

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, CULTURAL, MOLECULAR E
ENZIMÁTICA DE ISOLADOS DE *Fusarium* spp., DE SERINGUEIRA**

KAROLINA MARIE ALIX BENEDICTTE VAN SEBROECK DÓRIA

Tese apresentada à Faculdade
de Ciências Agronômicas da
Unesp – Câmpus de Botucatu,
para obtenção do título de
Doutor em Ciências Florestais

BOTUCATU-SP
Dezembro - 2012

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, CULTURAL, MOLECULAR E
ENZIMÁTICA DE ISOLADOS DE *Fusarium* spp., DE SERINGUEIRA**

KAROLINA MARIE ALIX BENEDICTTE VAN SEBROECK DÓRIA

Orientador: Prof. Dr. EDSON LUIZ FURTADO

Tese apresentada à Faculdade
de Ciências Agronômicas da
Unesp – Câmpus de Botucatu,
para obtenção do título de
Doutor em Ciências Florestais

BOTUCATU-SP
Dezembro - 2012

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

D696c Doria, Karolina Marie Alix Benedictte Van Sebroeck, 1980-
Caracterização morfológica, cultural, molecular e
enzimática de isolados de *Fusarium* spp., de seringueira /
Karolina Marie Alix Benedictte Van Sebroeck Doria. -
Botucatu : [s.n.], 2012
xii, 115 f. : il. color., gráfs., tabs., fots., maps.

Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2012
Orientador: Edson Luiz Furtado
Inclui bibliografia

1. Enzimas extracelulares. 2. Fungos. 3. Pragas -
Controle. 4. Seringueira. 5. Tubulina. I. Furtado, Edson
Luiz. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita
Filho" (Campus de Botucatu). Faculdade de Ciências
Agrônômicas. III. Título.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: "CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, CULTURAL, MOLECULAR E
ENZIMÁTICA DE ISOLADOS DE *Fusarium* spp., DE SERINGUEIRA"

ALUNA: KAROLINA MARIE ALEX BENEDICTTE VAN SEBROECK DÓRIA

ORIENTADOR: PROF. DR. EDSON LUIZ FURTADO

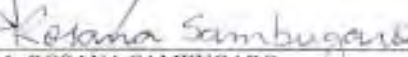
Aprovado pela Comissão Examinadora



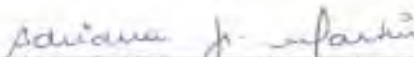
PROF. DR. EDSON LUIZ FURTADO



PROFA. DRA. JULIANA CRISTINA SODÁRIO CRUZ



PROFA. DRA. ROSANA SAMBUGARO



PROFA. DRA. ADRIANA NOVAIS MARTINS



PROFA. DRA. MARLI DE FÁTIMA STRADIOTO PAPA

Data da Realização: 14 de dezembro 2012.

DEDICO,

- *Aos meus pais, BENEDITO e BEATRICE que com seus sorrisos e orações tornaram possível o encerramento dessa jornada;*
- *Ao FABIANO que idealizou e dedicou seu tempo em pesquisar sobre o tema. Toda sua dedicação com certeza há de ser reconhecida. Também pela paciência e compreensão!*
- *Aos meus irmãos KAMILLA e DIOGO, pelo apoio e carinho. E a minha querida sobrinha STHEPHANY, que na inocência da infância acredita que tudo é possível.*
- *À minha Avó BENEDITA que com sua grandeza de conhecimento, sempre nos plantou a semente de sermos humildes em ouvir. Nada está terminado. Coisas novas sempre estão por vir!*
- *Aos meus Avós JOSEPH (fonte de inspiração na escolha da profissão), ELISABETH E ARISTIDES (in memoriam) por terem incentivado esse senso de curiosidade desde a infância.*

Necessita-se homens para jornada arriscada. Salários baixos. Frio implacável. Longos meses de completa escuridão. Perigo constante. Retorno seguro duvidoso. Honra e reconhecimento em caso de sucesso.”

ERNEST SHACKLETON

AGRADECIMENTOS

À Deus, por sua infinita bondade e generosidade presente em todos os momentos. Obrigada por estar viva;

Ao Professor Dr. Edson Luiz Furtado pela orientação e pela amizade, sempre abrindo portas e oportunidades. Pelo apoio nas horas mais difíceis, muito obrigado;

Ao curso de Pós Graduação em CIÊNCIA FLORESTAL da Faculdade de Ciências Agrônômicas da UNESP – Botucatu pela oportunidade oferecida;

Ao Grupo GUAPORÉ, em especial ao Airton que nos recebeu e nos proporcionou a coleta dos dados mais detalhados desse estudo. Obrigado também ao Nilson – pesquisa;

Ao Grupo SOTECO por ceder a oportunidade de efetuarmos os levantamentos em Porto Esperidião – MT;

À MICHELIN da Bahia, em especial ao Carlos Mattos, por ceder oportunidade de visitar os campos de pesquisa e efetuar os levantamentos;

Ao Sr. Eduardo e ao Cido, que abriram as portas da fazenda APHIDIAS para os primeiros levantamentos em Pirajuí-SP;

Ao Sr. Jayme Vazquez Cortez, (*in memorian*) e o Dr. João Jacob Hoelz pelo pioneirismo em acreditar que o estado de São Paulo poderia ser um grande produtor de látex;

Ao Sr. Ireu Moreira (*in memorian*) que nos apresentou os seringais mais incríveis do interior de São Paulo;

Ao Prof Iraê Amaral Guerrini e à Selma Regina Lopes Miranda, pela disposição em ajudar e a consolidar o trabalho;

A CAPES e a FAPESP pela ajuda financeira concedendo minha bolsa de estudos e o financiamento do Projeto;

Às meninas da Seção de Pós-Graduação, Jaqueline, Marlene, Taynan e Kátia, pelos cuidados dispensados;

As minhas amigas de todas as horas, Helenize Gabriela Souza e Milena Ribeiro, que mesmo distantes conseguiam me fazer acreditar na minha capacidade. Vocês são responsáveis por grande parte das horas de diversões via celular.

As amigas que tenho um imenso carinho, e que fizeram esta jornada mais leve em todos os momentos que estiveram presentes: Monika Fecury, Djanira Negrão, Carol Souto, Natália Godinho, Thaiza Rossi e Priscila Modesto (com Davi). Vocês desde o começo, e logo, vieram a Ana Carolina e a Lorena! Sentirei falta de vocês...

Aos meus queridos tios Vitória Marie, Dominique e Ana, Jean Pierre, François (*in memorian*), Geneviève (*in memorian*), Benoit, Damien, Carmelita, Jair, Maria, Zacarias (*in memorian*). Cada um ao seu modo pode me proporcionar uma energia extra. Quero deixar a todos um grande beijo.

Quero agradecer minha prima, Luciana Dória, por ter me ajudado com tanto bom humor nos momentos mais delicados de escrever a tese. Não tenho palavras para agradecer!

Às minhas primas-irmãs Bárbara Marie, Thais Marie e Maria Thereza por todos os momentos que estivemos juntas desde a infância até agora!

Ao amigo Wandir Ribeiro, pelos momentos de alegria compartilhados! Obrigada por me relemburar o quanto é fascinante nosso trabalho;

Aos colegas do Departamento Marília Pizzeta, Karina Tumura, Martha Passador, Cristiane e Paula. Em especial aos João, Facão e Tadeu. Gente valeu pelas risadas;

Ao Cristiano de Bueno pela ajuda nas análises genéticas;

Aos funcionários do Departamento de Proteção de Plantas – Defesa Fitossanitária, Norberto, Paulinho, Dinha, Beá, Fátima e o Zé;

Aos funcionários da portaria da Fazenda do Lageado, que por infinitas vezes riram com o tamanho do meu nome, e pela gentileza de abrirem as cancelas aos finais de semana;

Aos funcionários da biblioteca, que sempre são muito gentis e amáveis em esclarecer dúvidas ou nos ajudar com as pesquisas;

A todos os heveicultores e apaixonados pela cultura. Estar no ambiente de floresta nos proporciona o que há de melhor em estar vivo! Aguça todos os nossos sentidos: paladar, tato, e principalmente a audição, a visão e o olfato.

À banca examinadora pelas excelentes sugestões. Muito obrigada pela gentileza de comentários e sugestões.

SUMÁRIO

1. RESUMO	1
2. ABSTRACT.....	3
3. INTRODUÇÃO.....	5
4. OBJETIVOS	7
5. REVISÃO LITERATURA	8
5.1. A Seringueira	9
5.2. Clones de seringueira	10
5.2.1. Clones de seringueira e suas características.....	10
5.3. Origem, histórico e distribuição da seringueira.....	11
5.4. Propagação	12
5.5. <i>Fusarium</i> spp.....	12
5.6. Caracterização molecular	14
6. MATERIAL E MÉTODOS.....	16
6.1. Coleta de material, preservação e levantamento de incidência e severidade de Fusariose.	16
6.2. Isolamento	19
6.2.1 Obtenção dos esporos de <i>Fusarium</i> spp	19
6.2.2 Obtenção dos isolados monospóricos de <i>Fusarium</i> spp	20
6.3. Caracterização morfológica dos isolados de <i>Fusarium</i> spp.....	20
6.4. Teste de Patogenicidade de isolados de <i>Fusarium</i> spp.....	21
6.5. Teste de resistência clonal aos isolados de <i>Fusarium</i> spp.	24
6.5.1. Avaliação do tamanho da área produzida em cada clone pelos diferentes isolados de <i>Fusarium</i> spp.....	24
6.5.2. Estimativa dos parâmetros genéticos quantitativos.....	24
6.6. Efeito de fungicidas no controle <i>in vitro</i> de <i>Fusarium</i> spp., agente etiológico da fusariose da seringueira.	26

6.7. Extração de DNA dos isolados de <i>Fusarium</i> spp.....	29
6.8. Seqüenciamento da região ITS 5.8 dos isolados de <i>Fusarium</i> spp.	29
6.8.1. Reação de PCR.....	29
6.9. Produção de enzimas extracelulares por isolados de <i>Fusarium</i> spp.	31
6.9.1. Meio de cultura para a atividade Amilolítica.....	32
6.9.2. Meio de cultura para a atividade de Fenoloxidasas –Lacase	32
6.9.3 Meio de cultura para a atividade de Fenoloxidasas – Lignina Peroxidase	33
6.9.4 Meio de cultura para a atividade de Catalase.....	33
6.9.5. Meio de cultura para a atividade Caseinase.....	34
6.9.6. Meio de cultura para a atividade Protease.....	34
6.9.7. Meio de cultura para a atividade da Celulase	34
6.9.8. Meio de cultura para a atividade da Pectinolítica	35
7. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
7.1. Coleta de material	36
7.2. Isolamento monospórico	45
7.3. Caracterização morfológica dos isolados de <i>Fusarium</i> spp.....	47
7.3.1. Velocidade de crescimento micelial dos isolados de <i>Fusarium</i> spp.	54
7.4. Teste de patogenicidade dos isolados de <i>Fusarium</i> spp.	58
7.5. Teste de resistência clonal aos isolados de <i>Fusarium</i> spp.	68
7.5.1. Avaliação do tamanho da área produzida em cada clone pelos diferentes isolados de <i>Fusarium</i> spp.....	68
7.5.2. Estimativa dos parâmetros genéticos quantitativos.....	74
7.6. Efeito de fungicidas no controle <i>in vitro</i> de <i>Fusarium</i> spp., agente etiológico da fusariose da seringueira.....	78
7.7 Extração de DNA	84
7.8 Sequenciamento da região ITS 5.8 dos isolados de <i>Fusarium</i> spp.....	85
7.8. Produção de enzimas extracelulares <i>in vitro</i> por isolados de <i>Fusarium</i> spp.	86
8. CONCLUSÃO.....	91
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	93
10. APÊNDICES	101

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Mapa do Brasil mostrando os estados produtores e o percentual da produção de látex em cada um deles (AGRIANUAL, 2012). Áreas circuladas em vermelho representam os estados onde foram realizadas as coletas de material com sintomas de fusariose.17
- Figura 2:** Escala diagramática para avaliação dos sintomas em campo (Nota 1 – Sadia; Nota 2 – Sintoma pontual da fusariose, com pequenas trincas; Nota 3 – Fusariose mediana e trincas maiores; Nota 4 – Fusariose severa ou total) 18
- Figura 3:** A) Abertura do orifício para a inoculação; B) Câmara úmida com o auxílio de algodão úmido e identificação do isolado inoculado..... 22
- Figura 4:** Reisolamento de material inoculado no clone RRIM 600 – Postulado de Kock. A) Método de inoculação; B) Lesão – Retirada dos fragmentos para constatação do patógeno; c) Colônias de *Fusarium* spp. em meio ágar – água, provenientes dos fragmentos retirados de material inoculado no campo. 23
- Figura 5:** Localização dos “primers” ITSs no DNA ribossomal nuclear..... 30
- Figura 6:** Perfil eletroforético do fragmento amplificado pelos oligonucleotídeos ITS 1 e ITS 4 em PCR, gel de agarose a 0,8 %. M: Marcador Molecular GeneRuler 1Kb Plus DNA Ladder, Marca Fermentas; 1: Isolado F1; 2: Isolado F2; 3: Isolado F3; 4: Isolado F4; 5: Isolado F5; 6: Isolado F6; 7: Controle negativo água. 31
- Figura 7:** Amostragem nos talhões dos clones de seringueira da Fazenda SOTECO – Porto Esperidião –MT 37
- Figura 8:** Amostragem nos talhões dos clones de seringueira da Fazenda Triângulo – Pontes e Lacerda –MT 37
- Figura 9:** Amostragem nos talhões dos clones de seringueira da Fazenda Triângulo – Pontes e Lacerda –MT 38
- Figura 10:** Incidência da fusariose da seringueira em cada um dos clones nas Fazendas Soteco (Porto Esperidião) e Triângulo (Δ) (Pontes e Lacerda) – MT 38
- Figura 11:** Sintoma de escurecimento da região do lenho em painel de seringueira 40
- Figura 12:** Porcentagem dos níveis de severidade da fusariose nos diferentes clones das Fazendas Triângulo e Soteco (Dados de levantamentos efetuados em 2009). 42
- Figura 13:** Porcentagem dos níveis de severidade da fusariose nos diferentes clones das Fazendas Triângulo e Soteco (Dados de levantamentos efetuados em 2009). 43
- Figura 14:** Porcentagem dos níveis de severidade da fusariose nos diferentes clones das Fazendas Triângulo e Soteco (Dados de levantamentos efetuados em 2009).....434

Figura 15: F1: Macroconidio do isolado F1; F2: Clamidósporo do isolado F2; F3: Macroconidio do isolado F3; F4: Macroconidio do isolado F4; F5: Macro e microconidio do isolado F5; F6: Microconidio do isolado F6; F7: Macroconidio do isolado F7; F8: Macro e microconidio do isolado F8; F9: Macroconidio do isolado F9; F10: Macroconidio do isolado F10; F11: Macroconidio do isolado F11; F12: Macroconidio do isolado F12; F13: F13A: Macroconíidio e F13B: Clamidósporo do isolado F13; F14: Macroconidio do isolado F14; F15: Macroconidio do isolado F15; F16: Macroconidio do isolado F16; F17: Macroconidio do isolado F17; F18: Macroconidio do isolado F18; F19: Macroconidio do isolado F19; F20: Macroconidio do isolado F20; F21: Microconidio do isolado F21; F22: Macroconidio do isolado F22; F23: Microconidio do isolado F23; F25: Macroconidio do isolado F25; F26: Macroconidio do isolado F26; F27: Macroconidio do isolado F27; F28: Macroconidio do isolado F28; F29: Macroconidio do isolado F29; F30: Microconidio do isolado F30; F31: Macroconidio do isolado F31.....	52
Figura 16: F32: Clamidósporo do isolado F32; F33: Macro e microconidio do isolado F33; F34: Macroconidio do isolado F34; F35: Macroconidio do isolado F35; F36: Macroconidio do isolado F36; F37: Macroconidio do isolado F37; F38: Microconidio do isolado F38; F39: Macroconidio do isolado F39; F40: Macroconidio do isolado F40; F41: Macroconidio do isolado F41; F42: Macroconidio do isolado F42; F43: Macroconidio do isolado F43; F44: Macroconidio do isolado F44; F45: Macroconidio do isolado F45; F46: Macroconidio do isolado F46; F47: Macroconidio do isolado F47; F48: Macroconidio do isolado F48; F49: Macroconidio do isolado F49; F50: Macroconidio do isolado F50; F51: Macroconidio do isolado F51; F52: Macroconidio do isolado F52;	53
Figura 17: Média diária do crescimento micelial dos isolados de <i>Fusarium</i> spp. em diferentes temperaturas.....	55
Figura 18: Média diária do crescimento micelial dos isolados de <i>Fusarium</i> spp. em diferentes temperaturas.....	56
Figura 19: Média diária do crescimento micelial dos isolados de <i>Fusarium</i> spp. em diferentes temperaturas.....	57
Figura 20: Média diária do crescimento micelial dos isolados de <i>Fusarium</i> spp. em diferentes temperaturas.....	57
Figura 21 – A) Retirada da fita crepe e algodão 120 dias após a inoculação (d.a.i); B) Lesão observada na região da casca externa 120 d.a.i.; C) Contorno da região lesionada com papel contacto transparente e caneta porosa; D) Testemunha; E) Detalhes da área inoculada e da lesão 70 d.a.i.; F) Lesão observada na região do lenho 120 d.a.i.;.....	59
Figura 22: Área da lesão da casca externa e interna 70 dias após a inoculação no clone RRIM 600.	63

Figura 23: Área da lesão da casca externa e interna 120 dias após a inoculação no clone RRIM 600.	64
Figura 24: Variação da temperatura durante 120 dias em condições de campo	65
Figura 25: Variação diária da umidade relativa do ar em condições de campo durante os 120 dias de experimento a campo.	67
Figura 26: Área média das lesões (cm ²) na casca externa nos clones GT1, PR 255 e RRIM 600 quando inoculados com os 27 isolados de <i>Fusarium</i> spp.	69
Figura 27: Área média das lesões (cm ²) na casca interna do caule nos clones de seringueira GT1, PR 255 e RRIM 600 quando inoculados com os 27 isolados de <i>Fusarium</i> spp ...	70
Figura 28: Área média da lesão (cm ²) que cada isolado de <i>Fusarium</i> spp. produziu na casca externa em duas avaliações (70 d.a.i. e 120 d.a.i.). Letras iguais não diferem entre si Teste de Tukey 5% de probabilidade.....	72
Figura 29: Área média da lesão (cm ²) que cada isolado de <i>Fusarium</i> spp. produziu na casca interna em duas avaliações (70 d.a.i. e 120 d.a.i.) Letras iguais não diferem entre si Teste de Tukey 5% de probabilidade.....	73
Figura 30: Inibição do crescimento micelial do isolado F7 de <i>Fusarium</i> sp. sob 14 fungicidas em cinco concentrações.	79
Figura 31: Inibição do crescimento micelial do isolado F37 de <i>Fusarium</i> sp. sob 14 fungicidas em cinco concentrações.	81
Figura 32: Inibição do crescimento micelial do isolado F54 de <i>Fusarium</i> sp. sob 14 fungicidas em cinco concentrações.	82
Figura 33: Gel de agarose 0,8% com amostras das reações de PCR – ITS 1,4 de 22 isolados de <i>Fusarium</i> spp.	85
Figura 34: 1. Meio para detecção da amilase reação (+); 2. Meio para a detecção da caseinase. (2a. reação negativa e 2b. reação positiva); 3.Meio para a detecção da lacase (3a. reação negativa e 3b. reação positiva); 4. Meio para a detecção da protease (4a. reação negativa e 4b. reação positiva); 5. Meio para a detecção da celulase (5a. reação negativa e 5b. reação positiva); 6. Meio para a detecção da catalase (6a. reação de intensidade +; 6b. reação de intensidade ++ e 6c. reação de intensidade +++); 7. Meio para a detecção da ligninase (7a. reação positiva e 7b. reação negativa).	90

