.4 Efeito dos fungos sapróbios na severidade da doença..... 31

3.5 Atividade enzimática em folhas de eucalipto inoculadas com *Puccinia psidii* e tratadas com fungos sapróbios..... 32
3.5.1 Obtenção do extrato proteico..... 33
3.5.2 Determinação da atividade de Peroxidase..... 34
3.5.3 Determinação da atividade de Fenilalanina amônia-liase..... 35
3.5.4 Determinação da atividade de β-1,3-Glucanase..... 35
3.6 Análises estatísticas..... 36
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 37
4.1 Testes fisiológicos - Crescimento micelial e produção de conídios.. 37
4.1.1 *Curvularia eragrostidis*..... 37
4.1.2 *Curvularia inaequalis*..... 41
4.1.3 *Memnoniella levispora*..... 44
4.1.4 *Mytothecium leucotrichum*..... 47
4.1.5 *Myrothecium roridum*..... 50
4.1.6 *Phialomyces macrosporus*..... 53
4.1.7 *Stachybotrys chartarum*..... 56
4.2 Indução do enraizamento..... 59
4.3 Inibição da germinação *de P. psidii* por voláteis dos fungos sapróbios..... 61
4.4 Efeito dos fungos sapróbios na severidade da doença..... 63
4.5 Atividade enzimática em folhas de eucalipto inoculadas com *Puccinia psidii* e tratadas com fungos sapróbios..... 65
4.5.1 Fenilalanina amônia-liase (FAL)..... 65
4.5.2 Peroxidase (POD)..... 67
4.5.3 β-1,3-glucanase (GLU)..... 70
5 CONCLUSÕES..... 73
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 75

LISTA DE TABELAS

Página

Tabela 1. Fungos utilizados no trabalho..... 24

Tabela 2. Índice médio da velocidade de crescimento micelial (cm/dia) de *Curvularia eragrostidis* em diferentes meios de cultura e em diferentes temperaturas de incubação..... 38

Tabela 3. Concentração média de conídios (10^4) de *Curvularia eragrostidis,* em mL, em diferentes meios e temperaturas de incubação..... 39

Tabela 4. Índice médio da velocidade de crescimento micelial (cm/dia) de *Curvularia inaequalis* em diferentes meios de cultura e em diferentes temperaturas de incubação..... 41

Tabela 5. Concentração média de conídios (10^4) de *Curvularia inaequalis*, em mL, em diferentes meios e temperaturas de incubação..... 42

Tabela 6. Índice médio da velocidade de crescimento micelial (cm/dia) de *Memnoniella levispora* em diferentes meios de cultura e em diferentes temperaturas de incubação..... 44

Tabela 7. Concentração média de conídios (10^4) de *Memnoniella levispora*, em mL, em diferentes meios e temperaturas de incubação..... 45

Tabela 8. Índice médio da velocidade de crescimento micelial (cm/dia) de *Myrothecium leucotrichum* em diferentes meios de cultura e em diferentes temperaturas de incubação..... 47

Tabela 9. Concentração média de conídios (10^4) de *Myrothecium leucotrichum*, em mL, em diferentes meios e temperaturas de incubação..... 48

Tabela 10. Índice médio da velocidade de crescimento micelial (cm/dia) de *Myrothecium roridum* em diferentes meios de cultura e em diferentes temperaturas de incubação..... 50

Tabela 11. Concentração média de conídios (10^4) de *Myrothecium roridum*, em mL, em diferentes meios e temperaturas de incubação..... 51

Tabela 12. Índice médio da velocidade de crescimento micelial (cm/dia) de *Phialomyces macrosporus* em diferentes meios de cultura e em diferentes temperaturas de incubação..... 53

Tabela 13. Concentração média de conídios (10^4) de *Phialomyces macrosporus*, em mL, em diferentes meios e temperaturas de

incubação..... 54

Tabela 14. Índice médio da velocidade de crescimento micelial (cm/dia) de *Stachybotrys chartarum* em diferentes meios de cultura e temperaturas de incubação..... 56

Tabela 15. Concentração média de conídios (10^4) de *Stachybotrys chartarum*, em mL, em diferentes meios e temperaturas de incubação..... 57

Tabela 16. Comprimento médio de raízes (cm) de estacas de dois clones de eucalipto inoculados com diferentes fungos sapróbios..... 59

Tabela 17. Médias de peso das raízes (g) para os diferentes clones de eucalipto inoculados com diferentes fungos sapróbios..... 60

Tabela 18. Porcentagens médias de germinação de urediniósporos de *P. psidii* em contato com os fungos sapróbios..... 61

Tabela 19. Médias de notas de suscetibilidade à ferrugem para inoculações dos sapróbios de forma preventiva e curativa..... 63

LISTA DE FIGURAS

Página

Figura 1. A - Corte de cinco discos em meio Agar água; **B -** Deposição de 25 µl de esporos; **C -** União e vedação das partes inferiores das placas; **D -** Retirada dos discos para a contagem de urediniósporos germinados, **E.** Preparo dos discos em lâminas; **F -** Adição de lacto glicerol, com corante azul de algodão, para paralização da germinação e contagem de urediniósporos..... 25

Figura 2. A - Raspagem da cultura com auxílio da alça de Drigalski; **B -** Filtragem da suspensão; **C -** Programa utilizado na contagem dos conídios; **D -** Conídios em câmara de Neubauer..... 28

Figura 3. Inoculação dos fungos sapróbios em substrato..... 29

Figura 4. Híbridos das espécies *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* utilizados no teste de indução de enraizamento, clone 01 e clone 02, respectivamente..... 30

Figura 5. A - Coleta de urediniósporos em folha de jambeiro; **B -** Suspensão de urediniósporos na concentração de 1.10^6; **C -** Inoculação da suspensão de urediniósporos de *P. psidii* utilizando borrifador manual..... 31

Figura 6. Escala de notas para avaliação da severidade de ferrugem do eucalipto em mudas. (1) Ausência total de sintomas ou reação de hipersensibilidade; (2) Reação de hipersensibilidade e/ou bronzeamento das folhas; (3) Lesão não apresentando pústulas; (4) Lesão com pústulas pouco esporulantes; (5) Lesão apresentando pústulas altamente esporulantes. **Fonte:** Pieri, C. de, 2011..... 32

Figura 7. A - Pesagem de 1,0 g de folhas para cada tratamento; **B -** Folhas após maceração em nitrogênio líquido; **C -** Amostra homogeneizada em tampão de fosfato de potássio; **D -** Centrífugação de amostras a 12350g; **E -** Sobrenadante utilizado para analisar as enzimas Peroxidase, β-1,3-Glucanase e Fenilalanina amônia-liase..... 34

Figura 8. Crescimento micelial de *Curvularia eragrostidis* em diferentes meios de cultura e temperaturas de incubação..... 40

Figura 9. Crescimento micelial de *Curvularia inaequalis* em diferentes meios de cultura e temperaturas de incubação..... 43

Figura 10. Crescimento micelial de *Memnoniella levispora* em diferentes meios de cultura e temperaturas de incubação..... 46

Figura 11. Crescimento micelial de *Myrothecium leucotrichum* em diferentes meios de cultura e temperaturas de incubação..... 49

Figura 12. Crescimento micelial de *Myrothecium roridum* em diferentes meios de cultura e temperaturas de incubação..... 52

Figura 13. Crescimento micelial de *Phialomyces macrosporus* em diferentes meios de cultura e temperaturas..... 55

Figura 14. Crescimento micelial de *Stachybotrys chartarum* em diferentes meios de cultura e temperaturas de incubação..... 58

Figura 15. Concentração de FAL em folhas de eucalipto coletadas em diferentes estágios após a inoculação do patógeno..... 65

Figura 16. Concentração de FAL em folhas de eucalipto coletadas em diferentes estágios após a inoculação do patógeno..... 66

Figura 17. Concentração de POD em folhas de eucalipto coletadas em diferentes estágios após a inoculação do patógeno..... 67

Figura 18. Concentração de POD em folhas de eucalipto coletadas em diferentes estágios após a inoculação do patógeno..... 68

Figura 19. Concentração de GLU em folhas de eucalipto coletadas em diferentes estágios após a inoculação do patógeno..... 70

Figura 20. Concentração de GLU em folhas de eucalipto coletadas em diferentes estágios após a inoculação do patógeno..... 71

RESUMO

O eucalipto é acometido por diversos patógenos, podendo dificultar o desenvolvimento habitual da planta. Um caso típico e atualmente frequente é a ferrugem do eucalipto, ocasionada pelo fungo fitopatogênico *Puccinia psidii* G. Winter, responsável por deformações em órgãos, perda de dominância apical e redução de crescimento das plantas. Sendo assim, o presente estudo teve como principal finalidade uma avaliação prospectiva da ação dos fungos sapróbios isolados do Semiárido Nordestino, na ativação de mecanismos latentes de resistência em mudas de eucalipto, de clone suscetível, contra a ação da *P. psidii*. Para tanto, realizaram-se testes fisiológicos com estes fungos, visando avaliar o crescimento micelial e a concentração de esporos em diferentes meios de cultura e temperaturas de incubação. Avaliou-se o potencial inibitório destes fungos na germinação de urediniósporos do agente causal da ferrugem. Nos testes *in vivo*, mudas de *Eucalyptus* do clone H13 foram inoculadas tanto com *P. psidii*, quanto com os possíveis indutores de resistência, visando avaliar a severidade da doença e determinar a atividade enzimática quando os indutores estão associados ao patógeno no hospedeiro. A ação dos sapróbios no potencial de enraizamento de miniestacas também foi avaliada. Os resultados mostraram que *Phialomyces macrosporus* apresentou indícios de ser um ótimo indutor biótico para a ferrugem inibindo germinação de urediniósporos de *P. psidii*, e aumentou a atividade das enzimas Fenilalanina amônia-liase, Peroxidase e β-1,3-glucanase. Outros fungos também apresentaram resultados promissores, como *Curvularia eragrostidis* que diminui a severidade da ferrugem e induziu enraizamento de estacas; *Stachybotrys chartarum* que diminuiu a severidade da ferrugem e aumentou a atividade da β-1,3-glucanase; e *Curvularia inaequalis* que aumentou a atividade da enzima Fenilalanina amônia-liase.

Palavras chave: bioprospecção, *Eucalyptus*, resistência.

SAPROBE FUNGI SEMIARID THE NORTHEAST: PHYSIOLOGICAL ASPECTS, ACTION IN CONTROL OF RUST AND INDUCTION OF ROOTING IN PLANTS EUCALYPTUS. Botucatu, 2013. 91p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal/Ciência Florestal) – Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista.

Author: CAROLINE GERALDI PIEROZZI

Adviser: EDSON LUIZ FURTADO

SUMMARY

Eucalyptus is affected by many pathogens, which may hinder the normal development of the plant. A typical case is the frequent and currently eucalyptus rust, caused by the plant pathogenic fungus *Puccinia psidii* G. Winter responsible for malformations in organs, loss of apical dominance and reduced plant growth. Thus, this study had as its main purpose a prospective assessment of the action of saprobe fungi isolated from the semiarid Northeast, the activation of latent resistance in seedlings of Eucalyptus clone susceptible, against the action of *P. psidii*. Therefore, we tested if physiological with these fungi, to evaluate the mycelial growth and spore concentration in culture media and incubation temperatures. We evaluated the inhibitory potential of these fungi on germination of urediniospores of the causal agent of rust. In in vivo tests, seedlings of Eucalyptus clone H13 were inoculated with either *P. psidii* as to the possible induction of resistance, to evaluate the severity of the disease and determine the enzymatic activity when the inductors are associated with the pathogen in the host. The action of saprobes in rooting potential of cuttings was also evaluated. The results showed that *Phialomyces macrosporus* showed signs of being a great biotic inducer for rust inhibiting germination of urediniospores of *P. psidii*, and increased the activity of the enzyme phenylalanine ammonia-lyase, peroxidase and β-1,3-glucanase. Other fungi also showed promising results, as *Curvularia eragrostidis* which decreases the severity of rust and induced rooting; *Stachybotrys chartarum* which reduced the disease severity and increased the activity of β-1,3-glucanase, and *Curvularia inaequalis* that increased activity the enzyme phenylalanine ammonia-lyase.

Keywords: bioprospecting, *Eucalyptus*, resistance.

1 INTRODUÇÃO

O eucalipto é originário da Austrália e da Indonésia, constituindo-se uma das principais fontes de matéria-prima para a produção de papel e celulose. Trata-se da essência florestal de maior cultivo no país, apresentando também um constante crescimento e consequentemente, gerando considerável retorno econômico (ABRAF, 2012). Neste sentido, o manejo de pragas e doenças limitantes no desenvolvimento das plantas em campo ou viveiros, tornou-se de fundamental importância, incentivando pesquisas e o desenvolvimento de manejo adequado a esses problemas.

Esta cultura, assim como diversas outras espécies florestais, é infectada por diferentes patógenos nas mais diversas fases de desenvolvimento. Os principais agentes patogênicos são de origem fúngica, causadores de doenças conhecidas como o mofo cinzento, a mancha de *Cylindrocladium*, a podridão da raiz, a seca de ponteiros e a ferrugem do eucalipto, uma das principais doenças acometedora da cultura, cujo agente causal é o fungo *Puccinia psidii* G. Winter. Os sintomas da ferrugem são observados principalmente em folhas jovens e tenras de mudas e plantas com até dois anos, causando também a perda de brotações em tocos e comprometendo-as severamente (FERREIRA, 1989). Condições como temperaturas entre 18 e 25°C,

elevada umidade relativa e condições de escuro são favoráveis para a germinação de urediniósporos de *P. psidii*, sendo os meses de dias curto como os de maio a agosto, os de maior ocorrência da doença no Brasil (RUIZ et al., 1989a).

O atual manejo da ferrugem do eucalipto restringe-se ao uso de materiais resistentes, associado ao uso emergencial de fungicidas químicos sistêmicos dos grupos dos triazóis e estrubilurinas, sendo o grupo dos triazóis o que apresenta melhores resultados de eficácia (COUTINHO et al., 1998; MASSON et al., 2008; MASSON, 2009). Porém, a eficácia do fungicida pode ser comprometida se a quantificação da doença não for realizada da forma adequada, sendo essa incidência ou gravidade estimada com base na intensidade visível no campo (MASSON et al., 2013). No entanto, o controle da ferrugem do eucalipto utilizando fungicidas é recomendado apenas em situações emergenciais, devido ao limitado registro de produtos para essa cultura (MASSON et al., 2013), além de, muitas vezes, o controle químico ser oneroso para o produtor. Isto tem incentivado os estudos de novos métodos de controle, como melhoramento genético visando resistência e o controle biológico.

Uma alternativa, que vem sendo muito estudada, para controle de doenças é o uso da indução de resistência biótica, a qual compreende no aumento do nível de resistência por meio de agentes externos, como fungos e bactérias, não afetando o genoma da planta (STADNIK et al., 2000). A resistência induzida pode ser detectada pela ativação de enzima envolvida neste mecanismo, sendo as principais, Fenilalanina amônia-liase, Peroxidase e β-1,3-glucanase (PASCHOLATI et al., 2005; ROMEIRO et al., 2009).

Neste sentido, as limitações de manejo dessa doença, associadas principalmente ao uso de genótipos resistentes, fomentaram o interesse pelo presente trabalho, resultando em uma pesquisa de indução de resistência pelo uso de fungos sapróbios oriundos do Semiárido Nordestino. Neste trabalho objetivou-se estudar aspectos relacionados à fisiologia desses fungos sapróbios, assim como verificar a sua ação na ativação de mecanismos latentes de resistência em mudas de eucalipto e a ativação de enzimas por esses fungos, além de observar a ação dos mesmos como potenciais indutores de enraizamento de miniestacas de eucalipto.

2 REVISÃO DE BIBLIOGRÁFICA

2.1 Importância do eucalipto no Brasil

O eucalipto pertence à Divisão Angiospermae, Classe Dicotyledonea, Ordem Myrtales, Família Myrtaceae e gênero *Eucalyptus* com um pouco mais de 600 espécies e subespécies. O nome eucalipto deriva do grego: eu (= bem) e kalipto (= cobrir), referindo-se à estrutura globular arredondada de seu fruto, caracterizando o opérculo que protege bem as suas sementes (BERTOLUCCI et al., 1995). Foi descrito pela primeira vez pelo botânico francês L'Héritier de Brutelle, no Sertum Anglicum, em Paris, valendo-se do material recolhido em expedições no território australiano (ANDRADE, 1961).

A data de introdução do eucalipto no Brasil é difícil ser afirmada. Acredita-se que foi implantado pelo Imperador D. Pedro I no Jardim Botânico do Rio de Janeiro em 1825 para fins ornamentais (ANDRADE, 1961). A partir de 1903 exemplares foram introduzidos no Horto Florestal de Rio Claro, por Edmundo Navarro de Andrade, que trabalhava na Companhia Paulista de Estradas de Ferro, objetivando estudar espécies ideais para a produção de madeira para alimentar as caldeiras das locomotivas, produzir moirões para ferrovias e postes para eletrificação (ANDRADE, 1961; LIMA, 1993). Desde então o eucalipto não parou de passar por constantes processos de melhoramento, visando atender as necessidades edafoclimáticas e disposição final da madeira nos diversos Estados brasileiros.

Menos de 1% das 600 espécies é usado com propósito industrial, ficando restrito a duas espécies: *E. globulus*, *E. grandis* e seu híbrido *E. urophylla*,

sendo também as espécies mais cultivadas no Brasil, pois apresentam características almejadas no cultivo comercial (COTTERILL; BROLIN, 1997). Trata-se de uma cultura de grande exigência hídrica e outros recursos naturais presentes no solo, mesmo utilizando-se de genótipos melhorados geneticamente (PALUDZYSZYN et al., 2006).

Em 2011, o Brasil apresentou uma área de cultivo de 4.873.952 hectares dessa cultura, representando um incremento de 2,5% em relação ao ano anterior. Atualmente os Estados de Minas Gerais e São Paulo são os que mais se destacam no cultivo desta essência, apresentando 28,8% e 21,2% de percentual da área de plantios, respectivamente (PALUDZYSZYN et al., 2006; ABRAF, 2012).

As áreas de florestas com eucalipto estão em expansão na maioria dos Estados brasileiros, principalmente Regiões Sul e Sudeste que são tradicionais nas atividades silviculturais. Além dos Estados considerados tradicionais no país neste setor, Maranhão, Tocantins, Piauí e Mato Grosso do Sul vem sendo considerados como novas fronteiras da silvicultura (ABRAF, 2012). Porém, com tamanha expansão da cultura, não existem materiais genéticos totalmente resistentes a pragas e doenças, inclusive à ferrugem do eucalipto.

A importância da cultura do eucalipto para o Brasil pode ser avaliada pela participação do setor florestal na economia do país. Os produtos florestais participam com 2,9% do Produto Interno Bruto Brasileiro e representam 4,2% das exportações nacionais, geram cerca de setecentos mil empregos diretos e quatro milhões de indiretos (PAINEL FLORESTAL, 2010; ABRAF, 2012).

Atualmente, a principal finalidade dos plantios brasileiros é abastecer as indústrias de papel, celulose, siderurgia e carvão vegetal, além de matéria prima para fabricação de painéis de madeira industrializada e madeira mecanicamente processada, havendo ainda uso em menores proporções para produção de pellets, mel, quebra-vento, extração de óleos essenciais para indústrias farmacêuticas e na construção civil.

Eucalyptus foi considerado um gênero praticamente livre de doenças até 1970. Porém, o progresso de áreas de reflorestamento de regiões mais quentes e chuvosas, o plantio de espécies mais sensíveis e o uso repetido da mesma área para plantio interferiram nos processos fisiológicos da planta, determinando desempenho anormal de suas funções vitais, e assim, criando condições favoráveis para ocorrência de uma série de doenças, entre elas encontra-se a ferrugem causada por

Puccinia psidii (KRUGNER; BACCHI,1995; JUNGHANS, 2000; FURTADO et al., 2008).

2.2 Ferrugem do eucalipto

Com mais de 6000 espécies de ferrugem existentes no mundo, a ordem das Pucciniales (ferrugens) é considerada uma das maiores ordens naturais de fungos, a qual compreende mais de um terço de todos os basidiomicetos conhecidos (AINSWORTH, 1971). No Brasil estima-se que, 725 espécies de ferrugens, das 3.000 existentes no país (HENNEN et al., 1982), são conhecidas e das quais pouco se sabe sobre a biologia e ciclos de vida dos patógenos, devido à dificuldade de cultivá-los em laboratório (FIGUEIREDO; PASSADOR, 2008).

A ferrugem é uma das doenças mais severas da cultura, tanto aqui no Brasil quanto em outras regiões tropicais e subtropicais do mundo (COUTINHO et al., 1998). Esta doença é causada por *Puccinia psidii* G. Winter, um patógeno biotrófico, ou seja, necessita de tecidos vivos do hospedeiro, o que não possibilita seu cultivo *in vitro* (ALFENAS, 2009). É um fitopatógeno, atualmente, muito comum na cultura do eucalipto e é considerado causador de uma doença grave em espécies suscetíveis à doença (FERREIRA, 1989). Nativa da América do Sul, a ferrugem foi relada pela primeira vez no Brasil em 1929 (GONÇALVES, 1929) e formalmente descrita em 1944 (JOFFILLY, 1944).

De acordo com uma pesquisa realizada por Furtado e Marino (2003), *P. psidii* foi encontrado em 14 espécies de eucalipto e 23 espécies de Myrtaceae nativas e exóticas no Brasil, sendo as espécies mais suscetíveis ao patógeno: *Eucalyptus grandis*, *E. cloeziana*, *E. dunnii*, *E. benthamii*, *E. phaeotricha*, *E. globulus* e *E. nitens* , e as espécies nativas ou exóticas da família Myrtaceae mais suscetíveis são: goiabeira, jabuticabeira, jambeiro, melaleuca, jamelãozeiro e calistemon, entre outras (FURTADO; MARINO, 2003; ALFENAS et al., 2004; ALFENAS, 2009).

A incidência da doença se dá principalmente em plantas jovens em viveiro e no campo, como folíolos, inflorescências e gemas (SILVEIRA, 1951; GALLI, 1980; SOUZA, 1985; FERREIRA, 1989).

Temperaturas na faixa de 18-25°C (ótimo 23°C), períodos prolongados de molhamento foliar, (orvalho noturno ou garoas por períodos superiores

à 6h por 5-7 dias consecutivos) e órgãos juvenis (folhas jovens e terminais de crescimento) são favoráveis à infecção (RUIZ et al., 1989). Em contrapartida, temperatura acima de 30°C e abaixo de 10°C, órgãos maduros e ausência de molhamento são fatores que desfavorecem a infecção (FERREIRA, 1983; RUIZ; ALFENAS, 1989; ALFENAS et al., 2004;).

Os primeiros indícios da presença do fungo são minúsculas pontuações, levemente salientes, verde-claras ou vermelho-amareladas. Após um ou dois dias, essas pontuações transformam-se em pústulas amarelas formadas por urediniósporos. Com o tempo as pústulas aumentam de tamanho, podendo apresentar mais de 20 urédias, cada uma com cerca de 0,2-0,3 mm de diâmetro (FERREIRA, 1989).

A infecção secundária irá ocorrer nos próximos dias que se seguem ao surgimento das primeiras pústulas, especialmente pela disseminação dos urediniósporos por orvalho da chuva. Sendo assim em condições favoráveis à doença, em poucos dias, os órgãos tenros mostram-se totalmente tomados pelo patógeno. É nesse estádio que a ferrugem apresenta seu sintoma inconfundível com, esporulação de coloração amarelo-gema-de-ovo. Em condições de campo, esta fase começa a desaparecer com cerca de uma a duas semanas depois de sua manifestação. Assim, as áreas atacadas apresentam regiões hipertrofiadas, verrucosas, com forte coloração ferrugínea (FERREIRA, 1989). Consequentemente, os tecidos afetados morrem e tornam-se secos, obtendo uma coloração escura, como se estivessem queimadas.

O fungo *P. psidii* produz dois tipos de esporos: urediniósporos e teliósporos. A infecção ocorre quando os esporos (predominantemente urediniósporos), espalhados pelo vento, chuva, insetos e pássaros, atingem o hospedeiro suscetível, germinando no hospedeiro, beneficiado por condições ambientais favoráveis para o desenvolvimento do fungo. Desse modo, os tubos germinativos dos urediniósps penetram diretamente nas células da epiderme através da cutícula formando os apressórios e adentrando por meio dos estômatos. O crescimento das hifas do fungo no interior do hospedeiro se dá interceluarmente, e em seguida intracelularmente com a emissão dos haustórios no interior das células, para absorção de nutrientes (FIGUEIREDO; CARVALHO JR., 1994). Quando o patógeno inicia sua reprodução, ocorre um rompimento da epiderme foliar ficando exposta a massa de urediniósps. Estas pústulas são geralmente salientes e podem coalescer, tomando uma parte considerável do limbo foliar (FIGUEIREDO; CARVALHO JR., 1994).

Quando em condições ambientais favoráveis os rebentos foliares e hastes das brotações mostram-se rapidamente tomados pela doença. Nessas condições, as plantas apresentam terminais de galhos e de haste principal ressecados, com áreas hipertrofiadas verrucosas e ferrugíneas, e com brotações abundantes e primórdios foliares deformados pelo ataque da ferrugem. Esse aspecto de superbrotamento, deformações dos primórdios foliares, o que impede alcançar seu desenvolvimento completo, confere à planta um aspecto atrofiado. Os sucessivos surtos da doença numa plantação têm acarretado, comumente, no aumento de árvores dominadas (FERREIRA, 1989).

Em condições ambientais desfavoráveis, na época mais quente do ano, ocorre a formação dos teliósporos, que possibilitam a sobrevivência do patógeno. Estas estruturas, apresentam ainda, em suas paredes, substâncias auto-inibidoras da germinação que possibilitam a sobrevivência do esporo na ausência do hospedeiro, porque impedem que ocorra a germinação de todos os esporos ao mesmo tempo (FIGUEIREDO; CARVALHO JR., 1994, 1995). Tais substâncias podem ser removidas pelas águas das chuvas ou irrigação. Como resultado dessas "estratégias" de sobrevivência, a infecção primária pode ocorrer assim que as condições tornam-se favoráveis, devido à liberação dos basidiósporos infectivos produzidos em decorrência da germinação dos teliósporos, dando continuidade à disseminação da doença (FERREIRA, 1983).