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Fungicidas utilizados nos bioensaios do controle <i>in vitro</i> de <i>Fusarium</i> spp. UNESP, Botucatu - SP, 2011.....	28
Tabela 2. Sequências dos “primers” ITS1 e ITS4 que foram utilizadas nas reações de PCR e reações de sequenciamento de isolados de <i>Fusarium</i> spp (White et al., 1990).....	30
Tabela 3. Isolados de <i>Fusarium</i> spp. já armazenados na micoteca do Departamento de Produção Vegetal – FCA – UNESP – Botucatu – SP.	45
Tabela 4. Características morfológicas e culturais dos isolados de <i>Fusarium</i> spp., de seringueira do estado de São Paulo, crescidos em meio NSA, 25± 1°C, por 25 dias. ...	50
Tabela 5. Características morfológicas e culturais dos isolados de <i>Fusarium</i> spp., de seringueira do estado do Mato Grosso, crescidos em meio NSA, 25± 1°C, por 25 dias.	51
Tabela 6. Área das lesões (cm ²) de casca externa e casca interna produzidas no clone RRIM 600	Erro! Indicador não definido.
Tabela 7. Estimativas dos parâmetros genéticos de resistência à fusariose nos clones RRIM 600, GT1 e PR255	76
Tabela 8. Análise de variância para resistência a fusariose (<i>Fusarium</i> spp.) de clones de seringueira – Avaliação da Casca Externa aos 70 d.a.i	77
Tabela 9. Análise de variância para resistência a fusariose (<i>Fusarium</i> spp.) de clones de seringueira – Avaliação da Casca Externa aos 120 d.a.i	77
Tabela 10. Análise de variância para resistência a fusariose (<i>Fusarium</i> spp.) de clones de seringueira – Avaliação da Casca Interna aos 70 d.a.i	77
Tabela 11. Análise de variância para resistência a fusariose (<i>Fusarium</i> spp.) de clones de seringueira – Avaliação da Casca Interna aos 120 d.a.i.....	78
Tabela 12. Crescimento micelial do isolado F7 de <i>Fusarium</i> sp. sob 14 fungicidas em cinco concentrações	79
Tabela 13. Crescimento micelial do isolado F37 de <i>Fusarium</i> sp. sob 14 fungicidas em cinco concentrações.....	80
Tabela 14. Crescimento micelial do isolado F54 de <i>Fusarium</i> sp. sob 14 fungicidas em cinco concentrações.....	82
Tabela 15. Valores médios de ED50 (concentração suficiente para inibir 50% do crescimento micelial), eficiência e sensibilidade de <i>Fusarium</i> spp. a fungicidas.	84
Tabela 16. Produção de enzimas extracelulares de <i>Fusarium</i> spp. isolados de painel de seringueira, em meios de cultura específicos.	89
Tabela 17. Área das lesões (cm ²) na casca externa e interna do clone GT 1 em duas avaliações 70 d.a.i. e 120 d.a.i.....	103

Tabela 18. Área das lesões (cm ²) na casca externa e interna do clone PR 255 em duas avaliações, aos 70 d.a.i. e 120 d.a.i.....	104
Tabela 19. Área das lesões (cm ²) na casca externa e interna do clone RRIM 600 em duas avaliações, aos 70 d.a.i. e aos 120 d.a.i.....	105
Tabela 20. Componentes de Média (BLUP individual). Dados relativos à interação Genótipo x Isolado. Casca Externa (70 d.a.i.). Genótipo (1- GT1) (2-PR255) (3-RRIM 600).....	106
Tabela 21. Componentes de Média (BLUP individual). Dados relativos à interação Genótipo x Isolado. (Casca interna 70 d.a.i.) Genótipo (1- GT1) (2-PR255) (3-RRIM 600).....	109
Tabela 22. Componentes de Média (BLUP individual). Dados relativos à interação Genótipo x Isolado. (Casca externa 120 d.a.i.) Genótipo (1- GT1) (2-PR255) (3-RRIM 600).....	110
Tabela 23. Componentes de Média (BLUP individual). Dados relativos à interação Genótipo x Isolado. (Casca interna 120 d.a.i.) Genótipo (1- GT1) (2-PR255) (3-RRIM 600).....	113

1. RESUMO

Dentro do setor florestal há diferentes culturas implantadas de forma comercial no Brasil, dentre elas destacam-se o eucalipto, o pinus e a seringueira. A produção nacional de borracha seca (oriunda da seringueira) cresceu mais de oito vezes nos últimos 18 anos, e chegou a 130 mil toneladas em 2010. A produção interna está concentrada em São Paulo (57,8%), Bahia (14,05%) e Mato Grosso (11,53%). Como em outras culturas de plantio, a heveicultura enfrenta inúmeros problemas com doenças, entre elas as doenças das folhas, tronco e painel. No presente trabalho, o objeto principal foi o estudo da fusariose, cujos sintomas se iniciam a partir de trincas na casca, a partir do porta-enxerto, e segue em direção ao painel, causando o secamento ao redor desta lesão. Com o passar do tempo esta lesão cresce em tamanho e a casca acaba se desprendendo, tornando a árvore imprópria para a sangria. Os objetivos específicos foram à caracterização dos isolados obtidos e o conhecimento das diversidades genética e patogênica de isolados oriundos das principais regiões produtoras de látex no Brasil, utilizando para isso: a) caracterização morfológica e cultural; b) estudo de agressividade dos isolados; c) teste de resistência clonal; d) efeito de fungicidas no controle *in vitro*; e) caracterização genética, através de sequenciamento de regiões gênicas com valor

taxonômico, como a região ITS e f) produção *in vitro* de enzimas extracelulares. Nas coletas de isolados e levantamento de dados de campo, verificou-se alguns talhões com 49,20% de incidência de seca patológica, com árvores atacadas em agregados ou reboleiras e o patógeno se distribuindo mais no sentido da linha de plantio, o agente foi caracterizado a nível de gênero como *Fusarium* spp. que é um fungo mitospórico, da classe forma *Hyphomycetes*, que produz conídios hialinos, septados, em forma de “canoa”, chamados de macroconídio, a doença foi denominada de fusariose da seringueira. A temperatura preferencial para o desenvolvimento do patógeno está entre 25 a 30°C. As sequências obtidas da região ITS tem semelhança a *Fusarium decemcellulare*. Os isolados responderam de forma diferencial quanto ao controle químico *in vitro* sendo que o princípio ativo com maior eficácia para os três isolados testados foram o clorotalonil + tiofanato metílico e o tebuconazole. Os isolados testados produzem as enzimas extracelulares amilase, celulase, proteases (caseinase), lacase (oxidase), pectinase e catalase. No entanto, a quantidade produzida de cada enzima é significativamente diferente entre os isolados, com exceção da amilase. Através dos testes de inoculação verificou-se que os isolados oriundos de São Paulo, foram os mais agressivos e o clone mais resistente foi o RRIM 600.

Palavras-chave: ITS, enzimas extracelulares, controle químico, diversidade genética, resistência clonal, *Hevea* spp..

2. ABSTRACT

In the Brazilian forestry sector there are different cultures, such as eucalyptus, pine and rubber, grown as a business. Domestic production of dry rubber (derived from the rubber tree) rose more than eight times in 18 years, and reached 130 thousand tons in 2010. Domestic production is concentrated in São Paulo (57.8%), Bahia (14.05%) and Mato Grosso (11.53%). As in other plantation crops, heveiculture faces numerous problems such as diseases, including diseases of the leaves, trunk and panel. In the present work, the main goal was the study of *Fusarium*, whose symptoms begin in the cracks in the bark, from the rootstock, and goes towards the panel, causing the bark around the injury to dry up. Over time the lesion grows in size and the bark ends up shedding, making the tree unsuitable for bleeding. Specific goals were characterizing the obtained isolates and cognition of the genetic and pathogenic diversity of isolates from the major latex producing regions in Brazil, using for this: a) morphological and cultural characterization b) study of the aggressiveness of isolates c) test of clonal resistance d) effect of fungicides on in vitro control e) genetic characterization by sequencing genic regions with a taxonomic value, such as the ITS region and f) *in vitro* production of extracellular enzymes. In the collections of isolates and survey field data, there were some plots with 49.20% of pathological incidence of drought, with trees attacked in aggregates and the pathogen spreading more towards the planting row, the agent has been

characterized at genus-level as *Fusarium* spp, a mitosporic fungus of the form- class Hyphomycetes, which produces conidia hyaline, septated in a canoe-like form, called macroconid, the disease has been named fusariose of rubber. The preferred temperature for the development of the pathogen is between 25 and 30 ° C. The sequences obtained from the ITS region has similarity to *Fusarium decemcellulare*. The isolates differentially responded to in vitro chemical control and the most efficient active ingredients for the three isolates were chlorothalonil + thiophanate methyl and tebuconazole. The tested isolates produce the extracellular enzymes: amylase, cellulase, protease (caseinase), laccase (oxidase), pectinase and catalase. However, the quantity produced of each enzyme is significantly different among the isolates, except for amylase. Through the inoculation tests it has been found that the isolates from São Paulo were the most aggressive and the most resistant clone was RRIM 600.

Keywords: ITS, extracellular enzymes, chemical control, genetic diversity, clonal resistance, *Hevea* spp .

3. INTRODUÇÃO

A seringueira [*Hevea brasiliensis* (Wild. Ex. A. Juss.) Muell. Arg] tem como centro primário de diversidade genética o Rio Negro em confluência com o Rio Amazonas. Já o centro secundário abrange uma vasta área nas proximidades do município de Borba, no baixo rio Madeira (WYCHERLEY, 1977).

Ao redor do centro de origem, espécies de *Hevea* ocorrem naturalmente na Bolívia, Brasil, Colômbia, Guiana Francesa, Guiana, Peru, Suriname e Venezuela. Todas as espécies ocorrem no Brasil exceto *H. microphylla*. (PRIYADARSHAN & CLEMENT-DEMANGE, 2004).

O seu subproduto mais importante, o látex, foi descoberto em meados do século XVIII e atualmente é a principal fonte de borracha natural do mundo. A crescente demanda pela borracha ocorreu no século XIX com a invenção da vulcanização, levando o Brasil a explorar seringais nativos da região amazônica e constituir-se no maior produtor e exportador (ALVARENGA & CARMO, 2008). A baixa produtividade dos seringais brasileiros, em função das técnicas de cultivo e da ocorrência do mal-das-folhas, provocou seguidas perdas de participação do mercado mundial, passando o país da categoria de exportador para importador de borracha.

Os programas de melhoramento conduzem a seleção de clones com alta produtividade e resistência a doenças (GONÇALVES & MARQUES, 2008). O desenvolvimento de clones resistentes é uma alternativa viável, entretanto pode levar muito tempo, uma vez que a obtenção de um clone pode demorar 30 anos.

Normalmente o ciclo de produção da seringueira é de 30 anos, mas este tempo pode ser consideravelmente reduzido em função da ocorrência do secamento do painel de sangria. A seca pode ser fisiológica, também conhecida como *brown bast*, que ocorrem por manejo inadequado da cultura, ou ainda existem hipóteses que esta seca seja por motivos ambientais, como períodos prolongados de seca. Verificou-se ao longo das visitas de coletas a presença de sintomas diferentes aos da seca fisiológica, oriundos a partir de trincas da casca, que se originavam desde a altura do solo até a linha de corte do painel de sangria. Ao lado destas trincas a casca ficava necrosada e se desprendia com várias alterações neste tecido levando a seca da área necrosada, semelhante às lesões necróticas em casca não sangrada que se estendiam para toda a superfície do painel como descritas por Stradiotto (1988).

Dessa forma, no presente estudo pretende-se a caracterização do agente causal desta doença, verificando a variabilidade genética, cultural e patogênica, assim como o estudo de controle químico e do arsenal enzimático produzido pelos isolados visando encontrar medidas para o manejo adequado para as áreas infestadas.

4. OBJETIVOS

- A) Caracterizar morfológica e culturalmente os isolados de *Fusarium* spp.;
- B) Estudar a agressividade dos isolados no clone RRIM 600;
- C) Estudar a resistência clonal aos isolados de *Fusarium* spp.;
- D) Estudar o efeito de fungicidas no controle *in vitro* de isolados de *Fusarium* spp.;
- E) Caracterização genética, através do sequenciamento das regiões com valor taxonômico, como ITS para 17 isolados;
- F) Estudar a produção de enzimas extracelulares *in vitro* por diferentes isolados de *Fusarium* spp.

5. REVISÃO DE LITERATURA

5.1. A Seringueira

A seringueira tem como habitat natural a Região Amazônica, sendo que existem dez espécies no Brasil, das onze conhecidas (ALBUQUERQUE, 1985). Segundo Secco (2008), botanicamente, a seringueira é uma dicotiledônea monóica do gênero *Hevea*, pertencente à família *Euphorbiaceae*, sendo todas as espécies lenhosas e arbóreas, com exceção de *H. camargoana* que é arbustiva. Possui flores unissexuais e suas folhas são longamente pecioladas e compostas trifolioladas. O caule da seringueira é composto por celulose, hemicelulose, lignina e suberina.

Segundo Souza (2007), a cultura tem inúmeras aplicações. Sua borracha é de suma importância para o país e para o mundo, por sua intensa utilização, na fabricação de pneumáticos e em centenas de artefatos de grande utilidade. Por estas razões, mais recentemente, a pesquisa da seringueira tem sido direcionada para o desenvolvimento de clones com dupla aptidão quer para produção de borracha quer para madeira, tornando-se dessa forma mais útil e lucrativa.

Além disto, Souza (2007) descreve que da cultura, também, podem-se extrair óleos visando à produção de biodiesel e sabão. Ressalte-se, ademais, sua grande importância ambiental, pois além de sequestrar gás carbônico, um dos gases responsáveis pelo efeito estufa, é reflorestadora. Com isso, contribui para o não aquecimento do planeta, conserva o solo e a água e é fonte de alimento e proteção para animais silvestres, através de fornecimento de suas sementes, lhes servindo de abrigo.

Em âmbito nacional, os estados de São Paulo, Bahia, Mato Grosso e Espírito Santo são os principais produtores, sendo São Paulo responsável pela maior parcela da produção nacional, o que lhe confere a condição de principal produtor de borracha natural do Brasil (IAC, 2008). Em 2010, o Estado de São Paulo produziu 122.318 toneladas de látex coagulado, correspondendo a 57,8% da produção brasileira (AGRIANUAL, 2012). Neste mesmo ano, a produção brasileira de látex coagulado foi de 211.621 toneladas (AGRIANUAL, 2012). A expansão da cultura, no Estado de São Paulo, deve-se ao plantio e intensificação de novas áreas e, ainda, aos altos preços da borracha natural no mercado e pelas instalações de usinas de beneficiamento, resultando em uma rápida expansão da capacidade de processamento de látex e de coágulo (CAMARGO & BERGAMIN FILHO, 1995).

O extrativismo da borracha, nos seringais nativos da Amazônia, foi gradativamente desativado a partir dos anos 80, mas ainda gera ocupação e renda para a comunidade local (SOUZA, 2007).

Os países asiáticos, Tailândia, Indonésia, Malásia, China e Vietnã são importantes produtores mundiais de borracha natural, respondendo por quase 90% do total mundial (IAC, 2008). Em 2005, o Brasil importou 243,7 mil toneladas de borracha natural, principalmente dos países asiáticos (MAPA, 2011). A produção brasileira, no ano de 2011, atendeu apenas a 39% de suas necessidades (IRSG, 2012). Em 2011, o quilo do coágulo comercializado no Brasil ficou acima de R\$3,69 (AGRIANUAL, 2012).

5.2. Clones de seringueira

As primeiras seleções para a resistência ao mal-das-folhas no Brasil foram realizados pela Companhia Ford. Durante os anos de 1942 e 1945, o programa se expandiu, sendo realizado em cooperação entre a própria Companhia Ford, o Instituto Agrônomo do Norte e o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA) (GONÇALVES & MARQUES, 2008).

5.2.1. Clones de seringueira e suas características

RRIM 600: Clone secundário (as árvores matrizes são obtidas através de cruzamentos controlados entre dois clones primários), desenvolvido pelo Rubber Research Institute of Malaysia, cujos parentais são os clones primários Tjir 1 e PB 86. São árvores altas, com caule vertical e de rápido crescimento quando jovem. A casca, por ser fina, torna um pouco delicada a prática da sangria, em compensação a renovação é boa. A alta produção é seu ponto de destaque. A produção durante o verão (período de senescência) também é alta. Este clone demonstra tolerância à seca do painel, salvo quando é submetido à sangria intensiva (GONÇALVES & MARQUES, 2008).

GT1: Clone primário (oriundos de parentais desconhecidos, que apresentam caracteres desejáveis), foi desenvolvido no seringal Gondang Tapen, na Indonésia (REVIEW, 1970 apud GONÇALVES & MARQUES, 2008). A casca é média, bastante tenra, e se renova imediatamente, não apresentando problemas à sangria. Apresenta caracteres secundários desejáveis, pois a resistência a quebra pelo vento é média para boa e a ocorrência de seca do painel é pouco notada, assim como a incidência de *Phytophthora* spp. Este clone apresenta a tendência de aumentar a produção com o passar do tempo. Por ser precoce e pela sua rusticidade e qualidades agrônomicas, deve ser recomendado para pequenos agricultores do planalto paulista (GONÇALVES & MARQUES, 2008).

PR 255: Clone de alta produção, possuidor de bons caracteres secundários. Os parentais são o Tjir 1 x PR 107. Possui caule alto e reto. A incidência de queda

das folhas causada por antracnose, bem como a seca do painel é moderada (GONÇALVES & MARQUES, 2008).

5.3. Origem, histórico e distribuição da seringueira

Por volta do século XIX, a transferência de plantas exóticas e a busca de plantas selvagens passíveis de domesticação eram atividades que se tornavam racionalizadas, organizadas e postas a serviço do capitalismo industrial. De todos os grandes feitos daquela época de descobertas botânicas, nenhum foi mais grandioso do que a domesticação das árvores produtoras de borracha. Os habitantes do Novo Mundo mostraram a borracha, que obtinham de várias espécies de plantas tropicais, aos primeiros exploradores, inclusive Colombo. Sendo um produto instável, a borracha permaneceu como uma simples curiosidade por mais de três séculos (DEAN, 1989).

De acordo com Rocque (1967) a borracha foi a principal fonte de renda da Amazônia a partir da segunda metade do século XIX até a segunda metade do século XX, período em que ocorreu o ciclo da borracha, de grande prosperidade regional, evidenciada principalmente nas cidades de Belém e Manaus (SECCO, 2008).

De acordo com Pires et al. (2002), *Hevea brasiliensis* distribui-se por uma área ampla, inferior apenas à de *H. guianensis*, localizada particularmente ao sul do rio Amazonas, ultrapassando a margem esquerda do grande rio apenas em estreita faixa no trapézio colombiano, na foz do rio Negro e na costa amazônica do Amapá. Nota-se que com relação à *Hevea benthamiana* (terceiro lugar em distribuição), as duas espécies ocupam áreas nitidamente disjuntas. Entretanto a bacia do rio Negro, que é considerada o centro de dispersão das espécies de *Hevea*, não tem representantes de *H. brasiliensis*, a não ser uma pequena área do curso inferior, na região do igarapé Jaú.

Hoje, a heveicultura está difundida em todas as regiões do globo. Os maiores produtores de borracha são a Indonésia (39,98%), Tailândia (39,67%) Malásia (14,98%), Índia (1,77%), Vietnã (1,07%), Cingapura (0,51%) e os demais países correspondem com uma produção de apenas 2,2% do total (AGRIANUAL, 2012). A produção nacional

cresceu mais de oito vezes, nos últimos 18 anos, e chegou a 211.621 mil toneladas em 2011. Cerca de 80% da borracha natural consumida no mercado doméstico destina-se à indústria de pneumáticos. A produção interna está concentrada em São Paulo (57,80%), Bahia (14,05%) e Mato Grosso (11,53%) (AGRIANUAL, 2012).

5.4. Propagação

Ao se instalar um bom seringal, a muda de boa qualidade representa um dos principais fatores para o sucesso do empreendimento.

O processo para a obtenção da muda pode ser resumido da seguinte forma: escolha das sementes, sementeira, preparo das mudas a partir de sacolas plásticas, seleção das mudas e transplântio. Em seguida, dá-se o processo de enxertia, com retirada das borbulhas e enxertia nos porta enxertos (ALVARENGA & CARMO, 2008).

5.5. *Fusarium* spp.

A cultura da seringueira é acometida por várias doenças causadas, principalmente, por fitopatógenos (FURTADO & TRINDADE, 2005). Essas doenças podem ocorrer na fase de semente, jardim clonal e em plantas adultas; podendo comprometer, desde o sistema radicular até a parte aérea das plantas. As doenças são uma das causas da queda de produtividade de borracha e de madeira, na cultura. Especificamente, com relação aos problemas que afetam o painel de sangria, e, conseqüentemente, prejudicam a exploração e produção de látex, destacam-se:

- a) *Phytophthora* spp., agente causal do cancro estriado do painel;
- b) *Colletotrichum gloesporioides*, agente causal da antracnose nas folhas e, também, de lesões no painel de sangria;
- c) Secamento do painel, que pode ter causas abióticas (*Brown bast*) e
- d) Fusariose, causada por algumas espécies de *Fusarium*.