Em geral, quando as plantas atingem o estágio fenológico B (FERREIRA, 1989), ou seja, quando alcançam uma altura de aproximadamente 3-4 m, elas tornam-se mais resistentes à doença, provavelmente devido à diminuição das condições favoráveis à infecção, como partes jovens suscetíveis (ALFENAS et al., 2004).

O clima é um fator essencial que desempenha influência marcante sobre o desenvolvimento de doenças, podendo atuar sobre o patógeno, sobre o hospedeiro e sobre a interação patógeno x hospedeiro. O conhecimento das exigências climáticas dos fitopatógenos é de grande importância para o entendimento da evolução da doença no campo. Observa-se que para ocorrer o ataque de *P. psidii* são necessárias condições ambientais favoráveis associadas à fenologia do patógeno, podendo assim concluir que o fungo possui mecanismos de sobrevivência altamente eficientes, pois ambas as condições nem sempre ocorrem ao mesmo tempo e em qualquer época do ano (KRUGNER, 1980).

Ataques severos do patógeno podem ocasionar perda total da produção (JUNQUEIRA et al., 1997). Segundo Moraes (2012), no Estado de São Paulo a ferrugem pode causar danos de até 44% na produção. Porém, sob condições de infecção natural, é esporádica a elevada incidência da ferrugem do eucalipto em progênies suscetíveis durante o ano, podendo ocorrer durante um mês apenas, ou de cinco ou mais meses durante o ano (CARVALHO et al., 1994). Segundo Ruiz et al. (1989a; 1989b), tal fato ocorre quando prevalecem temperaturas noturnas entre 18º e 25ºC e umidade relativa superior ou igual à 90%, durante um período mínimo de oito horas. No Brasil, essas condições favoráveis para a ocorrência da ferrugem ocorrem nos meses de maio a agosto, períodos em que foram registrados altos índices da doença no campo (RUIZ et al., 1989a; TAKAHASHI et al., 1999).

O controle da ferrugem pode ser alcançado com a aplicação de fungicidas, a colheita de materiais genéticos suscetíveis em períodos desfavoráveis à doença (período de escape) e plantio de materiais resistentes. O plantio de eucalipto de crescimento rápido é outra alternativa recomendada (MASSON et al., 2013). O uso de materiais geneticamente resistentes é a medida de controle mais recomendada, uma vez que tem o menor custo, é fácil à conduta e reduz o impacto de fungicidas no meio ambiente (MASSON et al., 2013).

Os principais grupos químicos utilizados para o controle da doença são: triazol e estrobilurina, sendo que os melhores resultados de eficácia são apresentados pelo primeiro grupo. Dependendo da gravidade da doença, diferentes grupos químicos podem ser utilizados em viveiro e no campo. O uso de fungicidas como ferramenta é útil para o controle da ferrugem, pois permitem o uso de clones que são altamente produtivos, mas suscetíveis à doença (MASSON et al., 2006). Porém, no Brasil, os fungicidas devem ser utilizados apenas em caráter experimental ou emergencial, devido à política de registros de produtos do país. A gravidade da doença, deve ser verificada com base em critérios numéricos, uma vez que as escalas subjetivas são normalmente adotado (MASSON et al., 2008; MASSON et al., 2009).

A quantificação da doença foi realizada por Takahashi (2002), sendo avaliados os danos da ferrugem sobre o eucalipto e observada à existência de diferença significativa entre plantas doentes e sadias, as quais foram avaliadas aos 11 meses de idade. Os dados foram bem expressivos, para a altura média (a diferença entre plantas sadias e infectadas foi de 35,81%), para o diâmetro à altura do peito (50,49%) e, para o volume individual (98%). Os danos em árvores que apresentaram sintomas da

ferrugem variaram de 19,79 a 41%, resultados estes, consideráveis para o manejo desta cultura.

Diante dos fatos faz-se necessário desenvolver estudos que ofereçam novas alternativas de controle para a doença, que proporcionem um menor impacto ambiental e não fiquem presos aos materiais genéticos resistentes.

2.3 Fungos sapróbios do Semiárido Nordestino

Os fungos sapróbios isolados do Semiárido Nordestino estão depositados na CMB (Coleção de Microrganismos da Bahia) situada na Universidade Estadual de Feira de Santana – BA, sendo uma coleção certificada pelo CGEN (Conselho de Gestão do Patrimônio Genético). Essa coleção está sob a responsabilidade do Prof. Dr. Luis Fernando P. Gusmão.

2.3.1 *Curvularia*

O gênero *Curvularia* pertence ao Reino Fungi, Filo Ascomycota, Classe Euascomycetes, Ordem Pleosporales, Família Pleosporaceae e Gênero *Curvularia* (SIVANESAN, 1987). Atualmente, o gênero é composto por 35 espécies (KIRK et al., 2001), das quais algumas já foram conectadas ao seu estado teleomorfo que pertence ao gênero *Cochiliobolus drechsler*, um ascomiceto bitunicado (GUSMÃO et al., 2005). Os táxons desse gênero se distinguem pelas diferenças na morfologia dos conídios, número de septos e morfologia da colônia (SIVANESAN, 1987; HOSOKAWA, 2003; SIVANESAN, 2003; ZHANG-MENG et al., 2003; ZHANG-MENG et al., 2004; CHUNG; TSUKIBOSHI, 2005). A maioria das espécies são saprófitas, apesar de existirem algumas fitopatogênicas.

As características morfológicas de algumas espécies de *Curvularia* são similares com os gêneros *Bipolaris* e *Exserohilum* (SIVANESAN 1987, TSUDA; UEYAMA, 1985). No entanto os três gêneros podem ser separados por diferenças nos conidióforos e conídios (SIVANESAN, 1987; ALCORN, 1988). Segundo estudos de Olivier et al. (2000), análises filogenéticas moleculares mostraram

que *Bipolaris* e *Curvularia* são diferentes filogeneticamente de *Exserohilum*, e *Bipolaris* está intimamente relacionado com *Curvularia* (BERBEE et al., 1999).

Os fungos do gênero *Curvularia* constituem um dos mais fascinantes grupos, devido à grande frequência com que exemplares são encontrados e ao elevado número de espécies que são normalmente identificadas em diferentes substratos vegetais. O fungo, em geral, quando cultivado em meio de cultura produz conidióforos terminais ou laterais em hifas ou estroma, isolados em pequenos grupos com comprimento de até 240 µm, simples ou ramificados, direitos ou frequentemente flexuosos, ocasionalmente geniculados, de coloração castanha e superfície lisa (SIVANESAN, 1987).

A variabilidade morfológica observada nos fungos enquadrados em *Curvularia* fez com que as espécies fossem separadas em três grupos, 'geniculata', com a espécie-tipo *C. geniculata* (Tracy & Earle) Boedijn, 'lunata', com a espécie-tipo *C. lunata* (Tracy e Earle) Boedijn, e 'maculans', com a espécie-tipo *C. maculans* (Bancroft) Boedijn (= *C. eragrostidis* (Henn.) Mey.), que se diferenciaram pela forma dos conídios e número de septos (CORBETTA, 1964).

2.3.1.1 *Curvularia eragrostidis* (Henn.) J.A. Mey. 1959

A espécie *C. eragrostidis* pertence à classe Deuteromycetes, sub-classe Hiphomycetidae, ordem Moniliales e família Dematiaceae (BARNETT; HUNTER, 1972). Possui como sinonímias *Brachysporium eragrostidis* Henn., *Spondylocladium maculans* Bancroft e *Curvularia maculans* (Bancroft) Boedijn (ELLIS, 1971).

As características de *C. eragrostidis* quando cultivado em meio de cultura, são conidióforos solitários ou em grupos, simples ou raramente ramificados, retos a flexuosos, algumas vezes geniculados, sendo sua coloração marrom e com cerca de cinco µm de espessura (SIVANESAN, 1990). Segundo Moura (2005) em meio de cultura batata-dextrose-ágar o fungo cresce vigorosamente, formando colônias circulares de aspecto cotonoso e de coloração negra. Os conídios apresentam forma elipsoidal com dimensões de 18-37 x 11-20 µm, possuindo três septos, sendo que o septo mediano aparece como uma espessa banda escura, as células centrais apresentam coloração marrom escura e as células externas apresentam coloração marrom pálida (SIVANESAN, 1990).

Em sua fase teleomórfica, *Cochiliobolus eragrostidis*, apresenta ascomas superficiais, globosos a sub-globosos, escuros, 375-750 μm de largura, com um protuberante bico ostiolar, com dimensões de 250-1125 x 85-190 μm, o qual é desenvolvido sobre estroma colunar ou plano, firmemente aderido ao substrato na base. Tal fase foi observada apenas em condições laboratoriais (SIVANESAN, 1990).

A espécie *C. eragrostidis* foi registrada por Ellis (1971) em várias áreas tropicais em uma ampla variedade de hospedeiros. Esta espécie tem sido constatada nas seguintes espécies botânicas: inhame (*Dioscorea* spp.), sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench), batata doce (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.), amendoim (*Arachis hypogea* L.), abacaxi (*Ananas comosus* (L.) Merr) (MENEZES; OLIVEIRA, 1993), e arroz (*Oryza sativa* L.) (RASHID, 2001).

Em *Tapeinochilus ananassae* (gengibre abacaxi) foram confirmadas perdas severas em sua produção (FURTADO et al., 2007) e também na cultura do inhame, causando queima das folhas em Pernambuco (PAULA, 2000; BRITO, 2006).

Outras culturas como milho, chá e maracujá foram relatadas como hospedeiras do patógeno *C. eragrostidis* (MICHEREFF et al., 1995; AMUSA, 1997; CZERWENKA WENKSTETTEN et al., 1997; SAHA et al., 1999, 2000; PAULA et al., 2000; MUNIZ et al., 2003, ZHANG-MENG, 2004; DOU et al., 2006). Além de ser um patógeno causador de manchas marrons nas pétalas de orquídesa (DUFF; DALY, 2002; ENG-SOON, 2005).

Zhu e Qiang (2011), em estudo com *C. eragrostidis*, revelou que o fungo tem grande potencial como micoherbicida para controle de capim-colchão, o fungo é altamente virulento e elimina as plantas invasoras rapidamente, além de não causar impacto negativo em outras culturas importantes cultivadas na China, onde foi desenvolvido o trabalho, incluindo arroz, milho, algodão, soja, amendoim, melão e gramíneas, portanto, torna-se uma opção segura nessas lavouras onde capim-colchão é muitas vezes um grande problema.

2.3.1.2 *Curvularia inaequalis* (Shear) Boedijn 1907

C. inaequalis apresenta colônias efusas, cotonosas a feltrosas, cinzentas a negras. Os conídios formados em culturas novas apresentam dimensões de

25-44 x 9-15 µm, já em culturas velhas mostram-se a 20-38 x 8-14 µm. (ELLIS, 1971; SIVANESAN, 1987; KIM et al., 2000).

Estudos foram realizados ressaltando a importância biotecnológica dessa espécie. Como exemplo pode ser citado o estudo realizado por Afifi et al. (2002) que constatou-se a capacidade de produção de pectina liase por *C. inaequalis*, utilizando meio de cultura sólido com cascas de laranja frescas, lavadas e moídas. Esta enzima produzida pelo fungo é utilizada em indústrias de suco com a finalidade de diminuir a viscosidade.

O fungo *C. inaequalis*, é agente causal de doença em grama esmeralda, o qual provoca manchas irregulares e que aumentam com a elevação da temperatura de 25°C para 35°C (Kim et al., 2000).

2.3.2 ***Memnoniella levispora*** Subram, 1954

Morfologicamente as espécies do gênero *Memnoniella* se assemelham ao gênero *Stachybotrys* (BARRON, 1968; KENDRICK; CARMICHAEL 1973). Mesmo sendo reconhecidos como *Memnoniella* e *Stachybotrys* gêneros distintos, existem alguns pesquisadores que os consideram sinônimos (SMITH, 1962; KENDRICK; CARMICHEL, 1973; CARMICHAEL et al., 1980). Um dos fatores que deixam os gêneros mais próximos é a existência de espécies que ocupam habitats naturais semelhantes como sapróbios que vivem no solo ou no lixo (JONG; DAVIS, 1976). As duas espécies mais estudadas, *M. echinata* e *S. chartarum*, tem a capacidade de degradar celulose e usá-la como fonte de carbono para o crescimento.

Os conidióforos de *M. levispora* são de coloração castanha, 30–85 × 5–12,5 µm. Os conídios são solitários, constituídos por um corpo central com 1–2 células, com 3–7 ramificações; ramificações retas, divergentes, verrucosas, septadas, cilíndricas, ápices arredondados a truncados, de coloração castanha na base e, castanho-clara no ápice, 27,5–95 × 7,5–10 µm. Sua cultura apresenta uma coloração verde escuro à negra com colônias exsudada dispersas, negras, pulverulentas, com abundante esporulação. Micélio parcialmente superficial esbranquiçado com predominância da esporulação verde escuro e apresenta um crescimento moderado.

2.3.3 *Myrothecium*

Atualmente são aceitas 16 espécies no gênero *Myrothecium* (KIRK et al., 2001). Os fungos desse gênero têm como ambiente natural o solo ou a superfície foliar de plantas, sendo assim patógeno causador de doença em vários tipos de vegetação (ELLIS; ELLIS, 1985; WATANABE, 1994). Espécies do gênero *Myrothecium* degradam tanto amido como celulose (MUELLER; LOEFFLER, 1976), além de ser considerado um gênero comum em gramíneas.

O gênero *Myrothecium* ganhou notoriedade nos últimos anos devido aos avanços das pesquisas sobre as espécies *M. verrucaria* e *M. roridum* produtoras de micotoxinas (BEAN et al., 1992; BERGMAN et al., 1992; UENO, 1983; MOSS, 1996). Como consequência, numerosos estudos investigaram a toxicidade dessas micotoxinas produzidas por estes fungos (UENO, 1983; MOSS, 1996), as quais são tricotecenos macrocíclicos, que são considerados os tricotecenos mais tóxicos. Estudos têm demonstrado que duas toxinas produzidas por esse fungo são capazes de causar a inibição da síntese de proteínas, a supressão imune e o comprometimento da função de macrófagos alveolares (JOHANNING; YANG, 1997).

Em estudos Levetin et al. (1995; 1996) notaram a presença de grande quantidade conídios da espécie *Myrothecium* no sistema de ventilação de uma escola em Las Vegas em 1994, podendo estes ser causadores de problemas respiratórios.

2.3.3.1 ***Myrothecium leucotrichum*** (Peck) M.C. Tulloch 1972

Espécies de *Myrothecium* já foram descritas em associação com o solo e vivem em material vegetal ou o decompõem (TULLOCH, 1972; AGARWALL, 1980; RAO; HOOG, 1983; CASTAÑEDA, 1985, SUTTON, 1985; MATSUSHIMA, 1989; CASTAÑEDA; KENDRICK, 1991), bem como em algas verdes calcificadas (MICHAELIDES; KENDRICK, 1980), além de ser um fungo endofítico (BOHN, 1993). O gênero também contém espécies fitopatogênicas de importância econômica como *Myrotecium roridum* em café (SCHIEBER; ZENTMYER, 1968, TULLOCH, 1972).

A ocorrência de *Myrothecium leucotrichum* e outras espécies do gênero foram detectadas em folhas de azevém, trevo branco e diversas pastagens na Nova Zelândia por Menna et al. (1973).

Os conídios da espécie apresentam 6-8 x 1,5-2 µm de diâmetro e a colônia apresenta coloração verde e preta nas áreas de esporulação (TODE, 1829).

2.3.3.2 ***Myrothecium roridum*** Tode, 1970

O fungo *Myrothecium roridum* é um Tuberculáriaceo (Hypocreales), que produz micélio branco de aspecto cotonoso e esporodóquios verdes quando jovens e pretos quando maduros, distribuídos em anéis concêntricos na superfície da colônia. Os conidióforos são ramificados, com 2 a 5 fiálides finas hialinas ou escuras medindo de 11 – 16µm de comprimento por 1,5 – 2,0µm de largura. Os esporodóquios medem de 60 a 750µm de diâmetro. Os conídios são, geralmente, cilíndricos ou ligeiramente elipsóides a ovóides, medindo entre 5,5 - 7µm de comprimento e 1,5 a 2,5µm de espessura, com extremidades arredondadas, ou raramente com uma das extremidades truncadas, inicialmente hialinos, tornando-se verde quando maduros. Esse fungo é um habitante natural do solo, com ampla gama de hospedeiros e grande distribuição geográfica (DOMSCH et al., 1980; FITTON; HOLLIDAY, 1998), podendo sobreviver como saprófita no solo por longos períodos e em restos culturais (REGO; CARRIJO, 2000; VIANA et al., 2001), embora a radiação solar e os microrganismos do solo reduzam sua densidade populacional no solo (MURAKAMI et al., 2000).

Em meloeiro, *M. roridum* pode ocasionar uma doença chamada podridão-de-cratera que apresenta sintomas em ramas, folhas, raízes e frutos. São os sintomas em frutos, de fácil visualização, que denominam a doença, caracterizados por lesões variando de superficiais a profundas, frequentemente em forma de cratera, medindo de 2 a 50 mm de diâmetro, nas quais são produzidos esporodóquios de cor verde-oliva e exsudados escuros. As lesões podem ocorrer em qualquer parte do fruto, embora sejam mais frequentes na interface com o solo (BRUTON, 1996).

Além do meloeiro, outras culturas são hospedeiras de *M. roridum* como noni, abóbora, maxixe e pepino (CABRAL et al., 2009). Diferentes hospedeiros também foram descritos por outros autores como: amendoim, soja, algodão, girassol, arroz e feijão (MENDES et al., 1998; POLTRONIERI et al., 2003; SILVA; MEYER, 2006; QUEZADO-DUVAL et al., 2010).

O processo de patogênese exercido por *M. roridum* é baseado num arsenal de enzimas e toxinas com habilidade para decompor amido e celulose. A

elevada atividade celulolítica é consequência da produção de várias substâncias toxicas, tais como tricotecenos e roridina A, B, C, D e E. Durante a infecção, ocorre formação de numerosos esporos que germinam e originam hifas que produzem enzimas e metabólicos altamente tóxicos, facilitando a penetração e colonização do tecido. Além disso, *M. roridum* é um forte produtor de substâncias que induzem a síntese de etileno no hospedeiro (DOMSCH et al., 1980).

2.3.4 ***Phialomyces macrosporus*** P.C. Misra e P.H.B. Talbot 1964

O gênero *Phialomyces* foi descrito por Misra e Talbot (1964) e caracterizado por apresentar conídios asseptados, geralmente subglobosos a levemente elipsóides, limoniformes, apiculado nas extremidades, produzidos em cadeia e de coloração negra. A colônia tem um crescimento moderado, apresenta uma coloração verde-oliva a negro. O micélio é parcialmente aéreo, hifas hialinas e predominância da esporulação de cor verde-oliva a negro. Misra e Talbot (1964) e Ellis (1971) relataram a dimensão de conídios dessa espécie com 20–26 x 16–20 µm e 22–27 x 16–20 µm, de comprimento e largura, respectivamente. Matsushima (1975) relataram *P. macrosporus*, como sendo uma espécie de solo no Japão.

2.3.5 ***Stachybotrys chartarum*** (Ehrenb.) S. Hughes 1958

O gênero *Stachybotrys* compreende fungos sapróbios, comuns no solo (ELLIS, 1971, 1976), material vegetal em decomposição (WHITTON, 2001) e frutas silvestres (TANG et al., 2003), além de terem sido registrados em madeira submersa em manguezais (MARIA; SRIDHAR, 2003).

Jong e Davis (1976) estudaram 15 espécies de *Stachybotrys* isoladas de culturas vivas, sendo este trabalho o ponto de partida para descobertas sobre a sistemática do gênero. Desde então pelo menos 25 espécies de *Stachybotrys* foram descritas, porém apenas 11 espécies foram morfologicamente reconhecidas, sendo que uma delas é *Stachybotrys chartarum* (JONG; DAVIS, 1976).

Trabalhos que envolvem o fungo *S. chartarum* a doenças fúngicas de plantas são raros, porém em relação a problemas de saúde em humanos e animais são mais comuns. Entretanto, o detalhamento sobre esses assuntos não são cabíveis para esse trabalho, podendo ser apenas citados alguns trabalhos como o de

Jarvis et al. (1998) que associou as numerosas toxinas produzidas pelo fungo à morte de cavalos que consumiram feno contaminado por *S. chartarum*, na Rússia em 1931, descrito por Forgas (1972). Este fungo também pode estar associado a casos de hemorragia pulmonar em crianças (JARVIS et al., 1998).

2.4 Indução de resistência a patógenos

Os primeiros relatos sobre indução de resistência a patógenos foram apresentados em trabalhos realizados por Ray e Beauverie, ambos com a interação *Botrytis cinerea* x *Begobia* sp. (KESSMAN et al., 1994). Já no Brasil foram executados em 1970, os quais abordavam o patossistema cafeeiro x *Hemileia vastatrix* (BONALDO et al., 2005).

A indução de resistência em plantas a patógenos envolve a ativação de mecanismos latentes de resistência em uma planta por meio de tratamentos com agentes bióticos ou abióticos, visto que a indução não é a criação de uma resistência onde ela não existe, e sim a ativação desses mecanismos latentes (VAN LOON et al., 1998; BONALDO et al., 2005). Com isso as plantas tornam-se mais resistentes à infecção por alguns patógenos (ROSS, 1961).

Moraes (1992) definiu o termo indução de resistência para designar uma proteção local, ou seja, a indução de resistência apenas aos tecidos onde se efetuou o tratamento com o agente indutor, como também pode indicar uma resistência sistêmica, que se manifesta a distância do local de aplicação do indutor. Quando é induzida a resistência a uma planta, seja por eliciadores bióticos ou abióticos, não se trata de um caso de imunidade, pois a doença pode acontecer, porém com menos lesões e redução da esporulação quando se trata de patógeno fúngico (STICHER et al., 1997 citado por ROMEIRO et al., 2009).

Os agentes indutores de origem biótica ou abiótica são capazes de ativar ou induzir qualquer resposta de resistência nas plantas e são chamados de eliciadores (SMITH, 1996), os quais podem apresentar natureza química diversificada, como oligossacarídeos, glicoproteínas, oligopeptídeos e ácidos graxos, o que demonstra a inexistência de característica estrutural única na determinação da atividade eliciadora (STANGARLIN et al., 1999).

Quando um eliciador, agente indutor de resistência, entra em contato com tecidos da planta, desencadeia-se a síntese de substâncias que agem como sinais bioquímicos, difundindo-se pela planta e ativando os genes de resistência até então inativos (ROMEIRO et al., 2009).

Sabe-se que as plantas são continuamente expostas a diversos patógenos, e como defesa apresentam mecanismos para reconhecer e se proteger, desenvolvendo barreiras como mecanismos de defesa que podem ser pré e pós formados, restringindo a infecção/colonização. Os pré-formados são aqueles já presentes na planta antes mesmo do contato com o patógeno, tais como: ceras, cutícula, parede celular espessa e tricomas, além de substâncias químicas, como fenóis, alcaloides, enzimas hidrolíticas e inibidores proteicos. Já fatores ausentes ou em baixo nível na planta antes da infecção são considerados pós-formados, pois são produzidos ou ativados em resposta à presença do patógeno, como formação de papilas, lignificação, camada de cortiça, bem como compostos químicos como fitoalexinas (PASCHOLATI; LEITE, 1995; AGRIOS, 2005).

Tais mecanismos apresentam fatores envolvidos na resistência que podem ser subdivididos em estruturais ou bioquímicos. Os estruturais correspondem a barreiras físicas, enquanto os bioquímicos atuam através da produção de substâncias tóxicas ou repelentes ao patógeno, além de criar situações adversas ao estabelecimento do patógeno na planta (SBALCHEIRO, 2006; MAZARO, 2007).

O efeito protetor pode durar poucos dias ou por todo o ciclo da cultura, como é o caso de plantas de pepino inoculadas com *Colletotrichum lagenarium*, onde a proteção mostrou-se efetiva por 10 semanas (PASCHOLATI; LEITE, 1995). A ativação de mecanismos de defesa induzidos por fungos, bactérias, vírus e nematóides pode ser alcançada por diferentes vias, as quais podem ocorrer isolada ou concomitantemente (PASCHOLATI et al., 2005).

A indução de resistência por meio de agentes bióticos tem sido relatada em diversas culturas como pepino, fumo, batata, tomate, trigo, cevada, melancia e melão. Os indutores naturais normalmente são constituídos por moléculas de oligossacarídeos constituintes da parede celular de patógenos como glucanas, derivados de quitina, glicoproteínas e, ainda, polissacarídeos da parede celular vegetal (HANN, 1996). Os indutores bióticos mais estudados são: fungos e oomicetos, a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, bactérias como as espécies de *Bacillus* e vírus. Esses

indutores são organismos vivos capazes de ativar respostas de defesa localizadas ou de maneira sistêmica em plantas (DUKE et al., 1987).

O uso de indutores abióticos envolve a ativação de mecanismos latentes de resistência, por meio de agentes eliciadores que ativam diversos mecanismos de defesa vegetal, impedindo ou atrasando a entrada do patógeno. Dentre as substâncias sintéticas, destacam-se o ácido salicílico, acibenzolar-S-metil (ASM), ácido jasmônico, ácido β-aminobutírico e etefon, além de indutores físicos como temperatura, radiações ultravioletas (UV) e gama (PASCHOLATI et al., 2005). O composto sintético éster-S-metil do ácido benzo-(1,2,3)-tiadiazol-7-carbotióico (acibenzolar-S-metil, BTH, CGA 245704, Bion®, Actigard®), derivado do benzotiadiazol, é um análogo do ácido salicílico e tem sido amplamente estudado como agente indutor (TERRY; JOYCE, 2004).

Teixeira et al. (2005) avaliou a indução de resistência sistêmica por rizobactérias à ferrugem do eucalipto e confirmou uma redução na severidade da doença. Boava et al. (2010), também estudando a indução a *P. psidii* por Bion® (Acibenzolar-S-metil-ASM), Agro-Mos®, Dipel®, Ecolife40®, Crop-set® e um preparo de *Saccharomyces cerevisiae*, observou melhores resultados no controle da doença pelos tratamentos ASM, preparo de *S. cerevisiae* e Ecolife40®.

Estudando o custo adaptativo da indução para o feijoeiro, Kuhn e Pascholati (2010) avaliou os indutores *Bacillus cereus* e ASM contra *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, e relatou que ASM proporcionou um elevado custo, enquanto *B. cereus* apresentou custo reduzido.