Enquanto as três primeiras doenças do painel estão bem descritas, inexistem informações mais precisas sobre a fusariose da seringueira causada pela ação de *Fusarium* sp..

Furtado et al. (2001), na tentativa de isolar *Ceratocystis fimbriata*, o agente causal do mofo cinzento, no painel de sangria da seringueira, pelo método de isca de cenoura, a partir de amostras com sintomas característicos, coletadas no ano de 2000, das regiões do Vale do Ribeira-SP, Rio Branco e Bujari-AC e Ituberá e Camamu-BA, constataram que todas as amostras revelaram-se negativas para o conhecido agente causal, no entanto, em todas as amostras foi encontrado o fungo *Fusarium solani*.

Após realização de testes de patogenicidade, reprodução dos sintomas e reisolamento do mesmo fungo, confirmaram a presença de *F. solani*, no painel de sangria, ao invés de *C. fimbriata*.

Além desta espécie Beteloni et al. (2009) obtiveram um isolado do fungo *Fusarium* spp., com características da espécie *F. moniliforme*, do painel de sangria. Após realização de teste de patogenicidade, com reprodução dos sintomas de rachaduras e reisolamento do mesmo isolado inicial, também confirmaram que essa espécie do fungo *Fusarium* causa problemas de rachaduras no painel de sangria da seringueira.

Assim, esses patógenos vêm causando sérias preocupações devido à possibilidade de limitar a exploração de látex, e, conseqüentemente, diminuir a produtividade, principalmente nos seringais do Estado do São Paulo, aonde a cultura vem crescendo ultimamente (Prof. Dr. Edson Luiz Furtado, comunicação pessoal).

O *Fusarium* spp. é um fungo mitospórico, da classe forma *Hyphomycetes*, que produz conídios hialinos, septados, em forma de “canoa”, chamados de macroconídios. Os macroconídios são produzidos em esporodóquios, que são as estruturas de frutificação do fungo na fase assexuada. Algumas espécies produzem, também, conídios em micélio aéreo, denominados de microconídios. A produção de macro e micronídios é variável, em função das condições do ambiente. Algumas espécies produzem ainda os clamidósporos, que são as estruturas de resistência deste fungo (HAWKSWORTH et al., 1995; WINDELS,

1992). A fase teleomórfica de *Fusarium* spp., ou seja, a fase sexual, é conhecida e ocorre nos gêneros *Gibberella* e *Nectria* (WINDELS, 1992).

Na cultura do maracujazeiro (*Passiflora* spp.), Fischer et al. (2005) descrevem o fungo *F. solani*, como agente causal da podridão do colo. Nesta cultura, na fase perfeita (sexuada), o fungo recebe o nome de *Nectria haematococca*. Em meio de cultura BDA, o fungo forma colônias de cor branca-acinzentada, com áreas de cor verde-limão, que são os locais de maior concentração de conídios. Os microconídios são cilíndricos, asseptados ou unisseptados e produzidos em fiálides laterais longas ou em conidióforos em forma de cacho. Os macroconídios apresentam de cinco a nove septos e formato fusiforme. Os clamidósporos são globosos e podem sobreviver no solo por vários anos. A produção de peritécio, constatada somente na fase perfeita, inicia-se após duas semanas, em meio de cultura BDA e após sete dias, em tecido vegetal doente, sob alta umidade. A doença é favorecida por temperatura e umidade elevadas, sendo ainda o patógeno descrito como polífago, pois afeta um grande número de plantas cultivadas.

Na cultura do milho (*Zea mays*), Pereira et al. (2005) descreve o fungo *F. moniliforme*, como causador da podridão do colmo. Nesta cultura, na fase perfeita (sexuada), o fungo recebe o nome de *Gibberella moniliforme*. Ele produz macroconídios curvos, com 3 a 7 septos, medindo 2,4-4,9 x 15-60 µm. Os microconídios são abundantes, medindo de 2-3 x 5-12 µm, e produzidos em cadeia ou em falsas cabeças no micélio. Os peritécios, raramente encontrados na natureza, produzem ascos com dimensões de 75-100 x 10-16 µm, que contêm 8 ascósporos retos, a maioria com 1 septo, medindo de 4,5-7,0 x 12-17 µm.

5.6. Caracterização molecular

A unidade de DNA ribossomal (rDNA) nuclear consiste de uma série repetitiva de três regiões gênicas (18S, 5.8S e 28S) e duas regiões espaçadoras intergênicas (ITS e IGS). Entre estes genes encontram-se as regiões variáveis ITS1 e ITS2, as quais são transcritas e processadas para dar origem ao RNA ribossômico. Estas regiões apresentam muitas mutações durante o processo de evolução podendo ser mais utilizado para a classificação intraespecífica

(FUNGARO, 2000). O fato das regiões ITS serem relativamente curtas (500 a 800 pb) e aparecerem em grande número de cópias no genoma permitem que sejam amplificadas e sequenciadas com facilidade (SKOUBOE et al., 1999; LEAL-JUNIOR, 2002).

A β -tubulina tem despertado significativo interesse no meio científico devido à alta conservação da sequência de aminoácidos. Tal fato faz com que esta proteína seja alvo de fungicidas do grupo benzimidazol, os quais são usados como forma de controle de diversos patógenos (COOLEY & CATEN, 1993).

Genes que codificam β -tubulina em fungos geralmente variam entre filos, mas são altamente conservados em espécies relacionadas (STEFAN et al., 2004; KAWCHUK et al., 2002).

A caracterização deste gene em *Basidiomycetos* revelou que este pode ser composto por oito, nove ou dez éxons, que juntos podem codificar uma proteína de 445, 446, 447 ou 448 aminoácidos, e, portanto, não existe um padrão quanto ao número de éxons e aminoácidos entre as espécies pertencentes a este filo (AYLIFFE et al., 2001; VAN DER MERWE et al., 2007).

6. MATERIAL E MÉTODOS

6.1. Coleta de material, preservação e levantamento de incidência e severidade de Fusariose

Os isolados de *Fusarium* spp. utilizados neste estudo foram coletados nos principais estados produtores de látex do Brasil, sendo cada um deles subdivididos em outras regiões, conforme podemos observar na Figura 1. Amostras do painel das árvores com sintomas de seca foram coletadas e identificadas. Houve a necessidade da confecção de uma escala diagramática, para observar a intensidade dos sintomas no campo, conforme podemos notar na Figura 2.

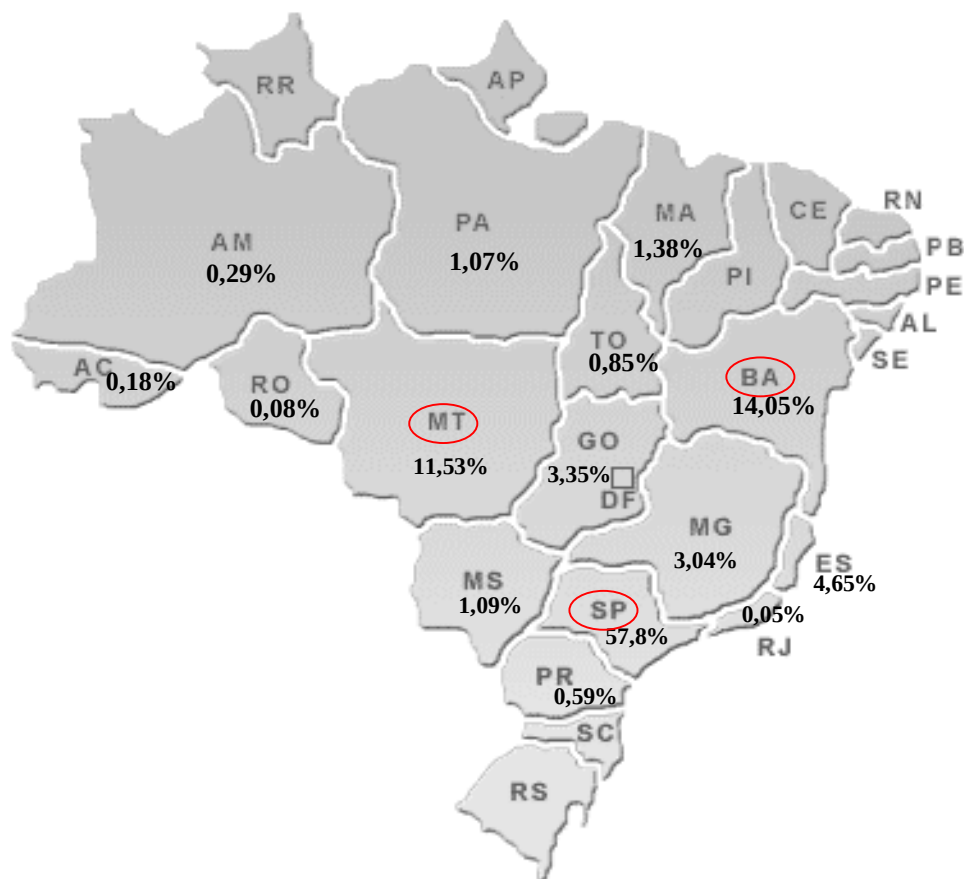


Figura 1. Mapa do Brasil mostrando os estados produtores de borracha natural de seringueira e o porcentual da produção de látex em cada um deles (AGRIANUAL, 2012). Áreas circuladas em vermelho representam os estados onde foram realizadas as coletas de material com sintomas de fusariose.



Figura 2: Escala diagramática para avaliação dos sintomas o caule de seringueira em campo (Nota 1 – Sadia; Nota 2 – Sintoma pontual da fusariose, com pequenas trincas; Nota 3 – Fusariose mediana e trincas maiores; Nota 4 – Fusariose severa ou total)

Foram anotadas ainda a cidade, a fazenda e o clone amostrado. Todos os talhões foram georreferenciados. O acondicionamento das amostras deu-se em caixas de isopor com gelo para manter a qualidade do material durante o transporte.

Os levantamentos de incidência da doença, georreferenciamento dos talhões e levantamento epidemiológico foram realizados somente no estado do Mato Grosso. Nas áreas amostradas, amostrou-se pelo menos um talhão do clone comercial, RRIM 600. Padronizou-se então utilizar apenas 150 árvores por talhão amostrado. O índice de incidência foi calculado seguindo: **$II = n^{\circ} \text{ plantas com sintomas} / n^{\circ} \text{ total de plantas amostradas}$** . A severidade da fusariose foi avaliada de acordo com a escala diagramática para a avaliação da doença no campo. Foram efetuados 17 levantamentos, com 250 indivíduos/talhão.

Os materiais coletados foram levados ao Laboratório de Patologia Florestal, da Faculdade de Ciências Agrônômicas – FCA, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita” – UNESP, Campus de Botucatu onde foi efetuado o isolamento do material.

Atualmente estes isolados de *Fusarium* spp. pertencem a micoteca do Departamento de Produção Vegetal/Defesa Fitossanitária da FCA.

6.2. Isolamento

6.2.1 Obtenção dos esporos de *Fusarium* spp.

Os isolados de *Fusarium* spp foram obtidos de árvores com sintomas de trinca na casca e/ou painel de sangria seco. Pequenos pedaços do tecido lesionado foram cortados com o auxílio de uma faca de sangria esterelizada (com a imersão desta no álcool e no fogo), e estes foram submetidos a uma assepsia com álcool 70% (1 minuto), hipoclorito 2% (30 segundos) e lavados com água destilada autoclavada. Estes fragmentos foram colocados em meio BDA e permaneceram na BOD a 25°C com fotoperíodo 12h, até a sua esporulação.

Os isolados obtidos foram depositados na micoteca do Departamento de Produção Vegetal da Faculdade de Ciências Agrônômicas – Campus de Botucatu – São Paulo.

6.2.2 Obtenção dos isolados monospóricos de *Fusarium* spp.

As colônias mantidas em BDA (Batata-Dextrose-Ágar) foram purificadas conforme a técnica de cultura monospórica descrita por Fernandes (1993). Aliquotas de micélio de *Fusarium* spp. foram transferidas para placas de Petri contendo meio de cultura BDA. Após 10 dias de incubação e com a presença de esporos neste meio de cultura, foram colocadas 5 mL de água destilada e esterilizada, agitadas e plaqueadas para placas de Petri contendo meio de cultura ágar-água (AA).

As placas foram deixadas inclinadas para que houvesse o escoamento do excesso de água. Após 24 horas de incubação em temperatura ambiente (22°C), foi realizada a observação dos esporos germinados em meio AA, através de microscópio ótico. De acordo com a metodologia descrita por Ventura (1999), esporos que germinaram isoladamente foram repicados para três placas de Petri contendo meio de cultura BDA, com o auxílio de uma alça metálica previamente flambada. As placas foram incubadas a 25°C ± 2°C e fotoperíodo de 12 horas.

Após a obtenção dos isolados monospóricos, procedeu-se sua preservação pelo método de castelani. Os isolados multispóricos também foram armazenados.

6.3. Caracterização morfológica dos isolados de *Fusarium* spp.

Para a caracterização morfológica dos isolados de *Fusarium* spp. coletados neste trabalho, foram escolhidos apenas 52 dos 61 isolados obtidos.

Os isolados foram submetidos a crescimento micelial em cinco diferentes temperaturas, 15°C, 20°C, 25°C, 30°C e 35°C. Foram realizadas medidas diametralmente opostas do crescimento micelial das colônias desenvolvidas, um dos critérios utilizados para definir a espécie na chave de classificação de Ventura (1999).

Para a observação dos micro e macroconídios, o meio de cultura utilizado foi o SNA (Nutriente Sintético Ágar). É um meio de cultura usado por alguns pesquisadores para estudo de taxonomia de *Fusarium* (NIRENBERG; O'DONNELL, 1998). A composição para um litro de meio consiste de 1g de KH₂PO₄; 1 g KNO₃; 0,5 g de

MgSO₄.7H₂O; 0,5g de KCl; 0,2g de dextrose; 0,2 g sacarose; 0,6 ml de NaOH solução a 1M e 23 g de ágar. Após a autoclavagem e distribuição nas placas, um disco de micélio do isolado de interesse foi colocado no centro da placa. A incubação foi à 25°C com o fotoperíodo 12h. A avaliação foi realizada após dez dias de incubação.

A mensuração dos conídios foi realizada utilizando-se sistema de vídeo-câmera Opton, modelo TA-0124XS, instalada em microscópio óptico. A imagem foi transmitida para computador e analisada por meio do programa EDN-2. Para a calibração do equipamento, utilizou-se uma lâmina micrografada (Carl Zeiss®). O aumento utilizado para as medições foi de 100x. Foram mensurados 40 conídios/isolado, sendo 20 microconídios e 20 macroconídios. Os resultados foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas por testes estatísticos de Scott-Knott a 5%, realizados no programa ASSISTAT versão 7.5 beta (2008).

6.4. Teste de Patogenicidade de isolados de *Fusarium* spp.

Após obtenção de isolados do agente causal dos sintomas da seca no painel de sangria, com grande probabilidade de ser o fungo *Fusarium* spp., conforme isolamentos já realizados por Furtado et al. (2001) e Beteloni et al. (2009), um teste de patogenicidade foi realizado com o intuito de selecionar os isolados patogênicos e completar os postulados de Kock já realizados.

O teste de patogenicidade foi conduzido no jardim clonal de seringueira em condições de campo. O plantio situa-se na Fazenda Experimental Lageado, junto ao Departamento de Produção Vegetal – Defesa Fitossanitária. O ensaio foi conduzido somente uma vez com início em março de 2011.

Plantas de seringueira do clone RRIM 600 foi inoculado com um disco (Ø=0,5 cm) de BDA, contendo micélio de cada isolado dos fungos, em aberturas feitas na casca, com auxílio de um furador de rolhas, de 0,5 cm de diâmetro. O disco contendo as hifas foi colocado em contato interno com os tecidos da planta após ferimento, com o auxílio de um vazador cilíndrico de metal, de 0,5 cm de diâmetro, retirando-se discos de cascas e expondo o

lenho. Em cada ferimento aberto, foi colocado um disco do inóculo, com a face contendo o micélio voltado para o lenho. Os discos possuíam o tamanho de 0,5 cm de diâmetro contendo meio BDA com o inóculo retirado das colônias do gênero *Fusarium*, com idade de dez dias de incubação.

Os locais inoculados foram cobertos com algodão umedecidos em água destilada e envoltos em fita adesiva de cinco cm de largura, para proteção contra dessecação. A proteção com as fitas foram mantidas até a leitura dos resultados, durante um período de 70 e 120 dias após a inoculação. Plantas testemunhas foram inoculadas somente com o meio BDA. Este clone foi escolhido por ser um dos mais produtivos em campo, além de apresentar uma extensa área plantada em todo o Brasil, e apresentar em campo os sintomas mais severos observados nos levantamentos.



Figura 3: A) Abertura do orifício para a inoculação; B) Câmara úmida com o auxílio de algodão úmido e identificação do isolado inoculado.

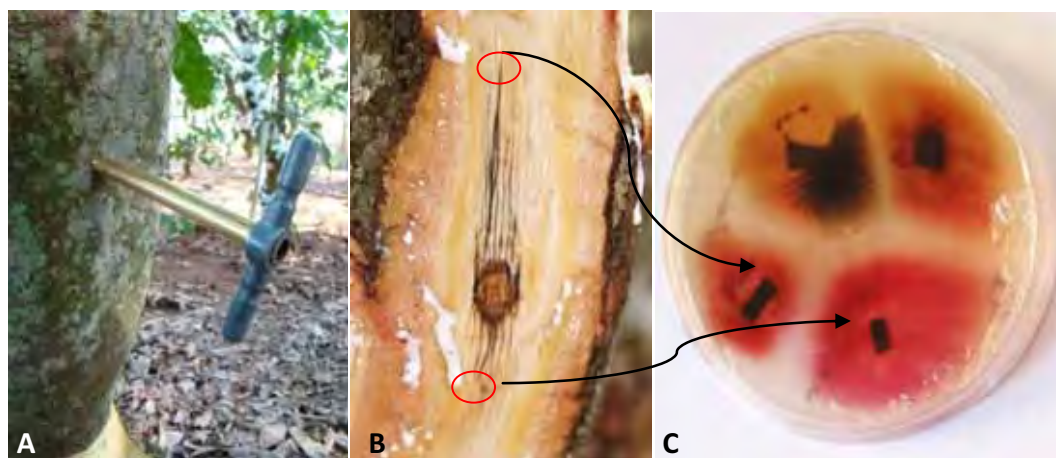


Figura 4: Reisolamento de material inoculado no clone RRIM 600 – Postulado de Kock. A) Método de inoculação; B) Lesão – Retirada dos fragmentos para constatação do patógeno; c) Colônias de *Fusarium* spp. em meio ágar – água, provenientes dos fragmentos retirados de material inoculado no campo.

Para a avaliação dos indivíduos, foi utilizada uma faca cortando e removendo a casca para expor a lesão e medir a área lesionada. A avaliação da doença foi efetuada aos 70 e 120 dias após a inoculação, onde a área da lesão provocada pelo patógeno foi transferida em um desenho para um papel contact transparente, circundando a lesão da casca com o auxílio de uma caneta pincel. A área da lesão foi obtida utilizando uma mesa digitalizadora MDD 190, e o programa SPLAN, após a digitalização da imagem.

O ensaio teve três repetições para cada isolado. O delineamento experimental adotado foi inteiramente ao acaso, com um arranjo de dois fatores: um clone de seringueira apenas e quantidade de isolados (53) mais a testemunha. Os isolados dos fungos foram reisolados e, em seguida, preservados para novos estudos.

As áreas produzidas tanto na casca externa como na interna foram submetidas à análise de variância e as médias foram comparadas por testes estatísticos de Scott-Knott a 5%, realizados pelo programa ASSISTAT versão 7.5 beta (2008).

6.5. Teste de resistência clonal aos isolados de *Fusarium* spp.

6.5.1. Avaliação do tamanho da área lesionada em cada clone pelos diferentes isolados de *Fusarium* spp.

O ensaio teve como objetivo testar o comportamento de três clones, sendo eles: GT1, PR 255 e RRIM 600, com relação à resistência aos diferentes isolados de *Fusarium* spp. A metodologia de inoculação foi a mesma descrita para o teste de patogenicidade. Foram realizadas duas avaliações, sendo a primeira 70 e a segunda 120 dias após a inoculação.

O teste de resistência clonal foi conduzido no jardim clonal de seringueira em condições de campo. O plantio situa-se na Fazenda Experimental Lageado, junto ao Departamento de Produção Vegetal – Defesa Fitossanitária. O ensaio foi implantado no mês de março, sendo finalizadas as avaliações em julho de 2011.

O delineamento experimental adotado foi de blocos inteiramente casualizado, com um arranjo de dois fatores: três clones de seringueira e 27 isolados de *Fusarium* spp. mais a testemunha (discos do meio de cultura BDA).

Para a avaliação dos indivíduos, fez-se o uso de uma faca cortando-se e removendo-se a casca para expor a lesão e medir a área lesionada. A avaliação da doença foi efetuada aos 70 e 120 dias após a inoculação, onde a área da lesão provocada pelo patógeno foi transferida em um desenho para um papel contacto transparente, circundando a lesão da casca com o auxílio de uma caneta pincel. A área da lesão foi obtida utilizando uma mesa digitalizadora MDD 190, e o programa SPLAN, que dá a área lesionada após a digitalização da imagem. Os dados foram submetidos à análise fatorial através do SISVAR pelo teste de Tukey a nível de 5% de probabilidade.

6.5.2. Estimativa dos parâmetros genéticos quantitativos

As estimativas de componentes de variância e parâmetros foram obtidas pelo método da máxima verossimilhança restrita e melhor predição linear não viciada (REML/BLUP), a partir dos dados área lesionada, empregando-se o programa genético-

estatístico SELEGEM-REML/BLUP, desenvolvido por Resende (2007). Para avaliação individual foi utilizado o modelo 96.

Análise de variância individual

Modelo 96: Avaliação de genótipos (Clone) em várias repetições

O modelo matemático utilizado foi:

$$y = Xr + Zg + e;$$

em que: y é o vetor de dados; r é o vetor dos efeitos de repetição (fixos) somados a média geral; g é o vetor dos efeitos genotípicos (aleatórios); e é o vetor de erros ou resíduos (aleatórios). X e Z são as matrizes de incidência para r e g respectivamente (RESENDE, 2007).

- Variâncias

$$\text{Variância Fenotípica } (\hat{\sigma}_f^2) = \hat{\sigma}_c^2 + \hat{\sigma}_e^2 + \hat{\sigma}_a^2$$

$$\text{Variância Aditiva } (\hat{\sigma}_a^2) = 4 \cdot \hat{\sigma}_{cl}^2$$

- Coeficientes de Variação

$$\text{Coeficiente de Variação Experimental } (CV_{\text{exp}}) = \frac{\sqrt{Q_{\text{Merro}}}}{\bar{X}} \cdot 100$$

$$\text{Coeficiente de Variação Genética aditiva individual } (CV_{gi}) = \frac{\sqrt{\hat{\sigma}_f^2}}{\bar{X}} \cdot 100$$

$$\text{Coeficiente de Variação genotípica entre clones } (CV_{gc}) = \frac{\sqrt{\hat{\sigma}_a^2}}{\bar{X}} \cdot 100$$

$$\text{Coeficiente de Variação relativa } (CV_r) = \frac{CV_{gc}}{CV_{\text{exp}}} 100$$

- Herdabilidades

A herdabilidade corresponde à proporção da variabilidade total, que é de natureza genética, indicando o grau de dificuldade para se melhorar determinado caráter através da seleção, definida como o quociente entre a variância genética e a variância total (VENCOVSKY, 1969; FALCONER, 1987).

O conhecimento genético da variabilidade fenotípica resultado da ação conjunta dos efeitos genéticos e de ambiente, é de grande importância para o melhorista na escolha dos métodos de melhoramento, dos locais para condução dos testes de rendimentos e o número de repetições, e na predição de ganhos genéticos. Quanto maior for a proporção da variabilidade decorrente do ambiente em relação à variabilidade total, mais difícil será selecionar genótipos de forma efetiva (BOREM & MIRANDA, 2005).

As herdabilidades foram estimadas através das seguintes fórmulas:

- Herdabilidade no sentido restrito: em nível de plantas $(\hat{h}^2) = \hat{\sigma}_a^2 / \hat{\sigma}_f^2$
- Herdabilidade entre médias de clones $(\hat{h}_m^2) = \frac{1}{4} \hat{\sigma}_a^2 / \hat{\sigma}_f^2$
- Herdabilidade dentro de clones $(\hat{h}_{ad}^2) = \frac{3}{4} \hat{\sigma}_a^2 / \hat{\sigma}_c^2$

6.6. Efeito de fungicidas no controle *in vitro* de *Fusarium* spp., agente etiológico da fusariose da seringueira

O efeito de diferentes fungicidas no controle de *Fusarium* spp. foi analisado por meio de testes *in vitro*, realizados no Laboratório de Patologia Florestal do Departamento de Produção Vegetal – Defesa Fitossanitária da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

Foram escolhidos aleatoriamente três isolados que foram transferidos para placas de Petri de 9 cm de diâmetro, contendo como substrato o meio BDA. Em seguida, procedeu-se a incubação em câmara de crescimento (BOD) ajustada a temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas, por 9 dias.

O bioensaio foi realizado incorporando-se os fungicidas ao meio de cultura, adotando-se a técnica descrita por Edgington et al. (1971), modificada por Menten et al. (1976). Cada fungicida foi dissolvido em 5 ml de acetona e completado o volume com água destilada esterilizada até 100 ml, obtendo-se uma solução estoque de 100.000 ppm do ingrediente ativo.

A partir da solução estoque, procedeu-se a diluição em série, de tal maneira que cada ml dessa solução quando adicionada a 99 ml de BDA fundente ($45-50^\circ\text{C}$), produziu a concentração desejada. Após adicionar o fungicida no meio de cultura, realizou-se a agitação dos mesmos. Em seguida foram vertidos em placas de Petri de 9 cm de diâmetro. Após a solidificação do meio, discos de 7 mm de diâmetro foram retirados do meio de cultura contendo o micélio do fungo, com o auxílio de um vazador e colocados no centro das placas de Petri com fungicidas. As placas foram incubadas em câmara de crescimento, a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, com fotoperíodo de 12 horas. O ingrediente ativo dos fungicidas, modo de ação e concentrações encontram-se na Tabela 2.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado (DIC), com esquema fatorial $14 \times 5 \times 3$, com 210 tratamentos e 3 repetições. Os tratamentos foram constituídos pelos seguintes fungicidas: 1. Fludioxonil + Metalaxil-M; 2. Iprodiona; 3. Azoxystrobina + difenoconazol; 4. Procimidona; 5. Flutriafol; 6. Trifloxistrobina + tebuconazol; 7. Propiconazol; 8. Epoxiconazol + piraclostrobina; 9. Clorotalonil + tiofanato metílico; 10. Tebuconazole; 11. Captana; 12. Mancozebe; 13. Azoxistrobina + ciproconazol; 14. Carbendazim em 5 concentrações (0, 1, 10, 100 e 1000 ppm). Foram testados 3 isolados sorteados aleatoriamente no banco de *Fusarium* spp deste trabalho.

Todos os dados foram submetidos ao teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, utilizando o programa ASSISTAT versão 7.5 beta (2008).

Tabela 1. Fungicidas utilizados nos bioensaios do controle *in vitro* de *Fusarium* spp. UNESP, Boucatu-SP, 2011.

Ingrediente ativo	Nome comercial	Grupo químico	Tipo	CIA ¹
Fludioxonil	Maxim XL (SC)	Fenilpirrol	Contato	25g/L
Metalaxil -M		Acilalaninato	Sistêmico	10g/L
Iprodiona	Rovral(SC)	Dicarboximida	Contato	500g/Kg
Azoxystrobina	Amistar Top (SC)	Estrubirulina	Sistêmico	500g/Kg
Difenoconazol		Triazol		125g/L
Procimidona	Sialex 500 (WP)	Dicarboximida	Sistêmico	500g/Kg
Trifloxistrobina	Nativo (SC)	Estrobirulina	Mesosistêmico	100g/L
Tebuconazol		Triazol	Sistêmico	200g/L
Propiconazol	Tilt (WP)	Triazol	Sistêmico	250g/L
Epoxiconazol	Ópera (SC)	Triazol	Sistêmico	50g/L
Piraclostrobina		Estrubirulina		133g/L
Clorotalonil	Cerconil (WP)	Isoftalonitrila	Sistêmico e de	500g/Kg
Tiofanato metílico		Benzimidazol	contato	200g/Kg
Tebuconazole	Folicur 200 (EC)	Triazol	Sistêmico	200g/L
Captana	Captan (SC)	Dicarboximida	Preventivo	480g/L
Mancozebe	Dithane NT(WP)	Alquilenobis	Contato	800g/Kg
Azoxistrobina	Priori Xtra (SC)	Estrobirulina	Sistêmico	200g/L
Ciproconazol		Triazol		80g/L
Carbendazim	Derosal 500 (SC)	Benzimidazol	Sistêmico	500g/L
Flutriafol	Impact (SC)	Triazol	Sistêmico	125g/L

¹Concentração do ingrediente ativo

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

Para a avaliação, mediu-se o diâmetro do crescimento micelial em dois sentidos perpendiculares entre si, usando um paquímetro digital, durante 9 dias após a incubação. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas por testes estatísticos de Tukey a 5%, realizados pelo programa ASSISTAT versão 7.5 beta (2008).

Os fungicidas foram classificados em 4 categorias de fungitoxicidade e sensibilidade *in vitro*, de acordo com a escala de Edgington et al. (1971) e Kataria e Grover (1978), citada por Parisi (1997), em que: ED50 (dose necessária para inibir em 50% o crescimento micelial) < 1 ppm: alta fungitoxicidade (AE) e alta sensibilidade (AS); ED50 1 - 10 ppm moderada fungitoxicidade (ME) e moderada sensibilidade (MS); ED50 10 - 100 ppm baixa fungitoxicidade (BE) e baixa sensibilidade (BS); ED 50 > 100 ppm não fungitóxico (I) e insensibilidade (IS).

6.7. Extração de DNA dos isolados de *Fusarium* spp.

A extração de DNA genômico total de todos os isolados foi realizada utilizando-se o Kit Plant/Fungi DNA isolation (cat. #26200) da Norgen®.

A quantificação do DNA foi realizada no nanodrop (ACTGene, ASP 2680 – Ver. 3.5) e a solução estoque de DNA foi diluída numa concentração final de 25ng/μL e estocadas em freezer -20°C, a fim de evitar a degradação do DNA, sendo descongeladas no momento da implementação das reações de PCR.

6.8. Sequenciamento da região ITS 5.8 dos isolados de *Fusarium* spp.

6.8.1. Reação de PCR

Após extração e obtenção do DNA dos isolados monospóricos do fungo, reações de PCR foram realizadas com todos os isolados utilizando-se dos *primers* ITS1 e ITS4 para amplificar a região ITS (*Internal Transcribed Spacers*) e gene 5.8S rDNA de acordo metodologia descrita por Rosa et al. (2005).

O sequenciamento foi realizado com os “primers” ITS 4 (reverso) e ITS 1 (frente), como pode ser observado na Figura 5 e Tabela 3.

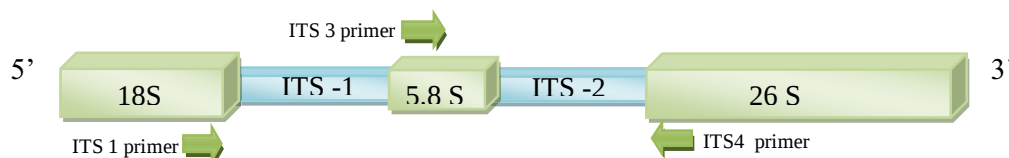


Figura 5: Localização dos “primers” ITSs no DNA ribossomal nuclear.

Tabela 2. Sequências dos “primers ITS1 e ITS4 que foram utilizadas nas reações de PCR e reações de sequenciamento de isolados de *Fusarium* spp (WHITE et al., 1990).

“Primer” – Sequências do primer (5’ para 3’)	
ITS1	TCC GTA GGT GAA CCT GCG G
ITS4	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC

Para a amplificação do DNA, realizou-se uma reação de 25µL em tubos Eppendorf de 250 µL contendo: o reagente de extração utilizado foi PCR Master Mix (2X) Amplicon®. Composto de 0,05 uni/ µL *Taq* DNA polimerase, 4 mM MgCl₂, 0,4mM dATP, 0,4 mM dCTP, 0,4 mM dGTP e 0,4 mM dTTP. No termociclador foi adotado uma programação de desnaturação inicial de 94°C por 2 minutos, 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto e 72°C por 2 minuto e, mais uma extensão final de 72°C por 5 minutos.

Uma alíquota de 5µL da reação de PCR de cada amostra foi misturada com 1,5µL de tampão de carregamento e separada em gel de agarose 0,8%. Foi utilizado o marcador GeneRuler 1Kb Plus DNA Ladder para observar o tamanho dos fragmentos obtidos.

Os produtos das reações PCR foram aplicados em gel de agarose 0,8% contendo 0,8 µL de brometo de etídio. A eletroforese foi realizada a 80 v / 200 mA / 35 minutos. Após a corrida, o gel foi colocado em um transluminador tipo STRATAGENE EAGLEEYE II de ultravioleta e os fragmentos puderam ser observados conforme a Figura 6.

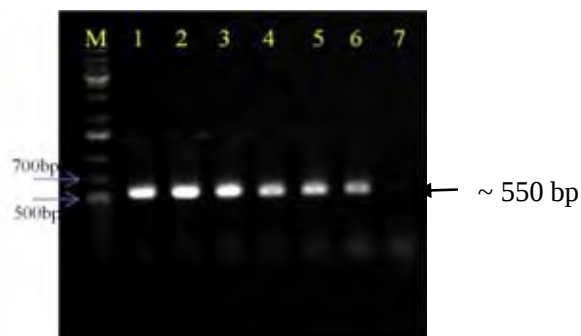


Figura 6: Perfil eletroforético do fragmento amplificado pelos oligonucleotídeos ITS 1 e ITS 4 em PCR, gel de agarose a 0,8 %. M: Marcador Molecular GeneRuler 1Kb Plus DNA Ladder, Marca Fermentas; 1: Isolado F1; 2: Isolado F2; 3: Isolado F3; 4: Isolado F4; 5: Isolado F5; 6: Isolado F6; 7: Controle negativo água.

6.9. Produção de enzimas extracelulares por isolados de *Fusarium* spp.

Discos com 5 mm de diâmetro de BDA contendo estruturas do fungo foram retirados do bordo de colônias cultivadas por 5 dias no escuro sob temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ e repicados individualmente para o centro de placas de Petri, contendo cada um dos meios descritos nos itens 5.9.1 à 5.9.8.

A avaliação das enzimas extracelulares amilase, celulase, protease, lignina peroxidase foi realizada através da medição de dois diâmetros ortogonais da colônia e dos respectivos halos de degradação formados pela ação enzimática do fungo.

Para a produção da enzima lacase e lignina peroxidase foi realizada apenas a observação da presença ou ausência da produção desta enzima pelos isolados.

Os dados obtidos foram submetidos à análise variância e as médias das repetições dos isolados foram comparadas entre si para cada enzima por meio da aplicação do teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade, realizado no programa ASSISTAT (2008).

Em todos os testes de produção utilizou-se apenas 10 isolados de *Fusarium* spp. A escolha foi aleatória, uma vez que sendo da mesma espécie, apresentam comportamento semelhante.

6.9.1. Meio de cultura para a atividade Amilolítica

Preparou-se 500 mL do meio ágar nutriente contendo 0,2% de amido solúvel (suspensão aquecida), em pH 6. Foram vertidos 10 mL do meio de cultura em placas plásticas de 90 mm e após a solidificação do meio, as placas foram inoculadas com culturas jovens (96 h de crescimento) dos isolados coletados e incubadas a temperatura de $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 5 dias. Em seguida, adicionou-se 2 mL da solução de lugol para a verificação do halo de degradação do amido pelos microorganismos. As culturas que demonstraram resultado positivo apresentavam uma zona amarelada ao redor do fundo roxo (HANKIN & ANAGNOSTAKIS (1975) modificado por FERREIRA et al., 2002).

A avaliação foi realizada pela mensuração dos diâmetros perpendiculares da colônia e da colônia mais o halo de degradação do amido com paquímetro. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com três repetições por tratamento.

6.9.2. Meio de cultura para a atividade de Fenoloxidasas –Lacase

Adicionou-se 20 g de ágar acrescido de 0,5% (p/v) de ácido gálico, 15 g extrato de malte e 1 g de peptona em 1 L de água. O ácido gálico foi homogeneizado em 50mL de água destilada e autoclavado a 120°C , 1 atm, 10 min. Os demais reagentes foram solubilizados (pH 7) e autoclavados (120°C , 1 atm, 20 min). Após resfriamento do meio ($45 - 50^{\circ}\text{C}$), o mesmo foi vertido em placas de Petri e posteriormente inoculado com culturas jovens (24 h), incubando-se $30 \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 7 dias no escuro. O teste é considerado positivo para aquelas colônias que formaram ao seu redor um halo marrom escuro (Reação de Bavendamm), sendo realizado em triplicada para cada isolado (SANTOS, 2007).

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com três repetições por tratamento.

6.9.3 Meio de cultura para a atividade de Fenoloxidasas – Lignina Peroxidase

Preparou-se o meio composto por 2 g de glicose; 2 g de tartarato de amônio; 2 g de extrato de malte; 0,26 g de KH_2PO_4 ; 0,26 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4^-$; 0,5 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,01g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; 0,0066 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0,005 g de FeSO_4 ; 0,0005 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,02mg de Na_2MoO_4 ; 0,09mg de MnCl_2 ; 0,07 mg de H_3BO_3 ; 0,1 g de azul de metileno (cloreto 3,7 – bis – dimetilaminofenazotionio) e 20 g de ágar para 1 L de água destilada. O pH foi ajustado para 5,5, seguindo-se a esterelização em autoclave a 121°C, 1 atm, por 20 min. Após o resfriamento do meio (45 – 50°C), o mesmo foi vertido em placas de Petri e posteriormente inoculado com culturas jovens (24h), incubando-se a 30 ±1°C por 30 dias no escuro (SANTOS, 2007).

A avaliação foi realizada com a observação da descoloração do meio de cultura. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com 3 repetições por tratamento.

6.9.4 Meio de cultura para a atividade de Catalase

A atividade da catalase foi constatada em meio BDA com a adição de H_2O_2 (3%) sobre o inóculo e observou-se a ocorrência de produção de gás (borbulhamento) imediatamente, o que indicou resultado positivo, isto é, que o fungo é capaz de produzir a enzima catalase, responsável pela decomposição de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) produzido pelas células durante o metabolismo (SHIN e KIM, 1998).

Segundo Bastos (2005), uma estimativa subjetiva da produção da enzima catalase foi mensurada por meio de símbolos, baseando-se na intensidade da coloração formada no meio: +++ (intensa); ++ (moderada); + (fraca) e - (ausência).

6.9.5. Meio de cultura para a atividade de Caseinase

A atividade proteolítica (ou proteases) foi constatada através da verificação da produção da enzima caseinase. A caseinase foi verificada em meio caseína-ágar contendo 1% de caseína como fonte de carbono, acrescido, após 96 h de incubação com o fungo, de 5,0 mL de solução de ácido acético a 5% (STANFORD et al., 1998). O resultado foi considerado positivo quando ao redor do inóculo surgiu um halo transparente, devido à hidrólise da caseína, circundado por um fundo de coloração esbranquiçada, correspondendo à área onde a caseína não tinha sido hidrolisada sendo, portanto, desnaturada pela reação do ácido acético. (FUENTEFRÍA, 2004).

6.9.6. Meio de cultura para a atividade Protease

O protocolo para avaliação da atividade da protease esta de acordo com a metodologia descrita por Hankin e Anagnostakis (1975).