O efeito indutor de resistência de ASM também foi estudado no controle da ferrugem do cafeeiro e confirmou o controle de *Hemileia vastatrix* de forma satisfatória em ano de safra baixa (FERNANDES et al., 2013).

Viecelli et al. (2010) estudou a ação de *Pycnoporus sanguineus* na indução de resistência a *Pseudocercospora griseola* em feijoeiro e relatou que *P. sanguineus* é eficiente para o controle alternativo de mancha angular.

A proteção contra a cercosporiose do cafeeiro pela aplicação da proteína harpina e ASM foi estudada por Galdeano et al. (2010) que comprovou que ambos indutores protegem mudas de café, somente até 30 dias após a inoculação com *Cercospora coffeicola*, sendo que 60 dias após apenas ASM apresentou bons resultados de controle.

2.5 Enzimas associadas à indução de resistência

O estado de indução de resistência em plantas pode ser detectado de várias formas, em termos laboratoriais e de pesquisa o método mais simples é a inoculação de plantas expostas e não expostas a eliciadores e quantificar a intensidade da doença. Entretanto, plantas expostas a eliciadores de resistência podem exibir menos doenças que as plantas não expostas, mas este fato pode não estar relacionado diretamente à indução e sim a outros fatores como inoculações realizadas da forma incorreta e variações nas condições do ambiente entre outros (ROMERO et al., 2009).

Existem outros critérios que podem ser utilizados para detectar a ocorrência da indução de resistência, como a restrição dos tecidos hospedeiros à multiplicação do patógeno e o aumento da atividade de enzimas ditas indicadoras do estado de indução (ROMERO et al., 2009). A restrição dos tecidos hospedeiros à multiplicação do patógeno se dá quando uma planta, após ser exposta a um eliciador apropriado, atinge o chamado estado de indução, é quando os patógenos têm mais dificuldade em se multiplicar no tecido hospedeiro.

Sabe-se que uma grande variedade de enzimas está relacionada com a resistência induzida, sendo peroxidades (POD), fenilalanina-amônia liases (FAL), β-1,3-glucanases (GLU) e quitinases as principais enzimas (LEON-KLOOSTERZIEL et al., 2005 citado por ROMERO et al., 2009). As mudanças na atividade dessas enzimas-chave estão correlacionadas aos mecanismos de defesa das plantas contra fitopatógenos.

As GLU são monômeros que produzem oligômeros com 2 a 6 unidades de glicose a partir do substrato laminarina, as β-1,3-glucanas, sendo este um importante componente da parede celular de muitos fungos (Cavalcanti et al., 2006). As GLU degradam a parede celular de patógenos liberando moléculas que agem como eliciadoras, nas etapas iniciais do processo de indução de resistência (VAN LOON et al., 1994 citado por ROMERO et al., 2009).

As POD, por estarem presentes nos tecidos das plantas, têm mais afinidade por substratos envolvidos na lignificação celular e podem ser ativadas quando a membrana plasmática da célula for danificada. Além disso, seus produtos têm atividade antimicrobiana direta na presença de peróxido de hidrogênio (STICHER et al., 1997 citado por ROMERO et al., 2009). Esta enzima participa de processos

fisiológicos, que são ativados em resposta à infecção, como a oxidação de compostos fenólicos (HOAGLAND, 1990; FRY, 1986).

A POD está envolvida em diversas outras reações como: ligações de polissacarídeos, oxidação do ácido indol-3-acético, ligações de monômeros, lignificação, cicatrização de ferimentos, oxidação de fenóis, regulação da elongação de células e a defesa de patógenos, a qual é a de maior interesse para esse trabalho (GASPAR et al., 1982; KAO, 2003). No processo de defesa esta enzima está envolvida no reforço da parede celular a partir da formação de lignina, suberina, polissacarídeos e glicopreoteínas ricas em hidroxiprolina (BOWLES, 1990), além de aumentar a produção de espécies ativas de oxigênio que apresentam ação antimicrobiana, e ainda incitam a formação de fitoalexinas (KRISTENSEN et al., 1999).

Madi e Katan (1998) observaram o aumento de forma sistêmica de POD em melão e em algodão em função do tratamento, por infiltração, de filtrado de cultura ou suspensão de esporos de *Penicilium janczewskii*, um fungo promotor de crescimento, que reduziu a incidência de tombamento de *Rhizoctonia solani* em 85%, em ambas culturas.

As FAL são enzimas ligadas ao metabolismo secundário das plantas, por isso são de extrema importância no mecanismo de proteção ao ataque de fitopatógenos. Estas enzimas geram precursores para a biossíntese de lignina e de outros compostos fenólicos que se acumulam em resposta à infecção (KLESSING; MALAMT, 1994 citado por ROMERO et al., 2009). E tem como principal função catalisar a eliminação não oxidativa da amônia da L-fenilalanina, transformando-a em *ácido trans-cinâmico*.

A FAL tem sido encontrada principalmente em plantas superiores, e também em fungos e bactérias (RÖSLER et al., 1997; XIANG; MOORE, 2005). Na planta está localizada principalmente no citoplasma das células, podendo estar associada também a organelas membranosas (DIXON; PAIVA, 1995; JONES, 1984).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Inibição da germinação *de P. psidii* por voláteis dos fungos sapróbios

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório do Departamento de Proteção Vegetal, setor Defesa Fitossanitária, da FCA-UNESP, Campus de Botucatu-SP.

Os isolados dos fungos sapróbios utilizados no presente trabalho estão depositados na CCMB (Coleção de Cultura de Microrganismos da Bahia) situada na Universidade Estadual de Feira de Santana – BA, sendo uma coleção fiel depositária certificada pelo CGEN (Conselho de Gestão do Patrimônio Genético) e foram fornecidos pelo Prof. Dr. Luis Fernando Gusmão. Estes fungos fazem parte do Projeto Sisbiota - Bioprospecção de fungos sapróbios no PPBIO/ Semiárido Nordestino para o controle de doenças infecciosas em plantas: indução de resistência – coordenado pelo Prof. Dr. Sérgio F. Pascholati. Os fungos utilizados foram selecionados seguindo critérios de crescimento e esporulação rápidos (Tabela 1).

Tabela 1. Fungos utilizados no trabalho.

Fungos
Curvularia eragrostidis
C. inaequalis
Dictyochaeta simplex
Gonytrichum clamydosporium
G.macrocladium
Memnoniella echinata
M. levispora
Myrothecium leucotrichum
M. roridum
Moorella speciosa
Pithomyces chartarum
Phialomyces macrosporus
Pseudobotrytris terrestres
Puccinia psidii (testemunha)
Stachybotrys chartarum
Stachylidium bicolor

Para verificar a inibição da germinação de urediniósporos de *P. psidii* por meio da ação de metabólitos voláteis liberados pelos fungos sapróbios, foi realizado um ensaio em que foram utilizadas duas partes inferiores de placas de poliestireno (Placa Petri – 90 x 15 mm), sendo que em uma parte havia meio de cultura ágar-água e na outra meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA). Onde continha o meio de cultura ágar-água foram feitos cinco cortes em discos (Figura 1) em seguida foram depositados 25µl da suspensão com 5.10^4 urediniósporos/mL de *P. psidii* em cada um desses cortes. Onde havia o meio de cultura BDA foi depositado um disco de cinco mm de diâmetro colonizado pelo fungo sapróbio, obtido da cultura crescida em meio BDA, a 25°C em fotoperíodo de 12 horas. As partes das placas foram unidas e devidamente vedadas com Parafilm®, mantidas a 21ºC sob fotoperíodo de 12 horas. Após 48 horas foi realizada a contagem de urediniósporos germinados.

Para a contagem cada corte em disco do meio de cultura ágar-água foi retirado da placa, colocado em uma lâmina e a estes foi depositada uma gota de lacto glicerol, para paralisar a germinação, em seguida foi colocada uma lamínula sobre a gota de lacto glicerol com azul de algodão. As lâminas foram levadas ao microscópio, e a contagem de urediniósporos foi realizada em campos de visão com aproximadamente 20 esporos (Figura 1).

Os testes foram compostos de cinco repetições por fungo, contendo cinco réplicas para cada repetição, sendo contados 20 urediniósporos por réplica, ou seja, 100 urediniósporos por tratamento. Os fungos que apresentaram melhores resultados neste teste foram utilizados para dar continuidade ao trabalho.

O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado, com 14 tratamentos e cinco repetições.

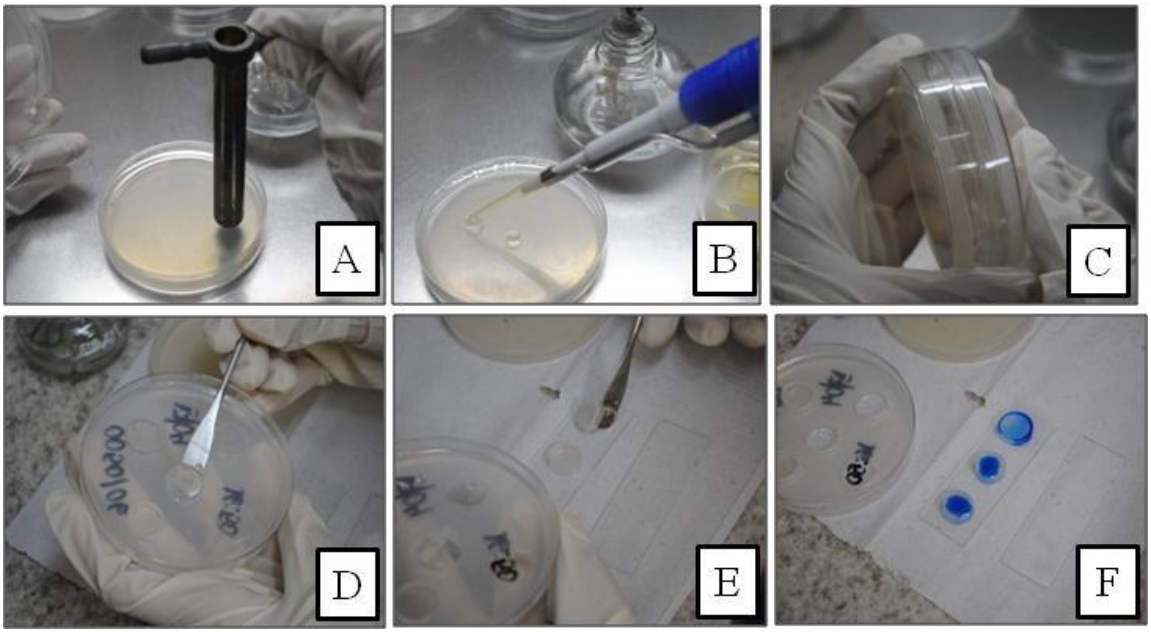


Figura 1. A - Corte de discos em meio Agar água; **B -** Deposição de 25 µl da suspensão de esporos; **C -** União e vedação das partes inferiores das placas; **D -** Retirada dos discos para a contagem de urediniósporos germinados, **E.** Preparo dos discos em lâminas; **F -** Adição de lacto glicerol com corante azul de algodão para paralisação da germinação e contagem de urediniósporos.

3.2 Testes fisiológicos - Crescimento micelial e produção de conídios

3.2.1 Fungos utilizados

Os fungos *Curvularia eragrostidis*, *C. inaequalis*, *Memnoniella levispora*, *Myrothecium leucotrichum*, *M. roridum*, *Phialomyces macrosporus* e *Stachybotrys chartarum* foram utilizados no decorrer do trabalho. Estes fungos apresentaram os melhores resultados no teste de inibição da germinação de urediniósporos de *P. psidii*.

3.2.2 Crescimento micelial

Os fungos foram submetidos a diferentes regimes de temperaturas, sendo estas: 20, 25 e 30°C e diferentes meios de cultura: Batata-Dextrose-Ágar (BDA) (39g/L de BDA), Extrato de Malte-Ágar (MEA) (20g/L de extrato de malte; 20g/L de ágar), Cenoura-Ágar (CA) [400mL/L de extrato de cenoura (20g/400mL de cenoura); 20g/L de ágar], segundo Alfenas et al., 2007, e Aveia-Ágar (AA) (20 g/L de aveia em flocos (Quaker®), 18 g/L de ágar), segundo Chagas et al., 2010. Os meios foram então esterilizados em autoclave por 30 minutos a 120°C, vertendo-os em placas de Petri para a utilização.

Os fungos foram reativados em meio de cultura BDA e mantidos a 25°C em fotoperíodo de 12/12 horas, por sete dias. Destas colônias foram retirados discos de cinco mm de diâmetro para montagem dos diferentes testes. Após a repicagem do fungo nos diferentes meios, procedeu-se a incubação em câmaras de crescimento (B.O.D.) com os diferentes regimes de temperatura e fotoperíodo de 12/12 horas. Para cada tratamento foram realizadas cinco repetições, sendo considerada cada placa de Petri (60 x 15 mm) uma repetição.

Para tal teste, fez-se a medição diária do diâmetro das culturas, em posição ortogonal (média das duas medições opostas), iniciando-se 24 horas a partir do momento em que foi colocado o disco do micélio na placa. A medição foi finalizada assim que uma placa de cada tratamento ficasse completamente preenchida pelo micélio. Esses dados foram utilizados no cálculo do índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM), conforme a fórmula descrita por Oliveira (1991).

$$IVCM = \sum \frac{(D - Da)}{N}$$

Sendo:

IVCM= índice de velocidade de crescimento micelial

D= diâmetro médio atual da cultura

Da= diâmetro médio da cultura do dia anterior

N= número de dias após a inoculação

O delineamento utilizado foi fatorial 4x3, com quatro meios de cultura e três temperaturas, utilizando cinco repetições por tratamento.

3.2.3 Concentração de conídios

Para a avaliação da produção de esporos foram utilizadas quatro placas, preenchidas pelo micélio, provenientes do experimento de crescimento micelial, a estas foram adicionados 10 mL de água destilada estéril, e a superfície da cultura foi raspada com auxílio da alça de Drigalski (Figura 2). As suspensões de cada placa foram filtradas em gazes estéreis e suspensas em 30 mL de água destilada estéril. Para cada suspensão de esporos, a concentração foi calibrada utilizando uma câmara de Neubauer, estabelecendo a concentração final de 1.10^4 conídios/mL, em cada repetição. Através dos dados coletados pela contagem calculou-se a concentração de inóculo (10^4) para cada repetição.

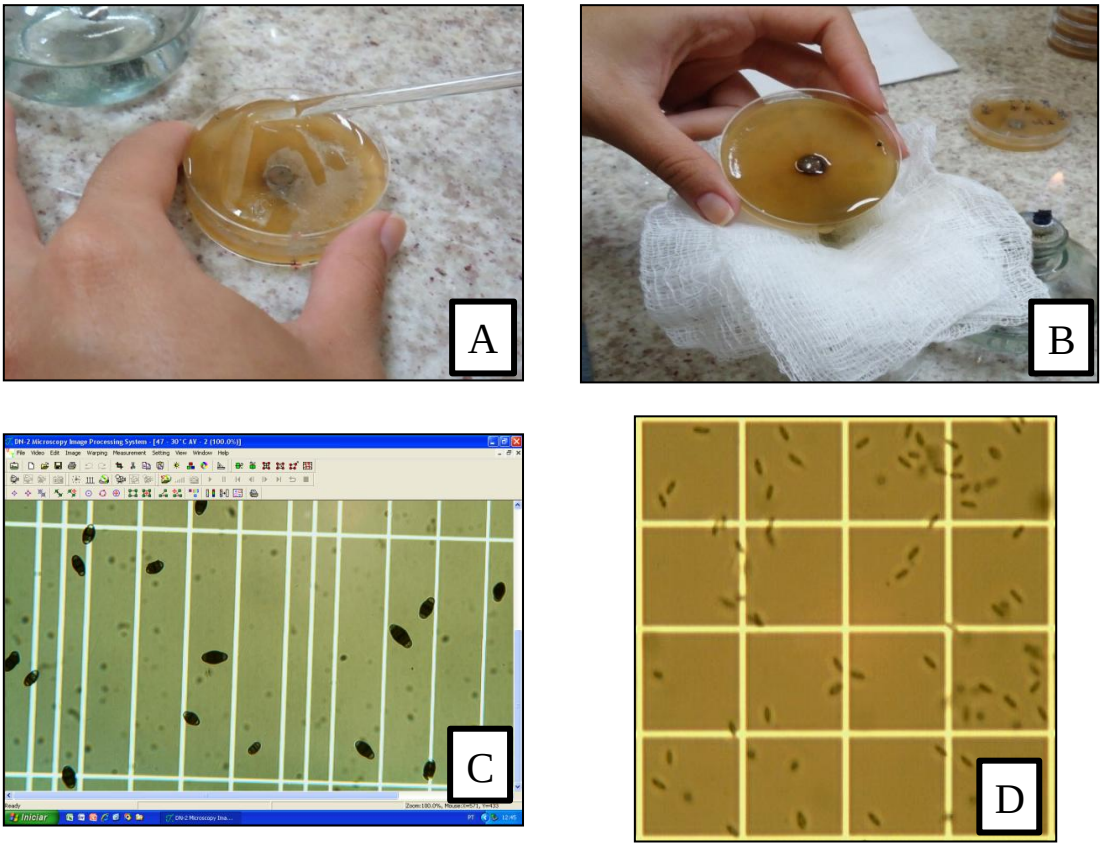


Figura 2. A - Raspagem da cultura com auxílio da alça de Drigalski; **B -** Filtragem da suspensão; **C -** Programa utilizado na contagem dos conídios; **D -** Conídios em câmara de Neubauer.

O delineamento utilizado foi fatorial 4x3, com quatro meios de cultura e três temperaturas, com quatro repetições por tratamento.

3.3 Indução do enraizamento

O experimento foi conduzido em casa de enraizamento no viveiro florestal da UNESP/FCA, em Botucatu-SP. Monitorando-se as condições do ambiente de forma a garantir que a temperatura e a umidade relativa do ar permanecessem constantes, em torno de 27°C e acima de 90%, respectivamente.

Os fungos utilizados neste teste foram: *Curvularia eragrostidis*, *C. inaequalis*, *Memnoniella levispora*, *Myrothecium leucotrichum*, *M. roridum* e *Phialomyces macrosporus*. Suspensões dos fungos sapróbios foram preparadas a uma

concentração 1.10^6 conídios/mL, aferidas em câmera de Neubauer. O substrato natural à base de composto de casca de arroz carbonizada: vermiculita (1:1), após a homogeneização, foi utilizado para enchimento de tubetes cônicos de 50 cm³ de capacidade, previamente esterilizados. Posteriormente o substrato contido nos tubetes, foi irrigado com suspensões dos fungos sapróbios (05 mL/tubete) (Figura 3). No tratamento testemunha doente foi preparada uma suspensão de *P. psidii* a uma concentração de 1.10^6 esporos/mL e inoculada via foliar, utilizando-se um borrifador manual.

Figura 3. Inoculação dos fungos sapróbios em substrato.

As miniestacas de dois clones (C1 e C2) híbridos das espécies *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*, denominados 'Urograndis' (Figura 4) foram coletadas em área de minijardim clonal e imediatamente estaqueadas, utilizando-se 60 estacas de cada clone para cada tratamento, pois a perda nessa fase de produção de mudas é muito elevada. Em seguida foram mantidas em casa de enraizamento por 20 dias e posteriormente avaliou-se o enraizamento. Dentre as 60 estacas de cada clone foram sorteadas 20 plantas por tratamento, sendo 10 plantas de cada clone, aferiu-se o peso úmido e seco de cada planta, além do comprimento, em centímetro, das raízes.

O delineamento utilizado foi fatorial 7x2, com sete fungos sapróbios e dois clones diferentes, utilizando-se 10 repetições por tratamento.

Figura 4. Híbridos das espécies *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* utilizados no teste de indução de enraizamento, clone 01 e clone 02, respectivamente.

3.4 Efeito dos fungos sapróbios na severidade da doença

Foram utilizadas mudas de eucalipto do clone H13 (suscetível à ferrugem), com dois meses de idade, para avaliação do efeito curativo e preventivo dos sapróbios no controle de *P. psidii*. As mudas foram gentilmente cedidas pelo Viveiro da Floresta, localizado no município de Itatinga-SP. Os fungos sapróbios utilizados neste teste foram: *Curvularia eragrostidis*, *C. inaequalis*, *Memnoniella levispora*, *Myrothecium leucotrichum*, *M. roridum*, *Phialomyces macrosporus* e *Stachybotrys chartarum*.

A inoculação do patógeno (tratamento testemunha) em plantas de eucalipto foi realizada utilizando-se uma suspensão na concentração de 1.10^6 urediniósporos/mL (Figura 5). Como fontes de inóculos foram utilizadas folhas de jambeiro contendo as pústulas, sendo pulverizado aproximadamente 10 mL da suspensão por planta com auxílio de um borrifador manual (Figura 5).

As mudas foram distribuídas em bandejas e a inoculação do patógeno foi realizada em câmara com condições controladas, umidade relativa maior de 95%, com ausência total de luz e temperatura de 18°C, por 24 horas e posteriormente as plantas continuaram no mesmo local a 21°C, fotoperíodo de 12 horas e com alta umidade relativa. A inoculação dos indutores de resistência foi realizada na

concentração de 1.10^5 esporos/mL, sendo adicionados 10 mL de suspensão por tubete, diretamente no substrato, com auxílio de uma seringa e uma agulha.

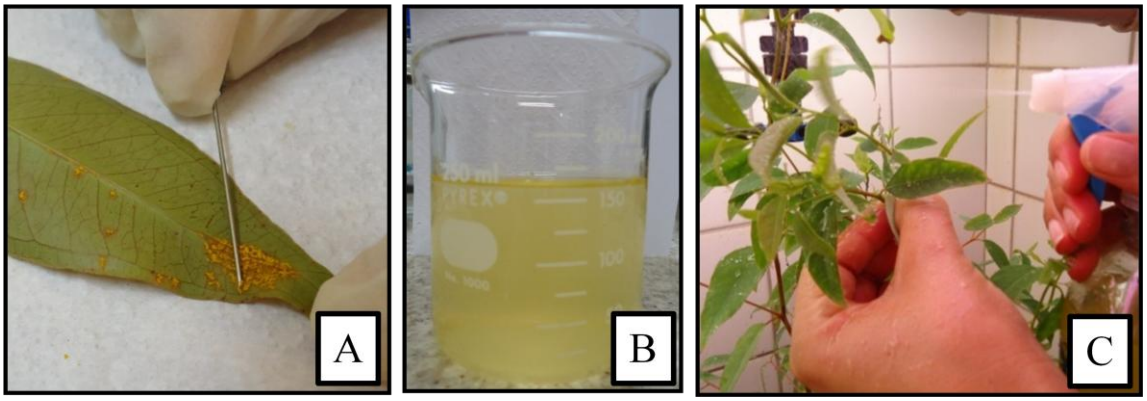


Figura 5. A - Coleta de urediniósporos em folha de jambeiro; **B -** Suspensão de urediniósporos na concentração de 1.10^6; **C -** Inoculação da suspensão de urediniósporos de *P. psidii* utilizando borrifador manual.

Para a verificação tanto do efeito curativo quanto do efeito preventivo dos fungos sapróbios no controle da ferrugem foram avaliados 16 tratamentos, sendo oito preventivos e oito curativos, com 12 repetições por tratamento. Cada repetição consistiu de uma única planta. Para o teste curativo o patógeno foi inoculado cinco dias antes dos indutores de resistência, já para o teste preventivo os indutores foram inoculados cinco dias antes do patógeno. Após 12 dias da inoculação do patógeno foi realizada a avaliação utilizando a escala de notas para a severidade da ferrugem em mudas (Figura 6).

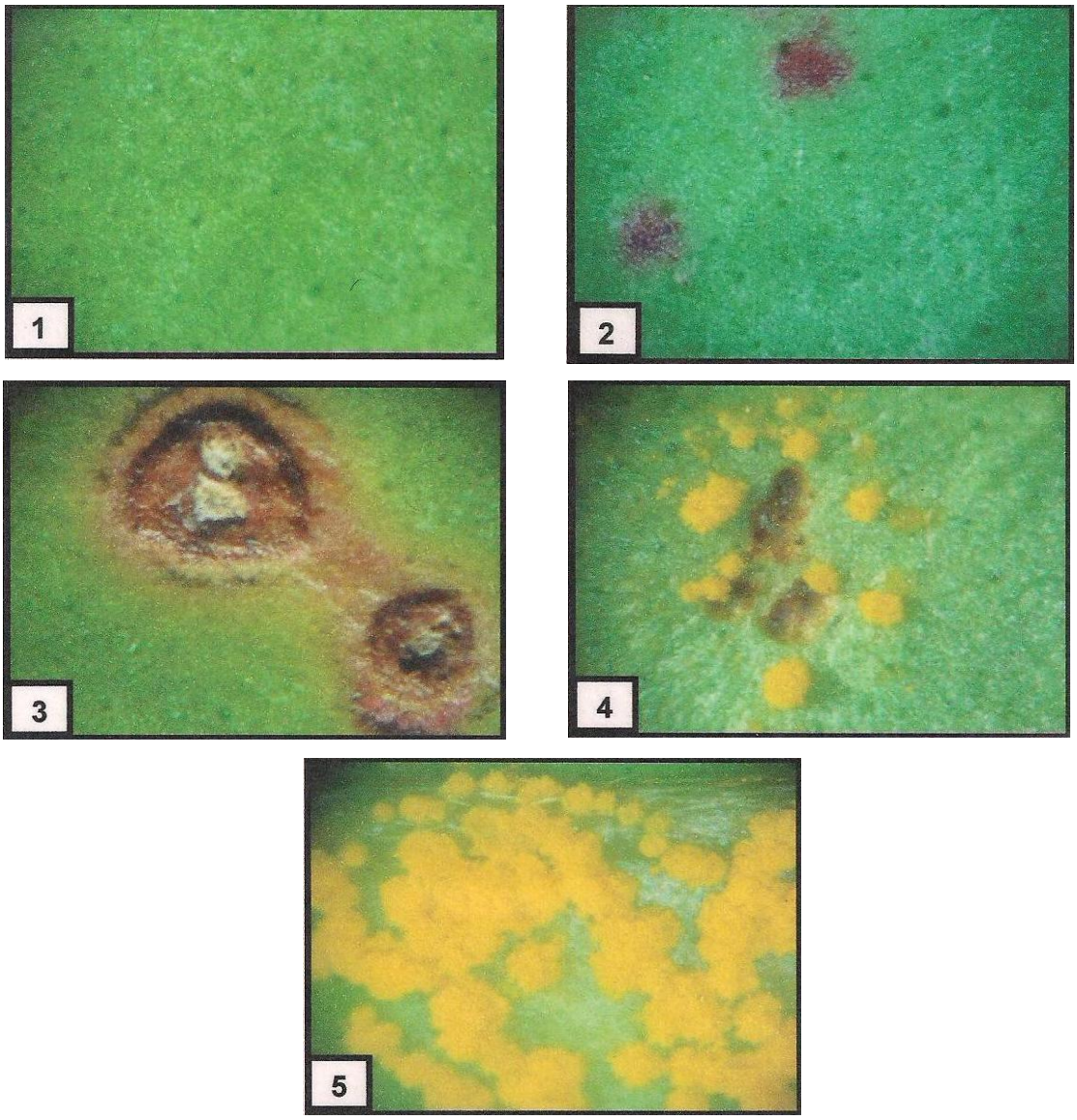


Figura 6. Escala de notas para avaliação da severidade de ferrugem do eucalipto em mudas. (1) Ausência total de sintomas ou reação de hipersensibilidade; (2) Reação de hipersensibilidade e/ou bronzeamento das folhas; (3) Lesão não apresentando pústulas; (4) Lesão com pústulas pouco esporulantes; (5) Lesão apresentando pústulas altamente esporulantes. **Fonte:** Pieri, C. de, 2011.

3.5 Atividade enzimática em folhas de eucalipto inoculadas com *Puccinia psidii* e tratadas com fungos sapróbios

Foram utilizadas mudas clonais, identificadas como H13, com 60 dias de idade, provenientes de híbridos das espécies *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus*

urophylla e suscetível à ferrugem. As mudas foram gentilmente cedidas pelo Viveiro Floresta, localizado no município de Itatinga-SP.

Os fungos sapróbios utilizados neste experimento foram: *Curvularia eragrostidis, C. inaequalis, Memnoniella levispora, Myrothecium leucotrichum, M. roridum, Phialomyces macrosporus* e *Stachybotrys chartarum*. Foi preparada uma suspensão de cada fungo sapróbio na concentração de 1.10^6 esporos/mL e aplicado cinco mL em cada tubete, diretamente no substrato. Já o tratamento com o indutor Acibenzolar-S-metil (ASM) foi pulverizado na dose de 50 ppm. Cinco dias após o tratamento com os possíveis indutores as plantas foram inoculadas com o patógeno *P. psidii.* As plantas referentes ao tratamento testemunha sadia foram borrifadas com água estéril e as plantas referentes ao tratamento testemunha doente foram inoculadas apenas com o patógeno *P. psidii*.

A obtenção do inóculo para o preparo da suspensão do patógeno consistiu na coleta de urediniósporos de *P. psidii* de plantas de jambeiro infectadas naturalmente no campo. A partir dessa coleta foi preparada uma suspensão de 5.10^4 esporos/ mL, em água destilada. O método de inoculação consistiu na aplicação da suspensão na face abaxial das folhas com o auxílio de um borrifador manual, e em seguida as plantas foram mantidas em câmara de crescimento regulada para 21ºC e escuro por 24 horas, e posteriormente as plantas continuaram no mesmo local a 21°C, fotoperíodo de 12 horas e com alta umidade relativa.

As amostras de folhas foram coletadas em diferentes estágios foliares 0, 24, 72 e 96 horas após a inoculação do patógeno. Estas folhas foram envoltas por papel laminado, e posteriormente banhadas em nitrogênio líquido para congelamento e acondicionadas a - 4ºC±1 até sua utilização.

As análises bioquímicas foram realizadas no laboratório de Fisiologia do Parasitismo no setor de Fitopatologia da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz-USP, localizado no município de Piracicaba-SP.

3.5.1 Obtenção do extrato proteico

Amostras de 1,0 g de folhas de cada tratamento foram maceradas em almofariz com nitrogênio líquido e em seguida homogeneizadas em cinco mL de tampão fosfato de potássio 100 mM e pH 7,5, contendo 10% de

Polivinipolilpirrolidona (PVPP). Os extratos foram centrifugados a 12350g por 30 min a 4 ºC e o sobrenadante foi transferido para tubos Eppendorf e armazenado a -20 °C (Figura 7). Os sobrenadantes foram utilizados para se avaliar a atividade de Peroxidase, Fenilalanina amônia-liase e β-1,3-glucanase.

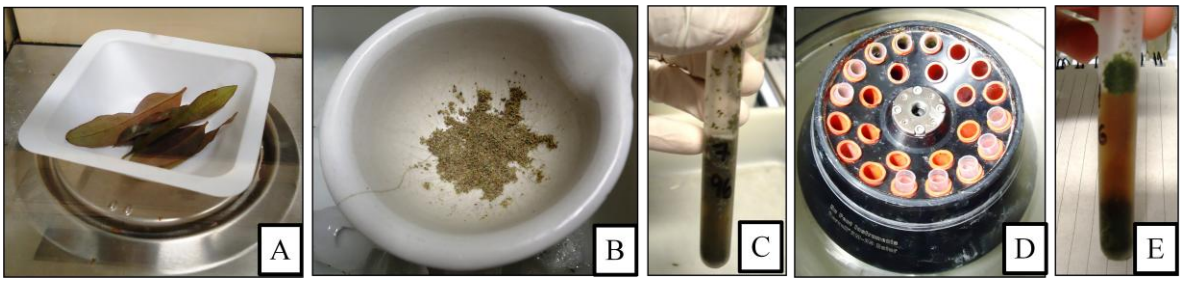


Figura 7. A - Pesagem de 1,0 g de folhas para cada tratamento; **B -** Folhas após maceração em nitrogênio líquido; **C -** Amostra homogeneizada em tampão de fosfato de potássio; **D -** Centrífugação de amostras a 12350g; **E -** Sobrenadante utilizado para analisar as enzimas Peroxidase, β-1,3-glucanase e Fenilalanina amônia-liase.

3.5.2 Determinação da atividade de Peroxidase

A atividade da peroxidase foi determinada a 30 ºC, através de método espectrofotométrico direto, pela medida da conversão do guaiacol em tetraguaiacol a 470 nm (LUSO; PASCHOLATI, 1999). A mistura da reação continha 0,5 mL do extrato proteico e 2,5 mL de solução, contendo 250 µL de guaiacol e 306 µL de peróxido de hidrogênio em 100 mL de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5). A cubeta de referência continha 3 mL da solução (0,5 mL extrato proteico + 2,5 mL de solução). A atividade da peroxidase foi expressa como atividade específica (unidades de absorbância.min^{-1}.mg $proteína^{-1}$). A concentração de proteínas, expressa em termos de equivalentes µg de albumina de soro bovino (ASB) em 0,5 mL de amostra (µg proteína mL^{-1}) foi determinada utilizando-se curva padrão de concentrações de ASB variando de 0 a 1,0 mg mL^{-1}.

3.5.3 Determinação da atividade de Fenilalanina amônia-liase

Para o preparo da mistura da reação de cada amostra foi adicionado 400 μL de tampão TRIS HCl 25 mM (pH 8,8) em 500 μL de L-fenilalanina e incubados por cinco minutos à 40°C. Passado o período de incubação foi adicionado à mistura 100 μL de extrato proteico e retornou a mistura para incubação por duas horas a 40°C. Depois de retiradas as amostras da incubação foi adicionado 50 μL de HCl com a finalidade de paralisar a reação. A absorbância das amostras foi determinada a 290 nm, contra tampão de extração, sendo subtraído de cada amostra o valor do controle. O controle de cada amostra correspondia a uma mistura contendo 100 μL do extrato proteico inativo, sendo que, para inativá-lo uma alíquota de 100 μL foi autoclavada por 30 minutos a 1 atm. Ao extrato proteico inativado foi adicionado 400 μL de tampão Tris HCl 25 mM, pH 8,8 e 500 μL de L-fenilalanina, sendo que o tampão mais a L-fenilalanina permaneceu em incubação por duas horas a 40°C. As leituras de absorbância foram expressas em Absorbância (Abs) de 290 nm/min/mg de proteína e multiplicadas pela constante 60 para transformá-las em Abs 290 nm/h/mg.

3.5.4 Determinação da atividade de β-1,3-Glucanase

A atividade da β-1,3-Glucanase foi determinada pela quantificação colorimétrica da glicose liberada do substrato de laminarina. O reagente ácido 3,5-dinitrosalicílico (ADNS) foi utilizado para a dosagem dos açúcares redutores liberados, conforme descrito por Miller (1959). A mistura da reação continha 0,15 mL de laminarina (4 mg mL^{-1}) em tampão acetato de sódio 100 mM (pH 5,0) e 0,1 mL do extrato proteico (ABELES et al., 1970). Após incubação durante duas horas a 40°C, a reação foi paralisada através da adição de 0,125 mL do reagente ADNS, e a solução foi aquecida em banho de água fervente por cinco minutos. Após o resfriamento em gelo, o volume da solução foi completado para 1,5 mL com água destilada, homogeneizada e absorbância determinada a 540 nm. A mistura de reação do branco continha 150 μL de substrato de laminarina, o qual foi incubado por duas horas à 40°C e posteriormente adicionado 125 μL do reagente ADNS, aquecido por cinco minutos em água fervente, resfriado em gelo e adicionado 1,125 μL de água destilada. Para o preparo das amostras controle foram incubados 150 μL de substrato de laminarina, 125 μL de reagente ADNS

e 100 μL de extrato proteico por duas horas a 40°C, finalizada a incubação foi resfriado em gelo e adicionado 1,125 μL de água destilada. O valor do branco foi subtraído de todos os valores das reações e desse valor obtido foi subtraído o resultado da leitura do controle correspondente de cada amostra. As leituras de absorbância foram plotadas em curva padrão de glicose, e a atividade enzimática específica foi expressa em mg de glicose liberada $min^{-1}mg^{-1}$ de proteína.

3.6 Análises estatísticas

Os dados obtidos foram submetidos ao teste F da análise de variância em que se verificaram as pressuposições do teste pela normalidade dos erros. Para as análises que apresentaram significância do teste F, procedeu-se à análise de variância, utilizando método de comparação entre médias através do teste Tukey a 1% de probabilidade, pelo programa estatístico Assistat- Assistência Estatística (SILVA; AZEVEDO, 2009).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Testes fisiológicos - Crescimento micelial e produção de conídios

4.1.1 *Curvularia eragrostidis*

Os maiores índices de velocidade de crescimento micelial (IVCM) para a espécie *C. eragrostidis* foram observados em meio BDA a 25 e 30°C e em MEA a 25°C (Tabela 2). Nos demais meios a velocidade de crescimento foi maior a 25°C em AA e a 30°C em CA. Avaliando-se as temperaturas isoladamente, notou-se que para 20°C e 30°C o meio mais favorável de crescimento foi BDA e a 25°C foram os meios BDA e MEA. Quando observado a interação meio de cultura e temperatura, as condições ideais para o desenvolvimento de *C. eragrostidis* foram em 25°C em BDA e MEA ou a 30°C em meio BDA.

Tabela 2. Índice médio da velocidade de crescimento micelial (cm/dia) de *Curvularia eragrostidis* em diferentes meios de cultura e em diferentes temperaturas de incubação.

Meios de cultura	**Temperaturas (°C)**		
	20°	**25°**	**30°**
AA	0,60 cC	0,89 bA	0,78 cB
BDA	0,86 aB	1,10 aA	1,04 aA
CA	0,60 cB	0,67 cB	0,78 cA
MEA	0,76 bC	1,09 aA	0,90 bB
P	< 0,001		

[1]/ Médias seguidas das mesmas letras minúsculas, dentro da mesma temperatura, e maiúsculas, dentro do mesmo meio de cultura, não diferiram entre si pelo Teste de Tukey, (α=0,01). Dados originais.
[2]/Somatória do diâmetro médio atual subtraído o diâmetro médio da cultura do dia anterior, dividido pelo número de dias após inoculação (∑(D-Da)/N).

Resultados semelhantes foram obtidos por Brito (2006), em estudos sobre a fisiologia e variabilidade genética de *C. eragrostidis* em inhame, o autor testou diferentes meios, dentre eles o BDA, que também favoreceu os melhores resultados de crescimento micelial a 25°C.

Analisando-se a concentração de conídios dentro dos diferentes meios de cultura notou-se um maior destaque em meio BDA a 20 e 25°C, em AA a 25°C e 30°C e em meio MEA a 30°C (Tabela 3). Quando avaliada a mesma variável dentro de cada temperatura, observou-se que a 20°C *C. eragrostidis* apresentou maiores concentrações de conídios nos meios AA e BDA, a 25°C em AA e a 30°C em MEA. Considerando-se a interação meio de cultura e temperatura foi possível observar maior produção de esporos em meio AA a 25°C, BDA a 20°C e em MEA a 30°C. Concentrações de conídios, próximas às obtidas no presente trabalho, foram encontradas por Paula (2000), em meio BDA a 25°C com 10 dias de incubação.

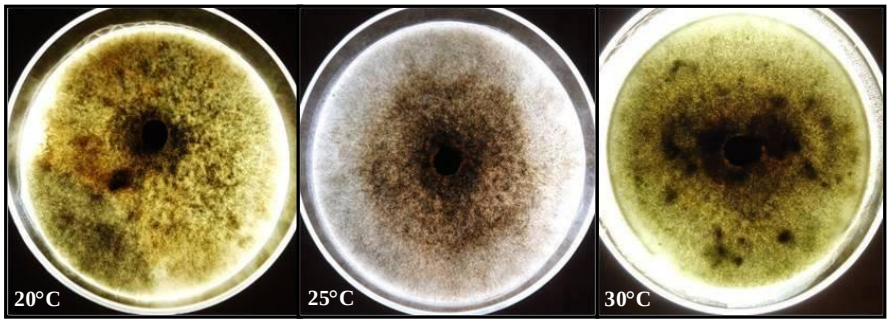
Tabela 3. Concentração média de conídios (10^4) de *Curvularia eragrostidis*, em mL, em diferentes meios e temperaturas de incubação.

Meio de cultura	**Temperatura (°C)[1]**		
	20°	**25°**	**30°**
AA	30,31 aB	51,56 aA	45,25 bA
BDA	24,18 aA	24,00 cA	2,31 cB
CA	1,56 bA	4,00 dA	3,81 cA
MEA	7,5 bC	38,56 bB	66,12 aA
P		<0,001	

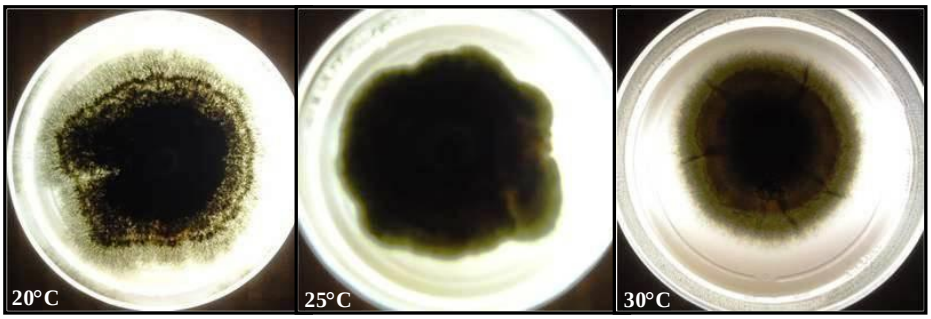
[1]/ Médias seguidas das mesmas letras minúsculas, dentro da mesma temperatura, e maiúsculas, dentro do mesmo meio de cultura, não diferiram entre si pelo Teste de Tukey, (α=0,01). Dados originais.

Brito (2006) estudando a fisiologia de diferentes isolados de *C. eragrostidis* provenientes de inhame, avaliou diferentes meios de culturas e regimes de luz, notando uma grande variação de concentração de conídios com maiores índices de esporulação em meio BDA no escuro contínuo a 25°C ($57,76.10^4$ conídios/mL). Já no presente trabalho observou-se concentrações mais baixas em fotoperíodo de 12 horas e no mesmo meio e temperatura (24.10^4 conídios/mL), porém em meio MEA a 30°C notou-se concentração de conídios superior ($66,12.10^4$ conídios/mL).

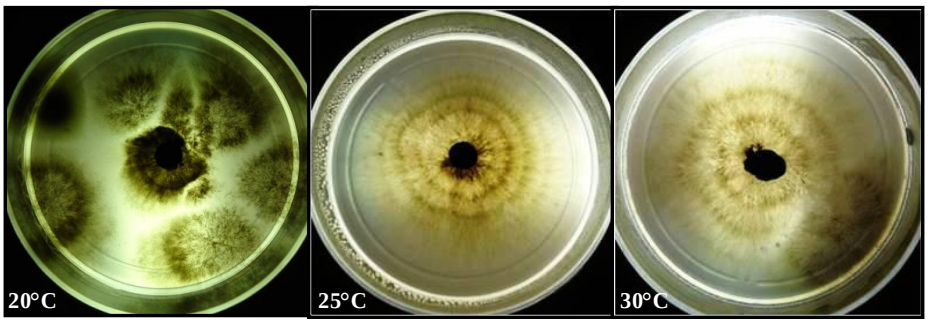
Aveia-ágar



Batata-dextrose-ágar



Cenoura-ágar



Malte-ágar

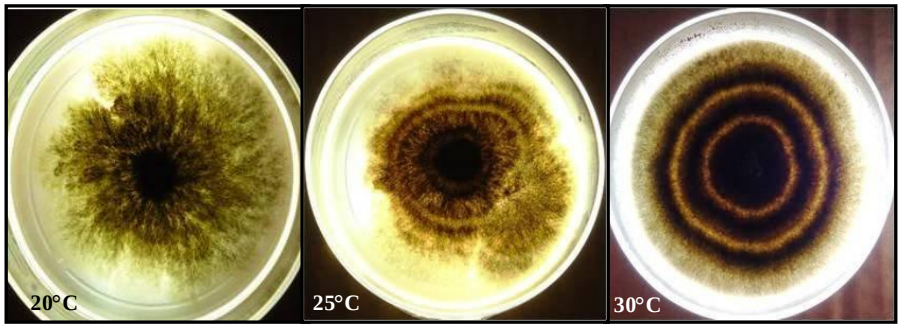


Figura 8. Crescimento micelial de *Curvularia eragrostidis* em diferentes meios de cultura e temperaturas de incubação.

4.1.2 *Curvularia inaequalis*

Analisando-se o crescimento micelial da espécie *C. inaequalis* nos diferentes meios, observou-se em AA a 25 e 30°C, em BDA a 20 e 25°C e em meio CA a 30°C um crescimento mais acelerado do fungo (Tabela 4). Já em meio MEA o crescimento não diferiu entre as temperaturas. Quando avaliadas as temperaturas isoladamente, notou-se que para as três temperaturas o meio que apresentou maior destaque foi CA. Considerando-se a interação dos fatores, meio de cultura e temperatura, observou-se que a condição ideal de crescimento de *C. inaequalis* é a 30°C em meio CA.

Kim et al. (2000) estudando a espécie *C. inaequalis* observou que a melhor temperatura de crescimento para o fungo foi 30°C em meio BDA, já no presente trabalho, em meio BDA, o fungo cresceu de forma mais rápida a 20 e 25°C, no entanto, foi obtido como condição ideal de crescimento o meio CA a 30°C.

Tabela 4. Índice médio da velocidade de crescimento micelial (cm/dia) de *Curvularia inaequalis* em diferentes meios de cultura e em diferentes temperaturas de incubação.

Meios de cultura	**Temperaturas (°C)**		
	20°	**25°**	**30°**
AA	0,68 cB	0,91 bA	0,90 bA
BDA	0,77 bA	0,77 cA	0,62 cB
CA	0,91 aC	1,10 aB	1,37 aA
MEA	0,66 cA	0,68 dA	0,66 cA
P		< 0,001	

[1]/ Médias seguidas das mesmas letras minúsculas, dentro da mesma temperatura, e maiúsculas, dentro do mesmo meio de cultura, não diferiram entre si pelo Teste de Tukey, (α=0,01). Dados originais.
[2]/Somatória do diâmetro médio atual subtraído o diâmetro médio da cultura do dia anterior, dividido pelo número de dias após inoculação (∑(D-Da)/N).

Esses resultados corroboram com os obtidos por Falloon (1976) em *Curvularia* sp. que apontaram 30°C como temperatura ideal para o desenvolvimento deste gênero. Ainda sobre *Curvularia* sp., Teixeira (2001) observou em cultivo *in vitro*

que este gênero não sofre influência da luz sobre o crescimento micelial, sendo capaz de desenvolver-se na presença ou ausência total de luz.

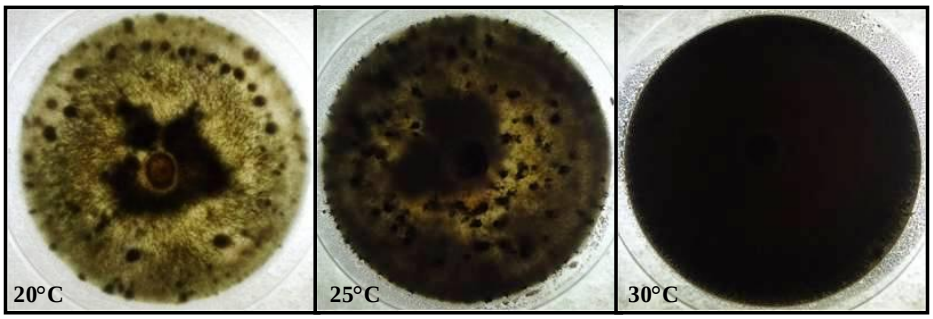
Quando avaliadas as concentrações médias de conídios de *C. inaequalis* nos diferentes meios notou-se que em AA em MEA a concentração foi maior a 30°C. Em BDA a produção de esporos foi maior a 25°C (Tabela 5). Já em meio CA a temperatura não influenciou na esporulação do fungo. Analisando separadamente as temperaturas, observou-se que a 20°C os meios AA e MEA se destacaram na concentração de conídios, no entanto nas temperaturas 25 e 30°C a produção de esporos foi maior em meio MEA. Quanto à interação meio de cultura e temperatura, foi possível observar que MEA a 30°C mostrou-se como condição ideal para produção de conídios desse fungo.

Tabela 5. Concentração média de conídios (10^4) de *Curvularia inaequalis*, em mL, em diferentes meios e temperaturas de incubação.

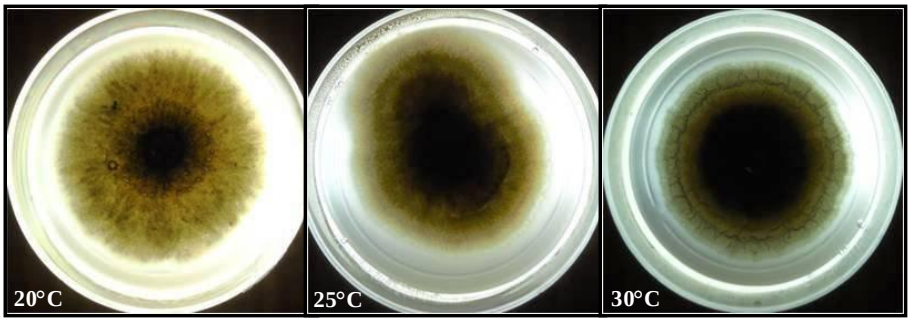
Meio de cultura	**Temperatura (°C)**		
	20°	**25°**	**30°**
AA	8,6 abB	11,5 bB	17,9 bA
BDA	4,9 bB	13,5 bA	5,3 cB
CA	3,9 bA	2,6 cA	7,1 cA
MEA	10,5 aC	27,9 aB	40,2 aA
P		< 0,001	

1/ Médias seguidas das mesmas letras minúsculas, dentro da mesma temperatura, e maiúsculas, dentro do mesmo meio de cultura, não diferiram entre si pelo Teste de Tukey, (α=0,01). Dados originais.

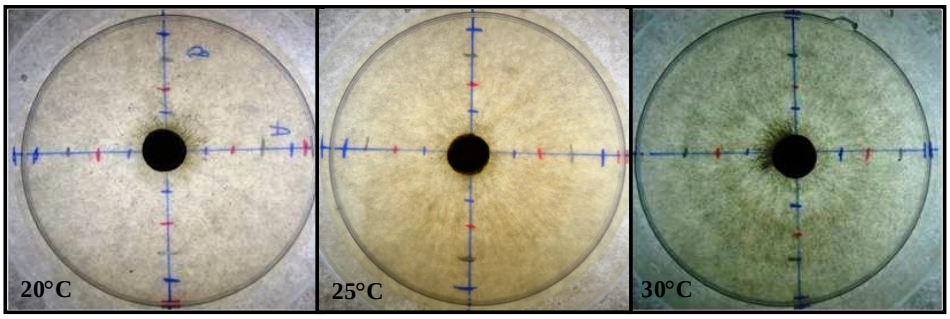
Aveia-ágar



Batata-dextrose-ágar



Cenoura-ágar



Malte-ágar

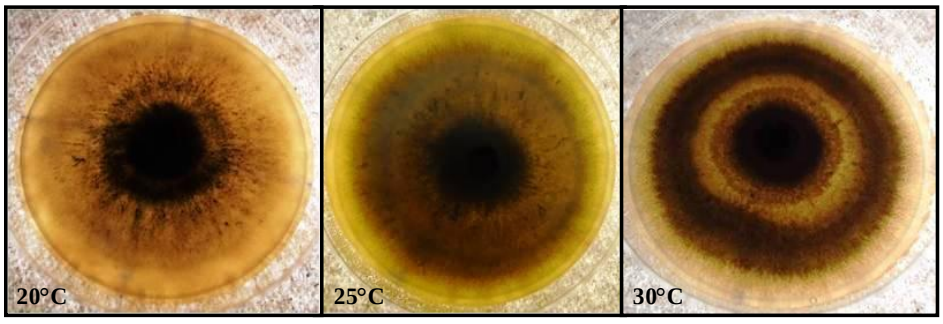


Figura 9. Crescimento micelial de *Curvularia inaequalis* em diferentes meios de cultura e temperaturas de incubação.

4.1.3 *Memnoniella levispora*

Avaliando-se o Índice de velocidade de crescimento micelial da espécie *M. levispora* foi possível observar um melhor crescimento em meio CA a 25°C. Em contrapartida, no mesmo meio a 30°C o fungo apresentou o pior crescimento (Tabela 6). Em meio AA não houve diferença de crescimento para as temperaturas de 20 e 25°C, já nos meios BDA e MEA notou-se um destaque para a temperatura de 25°C. Analisando-se isoladamente as diferentes temperaturas observou-se que para 20 e 25°C o maior crescimento em meio CA e a 30°C em meio AA. Quando avaliada a interação dos fatores, meio de cultura e temperatura, é possível chegar à condição ideal para o crescimento de *M. levispora*, sendo observado a 25°C em meio CA.