Para isso, os isolados foram cultivados em placas de Petri contendo meio solidificado composto por 5 g de peptona, 3 g de extrato de levedura, 1 g NaCl, 15g de ágar, 0,4 g gelatina e 1 L de água destilada, em pH 6,0. A gelatina foi autoclavada separadamente e misturada ao meio antes de vertê-lo para as placas. Este foi inoculado com culturas jovens (96 h) e incubada a $30 \pm 1^\circ\text{C}$ por 5 dias no escuro. A detecção da atividade foi verificada pela presença de zonas vermelhas ao redor da colônia após a aplicação de 2 mL de uma solução de vermelho de fenol (2 g vermelho de fenol, diluídos em 300 mL álcool 92° e 200 mL de água destilada autoclavada).

A avaliação foi realizada conforme o item 5.9.1. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com três repetições por tratamento.

6.9.7. Meio de cultura para a atividade da Celulase

Os isolados foram cultivados em ágar carboximetilcelulose (1 g de KH_2PO_4 ; 0,5 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,5 g de asparagina; 0,5 g de KCl; 0,2 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,1 g

de CaCl_2 ; 0,5 g de extrato de leveduras; 10 g de carboximetilcelulose; 20 g de ágar; 1 L de água destilada). As colônias foram incubadas por 96 horas a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ no escuro e em seguida submetidas a choque térmico por 16 horas a 50°C . Após esse período, foram adicionados 10 mL de solução corante de vermelho congo (2,5 g/L) em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0. Após 30 minutos, a solução foi descartada e as culturas foram lavadas com 5 mL de solução de NaCl 0,5 M neste mesmo tampão, visando revelar o halo claro e estreito de degradação da celulose ao redor da colônia (PEREIRA, 2009).

A avaliação da área de degradação da celulose foi realizada como no item 5.9.1. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com três repetições por tratamento.

6.9.8. Meio de cultura para a atividade da Pectinolítica

Preparou-se o meio de cultura composto por 2 g KH_2PO_4 , 7g K_2HPO_4 , 1g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 3g pectina, 1 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,6g de extrato de levedura, 13g de ágar. O pH foi ajustado para 7,2. Os isolados permaneceram neste meio de cultura por 4 dias, $25 \pm 1^\circ\text{C}$, com fotoperíodo de 12 horas. Em seguida estes foram repicados para um segundo meio de cultura, composto por 7,74g de ácido cítrico, 17,93g Na_2HPO_4 , 2,5g de pectina cítrica, 13g ágar e 1 L água destilada. O pH ajustado para 6. Este meio permitiu a difusão das pectinases para o meio circundante. Essas placas foram mantidas a $40 \pm 1^\circ\text{C}$ por 48h. Decorrido este tempo de incubação, verteram-se 2 mL de solução de lugol sobre a superfície do meio de cultura, os quais foram descartados após 10 minutos. As zonas de substrato degradado foram visualizadas, observando um halo claro ao redor da colônia desenvolvida no meio de cultura.

A avaliação da área de degradação da celulose foi realizada como no item 6.9.1. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com três repetições por tratamento.

7. RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.1. Coleta de material

As áreas de coleta no estado do Mato Grosso foram georreferenciadas e estão representadas pelas Figuras 7, 8 e 9.



Figura 7: Amostragem nos talhões dos clones de seringueira da Fazenda SOTECO – Porto Esperidião –MT.



Figura 8: Amostragem nos talhões dos clones de seringueira da Fazenda Triângulo – Pontes e Lacerda –MT.



Figura 9: Amostragem nos talhões dos clones de seringueira da Fazenda Triângulo – Pontes e Lacerda –MT

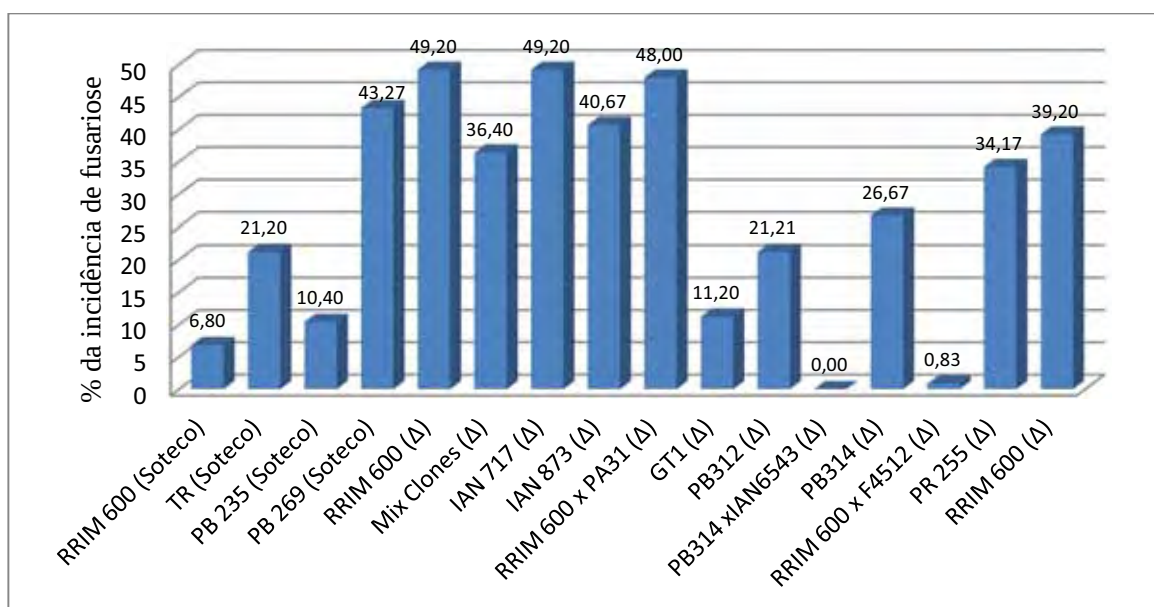


Figura 10: Incidência da fusariose da seringueira em cada um dos clones nas Fazendas Soteco (Porto Esperidião) e Triângulo (Δ) (Pontes e Lacerda) – MT

Fusarium solani (Mart.) Sacc. tem sido isolado a partir de uma variedade extremamente ampla de plantas (Booth, 1971). Isolados de *F. solani* foram associados a cancrios de árvores como teca (*Tectona grandis*) na Tanzânia (Hocking, 1968), no álamo (*Liriodendron tulipifera* L.) (Dochinger; Seliskar, 1962), no *Populus deltoides* (Boyer, 1961), no *Populus tremuloides* (Maini; Dance 1965), na *Nyssa sylvatica* var. *Biflora* (Toole, 1966), em *Juglans regia* L. (Chen; Stewart, 2000), na *Tapiscia sinensis* (Mei et al., 1999), em *Quercus rubra*, (Toole, 1966), e no álamo preto (*Populus nigra* subs. *betulifolia*) (Barbee, 1962).

Em inspeções realizadas em seringais do clone RRIM 600, nos municípios de Novo Horizonte, Macaubal e Cosmorama, na região de São José do Rio Preto – SP, foram constatadas plantas com áreas necróticas na casca, que se estendiam para toda a superfície do painel, mesmo em casca não sangrada. Nas áreas adjacentes às lesões, foram observadas alterações no tecido da casca, sendo essas como grânulos que se desprendem facilmente com o tato, e cujo agente causal foi identificado como *Fusarium moniliforme* (STRADIOTO et al., 1988).

Segundo Demirci e Maden (2002), árvores de *Acer negundo* infectadas com *Fusarium solani*, apresentam descoloração do alburno e podem assumir coloração de vermelho a marrom. Ramos velhos infectados apresentam-se descascados e com rachaduras profundas.

Esses sintomas de rachaduras podem ser observados claramente em caules de seringueira infectados, conforme proposto na escala de avaliação. Sintomas de manchamento do alburno em caules de seringueira foram observados durante as coletas, e podem ser notadas na Figura 11.



Figura 11: Sintoma de escurecimento da região do lenho em painel de seringueira

No álamo, os sintomas observados são de descoloração na casca com rachaduras irregulares e áreas deformadas. Geralmente o patógeno penetra por ferimentos (MAY DE MIO; AMORIM, 2000). *Fusarium solani* têm sido isolados em árvores de *Platanus acerifolia* sob condições de estresse (PILOTTI et al., 2002).

Os painéis de sangria da seringueira sofrem constantes injúrias mecânicas pelo ato da sangria e a faca pode funcionar, neste caso, como veículo de disseminação do *Fusarium* sp., ou ainda, deixar a planta suscetível à sua colonização em função da abertura de ferimentos para a entrada do patógeno. Através de comunicação pessoal, muitos sangradores afirmaram não fazer a assepsia da faca de sangria com a solução de hipoclorito.

Nandris et al. (1984; 1991) distinguiram uma grave forma de necrose da casca, posteriormente, chamada de necrose de floema (TPN – *Tapping panel dryness*), que afetava árvores jovens. TPN mostrou-se irreversível e é caracterizada principalmente pela necrose do floema interno. Eventualmente, o painel inteiro é afetado por rachaduras graves e descamação da casca (PELLEGRINI et al., 2007).

Os sintomas encontrados nos levantamentos de campo, nos casos mais graves, são rachaduras que se estendem do painel de sangria até a áreas próximas ao solo, assim como a paralisação da exsudação do látex quando este sintoma está presente. Este sintoma mais grave está ilustrado na Figura 2-4.

By Do et al. (2011) observaram que o clone RRIM 600 com TPN apresentam padrão de agregação entre as árvores. Peyrard et al. (2006) relatam agregação de árvores com TPN dentro de um terreno plantado com o clone PB 235, sem provas de um agente causal.

A hipótese simples de um patógeno envolvido aparentemente com o TPN pode encaixar com várias observações do estudo. O agente patogênico pode ser uma doença de solo, ou uma doença capaz de transitar com o equipamento de sangria. Ambas as possibilidades seriam compatíveis com a agregação de curta distância e a infecção de árvores de grande porte (BY DO et al., 2011). Este fato corrobora com os resultados obtidos neste trabalho, sendo que uma das hipóteses levantadas seria a de transmissão do *Fusarium* sp. pela faca de sangria.

Outro fato que corrobora com as hipóteses levantadas por By Do et al. (2011), de que o agente patogênico seria um fungo de solo, se encaixa perfeitamente com o obtido neste estudo, já que o *Fusarium* sp. é habitante de solo e apresenta estruturas de sobrevivência neste ambiente, quando ausente o hospedeiro. Um patógeno também pode explicar algumas diferenças entre TPN e seca das árvores.

A severidade da fusariose variou de acordo com os clones avaliados. Foram encontrados sintomas em todas as classes da escala proposta. As porcentagens de árvores em cada classe estão dispostas nas Figuras 12 e 13.

O clone IAN 717 apresentou 2% de indivíduos com nota 4. O clone RRIM 600 apresentou 1,2% dos indivíduos avaliados na Área 3 com a nota 4 de severidade da fusariose. Na área com o mix de clones este índice saltou para 4% com sintomas severos

Para a nota 3, ou seja, fusariose mediana, a área com a maior ocorrência é a do clone IAN 873, com 18,4%, seguido pelo IAN 717 com 11,2% de indivíduos com estes sintomas. A área com o mix de clones apresentou 12%, RRIM 600 – área 3 com 9,2%, PB 312 com 6,06%, RRIM 600 – área 2 com 2,4% e PB 269 com 1,92% de indivíduos com sintomas de fusariose mediana, conforme a escala proposta na Figura 2.

Os sintomas pontuais de fusariose foram notados em todos os clones avaliados, independente da área de estudo. O clone RRIM 600 x IAN 873 apresentou o maior índice de árvores com este sintoma, ou seja, 57,33%, ultrapassando a porcentagem de

indivíduos saudáveis (42,67%). O clone IAN 873 – área 2 apresentou 54% dos indivíduos nesta condição sintomática, seguido pelos clones RRIM 600 x PA 31 (47,2%), PB 269 (40,38), IAN 717 (36%), PR 255 (34,17%), PB 314 (26,67%), TR (21,2%), Mix clones (20,4%), IAN 873 – área 1 (18,8%), PB 312 (15,5%), PB 235 (10,4%), GT1 (11,2%) e RRIM 600 x F 4512 (0,83%).

Nestas avaliações, o clone com a maior porcentagem de indivíduos sem sintomas de fusariose foi o RRIM 600 x F 4512 com 99,17%. Outros clones apresentaram índices semelhantes, como por exemplo, o RRIM 600 – área 1 (93,2%), PB 235 (89,6%), GT 1 (88,8%), TR (78,8%), PB 312 (78,44%) e PB 314 (73,33%).

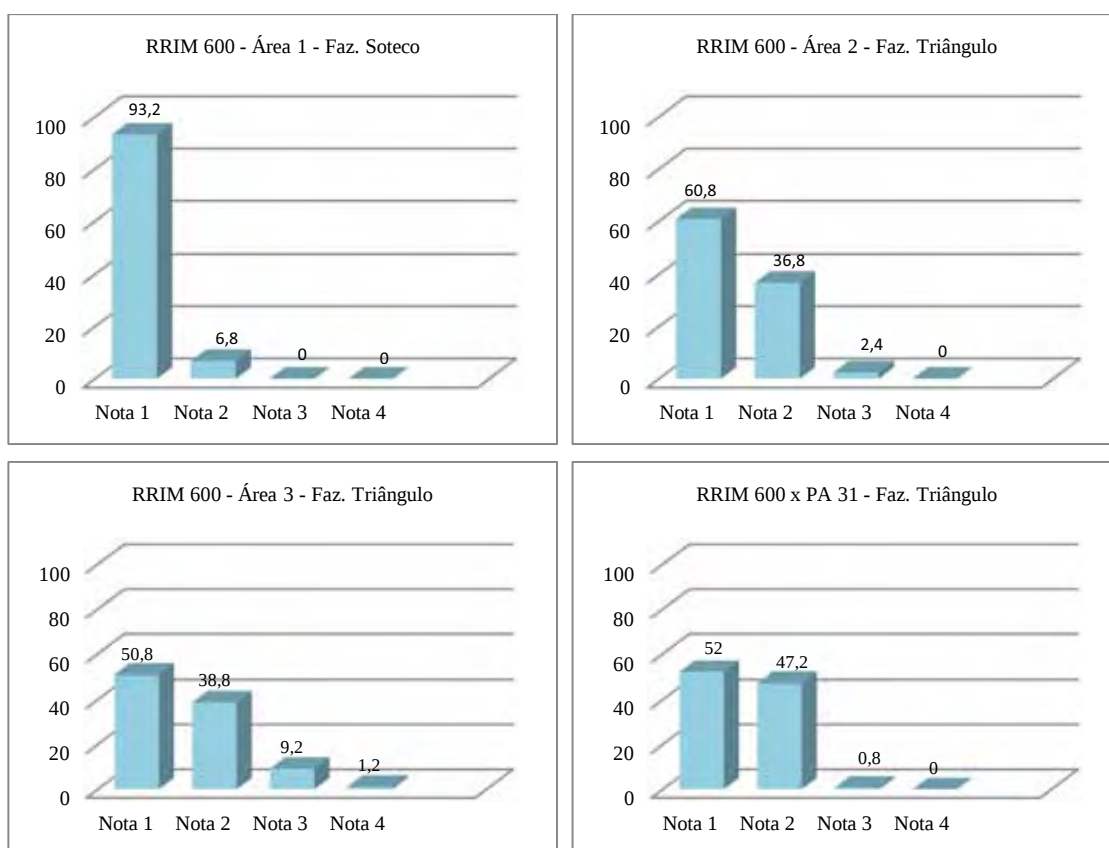


Figura 12: Porcentagem dos níveis de severidade da fusariose nos diferentes clones de seringueira das Fazendas Triângulo e Soteco (Dados de levantamentos efetuados em 2009).

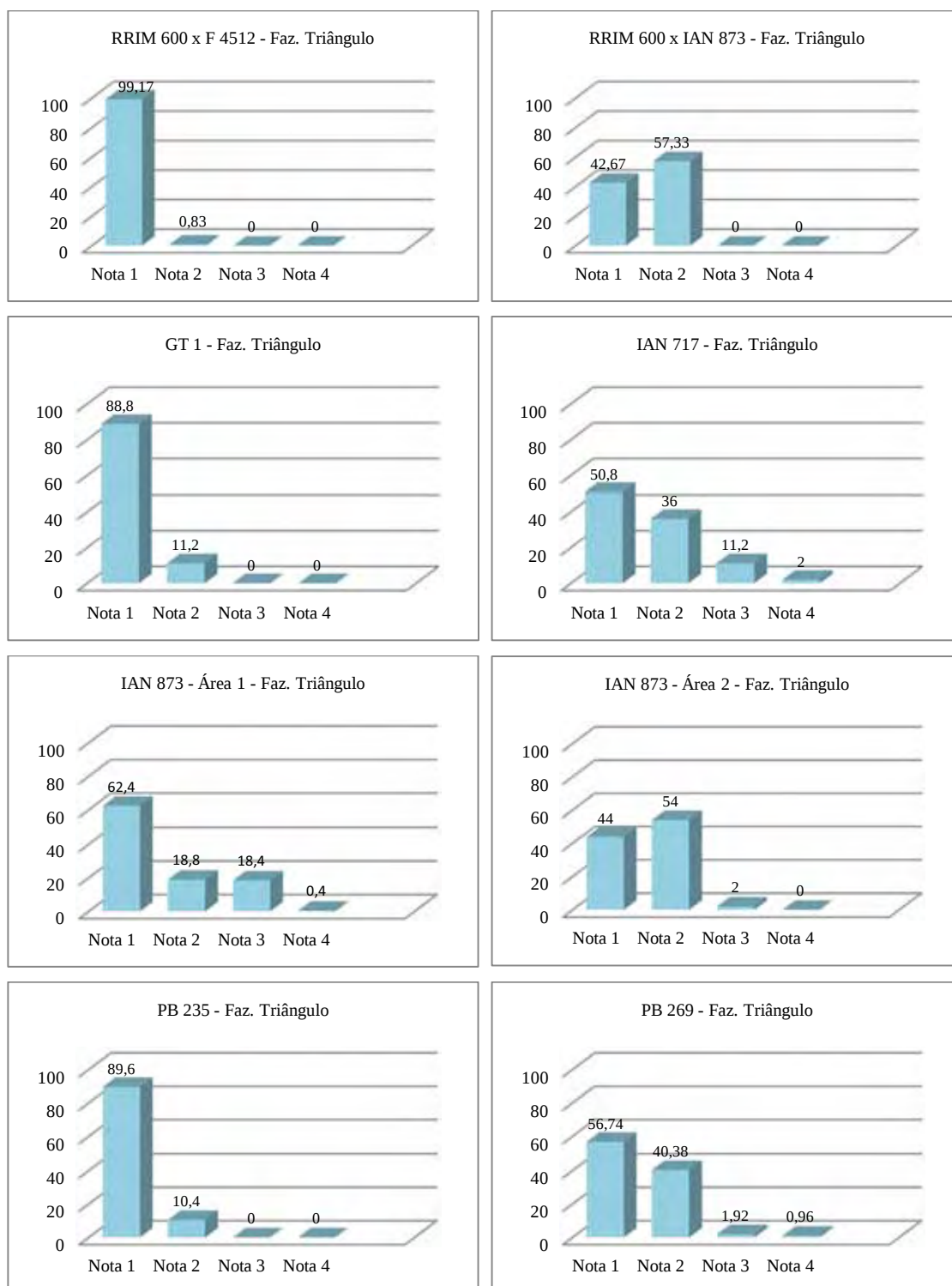


Figura 13: Porcentagem dos níveis de severidade da fusariose nos diferentes clones de seringueira das Fazendas Triângulo e Soteco (Dados de levantamentos efetuados em 2009).