Tabela 6. Índice médio da velocidade de crescimento micelial (cm/dia) de *Memnoniella levispora* em diferentes meios de cultura e em diferentes temperaturas de incubação.

Meios de cultura	**Temperaturas (°C)[1]**		
	20°	**25°**	**30°**
AA	0,23 bA	0,22 cA	0,20 aB
BDA	0,18 cB	0,19 dA	0,17 bB
CA	0,26 aB	0,29 aA	0,13 dC
MEA	0,15 dB	0,27 bA	0,15 cB
P		< 0,001	

[1]/ Médias seguidas das mesmas letras minúsculas, dentro da mesma temperatura, e maiúsculas, dentro do mesmo meio de cultura, não diferiram entre si pelo Teste de Tukey, (α=0,01). Dados originais.
[2]/Somatória do diâmetro médio atual subtraído o diâmetro médio da cultura do dia anterior, dividido pelo número de dias após inoculação ($\sum$(D-Da)/N).

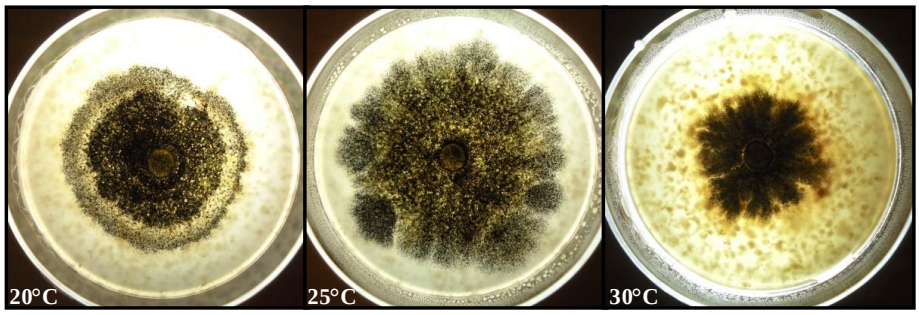
Maiores índices de esporulação do isolado *M. levispora* foram observados nos meios AA e MEA a 25°C, em BDA a 20 e 25°C e em CA a 30°C (Tabela 7). Avaliando-se as temperaturas isoladamente, notou-se que a 20°C a concentração de conídios foi maior nos meios AA e BDA. Já na temperatura de 25°C, o mesmo ocorreu nos meios AA e MEA, e a 30°C não houve diferença de esporulação entre os tratamentos.

Tabela 7. Concentração média de conídios (10^4) de *Memnoniella levispora*, em mL, em diferentes meios e temperaturas de incubação.

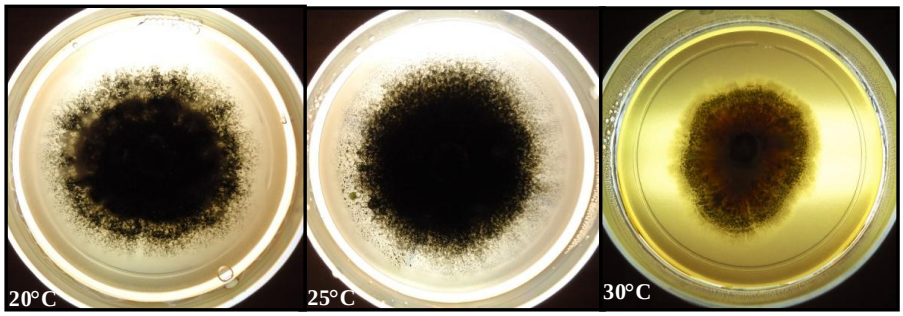
Meio de cultura	**Temperatura (°C)[1]**		
	20°	**25°**	**30°**
AA	864 aB	1408 aA	3,2 aC
BDA	816 aA	941 bA	3,2 aB
CA	67,5 bA	137 cA	0,2 aA
MEA	10,5 bB	1584 aA	0,7 aB
P		<0,001	

[1]/ Médias seguidas das mesmas letras minúsculas, dentro da mesma temperatura, e maiúsculas, dentro do mesmo meio de cultura, não diferiram entre si pelo Teste de Tukey, (α=0,01). Dados originais.

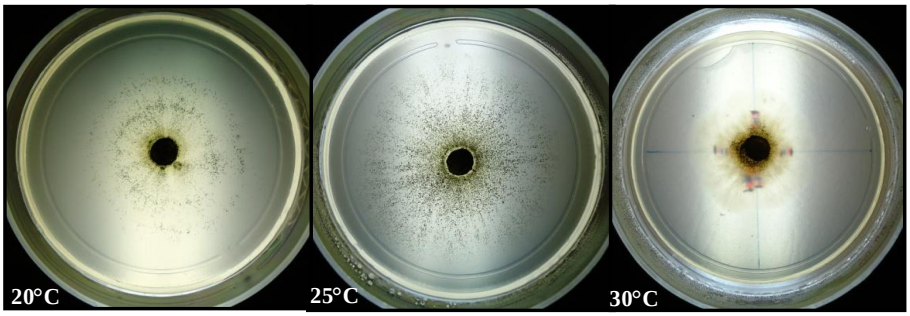
Aveia-ágar



Batata-dextrose-ágar



Cenoura-ágar



Malte-ágar

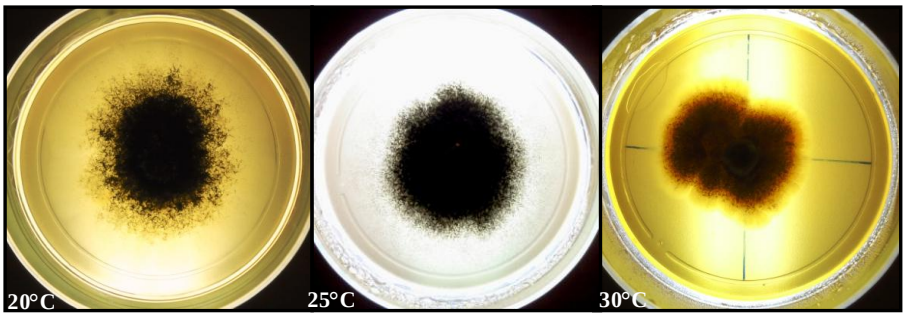


Figura 10. Crescimento micelial de *Memnoniella levispora* em diferentes meios de cultura e temperaturas de incubação.

4.1.4 *Mytothecium leucotrichum*

O fungo *M. leucotrichum* apresentou bom crescimento em meio de cultura CA em todas as temperaturas, destacando-se o IVCM em meio AA a 25°C, sendo ainda essas, as condições ideais de crescimento quando analisada a interação entre meios de cultura e temperaturas (Tabela 8). Em meio MEA os maiores índices de velocidade de crescimento foram observados nas temperaturas de 25 e 30°C. Já em meio BDA não foi obtida uma diferença significativa entre as temperaturas. Quando analisadas as temperaturas de forma isolada é possível observar que a 20 e 30°C o meio CA apresentou maior crescimento micelial e a 25°C apenas o meio BDA diferiu dos outros tratamentos, apresentando um menor crescimento.

Tabela 8. Índice médio da velocidade de crescimento micelial (cm/dia) de *Myrothecium leucotrichum* em diferentes meios de cultura e em diferentes temperaturas de incubação.

Meios de cultura	**Temperaturas (°C)[1]**		
	20°	**25°**	**30°**
AA	0,34 bB	0,39 aA	0,28 bC
BDA	0,26 cA	0,28 bA	0,26 bA
CA	0,39 aA	0,36 aA	0,36 aA
MEA	0,22 dB	0,25 bA	0,27 bA
P		< 0,001	

[1]/ Médias seguidas das mesmas letras minúsculas, dentro da mesma temperatura, e maiúsculas, dentro do mesmo meio de cultura, não diferiram entre si pelo Teste de Tukey, (α=0,01). Dados originais.
[2]/Somatória do diâmetro médio atual subtraído o diâmetro médio da cultura do dia anterior, dividido pelo número de dias após inoculação (∑(D-Da)/N).

As maiores concentrações de conídios de *M. leucotrichum* foram observadas em meio AA a 25°C e a na temperatura de 30°C nos meios CA e MEA (Tabela 9). Esse fato ocorreu quando analisada a interação dos fatores meio de cultura e temperatura. Observando-se os meios isoladamente, notou-se em AA e BDA uma maior esporulação do fungo na temperatura de 25°C, sendo que nos demais meios não houve

diferença significativa entre temperaturas. Estudando as temperaturas separadamente foi possível observar que o meio CA concentrou mais conídios a 20 e 25°C, já na temperatura de 30°C não houve diferença de esporulação entre os meios.

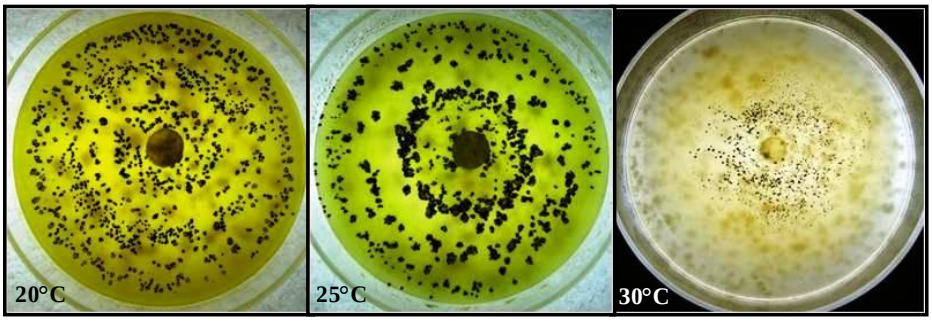
Tabela 9. Concentração média de conídios (10^4) de *Myrothecium leucotrichum*, em mL, em diferentes meios e temperaturas de incubação.

Meio de cultura	**Temperatura (°C)[1]**		
	20°	**25°**	**30°**
AA	2976 aB	6432 aA	165,7 aC
BDA	36,2 bB	2824 bA	161,0 aB
CA	4,3 bA	30,4 cA	9,0 aA
MEA	37,5 bA	42,7 cA	106,0 aA
P		< 0,001	

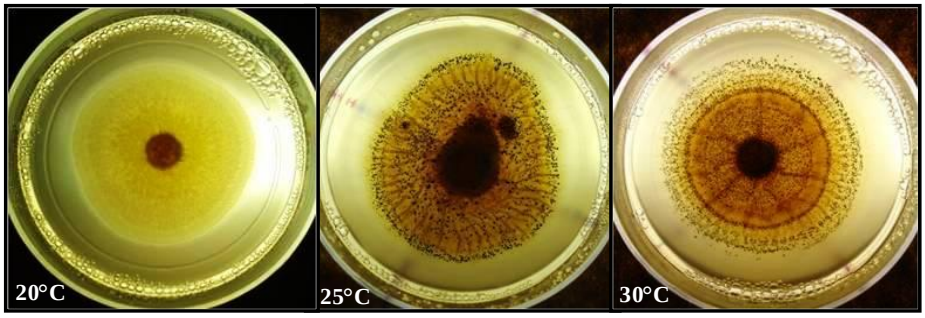
[1]/ Médias seguidas das mesmas letras minúsculas, dentro da mesma temperatura, e maiúsculas, dentro do mesmo meio de cultura, não diferiram entre si pelo Teste de Tukey, (α=0,01). Dados originais.

Na Figura 11 nota-se as diferenças de crescimento da colônia de *M. leucotrichum* em diferentes meios de cultura e diferentes temperaturas de incubação, sendo possível destacar uma grande formação de esporodóquios em meio AA a 20 e 25°C.

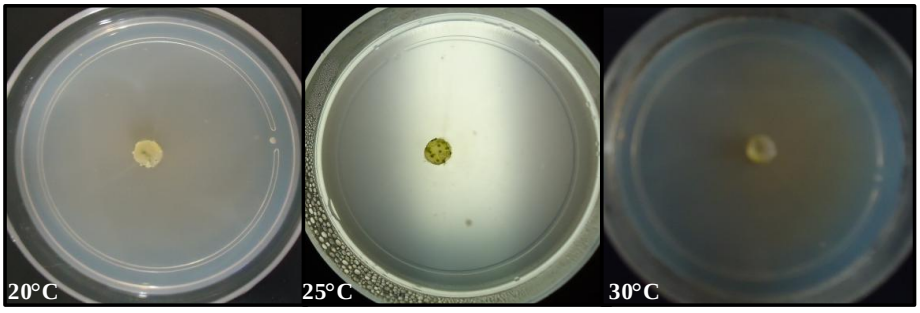
Aveia-ágar



Batata-dextrose-ágar



cenoura-ágar



Malte-ágar

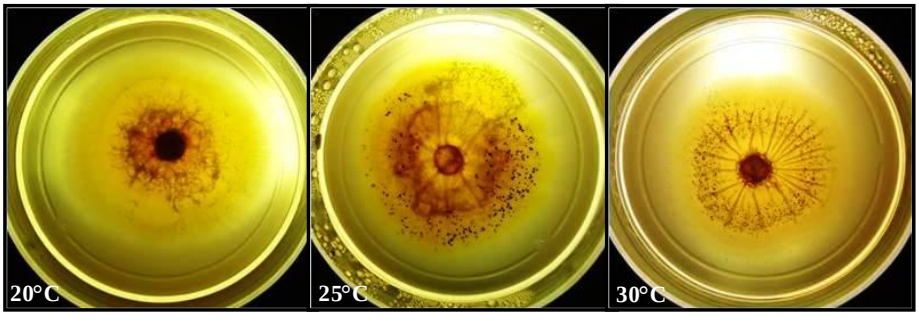


Figura 11. Crescimento micelial de *Myrothecium leucotrichum* em diferentes meios de cultura e temperaturas de incubação.

4.1.5 *Myrothecium roridum*

Avaliando-se o índice da velocidade de crescimento micelial (IVCM) para *M. roridum* foi observado que nos meios BDA e CA o fungo cresceu de forma mais rápida em 25 e 30°C (Tabela 10). Em meio AA o crescimento foi maior a 30°C e em MEA a 25°C. Analisando as temperaturas de forma isolada notou-se que a 20°C apenas o meio BDA diferiu dos demais, apresentando um menor crescimento, a 25°C o crescimento micelial foi significativo em meio CA e na temperatura de 30°C os meios AA e CA se destacaram para essa variável.

Okunowo et al. (2010) estudando o crescimento micelial e esporulação de *M. roridum* em diferentes meios, observaram que dentre os meios testados, BDA a 25°C apresentou-se como a melhor condição para seu crescimento micelial, apresentando a melhor esporulação em meio MEA. No presente trabalho, as condições que proporcionaram maior crescimento do fungo foram CA a 30°C e maior esporulação em AA a 30°C.

Tabela 10. Índice médio da velocidade de crescimento micelial (cm/dia) de *Myrothecium roridum* em diferentes meios de cultura e em diferentes temperaturas de incubação.

Meios de cultura	**Temperaturas (°C)[1]**		
	20°	**25°**	**30°**
AA	0,31 abC	0,39 bB	0,49 aA
BDA	0,26 bB	0,39 bA	0,35 bA
CA	0,34 aB	0,54 aA	0,50 aA
MEA	0,28 abB	0,34 bA	0,29 cAB
P		< 0,001	

[1]/ Médias seguidas das mesmas letras minúsculas, dentro da mesma temperatura, e maiúsculas, dentro do mesmo meio de cultura, não diferiram entre si pelo Teste de Tukey, (α=0,01). Dados originais.
[2]/Somatória do diâmetro médio atual subtraído o diâmetro médio da cultura do dia anterior, dividido pelo número de dias após inoculação (∑(D-Da)/N).

Em relação à concentração de conídios, é possível destacar que nos meios AA e MEA favoreceram uma acentuada produção de esporos a 30°C, já os demais meios não apresentaram diferenças significativas entre as temperaturas avaliadas

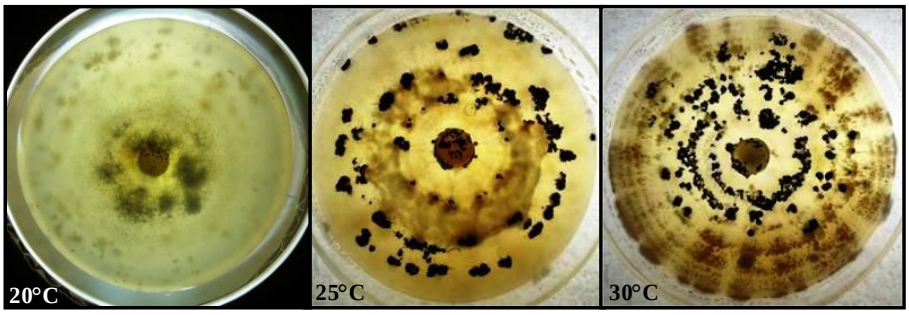
(Tabela 11). Quando analisadas as temperaturas de forma isolada notou-se que tanto a 25°C quanto a 30°C o substrato que induziu maior produção de conídios foi AA, no entanto a 20°C não houve diferença entre os meios estudados.

Tabela 11. Concentração média de conídios (10^4) de *Myrothecium roridum*, em mL, em diferentes meios e temperaturas de incubação.

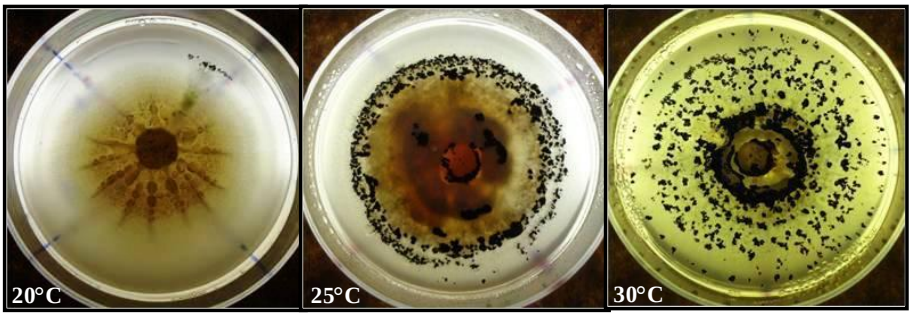
Meio de cultura	**Temperatura (°C)[1]**		
	20°	**25°**	**30°**
AA	20 aC	3840 aB	7040 aA
BDA	40 aA	35 cA	322 cA
CA	10 aA	64 cA	336 cA
MEA	768 aC	2336 bB	4328 bA
P		<0,001	

[1]/ Médias seguidas das mesmas letras minúsculas, dentro da mesma temperatura, e maiúsculas, dentro do mesmo meio de cultura, não diferiram entre si pelo Teste de Tukey, (α=0,01). Dados originais.

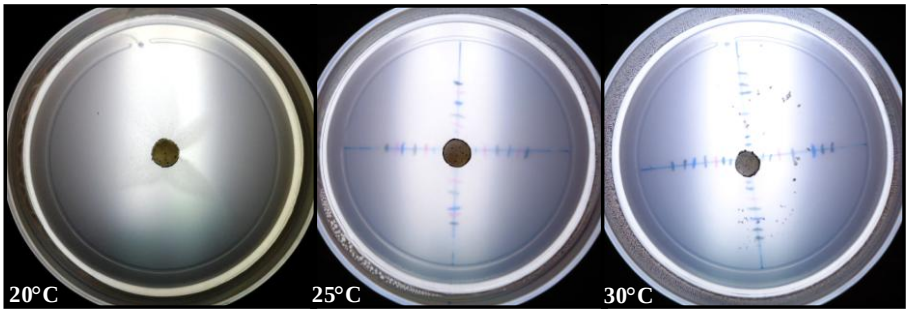
Aveia-ágar



Batata-dextrose-ágar



Cenoura-ágar



Malte-ágar

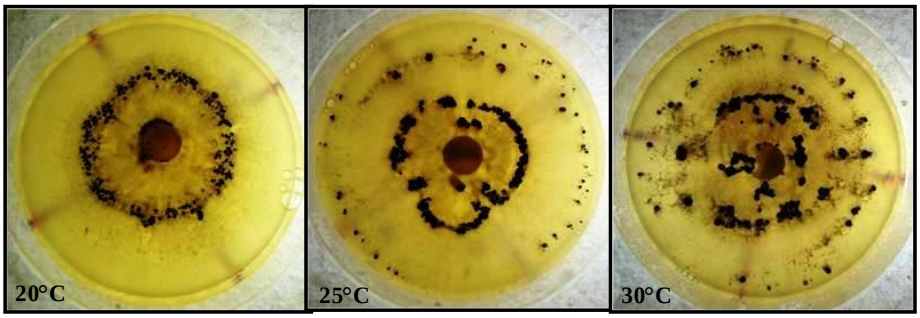


Figura 12. Crescimento micelial de *Myrothecium roridum* em diferentes meios de cultura e temperaturas de incubação.

4.1.6 *Phialomyces macrosporus*

Nos testes de crescimento micelial de *Phialomyces macrosporus* foi observado que o mesmo aproveitou de maneira mais eficiente o meio BDA a 30°C, pois este meio proporcionou um crescimento mais rápido, repetindo-se esta característica também no meio AA (Tabela 12). Quando avaliados os meios CA e MEA notou-se um maior índice de crescimento nas temperaturas 20 e 30°C, e estudando de forma separada as temperaturas, foi possível observar que o meio BDA proporcionou condições ideais para as três temperaturas.

Tabela 12. Índice médio da velocidade de crescimento micelial (cm/dia) de *Phialomyces macrosporus* em diferentes meios de cultura e em diferentes temperaturas de incubação.

Meios de cultura	**Temperaturas (°C)[1]**		
	20°	**25°**	**30°**
AA	0,64 cC	0,85 dB	1,35 bA
BDA	0,75 aC	1,25 aB	1,83 aA
CA	0,58 dB	1,09 bA	1,10 cA
MEA	0,68 bB	0,91 cA	0,91 dA
P		< 0,001	

[1]/ Médias seguidas das mesmas letras minúsculas, dentro da mesma temperatura, e maiúsculas, dentro do mesmo meio de cultura, não diferiram entre si pelo Teste de Tukey, (α=0,01). Dados originais.
[2]/Somatória do diâmetro médio atual subtraído o diâmetro médio da cultura do dia anterior, dividido pelo número de dias após inoculação (∑(D-Da)/N).

A concentração de conídios de *P. macrosporus* foi maior em meio AA a 20°C e em BDA a 30°C, enquanto que nos demais meios não houve diferença entre as temperaturas para produção de esporos (Tabela 13). Analisando isoladamente as temperaturas notou-se uma maior concentração de esporos a 20 e 30°C em meio AA, já a 25°C esse fato foi observado tanto em AA quanto em MEA.

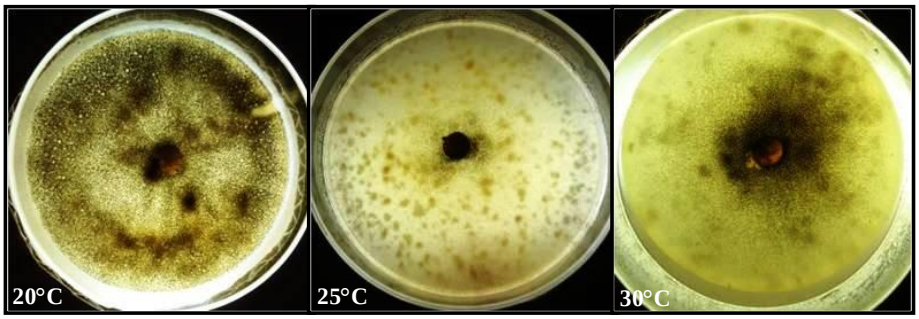
Tabela 13. Concentração média de conídios (10^4) de *Phialomyces macrosporus*, em mL, em diferentes meios e temperaturas de incubação.

Meio de cultura	**Temperatura (°C)[1]**		
	20°	**25°**	**30°**
AA	42,2 aA	6,1 aC	34,6 aB
BDA	0,2 cB	2,9 abB	23,2 bA
CA	0,9 cA	0,6 bA	1,6 dA
MEA	10,0 bA	7,7 aA	8,6 cA
P		<0,001	

[1]/ Médias seguidas das mesmas letras minúsculas, dentro da mesma temperatura, e maiúsculas, dentro do mesmo meio de cultura, não diferiram entre si pelo Teste de Tukey, (α=0,01). Dados originais.

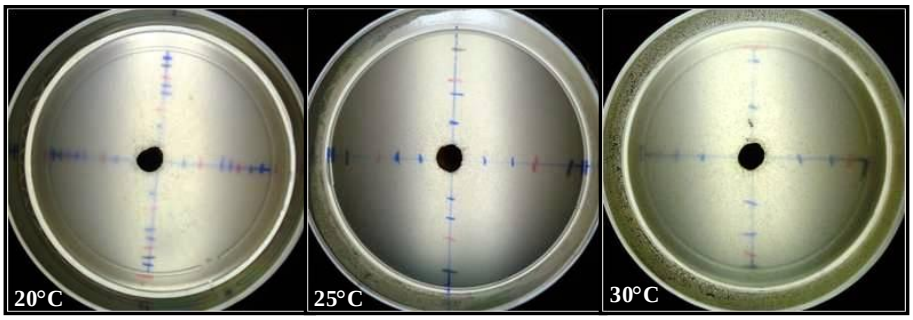
Analisando-se a Figura 13 é possível observar as mudanças nas características das colônias desenvolvidas em diferentes meios de cultura e diferentes temperaturas de incubação.

Aveia-ágar



Batata-dextrose-ágar

Cenoura-ágar



Malte-ágar

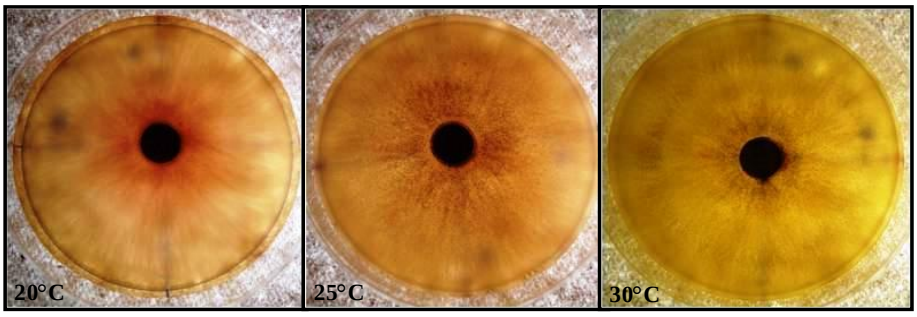


Figura 13. Crescimento micelial de *Phialomyces macrosporus* em diferentes meios de cultura e temperaturas.

4.1.7 *Stachybotrys chartarum*

O melhor crescimento micelial de *S. chartarum* nos meios CA e MEA foi observado a 30°C (Tabela 14). Em BDA, o fungo cresceu mais rapidamente a 25°C, e em meio AA, o crescimento se destacou tanto a 25 quanto a 30°C. Analisando-se as temperaturas separadamente notou-se que para todas elas o meio CA se apresenta como o melhor substrato de crescimento micelial. Udaiyan (1991) descreveu 43°C como sendo a temperatura ótima de crescimento para o gênero *Stachybotrus* spp., corroborando com os dados do presente trabalho, que na maioria dos meios testados a temperatura de 30°C mostrou-se melhor.

Tabela 14. Índice médio da velocidade de crescimento micelial (cm/dia) de *Stachybotrys chartarum* em diferentes meios de cultura e temperaturas de incubação.

Meios de Cultura	**Temperaturas (°C)[1]**		
	20°	**25°**	**30°**
AA	0,35 bB	0,45 bA	0,43 bA
BDA	0,32 bC	0,43 bA	0,37 cB
CA	0,48 aC	0,54 aB	0,59 aA
MEA	0,27 cC	0,32 cB	0,45 bA
P	< 0,001		

[1]/ Médias seguidas das mesmas letras minúsculas, dentro da mesma temperatura, e maiúsculas, dentro do mesmo meio de cultura, não diferiram entre si pelo Teste de Tukey, (α=0,01). Dados originais.
[2]/Somatória do diâmetro médio atual subtraído o diâmetro médio da cultura do dia anterior, dividido pelo número de dias após inoculação ($\sum$(D-Da)/N).

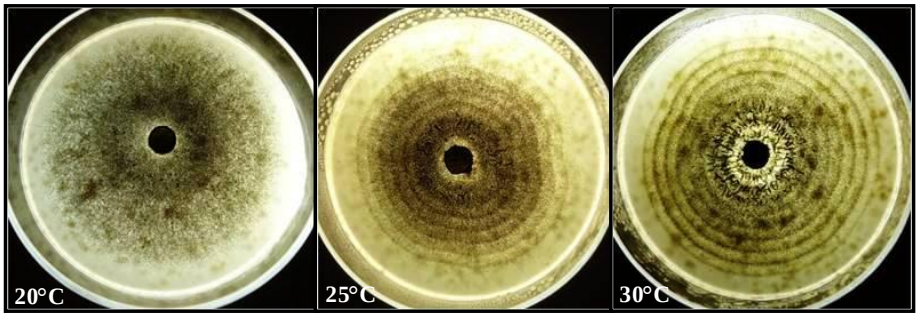
Avaliando-se a produção de conídios nos diferentes meios e temperaturas, foi possível observar que em AA o fungo produziu mais esporos a 20°C (Tabela 15), e em BDA e MEA as temperaturas que mais estimularam a produção de conídios foram 30 e 25°C, respectivamente. Quando observadas as temperaturas de forma isolada notou-se que em todas, o meio BDA proporcionou melhores condições para produção de conídios quando comparado aos outros meios.

Tabela 15. Concentração média de conídios (10^4) de *Stachybotrys chartarum*, em mL, em diferentes meios e temperaturas de incubação.

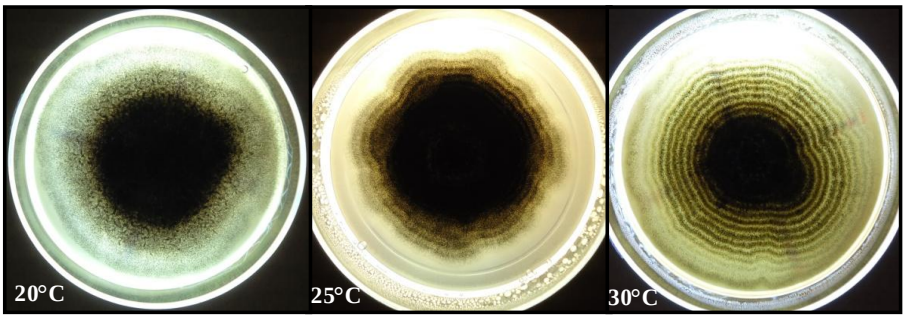
Meios de Cultura	**Temperaturas (°C)[1]**		
	20°	**25°**	**30°**
AA	242,6 cA	37,6 bB	47,8 cB
BDA	1065 aB	1044 aB	1654 aA
CA	100,7 cA	107,3 bA	58,5 cA
MEA	447 bC	1148 aA	663 bB
P		0,001	

[1]/ Médias seguidas das mesmas letras minúsculas, dentro da mesma temperatura, e maiúsculas, dentro do mesmo meio de cultura, não diferiram entre si pelo Teste de Tukey, (α=0,01). Dados originais.

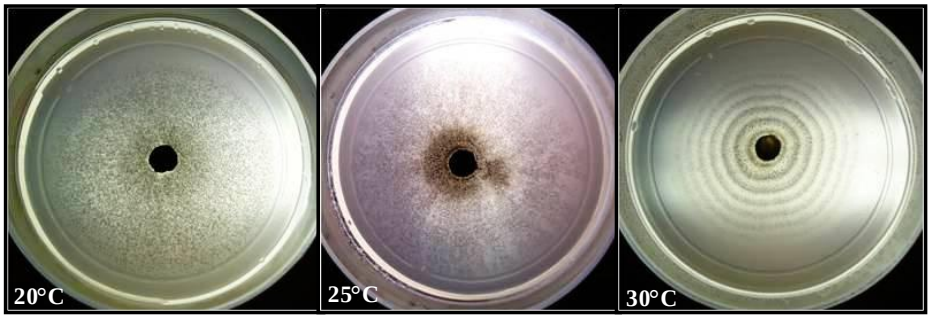
Aveia-ágar



Batata-dextrose-ágar



Cenoura-ágar



Malte-ágar

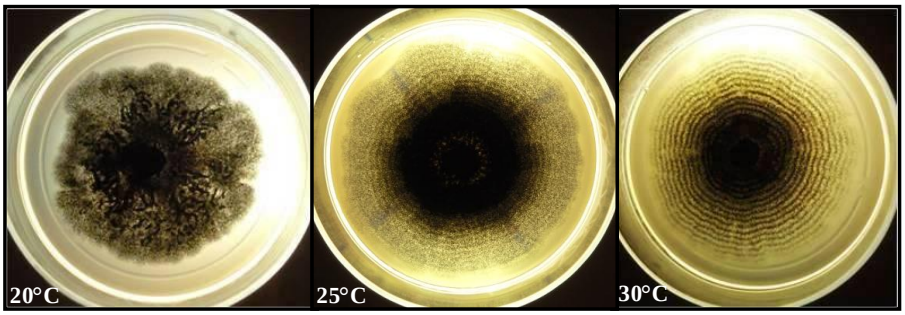


Figura 14. Crescimento micelial de *Stachybotrys chartarum* em diferentes meios de cultura e temperaturas de incubação.

4.2 Indução do enraizamento

Para o teste de indução do enraizamento foram realizadas as avaliações de comprimento e peso de raiz. Quando analisados os resultados das médias do comprimento de raízes foi possível observar que para o clone C1 a maior média foi da testemunha (16,82), ou seja, os fungos sapróbios, para esse clone, não apresentaram uma ação de indução de enraizamento. Já para o clone C2 todos os fungos testados induziram o enraizamento, destacando-se *Curvularia eragrostidis* (16,15) e *Memnoniella levispora* (14,73) (Tabela 16).

Tabela 16. Comprimento médio de raízes (cm) de estacas de dois clones de eucalipto inoculados com diferentes fungos sapróbios.

Fungos	**Clones[1]**	
	C1	**C2**
Curvularia eragrostidis	14,37 abA	16,15 aA
C. inaequalis	12,58 bA	13,91 abA
Memnoniella levispora	16,38 abA	14,73 aA
Myrothecium leucotrichum	16,34 abA	13,23 abB
M. roridum	14,79 abA	13,89 abA
Phialomyces macrosporus	13,49 abA	12,79 abA
P. psidii (testemunha)	16,82 aA	10,60 bB
P	< 0,001	

[1]/Médias seguidas das mesmas letras minúsculas (colunas) e maiúsculas (linhas) não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey (α=0,01).

Em outras pesquisas foram estudados também o efeito de promotores de crescimento na iniciação e no desenvolvimento de raízes adventícias em estacas de eucalipto como apresentado por Teixeira (2001), onde relatou-se a ação de isolados de rizobactérias no aumento de enraizamento de estacas e miniestacas de eucalipto. É importante mencionar que outros fatores alteram o tempo e a intensidade de enraizamento, como temperatura e umidade adequadas, além de período de sombra ideal em casa de enraizamento (ALFENAS et al., 2004).

Estudo realizado por Melo (2009) mostrou a eficiência do antioxidante ácido ascórbico no enraizamento de miniestacas de diferentes clones de eucalipto, avaliando-se fatores como a porcentagem de sobrevivência de miniestacas na saída da casa de vegetação e na saída de casa de sombra, além da porcentagem de miniestacas com raízes maiores que 10 cm na saída da casa de sombra. No trabalho, o uso do ácido ascórbico mostrou-se favorável à propagação vegetativa.

Quanto ao peso de raízes para o C1, foi possível observar que apenas estacas inoculadas com o fungo *Curvularia inaequalis* apresentaram raízes com média de peso inferior à apresentada pela testemunha, sendo os demais tratamentos iguais estatisticamente. Já as médias de peso para o clone C2 não apresentaram diferenças significativas (Tabela 17).

Cunha et al. (2013) avaliaram o potencial de rizobactérias no crescimento e enraizamento de mudas de sibipiruna (*Caesalpinia peltophoroides)* e observaram que isolados de rizobactérias veiculados em substrato aumentaram o peso da matéria seca do sistema radicular. Outros autores relataram resultados de rizobactérias influenciando positivamente no enraizamento de diversas culturas (MAFIA et al., 2007; SOUZA JÚNIOR, 2010; MACIEL, 2012).

Tabela 17. Médias de peso das raízes (g) para os diferentes clones de eucalipto inoculados com diferentes fungos sapróbios.

Fungos	**Clones[1]**	
	C1	**C2**
Curvularia eragrostidis	0,781 abB	0,936 aA
C.inaequalis	0,614 bB	0,845 aA
Memnoniella levispora	0,813 aA	0,805 aA
Myrothecium leucotrichum	0,817 aA	0,790 aA
M. roridum	0,865 aA	0,844 aA
Phialomyces macrosporus	0,730 abA	0,796 aA
P. psidii (testemunha)	0,821 aA	0,784 aA
P	< 0,001	

[1]/Médias seguidas das mesmas letras minúsculas (colunas) e maiúsculas (linhas) não diferem entre si pelo teste de Tukey (α=0,01).

4.3 Inibição da germinação *de P. psidii* por voláteis dos fungos sapróbios

Nota-se a partir dos resultados (Tabela 18), que a maioria dos fungos testados inibiu a germinação de urediniósporos de *P. psidii*, destacando *Phialomyces macrosporus*, *Stachybotrys chartarum* e *Memnoniella levispora*, que favoreceram médias de germinações de 6,43; 7,43 e 7,93% respectivamente, diferindo da testemunha (28,08%). Já os fungos *Moorella speciosa*, *Memnoniella echinata*, *Stachylidium bicolor* e *Pseudobotrytris terrestre*, permitiram uma maior germinação, com médias de 61; 47; 35 e 30% respectivamente, diferindo dos demais tratamentos, inclusive da testemunha.

Tabela 18. Porcentagens médias de germinação de urediniósporos de *P. psidii* em contato com os fungos sapróbios.

Fungos sapróbios	Urediniósporos germinados (%)
Curvularia eragrostidis	16,26 ef
C. inaequalis	20,96 de
Dictyochaeta simplex	16,14 ef
Gonytrichum clamydosporium	12,02 ef
G. macrocladium	11,43 ef
Memnoniella echinata	47,40 b
M. levispora	7,93 f
Myrothecium leucotrichum	7,93 f
M. roridum	16,26 ef
Moorella speciosa	61,90 a
Phialomyces macrosporus	6,43 f
Pithomyces chartarum	13,84 ef
Pseudobotrytris terrestres	30,85 cd
Puccinia psidii (testemunha)	28,08 cd
Stachybotrys chartarum	7,43 f
Stachylidium bicolor	35,87 c
P	<0,001

*Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey (α=0,01).

Nota-se ainda, que a testemunha apresentou uma taxa média de germinação (Tabela 19) de 28,08% (somente urediniósporos de *P. psidii*). Este resultado contesta os apresentados por Sena (2008), onde a germinação não ultrapassou 10%. Porém, vale ressaltar que o autor utilizou os urediniósporos suspensos em meio líquido (água e óleo mineral) apoiado em suportes como filme de celofane e filme de peleofane. Esta comparação revela que o uso de uma superfície em meio sólido Batata-Dextrose-Ágar (BDA) ou ágar-água (AA) se mostra mais eficaz para germinação de urediniósporos, podendo ser adotado como padrão para futuros ensaios de germinação deste fungo.

Aparecido et al. (2003), estudando a germinação de urediniósporos de *P. psidii* também a 21°C, obteve médias máximas de 36,4%, enquanto que no presente trabalho a maior média foi de 61,90%, proporcionada por possíveis indutores de germinação. Por outro lado, fungos também estudados neste trabalho, mostraram-se com grande potencial inibidor na germinação de urediniósporos do fungo fitopatogênico (Tabela 19 e Figura 15). Estes dados comprovam que existe uma grande ação sinérgica dos fungos sapróbios sobre a germinação de *P. psidii*. Os resultados obtidos neste teste ressaltam a possibilidade de que alguns fungos possuem uma ação inibidora da germinação dos urediniósporos de *P. psidii*, como é o caso de *P. macrosporus, S. chartarum***,** *M. levispora* e *Myrothecium leucotrichum*.

Uma explicação para a queda da germinação seria a associação de compostos voláteis produzidos pelos fungos sapróbios atuando como substâncias inibidoras desse processo, liberadas pelo próprio patógeno. A existência de substâncias inibidoras da germinação já foi relatada em esporos de agentes causais de ferrugem por Allen, (1976), Figueiredo e Carvalho Jr., (1995), Macko et al., (1976) e Staples; Macko, (1984).

Tessmann (1992) notou que o autoinibidor, extraído de urediniósporos de *P. psidii* com uma mistura de óleo mineral e octanol 10^{-4}M, inibiu completamente a germinação dos esporos *in vitro*. Este relato sugere futuros estudos unindo o autoinibidor dos urediniósporos com substâncias produzidas pelos fungos sapróbios na ação inibidora da germinação.

4.4 Efeito dos fungos sapróbios na severidade da doença

Para o teste do efeito dos fungos sapróbios na severidade da ferrugem foi possível observar que para a inoculação preventiva com *Curvularia eragrostidis* a média da nota de suscetibilidade foi de 1,50, com *Myrothecium roridum* foi de 1,66 e com *Stachybotrys chartarum* foi de 1,83 proporcionando menores intensidades de ferrugem nas plantas suscetíveis à *P. psidii* (Tabela 19).

Em plantas inoculadas com os fungos sapróbios de forma curativa (cinco dias após a inoculação do patógeno), foi observada uma menor severidade da ferrugem em plantas tratadas com *Curvularia inaequalis*, as quais apresentaram nota média de 2,08. Neste mesmo teste, os demais tratamentos não se diferenciaram da testemunha (Tabela 19).

Quando comparados os métodos de inoculação, curativo e preventivo, foi observado que *S. chartarum, M. roridum* e *C. eragrostidis* apresentaram maior eficiência quando inoculados de forma preventiva (Tabela 19). Os demais fungos não diferiram entre si em relação ao método de inoculação. Sendo assim é possível inferir que a ação preventiva desses fungos sapróbios é mais eficaz que sua ação curativa sobre o patógeno.

Tabela 19. Médias de notas de suscetibilidade à ferrugem para inoculações dos sapróbios de forma preventiva e curativa.

Fungos	**Inoculação[1]**	
	Curativa	**Preventiva**
Curvularia eragrostidis	2,83 abB	1,50 aA
C. inaequalis	2,08 aA	2,00 aA
Memnoniella levispora	2,33 abA	2,33 abA
Myrothecium leucotrichum	2,50 abA	2,16 aA
M. roridum	3,00 abB	1,66 aA
Phialomyces macrosporus	3,08 abA	2,83 abA
Puccinia psidii (testemunha)	3,58 bA	3,58 bA
Stachybotrys chartarum	2,83 abB	1,83 aA
P	<0,001	

*Médias seguidas das mesmas letras minúsculas (colunas) e maiúsculas (linhas) não diferem entre si pelo teste de Tukey (α=0,01).

Muitas pesquisas foram realizadas com o intuito de certificar a ação de alguns indutores, tanto de origem biótica quanto abiótica, na indução de resistência de plantas a patógenos. Boava et al. (2010) comprovou a ação do mecanismo de defesa do eucalipto contra o fungo *P. psidii* utilizando o potencial dos indutores acibenzolar-S-metil (ASM) e *Saccharomyces cerevisiae* na ativação de mecanismos de resistência. Ambos os tratamentos mostraram-se eficientes para o controle da ferrugem em plantas suscetíveis, sendo observada ausência de pústulas em plantas tratadas com os indutores. Esse fato foi verificado a partir da alteração da atividade das enzimas quitinase, peroxidase e fenilalanina amônia-liase.

Boava et al. (2010) relatou que a enzima quitinase apresentou atividade significativamente mais acentuada em plantas do clone suscetível que recebeu tratamento com o indutor *S. cerevisiae.* Enquanto que para as enzimas peroxidases as plantas apresentaram um condicionamento para o aumento de sua atividade, tal fato demonstra a relação da atividade enzimática com mecanismos de indução de resistência.

Sabe-se que a alteração do metabolismo enzimático está intimamente relacionada à ação indutora de resistência, como no caso da quitinase que catalisa a hidrólise dos polímeros quitina, principais componentes das paredes celulares dos fungos, podendo assim, apresentar uma atividade antifúngica (VAN LOON et al., 2006 citado por BOAVA et al., 2010), além das enzimas peroxidase e fenilalanina amônia-liase que também estão correlacionadas aos mecanismos de defesa das plantas.

O uso de Acibenzolar-S-metil (ASM) e *Bacillus cereus* também foram estudados por Kuhn (2007) como indutores de resistência em feijoeiro contra *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* e *Sclerotinia sclerotiorum*, confirmando-se que o uso de ambos indutores proporcionam resistência às doenças estudadas. Neste estudo, foi relatado que o indutor abiótico ASM alterou o metabolismo do feijoeiro, fazendo com que os fotoassimilados fossem investidos em atividades de defesa, porém ocasionando uma redução de produtividade. Em contrapartida o indutor biótico *B. cereus* alterou o metabolismo, mas não teve interferência na produtividade.

Esse estudo evidencia a importância de intensificar as pesquisas no setor de indutores bióticos, os quais podem propiciar uma indução de resistência à planta sem que ela tenha seus produtos fotossintéticos desviados de sua função de produção para as atividades defensivas da planta. Segundo os resultados apresentados neste teste, os fungos *Curvularia eragrostidis, Myrothecium roridum* e *Stachybotrys chartarum* demonstraram eficiência como indutores bióticos de resistência.

4.5 Atividade enzimática em folhas de eucalipto inoculadas com *Puccinia psidii* e tratadas com fungos sapróbios

4.5.1 Fenilalanina amônia-liase (FAL)

Plantas inoculadas com os fungos *P. macrosporus* e *C. inaequalis* destacaram-se como principais ativadoras da atividade de Fenilalanina amônia-liase (FAL), apresentando altas taxas nas avaliações de 96 e 72 horas após a inoculação, respectivamente (Figura 15 e Figura 16). Em plantas sadias e inoculadas com os fungos *M. levispora e S. chartarum* a atividade enzimática foi similar, apresentando aumento 72 horas após receberem o patógeno. Este fato evidencia a possibilidade desses fungos induzirem defesa nas plantas, pois o aumento de FAL favorece a síntese de precursores para a biossíntese de compostos fenólicos, onde a lignina (principal composto) acumula-se em resposta à infecção, conferindo maior resistência à parede celular (NAKAZAWA et al. 2001; KLESSING; MALAMY, 1994; GHOLIZADEH; KOHNEHROUZ, 2010).

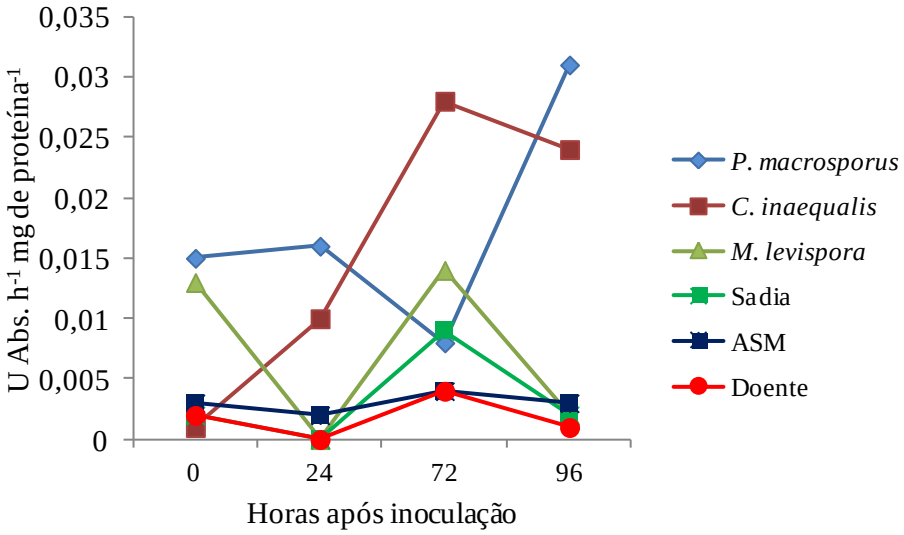


Figura 15. Concentração de FAL em folhas de eucalipto coletadas em diferentes estágios após a inoculação do patógeno.

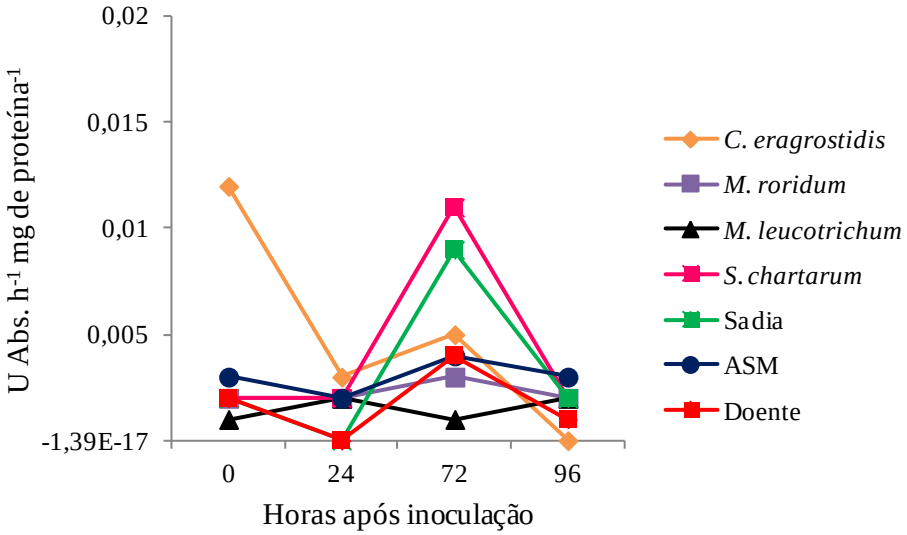


Figura 16. Concentração de FAL em folhas de eucalipto coletadas em diferentes estágios após a inoculação do patógeno.

A relação da FAL na ativação de mecanismos de defesa também foi observada por Danner (2008), que estudando a podridão parda em pêssegos notou que alguns eliciadores, como o ASM ativaram a enzima e assim potencializando a defesa e também reduzindo a área lesionada. O mesmo foi relatado por Stadnik e Buchenauer (2000) em plantas de trigo tratadas com ASM inoculadas com *Blumeria graminis*. Como visto no presente trabalho, *P. macrosporus* e *C. inaequalis* apresentaram-se como os melhores elicitores da enzima quando comparados ao indutor ASM.

Boava (2008), estudando indutores bióticos e abióticos, como *S. cerevisiae* e ASM no controle da ferrugem do eucalipto, observou o aumento da atividade de fenilalanina-amônia-liase em plantas suscetíveis a doença entre 0 e 72 horas após tratamento com os indutores. Já no presente trabalho foi possível observar que a ativação dessa enzima se deu principalmente entre 24 e 72 horas depois do tratamento com os fungos em plantas tratadas com ASM apresentaram baixa atividade enzimática em comparação aos outros tratamentos.

Observa-se também, que *C. eragrostidis* desacelerou a atividade da FAL, decrescendo constantemente sua atividade. Gallao et al. (2007) verificou uma queda na atividade da FAL em folhas de *Citrus aurantium* algumas horas após receberem o elicitor quitina. Segundo os autores tal fato está correlacionado com a capacidade das plantas restaurarem rapidamente seu metabolismo normal, sendo esta

também uma possível explicação para a baixa atividade na maioria das enzimas na avaliação de 96 horas.

No entanto a atividade da FAL não diferenciou entre plantas que receberam ASM, *M. roridum*, *M. leucotrichum* e apenas o patógeno (plantas doentes), mantendo a atividade baixa e constante.

4.5.2 Peroxidase (POD)

Ao analisar os efeitos dos fungos sapróbios e o intervalo de tempo após inoculação do patógeno sobre a atividade enzimática, verificou-se que plantas tratadas com ASM e *P. macrosporus* apresentaram aumento da atividade enzimática, atingindo picos de expressão em 24 e 96 horas após inoculação do patógeno, respectivamente (Figura 17 e Figura 18).