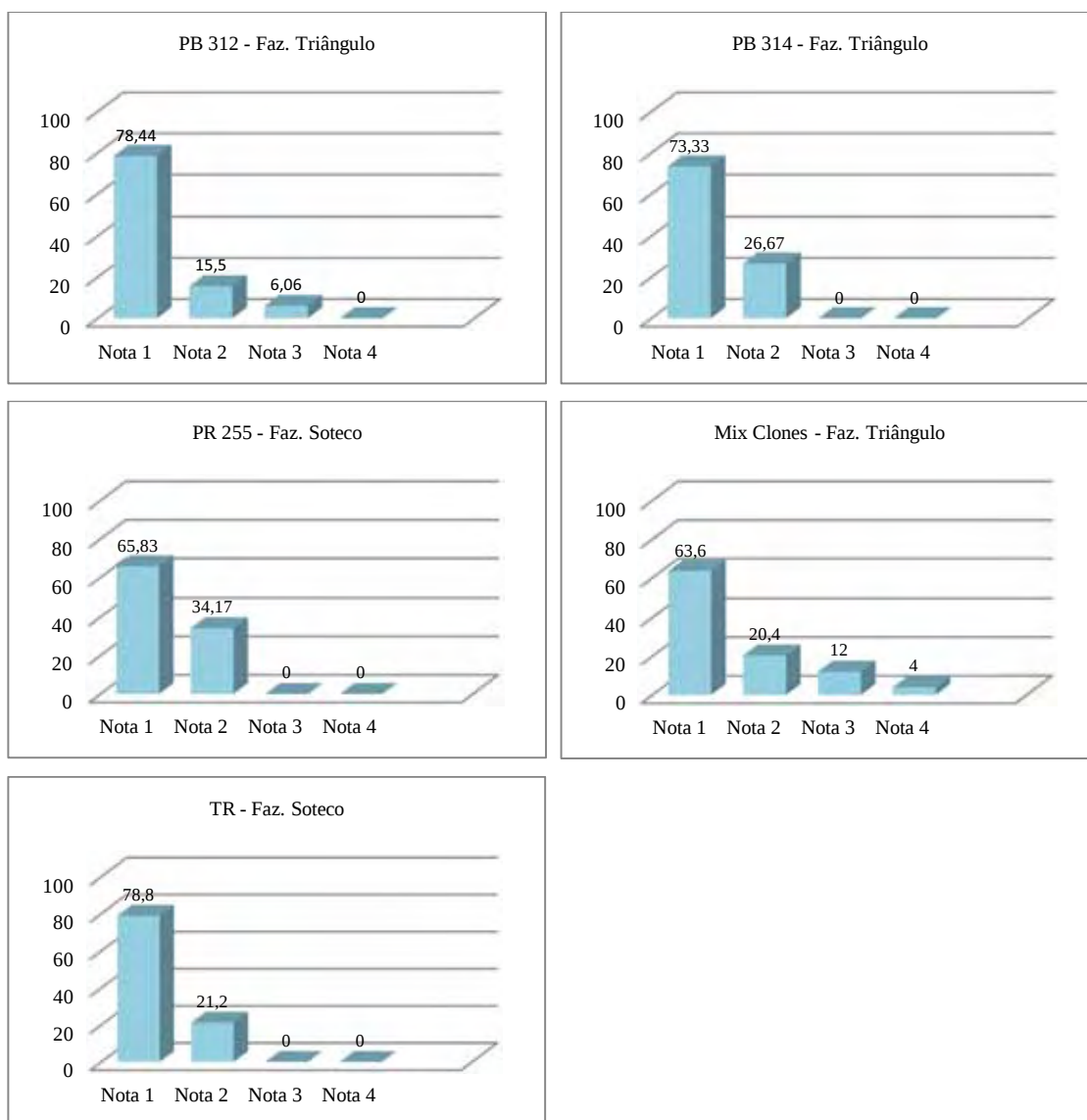


Figura 14: Porcentagem dos níveis de severidade da fusariose nos diferentes clones de seringueira das Fazendas Triângulo e Soteco (Dados de levantamentos efetuados em 2009).

7.2. Isolamento monospórico

Foram obtidos 61 isolados de *Fusarium* spp. das regiões de coleta, sendo que cada estado visitado, ou seja, São Paulo, Mato Grosso e Bahia forneceu: 26, 27 e 8 isolados respectivamente, conforme a Tabela 4.

Tabela 3. Isolados de *Fusarium* spp. já armazenados na micoteca do Departamento de Produção Vegetal – FCA – UNESP – Botucatu – SP.

Identificação	Local	Clone	Coletor	Ano da coleta
F1	Nhandeara -SP	PB 235	Fabiano G. Beteloni	2009
F2	Nhandeara -SP	PB 235	Fabiano G. Beteloni	2009
F3	Pirajuí- SP	PB 235	Fabiano G. Beteloni	2009
F4	Pirajuí- SP	PB 235	Karolina Dória	2009
F5	Nhandeara -SP	RRIM 600	Karolina Dória	2009
F6	Nhandeara -SP	RRIM 600	Karolina Dória	2009
F7	Nhandeara -SP	RRIM 600	Karolina Dória	2009
F8	Nhandeara -SP	RRIM 600	Fabiano G. Beteloni	2010
F9	Nhandeara -SP	RRIM 600	Fabiano G. Beteloni	2010
F10	Nhandeara -SP	RRIM 600	Fabiano G. Beteloni	2010
F11	Nhandeara -SP	RRIM 600	Fabiano G. Beteloni	2010
F12	Nhandeara -SP	RRIM 600	Karolina Dória	2010
F13	Nhandeara -SP	RRIM 600	Karolina Dória	2010
F14	Nhandeara -SP	RRIM 600	Karolina Dória	2010
F15	Nhandeara -SP	RRIM 600	Karolina Dória	2010
F16	Itajobi - SP	PB 235	Fabiano G. Beteloni	2010
F17	Itajobi - SP	PB 235	Karolina Dória	2010
F18	Itajobi - SP	PB 235	Fabiano G. Beteloni	2010
F19	Itajobi - SP	PB 235	Fabiano G. Beteloni	2010
F20	Itajobi - SP	PB 235	Fabiano G. Beteloni	2010
F21	Pontes e Lacerda - MT	RRIM 600 x PA 31	Karolina Dória	2010
F22	Pontes e Lacerda - MT	RRIM 660 x PA 31	Karolina Dória	2010
F23	Pontes e Lacerda - MT	RRIM 660 x PA 31	Fabiano G. Beteloni	2010
F24	Pontes e Lacerda - MT	RRIM 660 x PA 31	Fabiano G. Beteloni	2010
F25	Pontes e Lacerda - MT	RRIM 660 x PA 31	Fabiano G. Beteloni	2010

...Continua

Identificação	Local	Clone	Coletor	Ano da coleta
F26	Pontes e Lacerda - MT	RRIM 660 x PA 31	Fabiano G. Beteloni	2010
F27	Pontes e Lacerda - MT	RRIM 660 x PA 31	Karolina Dória	2010
F28	Pontes e Lacerda - MT	RRIM 660 x PA 31	Karolina Dória	2010
F29	Pontes e Lacerda - MT	s/ identificação	Karolina Dória	2010
F30	Pontes e Lacerda - MT	s/ identificação	Karolina Dória	2010
F31	Pontes e Lacerda - MT	PB 314	Fabiano G. Beteloni	2010
F32	Pontes e Lacerda - MT	PB 314	Fabiano G. Beteloni	2010
F33	Pontes e Lacerda - MT	PB 312	Fabiano G. Beteloni	2010
F34	Pontes e Lacerda - MT	PB 312	Karolina Dória	2010
F35	Pontes e Lacerda - MT	PB 312	Karolina Dória	2010
F36	Pontes e Lacerda - MT	PB 314	Karolina Dória	2010
F37	Pontes e Lacerda - MT	IAN 873	Fabiano G. Beteloni	2010
F38	Pontes e Lacerda - MT	IAN 873	Fabiano G. Beteloni	2010
F39	Pontes e Lacerda - MT	IAN 873	Karolina Dória	2010
F40	Pontes e Lacerda - MT	IAN 873	Karolina Dória	2010
F41	Pirajuí- SP	s/ identificação	Fabiano G. Beteloni	2009
F42	Pirajuí- SP	s/ identificação	Fabiano G. Beteloni	2009
F43	Pirajuí- SP	s/ identificação	Karolina Dória	2009
F44	Pirajuí- SP	s/ identificação	Karolina Dória	2009
F45	Pirajuí- SP	s/ identificação	Karolina Dória	2009
F46	Pirajuí- SP	s/ identificação	Fabiano G. Beteloni	2009
F47	Pontes e Lacerda - MT	PR 255	Fabiano G. Beteloni	2010
F48	Pontes e Lacerda - MT	PR 255	Karolina Dória	2010
F49	Pontes e Lacerda - MT	PR 255	Karolina Dória	2010
F50	Porto Esperidião - MT	RRIM 600	Fabiano G. Beteloni	2010
F51	Pontes e Lacerda - MT	Viveiro	Karolina Dória	2010
F52	Pontes e Lacerda - MT	IAN 717	Fabiano G. Beteloni	2010
F53	Igrapiúna - BA	FX 3864	Fabiano G. Beteloni	2010
F54	Igrapiúna - BA	FX 3864	Fabiano G. Beteloni	2010
F55	Igrapiúna - BA	CDC 312	Karolina Dória	2010
F56	Igrapiúna - BA	FX 3864	Karolina Dória	2010
F58	Igrapiúna - BA	FX 3864	Karolina Dória	2010

Continua...

Identificação	Local	Clone	Coletor	Ano da coleta
F59	Igrapiúna - BA	FX 3864	Fabiano G. Beteloni	2010
F60	Igrapiúna - BA	FX 3864	Fabiano G. Beteloni	2010
F61	Igrapiúna - BA	FX 3864	Karolina Dória	2010

7.3. Caracterização morfológica dos isolados de *Fusarium* spp

Os isolados foram caracterizados conforme proposto por Nelson et al. (1983) e suas características estão ilustradas na Tabela 5 e 6.

Para a maioria das espécies de fungos a taxonomia é baseada em caracteres morfológicos, a taxonomia de espécies do gênero *Fusarium* é bastante controversa, sendo a caracterização filogenética necessária. Estas abordagens têm levado à divisão clara de *F. thapsinum* de *F. moniliforme* (Klittich e Leslie, 1992; e Klittich et al. 1997), a redefinição da *F. moniliforme* / *verticillioides* para *Gibberella moniliformis* (SEIFERT et al., 2003).

Os isolados F2 e F3, provenientes do estado de São Paulo, não produziram microconídios. Enquanto os isolados F2 e F6 não produziram macroconídios. Destes isolados, houve uma variação no tamanho do microconidio de 2,02 – 3,66 µm para a largura e no comprimento 4,47 – 8,52 µm. No macroconidio as dimensões variaram de 3,48 – 5,69 µm para a largura e 35,17 – 79,87 µm para o comprimento. A variação do formato no microconidio ocorreu em todos os isolados testados. O formato ovoide foi o mais comum nas observações, enquanto a mais rara foi a reniforme. O número de septos dos macroconídios variou na média de 3,1 – 7,8.

Apenas o isolado F12 produziu micélio raro, enquanto os demais produziram em abundância. Dos 26 isolados de São Paulo, apenas oito (isolados F2, F3, F5, F8, F13, F14, F16 e F17) produziram clamidósporo, e dois (isolados F5 e F46) produziram peritécio.

Quanto a coloração, um isolado apresentou a coloração marrom, quatro isolados apresentaram a coloração bronzeada, sete isolados apresentaram a coloração púrpura,

11 isolados apresentaram a coloração vermelho carmim e três isolados apresentaram a coloração carmim, conforme escala proposta por Nelson et al. (1983).

Para os isolados do Mato Grosso, os microconídios apresentaram largura que variou de 2,16 – 4,01 μm e comprimento de 3,59 – 7,99 μm . O formato predominante foi o ovoide e o mais raro o reniforme. Para o macroconídio a largura de 2,66 – 7,35 μm e o comprimento de 28,33 – 84,32 μm .

Os 25 isolados provenientes do Mato Grosso produziram micélio aéreo em abundância. Apenas um isolado (F32) produziu peritécio, e 16 isolados (F22, F28, F29, F31, F32, F33, F34, F36, F37, F39, F40, F47, F49, F50, F51 e F52) produziram clamidósporo.

Ao observarmos os isolados F12, F13, F14, F17, F36, F39 e F47 (13,72% do total de isolados) o número de septos variou de 3 a 5. Este número de septos se encaixa nas descrições da espécie *F. verticiloides*. (LESLIE e SUMMERELL, 2006).

Os demais isolados apresentaram a quantidade de septos variando de 5 a 10. Esta característica é comum apenas a espécie de *Fusarium decemcellulare*. Esta espécie está presente em regiões tropicais e subtropicais, causando diversos tipos de cancos em espécies arbóreas (LESLIE e SUMMERELL, 2006). Neste caso, 86,28% dos isolados deste trabalho se enquadram nesta espécie.

F. decemcellulare é raramente confundido com outras espécies de *Fusarium* devido ao grande tamanho de seu macroconídio (LESLIE e SUMMERELL, 2006). Booth (1971) relata que *Fusarium moniliforme* e *Fusarium decemcellulare* formam microconídios em cadeias. A presença da cadeia de conídios é um método simples e útil para a separação de *Fusarium moniliforme* de *Fusarium oxysporum*, por exemplo (BOOTH, 1971).

Lombard et al. (2008), observaram árvores de *Cateniformis cedrelinga*, com sintomas de cancro no Equador. Através de isolamento do tecido sintomático, descobriu-se a presença de *F. decemcellulare*.

A espécie de *F. decemcellulare* foi relatada causando prejuízos nas culturas de erva mate (Poletto et al., 2006), em fruteiras tropicais como a manga (Ploetz et al., 1996), abacate (Darvas e Kotze, 1987), cacau (Marasas et al., 1984), o guaraná (Adis et al., 1985). Outros relatos de hospedeiros em que este fungo pode causar uma doença incluem

Annona squamosa × *A. cherimola* - Atemóia (Togawa e Nomura, 1998), *Bixa orellana* - urucum (Rondon e Materan, 1990), e *Toona ciliata* - Cedro australiano vermelho (Lori et al, 1994).

A coloração observada das culturas foram 10 isolados apresentaram a coloração carmim, cinco isolados apresentaram a coloração creme, quatro isolados apresentaram a coloração púrpura, três isolados apresentaram a coloração vermelho carmim, dois isolados apresentaram a coloração arroxeada, e um isolado apresentou a coloração bronzeado, conforme escala proposta por Nelson et al. (1983).

O formato de cada macro e/ou microconídio de todos os isolados utilizados na caracterização morfológica pode ser observado nas Figuras 15 e 16.

Tabela 4. Características morfológicas e culturais dos isolados de *Fusarium* spp., de seringueira do estado de São Paulo, crescidos em meio NSA, 25± 1°C, por 25 dias.

Isolado	Microconídios			Macroconídios			N° de Septos ²	Formatos(%) ³				Tipo Micélio	Produção ⁴		Cor da colônia
	L ¹	C ¹	L ¹	C ¹	L ¹	C ¹		Ovóide	Reniforme	Clavado	Globoso		Clamidosp.	Peritécio	
F1	2,75 c	8,56 a	5,42 c	74,87 b	Ausente	Ausente	6 a 7	80	0	20	0	Aéreo	-	-	Púrpura
F2	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	*	-	0	0	0	Aéreo	+	-	Púrpura
F3	Ausente	Ausente	5,57 c	64,04 d	Ausente	Ausente	6 a 7	-	0	0	0	Aéreo	+	-	Púrpura
F4	2,51 d	7,82 a	5,45 c	80,00 a	Ausente	Ausente	6 a 8	75	0	25	0	Aéreo	-	-	Vermelho Carmim
F5	2,63 c	7,31 b	5,43 c	71,96 b	Ausente	Ausente	5 a 8	80	0	20	0	Aéreo	+	+	Vermelho Carmim
F6	2,47 d	7,03 b	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	*	65	0	35	0	Aéreo	-	-	Vermelho Carmim
F7	2,62 c	7,14 b	5,40 c	73,79 b	Ausente	Ausente	6 a 8	45	0	55	0	Aéreo	-	-	Vermelho Carmim
F8	2,49 d	7,45 a	5,42 c	65,62 c	Ausente	Ausente	7 a 8	40	0	60	0	Aéreo	+	-	Vermelho Carmim
F9	3,65 a	7,12 b	5,69 c	65,47 c	Ausente	Ausente	7 a 8	65	0	35	0	Aéreo	-	-	Carmim
F10	3,30 b	7,44 a	4,98 c	74,35 b	Ausente	Ausente	6 a 7	25	0	50	25	Aéreo	-	-	Carmim
F11	2,87 c	7,26 b	5,57 c	68,22 c	Ausente	Ausente	6 a 8	35	0	50	15	Aéreo	-	-	Carmim
F12	2,05 d	6,89 b	3,84 e	37,63 f	Ausente	Ausente	3 a 5	25	20	0	55	Raro	-	-	Bronzeado
F13	3,44 b	6,95 b	4,48 d	28,85 f	Ausente	Ausente	3 a 4	55	15	10	20	Aéreo	+	-	Bronzeado
F14	2,76 d	8,52 a	5,67 c	79,82 a	Ausente	Ausente	3 a 5	60	5	5	30	Aéreo	+	-	Vermelho Carmim
F15	2,69 c	6,85 b	5,38 c	70,26 c	Ausente	Ausente	7 a 9	50	0	35	15	Aéreo	-	-	Vermelho Carmim
F16	2,83 c	7,06 b	4,03 e	35,17 f	Ausente	Ausente	5 a 8	85	0	0	15	Aéreo	+	-	Bronzeado
F17	2,43 d	7,11 b	5,07 c	74,43 b	Ausente	Ausente	3 a 4	85	0	0	15	Aéreo	+	-	Vermelho Carmim
F18	2,05 d	6,92 b	4,96 c	60,56 d	Ausente	Ausente	7 a 9	65	0	35	0	Aéreo	-	-	Bronzeado
F19	2,49 d	7,59 a	5,39 c	75,71 b	Ausente	Ausente	7 a 9	65	0	15	20	Aéreo	-	-	Púrpura
F20	2,45 d	6,21 c	5,28 c	71,85 b	Ausente	Ausente	6 a 8	95	0	0	5	Aéreo	-	-	Vermelho Carmim
F41	2,69 c	8,16 a	5,15 c	70,50 c	Ausente	Ausente	6 a 8	65	0	35	0	Aéreo	-	-	Vermelho Carmim
F42	2,82 c	7,48 a	5,58 c	75,27 b	Ausente	Ausente	7 a 8	50	0	30	20	Aéreo	-	-	Púrpura
F43	3,28 b	6,69 b	6,80 a	75,14 b	Ausente	Ausente	6 a 8	55	0	30	15	Aéreo	-	-	Vermelho Carmim
F44	2,88 c	5,96 c	6,76 a	80,53 a	Ausente	Ausente	6 a 8	95	0	5	0	Aéreo	-	-	Púrpura
F45	2,88 c	5,96 c	5,03 c	82,74 a	Ausente	Ausente	6 a 8	70	0	5	25	Aéreo	-	-	Marrom
F46	3,15 b	7,55 a	6,12 b	82,17 a	Ausente	Ausente	5 a 8	45	0	40	15	Aéreo	-	+	Púrpura

Continua...

Tabela 5. Características morfológicas e culturais dos isolados de *Fusarium* spp., de seringueira do estado do Mato Grosso, crescidos em meio NSA, 25± 1°C, por 25 dias.