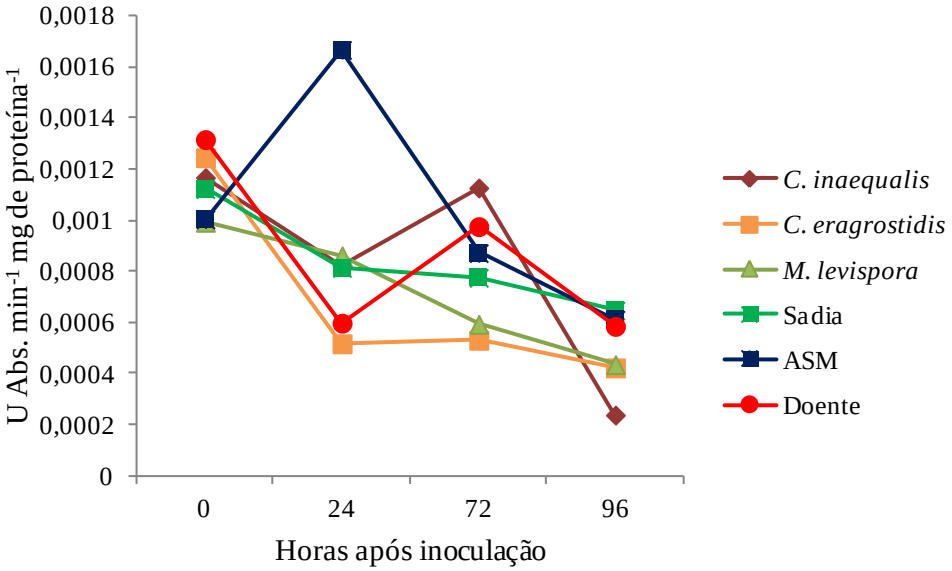


Figura 17. Concentração de POD em folhas de eucalipto coletadas em diferentes estágios após a inoculação do patógeno.

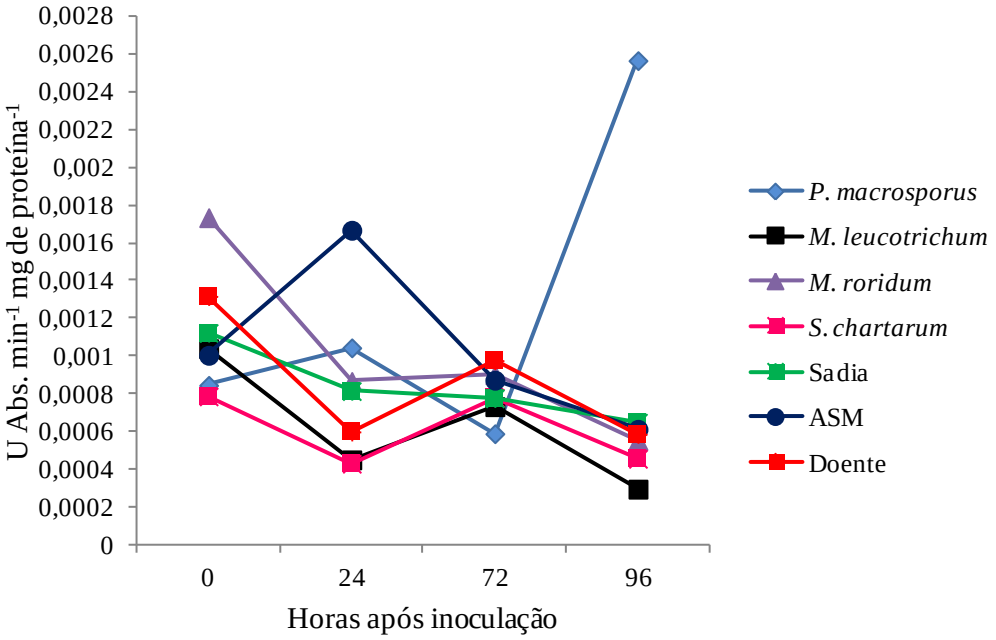


Figura 18. Concentração de POD em folhas de eucalipto coletadas em diferentes estágios após a inoculação do patógeno.

Mecanismos de defesa podem ser induzidos em plantas por meio de aplicações de indutores químicos ou por inoculações de microrganismos não patogênicos, funcionando como eliciadores de respostas de defesa em plantas (KESSMAN et al., 1994; NÜRNBERGER; BRUNNER, 2002). Uma dessas respostas é o aumento da atividade da enzima POD, que ocorre em momentos de estresse, provocado por ferimentos, infecções por fungos, salinidade, deficiência hídrica, deficiência nutricional, dentre outros, levando também ao acréscimo na produção de lignina e etileno (SCHALLENBERGER, 1994).

A POD está diretamente ligada à lignificação dos tecidos, reforçando a parede celular (PASCHOLATI; LEITE 1995; IRITI; FAORO, 2003), além de produzir radicais livres tóxicos ao patógeno (LAMB; DIXON, 1997). Relata-se também, a capacidade da POD produzir moléculas sinalizadoras como o Peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que podem levar a expressão de genes relacionados a outros mecanismos de resistência (LAMB; DIXON, 1997; OROZCO-CÁRDENAS et al., 2001). Iriti e Faoro (2003), estudando a ação ASM como indutor de resistência a *Uromyces appendiculatus* em feijoeiro obtiveram redução de 100% na ocorrência da

doença, associando esse fato à alta atividade da POD e consequente elevação da concentração de H_2O_2.

Diante desses fatos é possível inferir que o aumento da atividade desta enzima nos tratamentos com ASM e *P. macrosporus* está relacionado à ativação desses mecanismos de defesa, pois foram ativados após a entrada do patógeno na planta. Boava et al. (2010) demonstraram o efeito de indutores bióticos e abióticos no controle da ferrugem do eucalipto, obtendo maiores níveis de POD em plantas tratadas com ASM ou com S. *cerevisiae*.

A atividade enzimática pode variar dependendo da cultura e dos indutores a serem estudados, mas na maioria das vezes, mostra-se em maior evidência na presença do patógeno. Silva (2003) observou um aumento de 10 vezes na atividade da POD em plantas de tomateiro inoculadas com *B. cereus*. O aumento de atividade enzimática correlacionada ao aumento de resistência também foi relatado por Buzi et al. (2004), que trabalhando com melão observou uma ligação entre a elevação da atividade de POD e quitinase e o aumento da resistência a *Didymella bryoniae* e *Sclerotinia sclerotiorum*.

Plantas doentes e inoculadas com os fungos *C. inaequalis*, *M. leucotrichum*, *S. chartarum* apresentaram atividades enzimáticas similares, com queda após a inoculação do patógeno e leve pico após 72 horas. No entanto a enzima não apresentou diferença de expressão significativa em plantas sadias e quando tratadas com os indutores *M. roridum*, *C. eragrostidis* e *M. levispora*. Estes resultados sugerem a ausência da capacidade desses fungos em induzir mecanismos de resistência.

4.5.3 β-1,3-glucanase (GLU)

Plantas tratadas com *P. macrosporus* apresentaram aumento nos níveis de expressão de β-1,3-glucanase (GLU) quando comparado com a testemunha (sem tratamento) (Figura 19 e Figura 20). Observou-se uma queda na atividade enzimática 24 horas após a inoculação, porém notou-se um aumento significativo dessa atividade antes da presença do patógeno em 96 horas. A elevada atividade de GLU em plantas tratadas com *P. macrosporus* sugere uma ativação de mecanismos de defesa da planta. Sabe-se que esta enzima apresenta ação direta contra o patógeno degradando a parede celular (AGRIOS, 2005), contribuindo na geração de elicitores com potencial

para ativar respostas de defesa (MOHAMMADI et al., 2002). Tais elicitores, liberados pela degradação da parede celular de fungos e bactérias, ativam outros mecanismos de defesa, no entanto, estes mecanismos só são ativados durante a interação patógeno-hospedeiro, impedindo assim o estabelecimento de relações parasitárias estáveis e a colonização (KUHN, 2007).

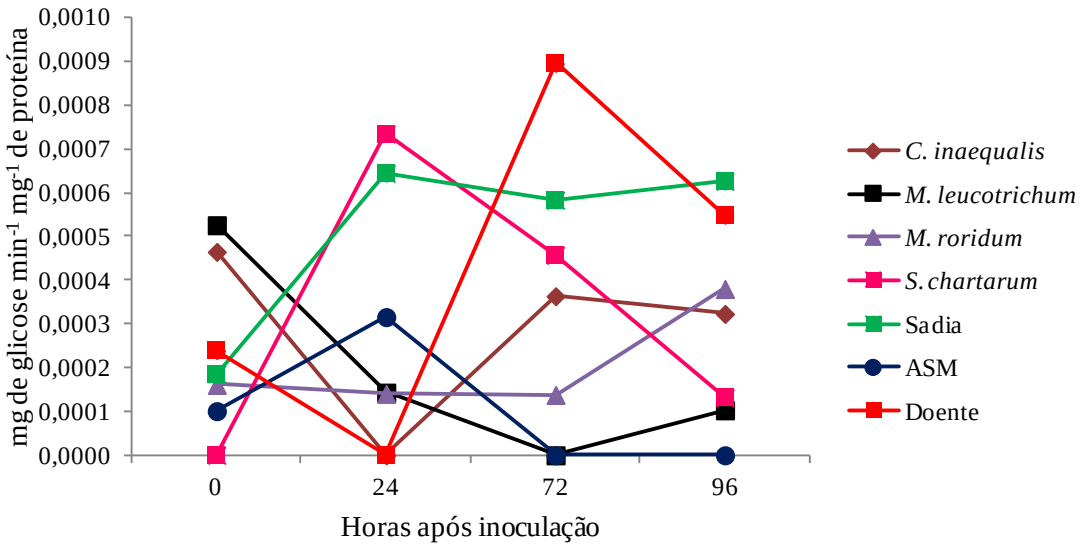


Figura 19. Concentração de GLU em folhas de eucalipto coletadas em diferentes estágios após a inoculação do patógeno.

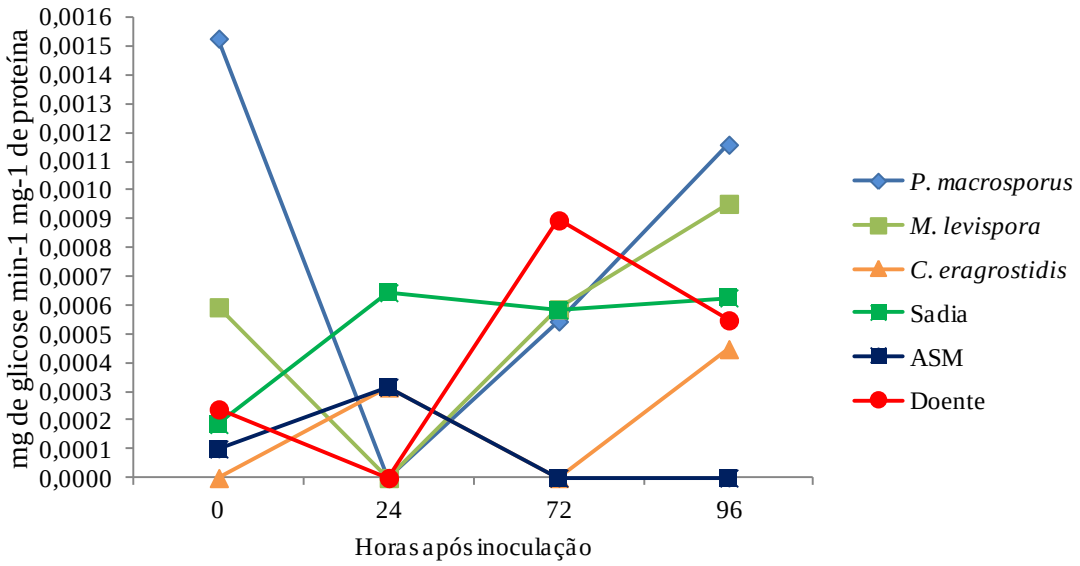


Figura 20. Concentração de GLU em folhas de eucalipto coletadas em diferentes estágios após a inoculação do patógeno.

Pelas Figuras 19 e 20, observa-se que a atividade da GLU não se mostrou diferente em plantas previamente tratadas com ASM, *C. inaequalis*, *M. roridum* e *C eragrostidis*, apresentando alguns momentos de destaque, como no caso de *C. inaequalis* que proporcionou sutil elevação na atividade 72 horas após inoculação. Porém, mesmo *C. inaequalis* mostrando-se desta forma, sua atividade foi inferior à atividade enzimática de plantas sadias e de outros tratamentos avaliados. Plantas sadias também apresentaram aumento de atividade enzimática até 24 horas após a inoculação, estabilizando-se após este período. Neste caso, acredita-se que a ativação enzimática em plantas sadias tenha sido desencadeada por fatores externos, como estresse hídrico, injúrias físicas, dentre outros.

Pela inoculação do patógeno nas plantas, observa-se o aumento da atividade enzimática, contrastando com as plantas sadias, que apresentaram um sutil aumento. Este fato reforça a ideia de ativação de mecanismos de defesa da planta pré-existentes, acreditando-se que a enzima GLU tenha ligação direta nesta defesa.

A atividade da enzima GLU na ativação de mecanismos de defesa já havia sido relatada por outros autores. Cavalcanti (2006) observaram o aumento dessa enzima em tomateiro pulverizado com ASM e inoculado com *Xanthomonas campestris*, e na mesma cultura, GLU foi associada com a indução de resistência a *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Pst) pré tratado com *Methylobacterium*

oryzae (INDIRAGANDHI et al., 2008). Em batata, a mesma relação foi observada em plantas tratadas com ASM, aumentando a resistência contra *Fusarium semitectum* (MORRIS; DEVERALL, 2003).

Andrade et al. (2013) observou uma aumento significativo de GLU durante todo o processo infeccioso de Pst em tomateiros pulverizados com ácido jasmônico, etefon e ASM, demonstrando uma relação com o aumento de resistência. Costa et al. (2010) estudando a indução de resistência à fusariose em porta-enxerto de videira observou que a atividade de GLU foi maior em plantas com *Fusarium* spp. em comparação ao controle, o que demonstra o favorecimento dessa enzima na supressão do patógeno.

Em suma, os resultados de análises enzimáticas obtidos neste trabalho revelaram que o fungo *P. macrosporus* induz a ativação de enzimas responsáveis pelo processo de defesa em eucalipto, estimulando o aumento de FAL, POD e GLU. De forma semelhante, *S. chartarum* também apresentou influência na ativação de FAL e GLU, reduzindo ainda os sintomas de ferrugem.

5 CONCLUSÕES

Em relação aos testes fisiológicos:

- *C. eragrostidis* apresentou um maior IVCM em meio BDA a 25°C e 30°C; esporulou mais em meio AA a 25°C, em meio BDA a 20°C e em meio MEA a 30°C;
- *C. inaequalis* cresceu mais rapidamente em meio CA a 30°C e produziu mais conídios também a 30°C em meio MEA;
- *M. levispora* apresentou maior velocidade de crescimento em meio CA a 25°C e produziu mais esporos a 25°C em AA, BDA e MEA; e a 30°C em CA;
- *M. leucotrichum* apresentou melhores resultados em AA a 25°C tanto para o crescimento quanto para esporulação;
- *M. roridum* apresentou maior IVCM em meio CA a 25°C e 30°C e maior produção de conídios em AA e MEA a 30°C;
- *P. macrosporus* cresceu de forma mais rápida em meio BDA a 30°C e esporulou mais em AA a 20°C;
- *S. chartarum* apresentou maior velocidade de crescimento em CA a 30°C e maior esporulação em MEA a 25°C.

Em relação aos testes de enraizamento, inibição de germinação e atividade enzimática:

- *C. eragrostidis* e *M. levispora* induziram o enraizamento de estacas de eucalipto;
- *M. leucotrichum*, *M. levispora*, *S. chartarum* e *P. macrosporus* inibiram a germinação de urediniósporos de *P. psidii;*
- *S. chartarum*, *M. roridum* e *C. eragrostidis*, inoculados de forma preventiva em mudas de eucalipto, diminuíram a severidade da ferrugem;

- *P. macrosporus* e *C. inaequalis* aumentaram a atividade da enzima Fenilalanina-amônia-liase;

- *P. macrosporus* e Acibenzolar-S-metil aumentaram a atividade da enzima peroxidase;

- *P. macrosporus* e *S. chartarum* aumentaram a atividade da enzima β-1,3-glucanase;

- *P. macrosporus* tem grande potencial estimulador da atividade de enzimas ligadas à indução de resistência inibindo também a germinação de urediniósporos de *P. psidii*.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABELES, F. B. et al. Preparation and purification of glucanase and chitinase from bean leaves. **Plant Physiol**, p. 129–134, 1970.

ABRAF, Anuário Estatístico da Associação Brasileira de Produtores de Florestas plantadas 2012 ano base 2011. **ABRAF** – Brasília, 150 p., 2012.

AFIFI, A.F.; FAWZI, E.M.; FOAAD, M.A. Purification and characterization of a pectin lyase produced by *Curvularia inaequalis* NRRL 13884 on orange peels waste, solid state culture. **Ann. Microbiol**., p. 287-297, 2002.

AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**. 5ed. San Diego: Elsevier Academic Press, 2005. 922 p.

AINSWORTH, B.C. **Ainsworth & Bisbys Dictionary of the fungi**. New Surrey: Commonwealth Mycological Institute, 1971. 663 p.

ALCORN, J. L. Additions to *Bipolaris*, *Cochliobolus* and *Curvularia*. **Mycotaxon**, p. 361-392, 1988.

ALFENAS, A. C. et al. **Clonagem e doenças do eucalipto.** 2. ed. Viçosa: Editora UFV, 2004. p. 442.

ALFENAS, A.C. et al. Isolamento de fungos fitopatogênicos. In: ALFENAS, A.C; MAFIA, R.G. **Métodos em fitopatologia**. Viçosa: UFV, 2007. p. 53-91.

ALFENAS, A. C.; et al**. Clonagem e doenças do eucalipto**. 2. ed. Viçosa, MG: UFV, 2009. 500 p.

ALLEN, P. J. Control of spore germination and infection structure formation in the fungi. In: Heitefuss, R. **Encyclopedia of plant physiology**, New York: New Series Editora, 1976. v. 4.

AMUSA, N. A. Fungi associated with anthracnose symptoms of yam (*Dioscorea* spp.) in south-west Nigeria and their roles in disease severity. **Crop Research,** v. 13, p. 177-183, 1997.

ANDRADE,C. C. L. et al. Indutores de resistência no controle da pinta bacteriana do tomateiro e na atividade de enzimas de defesa. **Tropical Plant Pathology,** v. 38, jan. /fev. 2013.

ANDRADE, E.N. **O Eucalipto**. Jundiaí: Companhia Paulista de Estradas de Ferro, 1961. 667 p.

APARECIDO, C. C.; FIGUEIREDO, M. B.; FURTADO, E. L. Efeito da idade e da temperatura na germinação de urediniosporos de *Puccinia psidii* coletados de jambeiro (*Syzygium jambos*) e de goiabeira (*Psidium guajava*). **Summa Phytopathologica**, Botucatu, SP, v. 29, n. 1, p. 30-33. 2003.

APARECIDO, C. C.; FIGUEIREDO, M. B.; FURTADO, E. L. Grupos de variabilidade fisiológica em populações de *Puccinia psidii*. **Summa Phytopathologica**, SP, v. 29, n. 3, p. 234-238. 2003.

BARNETT, H. L.; HUNTER, B.B. **Iustrated Genera Imperfect Fungi**. 3. ed. Minneapolis, Minnesota: Burgess Publishing Company, 1972. 241p.

BARRON, G. L. **The genera of *Hyphomycetes* from soil**. Baltimore: Williams & Wilkins. 364 p. 1968.

BEAN, G. A.; JARVIS, B. B.; ABOUL-NASR, M. B. A biological assay for the detection of *Myrothecium* spp. produced macrocyclic trichothecenes. **Mycopathologia,**. p. 175-80, 1992.

BERBEE, M. L.; PIRSEYEDI, M.; HUBBARD, S. *Cochliobolus* phylogenetics and the origin of known, highly virulent pathogens, inferred from ITS and glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase gene sequences. **Mycologia**, New York, v. 91, p. 964-977, 1999.

BERGMAN, F.; YAGEN, B., JARVIS, B. B. The toxicity of macrocyclic trichothecenes administered directly into the rat brain. **Toxicon**,1992.

BERTOLUCCI, F.; REZENDE, G.; PENCHEL, R. Produção e utilização de híbridos de eucalipto. **Silvicultura,** v. 51, p. 12-16, 1995.

BOAVA, L. P. **Ação de indutores bióticos e abióticos no controle da ferrugem do eucalipto, atividade enzimática e expressão gênica durante o processo de infecção.** 2008. 43 f. Tese (Doutorado em Proteção de Plantas)-Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2008.

BOAVA, L. P. et al.Efeito de indutores bióticos e abióticos na atividade de quitinase e peroxidase e no controle da ferrugem causada por *Puccinia psidii* em eucalipto. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, SP, v. 36, n. 2, p. 168-172, 2010.

BOHN. M. *Myrothecium groenlandicum* sp. Nov. a presumed endophytic fungus of Betula nana (Greenland). **Mycotaxon**, p. 335-41, 1993.

BONALDO, S. M.; PASCHOLATI, S. F., ROMEIRO, R. S. Indução de resistência: noções básicas e perspectivas. In: CAVALCANTI, L.S.; DI PIERO, R.M.; CIA, P.; PASCHOLATI, S.F.; RESENDE, M.L.V.; ROMEIRO, R.S. **Indução de Resistência em Plantas a Patógenos e Insetos**, Piracicaba: FEALQ, 2005. p. 11-28.

BOWLES, J.D. Defense-related proteins in higher plants. **Annual Review of Biochemistry**, p. 873-907, 1990.

BRITO, N. M. **Estudo da fisiologia e variabilidade genética de *Curvularia eragrostidis* na cultura do inhame**. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Universidade Federal da Paraíba, Areia – PB, 2006.

BRUTON, B. D. Crater rot. In: ZITTER, T. A.; HOPKINS, D. L.; THOMAS, C. E. **Compedium of cucurbit diseases**. St. Paul: APS Press, 1996. p. 49-50.

BUZI, A., et al. Induction of resistance in melon to *Didymella bryoniae* and *Sclerotinia sclerotiorum* by seed treatment with salicylic acid. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 152, p. 34-42, 2004.

CABRAL, C. S.; HENZ, G. P.; MOREIRA, A. J. A. New cucurbitaceous hosts of *Myrothecium roridum* in Amazonas State, Brasil. **Trop. Plant Pathol**, 2009.

CARMICHAEL, J. W. **Genera of Hyphomycetes**. Edmonton: University of Alberta Press, 1980, 386 p.

CASTAÑEDA, R. R. F.; KENDRICH, W. B. ***Myrothecium mucunae* Castañeda et Kendrick anam. sp.** University of Waterloo Biology Series, p. 73-76, nov.1991.

CASTAÑEDA RUIZ, R. F. *Myrothecium setiramosum* Castañeda sp. Nov. Deuteromycotina de Cuba. **Hyphomycetes**, p. 10-11, 1985.

CAVALCANTI, F. R.; RESENDE, M. L. V. DE; PEREIRA, R. B.; COSTA, J. C. B.; CRISTINA PAIVA DA SILVEIRA CARVALHO, C. P. S. Atividades de quitinase e beta-1,3-glucanase após eliciação das defesas do tomateiro contra a mancha-bacteriana. **Pesq. agropec. bras.,** Brasília, v.41, n.12, p.1721-1730, dez. 2006

CHAGAS, H. A. et al. Avaliação da esporulação de *Bionectria ochroleuca* em diferentes meios de culturas. **Biosci**. J., Uberlândia, v. 26, n. 3, p. , Maio/Jun., 2010.

CHUNG, W. H; TSUKIBOSHI, T. A new species of *Curvularia* from Japan. **Mycotaxon**, p. 49-54, 2005.

CORBETTA, G. Rassegna del specie del genere *Curvularia*. **Riso**, p. 3-23, 1964.

COSTA, M. D.; LOVATO, P. E.; SETE, P. B. Micorrização e indução de quitinases e β-1,3-glucanases e resistência à fusariose em porta-enxerto de videira. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v. 45, n. 4, p. 376-383, 2010.

COTERRIL, 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

COUTINHO, T. A. et al. Eucalyptus rust: A disease with the potential for serious international implications. **Plant Disease**, v. 82, n. 7, p. 819-825, 1998.

CUNHA, J. F., et al. Potencial de rizobactérias no crescimento de mudas de sibipiruna (*Caesalpinia peltophoroides* BENTH). **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 37, n. 2, p. 211-218, 2013.

CZERWENKA WENKSTETTEN I. M.; BERNER, D. K.; SCHILDER, A., GRETZMACHER, R. First report and pathogenicity of *Myrothecium roridum*, *Curvularia eragrostidis*, and *C. lunata* on seeds of Striga hermonthica in Nigeria. **Plant Disease,** p. 832-832, 1997.

DANNER, M.A. et al. Indução de resistência à podridão‑parda em pêssegos pelo uso de eliciadores em pós‑colheita. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.43, p.793‑799, 2008.

DIXON, R. A.; PAIVA, N. L. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. **Plant Cell**, Baltimore, v. 7, p. 1085-1097, 1995.

DOMSCH, K. W.; GAMS, W.; ANDERSON, T-H. **Compendium of soil fungi**. London: Academis Press, 1980. v. 1, 859 p.

DOU, Y. P., et al. Study on the production of nit mutant of maize *Curvularia* leaf spot fungus. **Journal of Anhui Agricultural Sciences,** v. 34, p. 2781-2782, 2006.

DUFF, J.; DALY, A. Orchid diseases in the Northern Territory. **Agnote**, Northern Territory of Australia, v. 13, p. 1-5, 2002.

DUKE, N. ; RAMIREZ, A. V.; TOMIYAMA, K. Systemic induction of resistence in potato plants against *Phytophthora infestans* by local treatment whith hyphal wall components of the fungus. **Journal of Phytopatology**, v. 119, p. 232-239, 1987.

ELLIS, M. B. Dematiaceous Hyphomycetes. Kew: **Commowealt Mycological Institute**, p. 608, 1971.

ELLIS, M.B. More Dematiaceous Hyphomycetes. **Commonwealth Mycological Institute**, Kew, UK. 1976.

ELLIS, N. B.; ELLIS, J. P. Microfungi on Land Plant. **An Identification Handbook**. New York: Macmillan Publishing, 1985.

FALLOON, R. E. *Curvularia trifolii* as a high-temperature turfgrass pathogen. New Zealand, **Journal of Agricultural Research**, p. 243-248, 1976.

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

FERREIRA, F. A. Ferrugem do eucalipto. **Revista Árvore**, p. 92-109, 1983.

FERREIRA, F. A. **Patologia Florestal:** principais doenças florestais no Brasil. Viçosa: SIF, 1989. 570 p.

FIGUEIREDO, M.B.; CARVALHO JUNIOR, A.A. Efeito da lavagem dos soros na germinação dos teliosporos telióides de Puccinia pampeana. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v.20, p. 101-104, 1994.

FIGUEIREDO, M. B., CARVALHO Jr., A. A. Presença de um auto-inibidor nos teliósporos telióides de *Puccinia pampeana* e o seu papel na sobrevivência da espécie. **Summa Phytopathologica**, v. 21, p. 200-5, 1995.

FIGUEIREDO, M. B.; PASSADOR, M. M. Morfologia, funções dos soros e variações dos ciclos vitais das ferrugens. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 75, n. 1, p. 117-134, jan. /mar., 2008.

FITTON, M.; HOLLIDAY, P. *Myrothecium roridum*. Bakeham Lane: **CABI Bioscience**, 1998. 3 p. (IMI Descriptions of Fungi and Bacteria, 253).

FORGACS, J. *Stachybotry* toxicosis,. In: KADIS, S.; CIEGLER, A.; AJL, S. J., **Microbial toxins**, Academic Press, Inc., New York, N.Y, v. 8, p. 95–128, 1972.

FRY, S. C. Cross-linking of matrix polymers in the growing cell walls of angiosperms. **Annual Reriew of Plant Physiology**, Stanford, v. 37, p. 165-186, 1986.

FURTADO, E. L., MARINO, C. L. **Eucalyptus rust management in Brazil**. Proceedings of Second IUFRO Rusts Forest trees W.P. Conference. Yangling, China, p. 118-124, 2003.

FURTADO, E. L.; SANTOS, C. A. G.; MASSON, M. V. Impacto potencial das mudanças climáticas sobre a ferrugem do eucalipto no Estado de São Paulo. In: GHINI, R. E.; HAMADA, E. **Mudanças climáticas: impactos sobre doenças de plantas no Brasil**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2008, 273-286 p.

FURTADO, D. D. M. et al. Ocorrência de *Curvularia lunata* e *Curvularia eragrostidis* em Tapeinochilus *ananassae* no Estado de Alagoas. **Summa Phytopathol.**, Botucatu, SP, v. 33, n. 2, p. 201, 2007.

GALDEANO, D. M. et al. Proteção do cafeeiro contra cercosporiose por acibenzolar‑S‑metil e proteína harpina. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, DF, v. 45, n. 7, p.686-692, 2010.

GALLI, F. Doenças da goiabeira. In: **Manual de Fitopatologia**: Doenças das Plantas Cultivadas. São Paulo: Agronômica Ceres, 1980, 335-7 p.

GASPAR, T. et al. Peroxidases: A survey of their biochemical and physiological roles in higher plants. **Univ. of Genova, Switzerland**, 1982.

GHOLIZADEH, A.; KOHNEHROUZ, B. B. Activation of phenylalanine ammonia lyase as a key component of the antioxidative system of salt‐challenged maize leaves. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 22, p. 217‐223, 2010.

GHUNG, W. H.; TSUKIBOSHI, T. A new species of *Curvularia* from Japan. **Mycotaxon,** v. 91, p. 49-54, 2005.

GONÇALVES, S. **Lista preliminar das doenças das plantas do estado do Espírito Santo**. Rio de Janeiro: Ministério da agricultura, 1929, 1-12 p.

GUSMÃO, L. F. P.; BARBOSA, F. R.; CRUZ, A. C. R. Espécies de *Curvularia* (fungos anamórficos – hyphomycetes) no Semi-árido do Estado da Bahia, Brasil. **Sitientibus Série Ciências Biológicas**, v. 5, p. 12-16, 2005.

HENNEN, J. F.; HENNEN, M.; FIGEUIREDO, M. B. Índice das ferrugens (Uredinales) do Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 49, (Supl.), p. 201, 1982.

HOAGLAND, R.E. (Ed.) **Microbes and microbial products as herbicides**. Washington: American Chemical Society, 1990. p.87-113: Biochemical responses of plants to pathogens.

INDIRADANDHI, P. I. et al. Induction of defense responses in tomato against *Pseudomonas syringae* pv. tomato by regulating the stress ethylene level with *Methylobacterium oryzae* CBMB20 containing 1- aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, p.1037-1045, 2008.

IRITI, M.; FAORO, F. Benzothiadiazole (BTH) induces cell-death independent resistance in *Phaseolus vulgaris* against *Uromyces appendiculatus.* **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 151, p. 171-180, 2003.

JARVIS, B. B. et al. Study of toxin production by isolates of *Stachybotrys chartarum* and *Memnoniella echinata* isolated during a study of pulmonary hemosiderosis in infants. **Appl. Environ. Microbiol**, p. 64, 1998.

JOFFILLY, J. Ferrugem do eucalipto. **Bragantia**, p. 475-487, 1944.

JONES, D. H. Phenylalanine ammonia-lyase: regulation of its induction, and its role in plant development. **Phytochemistry,** v. 23, n.7, p.1349-1359, 1984.

JONG, S. C.; E. E. DAVIS. Contribution to the knowledge of *Stachybotrys* and *Memnoniella* in culture. **Mycotaxon**, p. 409–485, 1976.

JUNGHANS, D. T. **Quantificação da severidade, herança da resistência e identificação de marcadores RAPD ligados à resistência à ferrugem (*Puccinia psidii)* em *Eucalyptus grandis.*** 2000. 53 f. Tese (Doutorado em Fitopatoplogia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2000.

JUNQUEIRA, N. T. V. et al. Doenças e potencial de produção do araçá-boi (*Eugenia stipitata*) nos cerrados. **Fitopatologia Brasileira**, v. 22 (Supl.), p. 272, 1997.

KAO, C.H. Differential effect of sorbitol and polyethylene glycol on antioxidant enzymes in rice leaves. **Plant Growth Regulation**, v.39, p.83-89, 2003.

KESSMAN, H. et al. Induction of systemic acquired disease resistance in plants by chemicals. **Annual Rewiew of Phytopathology**, v. 32, p. 439-459, 1994.

KIM, J. C. et al. Pathogenicity and pyrenocine production of *Curvularia inaequalis* isolated from zoysia grass. **Plant Disese**, p. 684-688. 2000.

KIRK, P.M. et al. **Ainsworth e Bisby's Dictionary of the fungi**. 9 ed. CAB International, 2001, 655 p.

KLESSIG, D. F.; MALAMY, J. The salicylic acid signal in plants. **Plant Molecular Biology**, v. 26, p. 1439-1458, 1994.

KRISTENSEN, B. K.; BLOCH, H.; RASMUSSEN, S. K. Barley coleoptiles peroxidases. Purification, molecular cloning, and induction by pathogens. **Plant Physiology**, Rockville, v. 120, p. 501-512, 1999.

KRUGER; BACCHI, L. M. A. In: BERGAMIN, A. F.; KITAMI, H.; AMORIM, L. (Ed.) **Manual de Fitopatologia**. São Paulo: Agronômica Ceres, cap. 4, 1995.

KRUGNER, T.L. Doenças do eucalipto. In: GALLI, F. (Ed.). **Manual de Fitopatologia**, 2ª ed. São Paulo, Agronômica Ceres, v. 2, 1980, p. 275-96.

KUHN, O. J.; PASCHOLATI, S. F. Custo adaptativo da indução de resistência em feijoeiro mediada pela rizobactéria *Bacillus cereus* ou acibenzolar-S-metil: atividade de

enzimas, síntese de fenóis e lignina e biomassa. **Summa Phytopathologica**, v. 36, n. 2, p. 107-114, 2010.

KUHN, O. J**. Indução de resistência em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) por acibenzolar-S-metil e *Bacillus cereus*: aspectos fisiológicos, bioquímicos e parâmetros de crescimento e produção**. 2007. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba – SP, 2007.

LAMB, C.; DIXON, R. A. The oxidative burst in plant disease resistance. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 4, p. 251-275, 1997.

LEON-LLOOSTERZIEL, K. M. et al. Colonization of the Arabidopsis rhizosphere by fluorescent Pseudomonas spp. Activates a root-specifc, ethylene-responsive PR-5 gene in the vascular bundle. **Plant Molecular Biology**, p. 731-748, 2005.

LEVETIN, E. Indoor Air Report for Bioaerosols in Two Las Vegas Elementary Schools. **Report submitted for EPA School Evaluation Project**, 1995.

LEVETIN, E.; SHAUGHNESSY, R.; STETZENBACH, L. A case study of airborne fungi: why viable sampling is not enough. **J Allergy Clin Immunol,** p. 97, 1996.

LIMA, W. P. **Impacto Ambiental do Eucalipto**. São Paulo: EDUSP, 1993. 301 p

LUSO, M. F. G.; PASCHOLATI, S. F. Activity and isoenzymatic pattern of soluble peroxidases in maize tissues after mechanical injury or fungal inoculation. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, SP, v. 25, p. 244-249, 1999.

MACIEL, C. G. ***Fusarium sambucinum* associado a sementes de pinus elliottii: patogenicidade, morfologia, filogenia molecular e controle**. 2012. 93f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2012.

MACKO, V. et al. Self –inhibitors of fungal spore germination. In: WEBWR, P. I.; HES, W. M. **The fungal spore**. New York: Jonh Wiley, 1976. 73-100 p.

MADI, L.; KATAN, J. *Penicillium janczewskii* and its metabolites, applied to leaves elicit systemic acquired resistance to stem rot caused by *Rhizoctonia solani*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 53, p. 163-175, 1998.

MAFIA, R. G. et al. Efeito de rizobactérias sobre o enraizamento e crescimento de clones de eucalipto em diferentes condições de propagação clonal. **Revista Árvore**, v. 31, n. 5, p. 813-821, 2007.

MARIA, G. L.; SRIDHAR, K. R. Diversity of filamentous fungi on woody litter of five mangrove plant species from the southwest coast of India. **Fungal Diversity**, v. 14,p. 109- 126, 2003.

MASSON, M. V. **Ferrugem do eucalipto: planejamento evasivo, estimativa de dano e análise da viabilidade do controle químico**. 2009. 167 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2009.

MASSON, M. V. et al. Identificação de áreas de evasão do eucalipto ao fungo *Puccinia psidii*, causador de ferrugem das mirtáceas. **Anais do XXIX Congresso Paulista de Fitopatologia**, p. 67, Botucatu, SP, 2006.

MASSON, M. V.; PORCENA, A. S.; FURTADO, E. L. Escala diagramática para determinação de área foliar lesionada para a ferrugem do eucalipto. **Anais do XXXI Congresso Paulista de Fitopatologia**, p. 40, Campinas, SP, 2008.

MASSON, M. V.; MORAES, W. B.; FURTADO, E. L. Chemical Control of Eucalyptus Rust: Brazilian Experiences. **InTech**, 2013. Disponível em: http://creativecommons.org/licenses/by/3.0.

MATSUSHIMA, T. Icones Microfungorum a Matsushima lectorum, **Plates**, Kobe, Japan, p. 1–405, 1975.
MATSUSHIMA, T. *Myrothecium australiense* sp. Nov. **Matsushima Mycological**, n. 6, p. 28-29, 1989.

MAZARO, S. **M. Indução de resistência a doenças em morangueiro pelo uso de elicitores.** 2007. 87 f. Tese (Doutorado em Agronomia/ProduçãoVegetal)-Universidade Federal do Paraná, Curitiba- PR, 2007.

MELO, L. A. **Armazenamento, aplicação de antioxidantes e otimização do tempo em casa de vegetação no enraizamento de miniestacas de híbridos de *Eucalyptus grandis***. 2009. Dissertação (Mestrado em Ciência Florestal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 2009.

MENDES, M. A. S. et al. Fungos em Plantas no Brasil. Brasília DF. **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, 1998.

MENEZES, M.; OLIVEIRA, S. M. A. de. Fungos fitopatogênicos. Recife, UFRPE, **Imprensa Universitária**, 1993. 277p.

MENNA, M. I; MORTIMER, P. H.; SMITH, B. L. The Incidence of the Genus *Myrothecium* in New Zealand Pastures and Its Relation to Animal Disease. **Journal of General Microbiology**, p. 81-87, 1973.

MICHEREFF, S. J. et al. Greenhouse screening of trichoderma isolates for control of *Curvularia* leaf-spot of yam. **Mycopathologia,** p. 103-108, 1995.

MILLER GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Anal Chem**. p. 426–427, 1959.

MOHAMMADI, M.; KAZEMI, H. Changes in peroxidase and polyphenol oxidases activities in susceptible and resistance wheat heads inoculated with *Fusarium graminearum* and induced resistence. **Plant Science**, Amsterdam, v. 162, p. 491-498, 2002.

MORAES, W. B. Quantificação de danos e relações entre severidade e produtividade no patossistema ferrugem do eucalipto. **Anais do XXXV Congresso Paulista de Fitopatologia**, p. 205, Jaguariúna, SP, 2012.

MORAES, W. B. C. Controle alternativo de fitopatógenos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasilia, DF, v. 27, p. 175-190, 1992.

MOURA, R. Doenças do inhame-da-costa (Dioscorea cayennensis). In: KIMATI, H. et al. **Manual de Fitopatologia**: doenças das plantas cultivadas. 4 ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. 415-419 p.

MÜLLER, E.; LOEFFLER, W. Mycology: An Outline for Science and Medical Students. **Scientia**, 1976. 306 p.

MUNIZ, M. F. S. et al. Identification of fungi causal agents of postharvest diseases on commercialized fruits in Alagoas. **Summa Phytopathologica,** Botucatu, SP, p. 38-42, 2003.

MURAKAMI, R.; SHIRATA, A.; INOUE, H. Survival and fluctuation in density of *Myrothecium roridum* in Mulberry field soil. **Journal General Plant Pathology**, Tokyo, v. 66, n. 2, p. 299-302, 2000.

NAKAZAWA, A., NOZUE, M. & YASUDA, H. Expression pattern and gene structure of phenylalanine ammonia-lyase in *Pharbitis nil.* **Journal of Plant Research**, p.323-328, 2001.

NÜRNBERGER, T.; BRUNNER, F. Innate immunity in plants and animals: emerging parallels between the recognition of general elicitors and pathogen-associated molecular patterns. ***Curr. Opin. Plant Biol.***, v. 5, p. 318-324, 2002.

OKUNOWO, W. O. et al. Media studies on *Myrothecium roridum* Tode: A potential biocontrol agent for water hyacinth. **Journal of Yeast and Fungal Research,** v. 1, p. 55-61, jun., 2010.

OLIVEIRA, J. A. **Efeito do tratamento fungicida em sementes no controle de tombamento de plântulas de pepino (Cucumis sativas L.) e pimentão (Capsicum annanum L.).** 1991. 111 f. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) – Escola Superior de Agricultura de Lavras, Lavras, 1999.

OLIVIER, C. et al. Molecular phylogenetic support from ribosomal DNA sequences for origin of Helminthosporium from Leptosphaeria-like loculoascomucete ancestors. **Mycologia**, p. 736-746, 2000.

OROZCO-CÁRDENAS, M. L.; NARVAEZ-VÁSQUES, J.; RYAN, C. A. Hydrogen peroxide acts as a second Messenger for the induction of defense genes in tomato plants in response to wounding, systemin, and methyl jasmonate. **Plant Cell**, Baltimore, v. 13, p. 179-191, 2001.

PAINEL FLORESTAL. Eucalipto: Emprego e Renda. Notícias Disponível em: <http://painelflorestal.com.br/noticias/eucalipto/10091/eucalipto-emprego-e-renda>. Mato Grosso do Sul. Acesso em: 25 nov. 2010.

PALUDZYSZYN FILHO, E. et al. Eucaliptos indicados para plantio no Estado do Paraná. Colombo: Embrapa Florestas - CNPF, 2006. (Documentos, 129)

PASCHOLATI, S. F. et al. **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba: FEALQ, 2005. 263 p

PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B. Hospedeiro: mecanismos de resistência. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIN, L. **Manual de Fitopatologia**: princípios e conceitos. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v.1, cap. 22, 417-453 p.

PAULA, H. **Variabilidade de isolados de *Curvularia eragrostidis* (henn.) *Meyer* causando queima das folhas do inhame (*Dioscorea cayennensis* Lam.) no Estado de Pernambuco.** 2000. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) – Universidade Rural de Pernambuco. Recife, PE, 2000.

POLTRONIERI, L. S. et al. Three new pathogens infecting Antilles cherry in the State of Pará. **Fitopatologia Brasileira**, p. 424-426, 2003.

QUEZADO-DUVAL, A. M. et al. New hosts of *Myrothecium* spp. in Brazil and a preliminary in vitro assay of fungicides. **Journal of Microbiology**, p. 46-252, 2010.

RAO, V.; HOOG, G. S. A new species of *Myrothecium*. **Persoonia,** p. 90-101, 1983.

RASHID, M. M. Detection of *Curvularia* species on boro rice seeds of Dinajpur. **Online Journal of Biological Sciences**, Pakistan, v. 1, n. 7, p. 591-592, 2001.

REGO, A. M.; CARRIJO, I. V. Doenças das cucurbitáceas. In: VALE, F. X. R; ZAMBOLIM, L; COSTA, H. **Controle de doenças de plantas e hortaliças**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2000. v. 2, 535-598 p.

ROMEIRO, R. S.; GARCIA, F. A. O. Indução de Resistência em Plantas a Patógenos por Eliciadores de Natureza Bacteriana. In.: BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. **Biocontrole de Doenças de Plantas**: Uso e Perspectivas. Fundag, Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2009, 341p.

RÖSLER, J. et al. Maize phenylalanine ammonia-lyase has tyrosine ammonia-lyase. **Plant Physiology**, Rockville, v. 113, p. 175-179, 1997.

ROSS, A. F. Localized aquired resistance to plant vírus infection in hypersensitive hosts. **Virology**, 1961. v. 14, 340-358 p.

RUIZ, R. A. R.; ALFENAS, A. C. Absorção e translocação de fungicidas sistêmicos em *Eucalyptus grandis* para o controle da ferrugem do eucalipto, causada por *Puccinia psidii*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 14, p. 47-49, (1989a).

RUIZ, R.A.R. et al. Influência da temperatura, do tempo de molhamento foliar, fotoperíodo e da intensidade de luz sobre a infecção de *Puccinia psidii* em eucalipto. **Fitopatologia Brasileira**, v. 14, p. 55-61, 1989.

RUIZ, R. A. R. et al. Progresso da ferrugem do eucalipto, causada por *Puccinia psidii* em condições de campo. **Fitopatologia Brasileira**, v. 14, p. 73-81, (1989b).

SBALCHEIRO, C.C. **Ação do biocontrolador com atividade de indução de resistência no controle do crestamento bacteriano comum do feijoeiro (phaseolus vulgaris l.).** 2006, 124 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia), Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2006.

SCHALLENBERGER, E. **Fatores que predispõem as plantas cítricas ao ataque de coleobrocas**. 1994. 110 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Horticultura), Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista, 1994.

SCHIEBER, E.; ZENTMYER, G. A. Myrothecium stem necrosis and leaf spot: Important coffee disease in Guatemala. **Plant Disease Reporter,** p. 115-17, 1968.

SENA, K. **Efeito de extratos epicuticulares de duas cultivares de goiabeira (*Psidium guajava*) sobre a germinação de urediniósporos de *Puccinia psidii*.,** 59 f. 2008. Dissertação. (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos de Goytacazes.

SILVA, J. C.; MEYER, M. C. Mancha de mirotécio em algodoeiro causada por *Myrothecium roridum*. **Summa Phytopathologica**, p. 390-393, 2006.

SILVA, F. de A. S. E.; AZEVEDO, C. A. V. de. Principal Components Analysis in the Software Assistat-Statistical Attendance. In: WORLD CONGRESS ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 7, Reno-NV-USA: American Society of Agricultural and Biological Engineers, 2009.

SILVEIRA, V. D. Elementos de Fitopatologia: *Puccini psidii*, ferrugem das Mirtáceas. **Agronomia**, v.10, p. 218-24, 1951.

SIVANESAN, A. *Cochliobolus eragrostidis*. **Mycopathologia**, Dordrecht, v.111, p.113-114, 1990. (CMI Descriptions of Fungi and Bacteria, 1002).

SIVANESAN, A. *Graminicolous* species of *Bipolaris*, *Curvularia*, *Dreschslera, Exserohilum* and their teleomorphs. Wallingford, UK: **CAB International Mycological Institute**, 1987. 261 p.

SIVANESAN, A. et al.Three new graminicolous species of *Curvularia* (anamorphic fungi) from Queensland, **Aust. Syst. Bot**., p. 275-278, 2003.

SMITH, C. J. Accumulation of phytoalexins: defense mechanisms and stimulus response system. **The New Phytologist**, London, v. 132, p. 1-45, 1996.

SMITH, G. Some new and interesting species of micro-fungi. III. **Transactions of the British Mycological Society**. 1962, p. 387-394.

SOUZA JUNIOR, I. T. **Controle biológico de doenças do arroz: ampliação do espectro de ação e promoção de crescimento pelo uso de combinações de rizobactérias eficientes.** 2010. 67f. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2010.

SOUZA, S. M. C. de. Doenças de Plantas – Goiaba. **Inf. Agropec**., 1985. v. 11, 26 p.

STADNIK, M. J. Indução de resistência a oídios. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, SP, v. 26, p. 175-177, 2000.

STADNIK, M. J.; BUCHENAUER, H. Inhibition of phenylalanine ammonia-lyase suppresses the resistance induced by benzothiadiazole in wheat to *Blumeria graminis* f. sp. *Tritici*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 57, p. 25-34, 2000.

STANGARLIN, J. R. et al. Plantas medicinais e o controle alternativo de fitopatógenos. **Biotecnologia**, Ciência e Desenvolvimento, Brasília, 1999. v. 2, 16-21 p.

STAPLES, R. C.; MACKO, V. Germination of urediniosporos and differentiation of infection strutures. In: BUSHNELL, W. R.; ROESLFS, A. P. **The cereal rusts**: origins, specificity, structure and physiology. New York: Academic Press, 1984. 255-289 p.

STICHER, L.; MAUCH-MANI, B.; MÉTRAUX, J. P. Systemic acquired resistance. **Annual Review of Phytopathoilogy**, v. 35, p. 235-270, 1997.

SUTTON, B. C. *Myrothecium* flavo-virens B. C. Sutton SP. Nov. Notes on Deuteromycetes. Sydowia, **Annales Mycologici,** p. 329-331, 1985.

TAKAHASHI, S. S. **Ferrugem do eucalipto: índice de infecção, análise temporal e estimativas de danos relacionadas à intensidade da doença no campo.** 2002. 37 f. Dissertação (Mestrado em Proteção de Plantas)-Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2002.

TAKAHASHI, S.S. et al. Teste de modelo para estimativa da incidência e evolução da ferrugem do eucalipto, *Puccinia psidii* Winter, em duas regiões de plantio no Estado de São Paulo. In: Forest: **Congresso e Exposição Internacional sobre Florestas**, 5, Curitiba, 1999. (CD-ROM).

TANG, A. M. C.; HYDE, K. D.; CORLETT, R. T. Diversity of fungi on wild fruits in Hong Kong. **Fungal Diversity**, p. 165-185, 2003.

TEIXEIRA, D. A. **Promoção de enraizamento e indução de resistência sistêmica à ferrugem e à mancha-de-cylindrocladium, mediadas por rizobactérias em clones de Eucalyptus spp. (Patente Pl 0101400-5).** 2001. 67 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa - MG, 2001.

TEIXEIRA, H., et al. Efeito de diferentes fontes de luz no crescimento e esporulação in vitro de fungos fitopatogênicos. **Ciênc. agrotec.,** Lavras, v. 25, n. 6, p. 1314-1320, 2005.

TERRY, L. A.; JOYCE, D. C. Elicitors of induced disease resistance in posharvest. **Horticultural Technology**, v.12, p.195-202. 2004.

TESSMANN, D. J. **Epidemiologia da ferrugem (*Puccinia psidii* Winter) do jambeiro e estudos sobre a germinação do seus urediniósporos.** 1992. 111 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade de Brasília, Brasília. 1992.

TSUDA, M.; UEYAMA, A. Two new Pseudocochliobolus and a new species of Curvularia. **Mycological Society of Japan**, p. 321-330, 1985.

TULLOCH, M. The genus *Myrothecium* Tode ex Fr. **Mycological Papers**, p. 42, 1972.

UDAIYAN, K. Some interesting hyphomycetes from the industrial water cooling towers of Madras. **Journal of Economic and Taxonomic Botany**, p. 427-647, 1991.

UENO, Y. Trichothecenes – chemical, biological and toxicological aspects. Tokyo: Kodansha, 1983.

VAN LOON, L. C.; REP, M.; PIETERSE, C. M. J. Significance of inducible defense related proteins in infected plants. **Annual Review of Phytopathology**, v. 44, p. 62-135, 2006.

VAN LOON, L. C.; BAKKER, P. A. H. M.; PITERSE, C. M. J.; Systemic resistence induced by rhizosphere bacteria. Annual Review of Phytopathology, p. 453-483, 1998.

VAN LOON, L. C. et al. Recommendations for naming plant pathogenesis-related proteins. **Plant Molecular Biology Reporter**, p. 245-264, 1994.

VIANA, F. M. P. et al. Recomendações para o controle das principais doenças que afetam a cultura do melão na região Nordeste. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2001. 6 p. (Embrapa Agroindústria Tropical. Circular Técnica, 12).

VIECELLI, C. A. et al. Indução de resistência em feijoeiro a mancha angular por extratos de micélio de *Pycnoporus sanguineus*. **Summa Phytopathologica**, v. 36, n. 1, p. 73-80, 2010.
XIANG, L.; MOORE, B. S. Biochemical characterization of a prokaryotic phenylalanine ammonia lyase. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 187, p. 4286-4289, 2005.

WATANABE, T. **Pictorial Atlas of Soil and Seed Fungi**. Boca Raton, CRC Press, 1994.

WHITTON, S.R., MCKENZIE, E.H.C. & HYDE, K.D. Microfungi on the Pandanaceae: *Stachybotrys*, with three new species. **New Zealand Journal of Botany**. p. 489-499. 2001.

ZHANG-MENG; ZHANG-TIAN, Y. A new species of *Curvularia* from China. **Mycosystema**, 2003. 357-358 p.

ZHANG-MENG; ZHANG-TIAN, Y.; WU-YUE, M. A new name and a new variety in *Curvularia*. **Mycosystema**, 2004. 177-178 p.

ZHU, Y.; QIANG, S. *Curvularia eragrostidis*, a Promising Mycoherbicide Agente for Grass Weeds. **Pest Technology**, 2011.