Isolado	Microconídios		Macroconídios		Nº de Septos ²	Formatos(%) ³				Tipo Micélio	Produção ⁴		Cor da colônia
	L ¹	C ¹	L ¹	C ¹		Ovóide	Reniforme	Clavado	Globoso		Clamidosp.	Peritécio	
F21	2,16 d	3,70 d	Ausente		-	50	20	10	20	Aéreo	-	-	Carmim
F22	2,99 c	7,99 a	6,35 b	71,91 b	5 a 8	70	0	0	30	Aéreo	+	-	Carmim
F23	2,823 c	6,08 c	6,42 b	65,11 c	6 a 7	80	0	20	0	Aéreo	-	-	Carmim
F25	3,49 b	6,06 c	7,34 a	71,09 c	6 a 8	95	0	5	0	Aéreo	-	-	Carmim
F26	3,70 a	6,52 b	6,95 a	73,50 b	7	30	0	70	0	Aéreo	-	-	Carmim
F27	3,63 a	6,90 b	6,64 a	72,71 b	7	65	0	30	0	Aéreo	-	-	Carmim
F28	3,32 b	5,64 c	6,04 b	62,79 d	5 a 8	60	0	20	20	Aéreo	+	-	Creme
F29	Ausente		6,37 b	59,46 d	5 a 7	77,78	0	11,11	11,11	Aéreo	+	-	Creme
F30	3,66 a	7,16 b	6,26 b	78,20 a	7 a 9	60	0	40	0	Aéreo	-	-	Púrpura
F31	3,79 a	5,47 c	6,39 b	68,55 c	6 a 7	65	0	20	15	Aéreo	+	-	Carmim
F32	2,26 d	3,59 d	Ausente		-	60	20	0	20	Aéreo	+	+	Creme
F33	3,24 b	6,50 b	5,43 c	56,66 d	6 a 7	50	0	40	10	Aéreo	+	-	Carmim
F34	Ausente		6,97 a	78,29 a	5 a 9	0	0	0	0	Aéreo	+	-	Creme
F35	2,91 c	7,74 a	6,64 a	81,12 a	5 a 8	85	0	15	0	Aéreo	-	-	Púrpura
F36	2,88 c	5,68 c	4,76 d	35,03 f	3 a 4	35	5	20	40	Aéreo	+	-	Creme
F37	3,39 b	6,45 b	6,97 a	35,03 f	5 a 7	60	0	40	0	Aéreo	+	-	Púrpura
F38	Ausente		5,24 c	68,58 c	4 a 5	0	0	0	0	Aéreo			Púrpura
F39	Ausente		5,11 c	44,86 e	4 a 5	0	0	0	0	Aéreo	+	-	Arrouxeada
F40	1,79 d	5,21 c	5,47 c	82,58 a	7 a 10	60	25	15	0	Aéreo	+	-	Vermelho Carmim
F47	3,81 a	6,19 c	7,07 a	46,99 e	4 a 5	0	15	15	70	Aéreo	+	-	Bronzeado
F48	3,52 b	7,01 b	5,97 b	68,34 c	5 a 9	80	0	0	20	Aéreo	-	-	Carmim
F49	4,01 a	7,32 b	5,66 c	84,35 a	7 a 9	65	0	20	15	Aéreo	+	-	Vermelho Carmim
F50	2,98 c	5,81 c	5,97 b	70,48 c	6 a 9	80	0	0	20	Aéreo	+	-	Carmim
F51	2,22 d	3,67 d	Ausente		-	70	10	20	0	Aéreo	+	-	Arrouxeada
F52	3,70 a	5,39 c	5,66 c	62,98 d	5 a 10	30	10	50	10	Aéreo	+	-	Vermelho Carmim

¹ Média de 20 conídios. L = largura (µm); C = comprimento (µm). ² Valores mínimos e máximos de 20 macroconídios observados; ³ Média em porcentagem de 20 microconídios observados; ⁴ Formação (+) ou não (-) de clamidósporos e peritécio no meio de cultura. CV% Microconídios (Largura:19,99%; Comprimento: 16,63%) Macroconídios (Largura:13,17 % Comprimento:11,76%) As médias seguiu da mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Teste Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade. Dados não transformados.

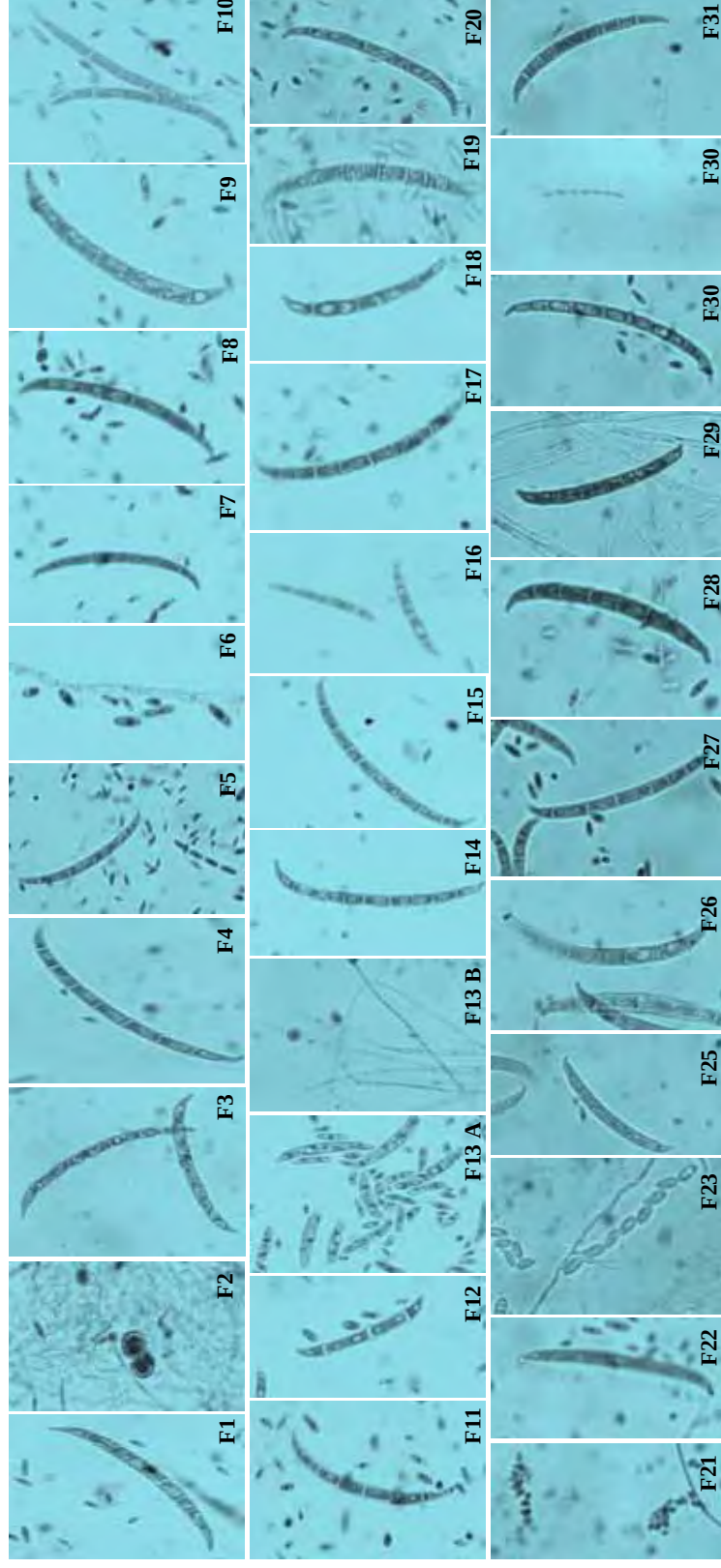


Figura 15: F1: Macroconídio do isolado F1; F2: Clamidósporo do isolado F2; F3: Macroconídio do isolado F3; F4: Macroconídio do isolado F4; F5: Macro e microconídio do isolado F5; F6: Microconídio do isolado F6; F7: Macroconídio do isolado F7; F8: Macro e microconídio do isolado F8; F9: Macroconídio do isolado F9; F10: Macroconídio do isolado F10; F11: Macroconídio do isolado F11; F12: Macroconídio do isolado F12; F13: F13A: Macroconídio e F13B: Clamidósporo do isolado F13; F14: Macroconídio do isolado F14; F15: Macroconídio do isolado F15; F16: Macroconídio do isolado F16; F17: Macroconídio do isolado F17; F18: Macroconídio do isolado F18; F19: Macroconídio do isolado F19; F20: Macroconídio do isolado F20; F21: Microconídio do isolado F21; F22: Macroconídio do isolado F22; F23: Microconídio do isolado F23; F25: Macroconídio do isolado F25; F26: Macroconídio do isolado F26; F27: Macroconídio do isolado F27; F28: Macroconídio do isolado F28; F29: Macroconídio do isolado F29; F30: Microconídio do isolado F30; F31: Macroconídio do isolado F31.

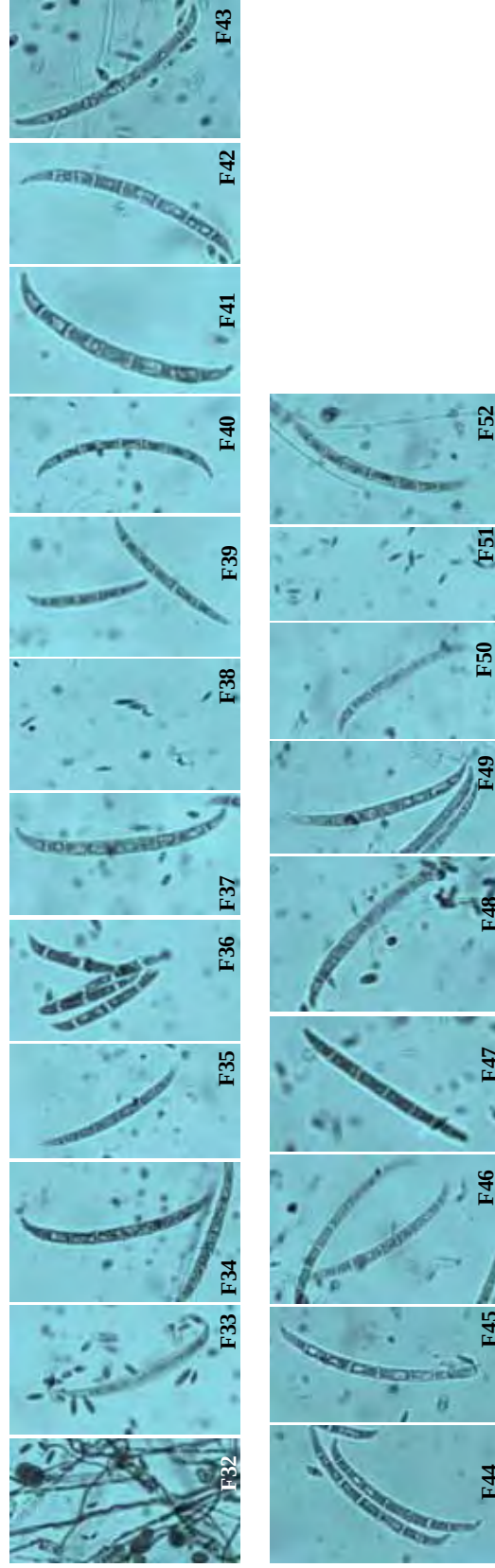


Figura 15: F32: Clamidósporo do isolado F32; F33: Macro e microconídeo do isolado F33; F34: Macroconídeo do isolado F34; F35: Macroconídeo do isolado F35; F36: Macroconídeo do isolado F36; F37: Macroconídeo do isolado F37; F38: Microconídeo do isolado F38; F39: Macroconídeo do isolado F39; F40: Macroconídeo do isolado F40; F41: Macroconídeo do isolado F41; F42: Macroconídeo do isolado F42; F43: Macroconídeo do isolado F43; F44: Macroconídeo do isolado F44; F45: Macroconídeo do isolado F45; F46: Macroconídeo do isolado F46; F47: Macroconídeo do isolado F47; F48: Macroconídeo do isolado F48; F49: Macroconídeo do isolado F49; F50: Macroconídeo do isolado F50; F51: Microconídeo do isolado F51; F52: Macroconídeo do isolado F52;

7.3.1. Velocidade de crescimento micelial dos isolados de *Fusarium* spp.

Os isolados de *Fusarium* spp. apresentaram comportamentos diferenciados quando expostos à diferentes temperaturas. O que podemos notar é que houve um padrão de crescimento, ou seja, a velocidade de crescimento maior entre as temperaturas de 25 e 30°C. Porém, quando submetidos a 35°C houve um acentuado decréscimo na sua velocidade de crescimento diário, como apresentado nas Figuras 17,18 e 19.

Os isolados F1, F6, F8, F36 e F45 apresentaram ápice de crescimento micelial quando expostos à 25°C. Isso corresponde à 10,41% dos isolados estudados. Eles apresentaram a taxa de crescimento micelial variando de 0,7 à 0,8 cm/dia. Nestas mesmas condições Burgess et al. (1994) observaram que isolados de *F. solani* apresentaram o crescimento de 0,83 cm/dia, de *F. verticiloides* de 0,95 cm/dia e de *F. decemcellulare* 0,6 cm/dia.

Os isolados F2, F3, F13, F18, F27, F28, F39, F50 e F51, ou seja, 18,75% dos isolados apresentaram ápice de crescimento micelial nas temperaturas de 25 e 30°C, não diferindo entre elas. O crescimento destes isolados variou numa taxa de 0,6 a 0,8 cm/dia. Exceção apenas para o isolado F2 que chegou a uma taxa de crescimento de 1,2 cm/dia.

Apenas o isolado F49 apresentou ápice de crescimento micelial diário quando exposto na temperatura de 20, 25 e/ou 30°C. Este número representa 2,09% dos isolados.

Quando observamos a temperatura de incubação de 30°C, houve um ótimo de crescimento para 68,75% dos isolados estudados, são os isolados F2, F4, F5, F7, F9, F10, F11, F12, F14, F15, F17, F19, F20, F21, F22, F23, F25, F26, F29, F30, F31, F32, F33, F34, F35, F37, F41, F42, F43, F44, F46, F47, F48 e F52. O crescimento destes isolados variou numa taxa de 0,6 a 0,8 cm/dia. Exceção apenas para os isolados F32 e F48 que chegaram a uma taxa de crescimento de 1cm/dia.

Burgess et al. (1994) observaram o crescimento de diferentes espécies de *Fusarium* submetidos à 30°C, e para a espécie *F. solani*, obtiveram a taxa de

crescimento micelial diário de 1,03 cm. Para o *F. verticiloides* este crescimento foi de 0,95 cm/dia e para *F. decemcellulare* este índice ficou próximo à 0,55 cm/dia.

Para todos os isolados, as temperaturas de 15 e 35°C demonstraram ser limitantes à sua fisiologia, e que em muitos casos, seu crescimento foi crítico, como no caso do F1, que quando exposto à 35°C, teve seu crescimento reduzido à apenas 0,2 cm/dia. Esta taxa de crescimento foi observada também com os isolados F9, F10, F11, F21, F25, F26, F27, F32, F45 e F46. Os isolados F34, F39, F51 e F52 apresentaram uma taxa de crescimento micelial de apenas 0,1cm/dia quando submetidos a 35°C.

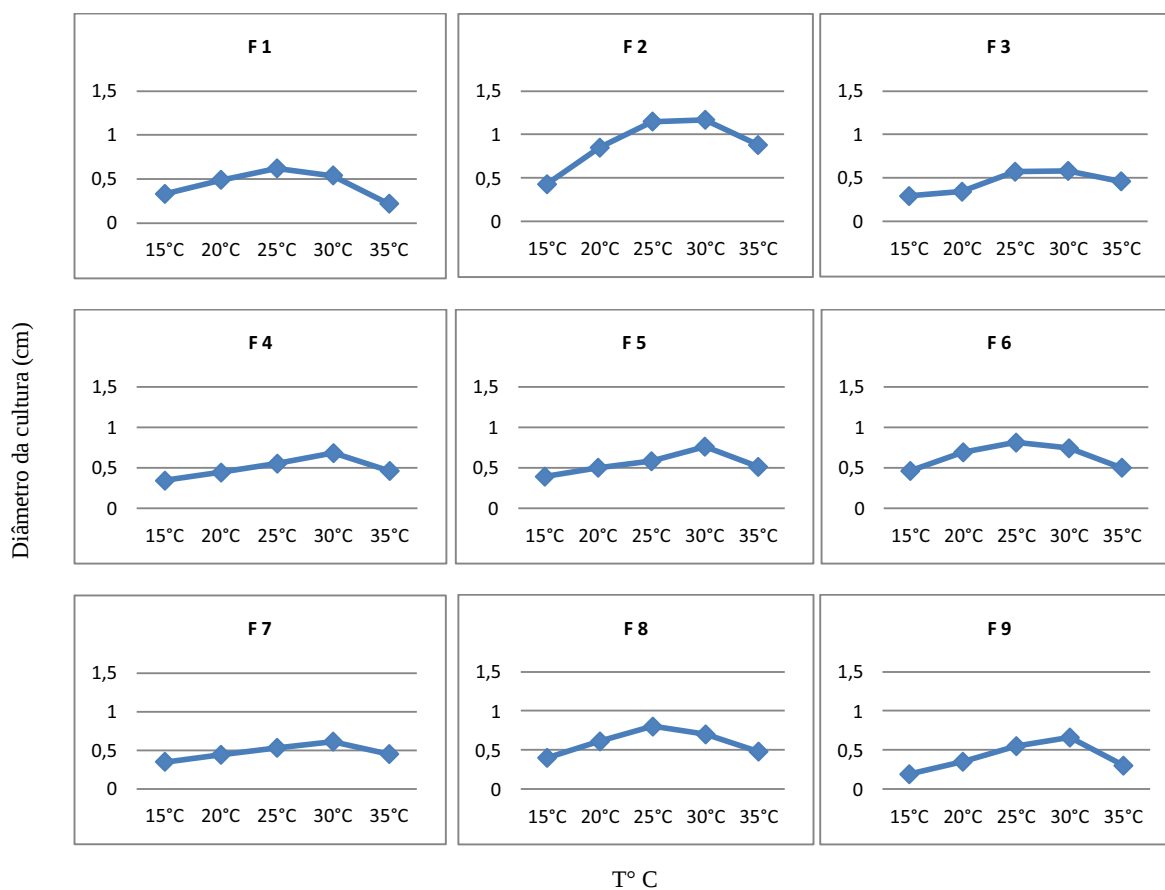


Figura 17: Média diária do crescimento micelial dos isolados de *Fusarium* spp. em diferentes temperaturas.

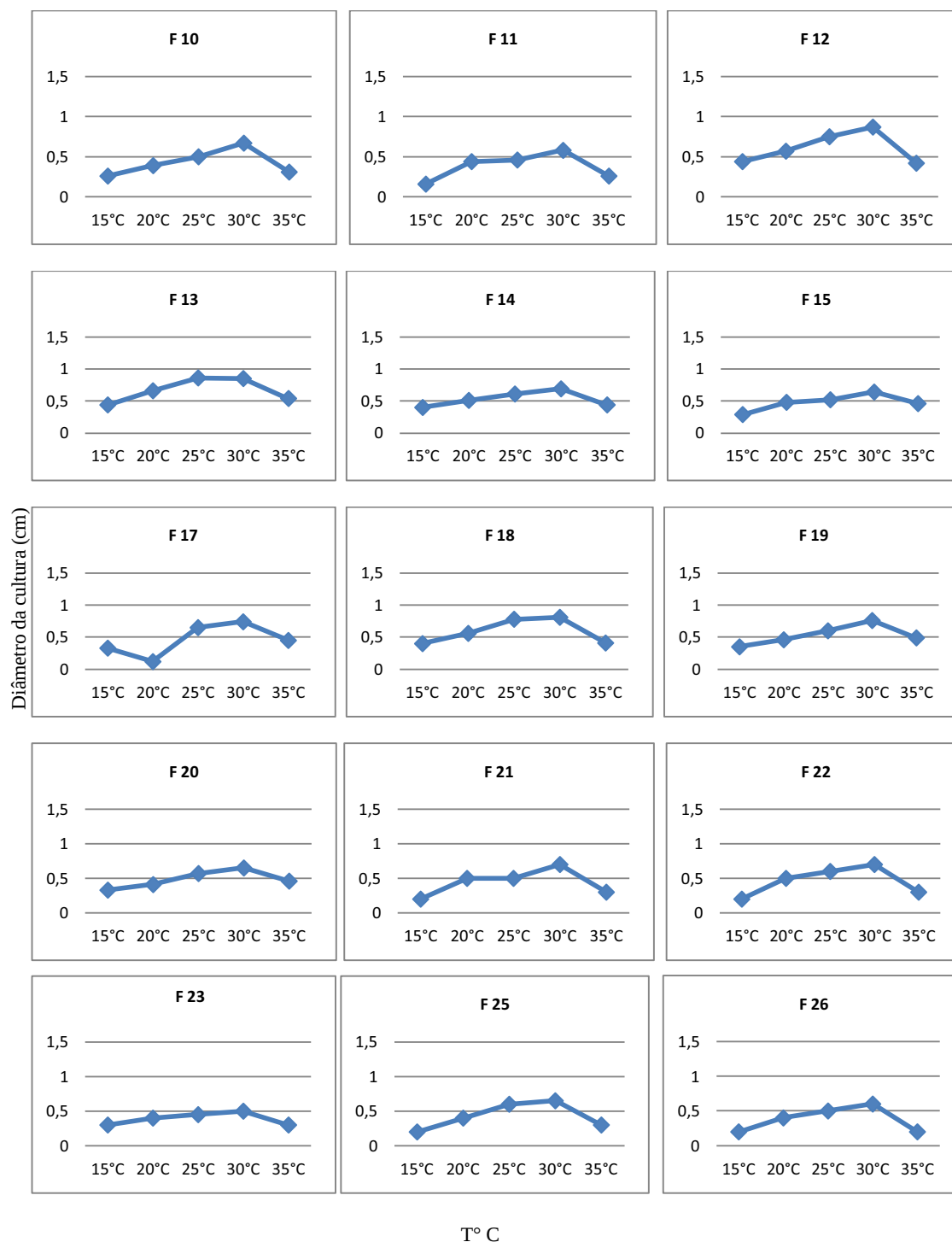


Figura 18: Média diária do crescimento micelial dos isolados de *Fusarium* spp. em diferentes temperaturas.

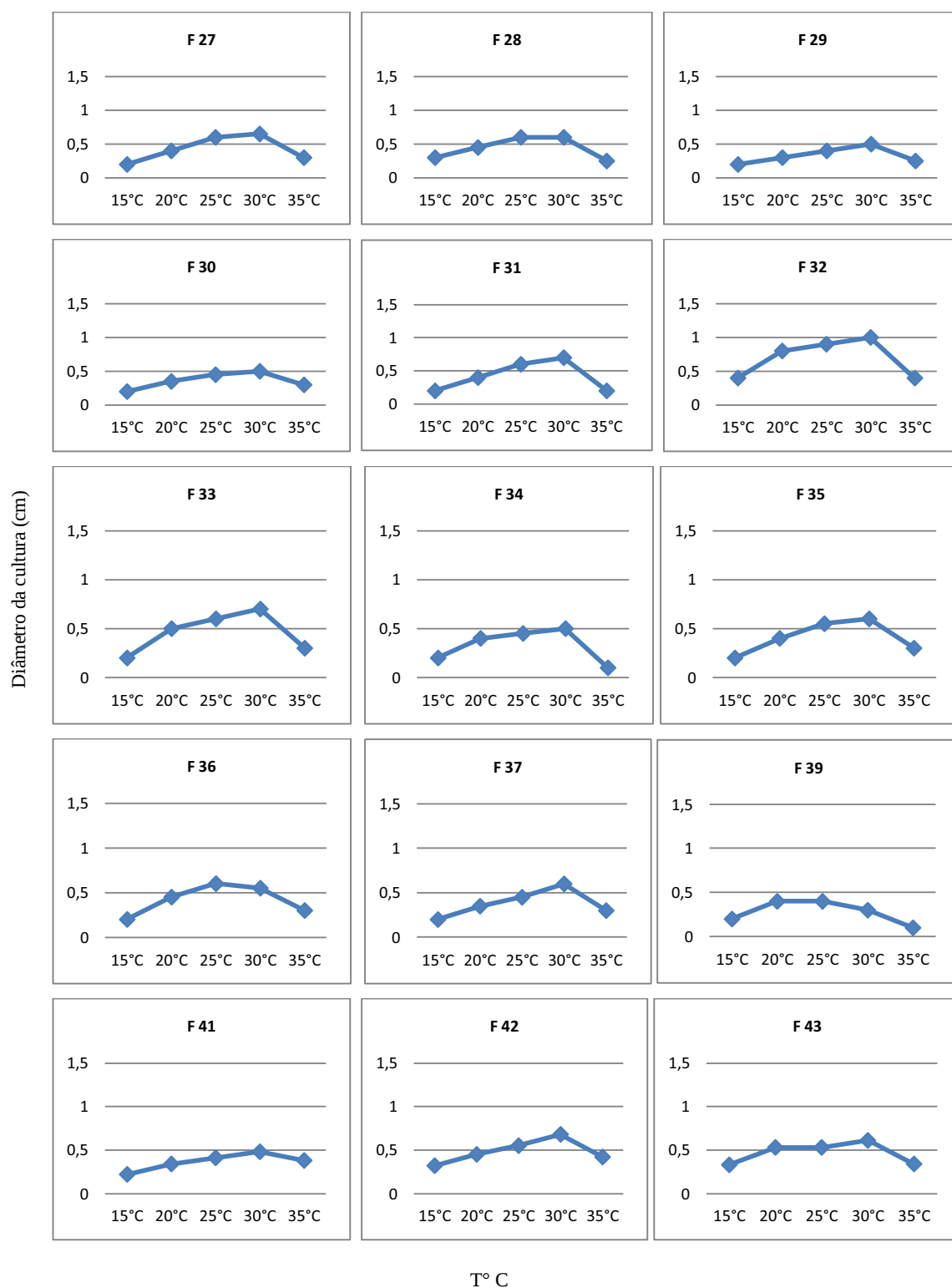


Figura 19: Média diária do crescimento micelial dos isolados de *Fusarium* spp. em diferentes temperaturas.

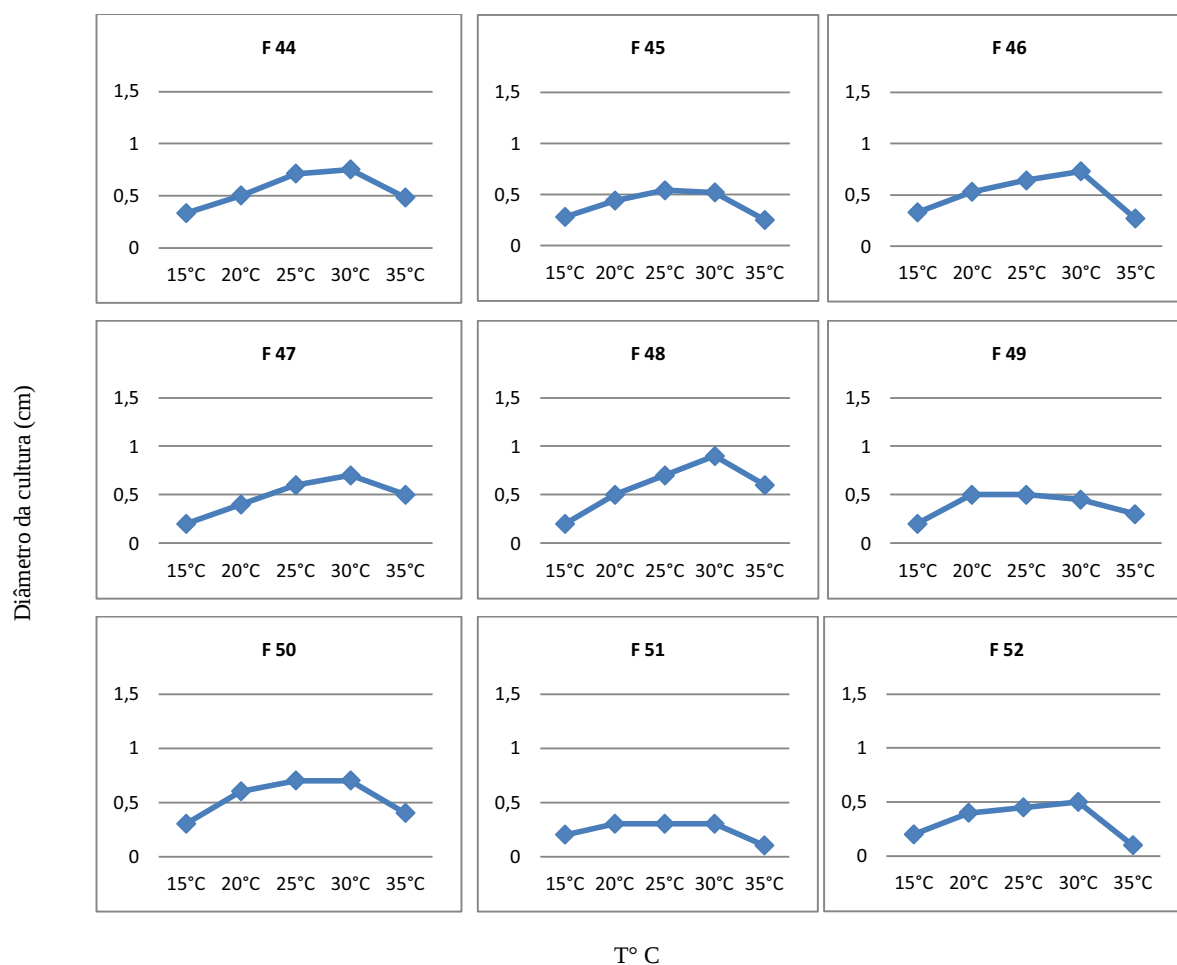


Figura 20: Média diária do crescimento micelial dos isolados de *Fusarium* spp. em diferentes temperaturas.

7.4. Teste de patogenicidade dos isolados de *Fusarium* spp.

Foram observados os sintomas no clone RRIM 600, após duas avaliações, sendo a primeira aos 70 e a segunda 120 dias após a inoculação. Na figura 20 estão visíveis as lesões tanto na casca externa quanto na interna em ambas as avaliações.



Figura 21 – A) Retirada da fita crepe e algodão 120 dias após a inoculação (d.a.i); B) Lesão observada na região da casca externa 120 d.a.i.; C) Contorno da região lesionada com papel contacto transparente e caneta porosa; D) Testemunha; E) Detalhes da área inoculada e da lesão 70 d.a.i.; e F) Lesão observada na região do lenho 120 d.a.i..

Houve diferença significativa no tamanho das lesões, independente da região da casca que foi observada. O tamanho da lesão produzida na casca externa foi diferente da produzida na casca interna, independente da época avaliada, para o clone RRIM 600, como podemos notar na Tabela 6.

Ao observar o tamanho da lesão da casca externa aos 70 d.a.i. notamos que o isolado F36 e F46 produziram as maiores lesões, com área de 3,83 e 3,43 cm², respectivamente (Figura 22). Ao avaliarmos a mesma região da casca com 120 d.a.i., observamos que o tamanho da maior lesão foi de 4,94 cm², proporcionado pelo isolado F35.

Não houve correlação entre as maiores lesões da primeira com a segunda avaliação (Figura 23).

Para as lesões de casca interna, a lesão com maior dimensão aos 70 d.a.i. foi de 16,66 cm², ocasionada pelo isolado F12. Ao avaliarmos aos 120 d.a.i., o isolado F12 novamente ocasionou a maior lesão com a área de 22,78 cm².

Souza (2008) avaliando a área de lesão em clones de eucalipto inoculado com *Chrysosporthe cubensis* obteve lesões com dimensões variando de 8,17 cm² até 14,30 cm² para a avaliação aos 60 d.a.i.

Pilotti et al. (2002) observaram que plantas de *Platanus acerifolia* inoculados com *Fusarium solani* desenvolveram cancrios elípticos que variaram de poucos centímetros até um metro. Estas lesões apresentavam a superfície interna necrótica.

Estas descrições corroboram com os resultados obtidos neste trabalho. O tempo de permanência no campo para as avaliações foi inferior ao descrito por Pilotti et al. (2002), que avaliaram os sintomas com vinte meses após a inoculação.

Na área em torno do ponto de inoculação formaram-se pequenas rachaduras, como pode ser observada na Figura 19B. Após a retirada da casca, os re-isolamentos foram realizados, confirmando a presença de *Fusarium* sp. Nos controles negativos, não foram re-isolados nenhuma espécie de fungo. Pilotti et al. (2002) conseguiram re-isolar *F. solani* das árvores de *Platanus acerifolia* inoculadas pelo método de sonda.

As plantas controle apresentaram lesões com a área variando de 1,77 e 1,74 cm² para a casca externa avaliada aos 70 e 120 d.a.i. respectivamente. Para as lesões de casca interna esta área foi de 3,04 e 3,80 cm² também para as avaliações aos 70 e 120 d.a.i. respectivamente. Pilotti et al. (2002) obtiveram lesões com comprimento que variou de 2,1 a 5,3 cm, para sua testemunha no ensaio com *Platanus acerifolia*.

Os isolados F9, F14, F18, F27, F28, F29, F30, F31, F32, F33, F34 e F55 não diferiram estatisticamente da testemunha para a avaliação da casca interna aos 70 d.a.i. Porém, quando avaliados aos 120 d.a.i. este panorama permanece somente para os isolados F9, F18, F27 e F55, levantando uma questão sobre o tempo de permanência das inoculações para a avaliação (Tabela 7).

Lesões maiores foram produzidas quando o inóculo foi colocado em contato com a região do lenho, excluindo-se as células superficiais da casca. Este fato pode ser explicado pela composição anatômica da área inoculada. A casca interna apresenta na sua constituição células parenquimáticas, ou seja, células vivas e com grandes reservas nutricionais (KLOCK et al., 2005).

A grande disponibilidade de nutrientes nesta região, aliada a grande concentração de vasos laticíferos, pode facilitar a colonização do *Fusarium* sp nesta área. Webster & Paardkooper (1989) observaram que os laticíferos ocorrem quase que exclusivamente na região do floema secundário do tronco. Escurecimento formando estrias enegrecidas longitudinais foram observadas no tecido inoculado, como pode ser observado na Figura 21 E.

Tabela 7. Área das lesões (cm²) de casca externa e casca interna produzidas no clone RRIM 600

Identificação	1ª Avaliação (70 d.a.i.)				2ª Avaliação (120 d.a.i.)			
	CE (cm ²)		CI (cm ²)		CE (cm ²)		CI (cm ²)	
F1	2,22	d	6,8	d	2,42	d	9,69	d
F2	2,12	d	7,54	c	2,56	d	15,21	c
F3	2,05	d	4,9	d	2,86	c	7,41	e
F4	2,15	d	6,3	d	2,52	d	9,8	d
F5	2,04	d	8,63	c	2,24	e	14,67	c
F6	2,05	d	4,65	d	3,04	c	8,91	e
F7	2,36	c	5,4	d	2,33	e	17,29	c
F8	1,81	d	5,53	d	3,13	c	9,65	d
F9	2,34	c	2,72	e	2,9	c	6,21	f
F10	2,44	c	7,07	d	2,65	d	11,84	d
F11	2,24	c	6,6	d	2,85	c	10,57	d
F12	2,1	d	16,66	a	2,33	e	22,78	a
F13	2,04	d	5,42	d	2,93	c	8,71	e
F14	2,41	c	4,48	e	3,53	b	15,25	c
F15	2,42	c	6,52	d	3,34	b	16,1	c
F16	2,19	d	6,14	d	2,92	c	12,11	d
F17	2,14	d	5,11	d	2,75	d	8,21	e
F18	2,15	d	4,1	e	3,03	c	7,1	f
F19	1,98	d	6,59	d	2,71	d	13,21	c

Continua...

Identificação	1ª Avaliação (70 d.a.i.)				2ª Avaliação (120 d.a.i.)			
	CE (cm²)		CI (cm²)		CE (cm²)		CI (cm²)	
F21	1,58	d	11,17	b	3,38	b	19,82	b
F22	2,53	c	5,84	d	2,67	d	16,51	c
F23	2,27	c	5,53	d	2,98	c	9,41	e
F25	2,35	c	6,53	d	2,79	d	13,97	c
F26	2,32	c	7,59	c	2,52	d	10,6	d
F27	2,11	d	3,07	e	2,36	e	6,21	f
F28	2,19	d	3,77	e	2,15	e	12,59	d
F29	2,65	c	2,66	e	3,52	b	12,4	d
F30	2,6	c	2,6	e	2,64	d	15,31	c
F31	2,12	d	2,12	e	2,19	e	16,42	c
F32	2,43	c	2,43	e	2,94	c	18,97	b
F33	2,49	c	2,49	e	2,02	e	14,26	c
F34	1,89	d	3,2	e	3,17	c	14,95	c
F35	2,36	c	5,18	d	4,95	a	8,54	e
F36	3,83	a	8,57	c	2,19	e	14,89	c
F37	1,87	d	7,82	c	2,11	e	18,91	b
F39	1,91	d	8,25	c	2,53	d	19,23	b
F40	1,96	d	11,64	b	2,49	d	16,42	c
F41	2,38	c	9,53	b	2,58	d	12,75	d
F42	2,14	d	8,25	c	2,27	e	12,35	d
F43	1,87	d	10,33	b	2,3	e	16,16	c
F44	2,01	d	5,46	d	2,7	d	8,77	e
F45	2,23	c	6,16	d	3,72	b	10,18	d
F46	3,43	a	10,2	b	3,16	c	14,36	c
F47	2,91	b	8,76	c	2,3	e	14,36	c
F48	2,27	c	6,52	d	3,11	c	9,13	e
F49	2,65	c	8,03	c	2,41	d	14,02	c
F50	2,03	d	8,51	c	2,39	e	11,99	d
F51	2,07	d	6,94	d	2,23	e	11,48	d
F52	2,09	d	6,81	d	3,05	c	9,21	e
F54	2,07	d	6,59	d	3,13	c	13,44	c
F55	2,26	c	2,97	e	3,33	b	5,73	f
F59	2,63	c	6,81	d	2,72	d	10,26	d
Testemunha	1,77	d	3,04	e	1,74	e	3,8	f
CV %	15,55		25,8		15,45		20,4	

Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem significativamente, segundo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade (Dados não transformados). CE (Casca Externa) e CI (Casca Interna).

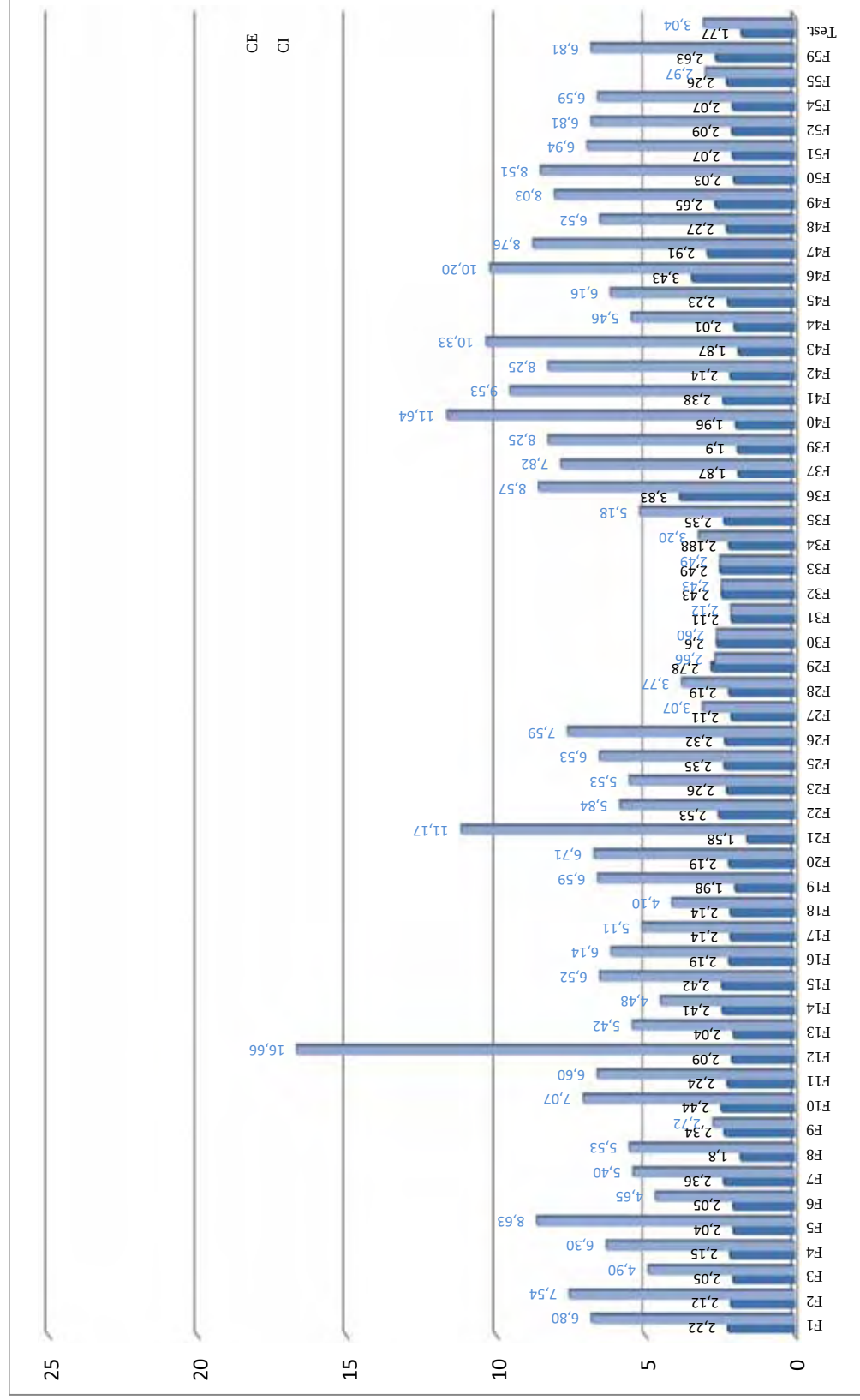


Figura 22: Área da lesão da casca externa (CE) e interna (CI) 70 dias após a inoculação de 54 isolados de *Fusarium* spp no clone RRIM 600 de seringueira. Botucatu, SP.

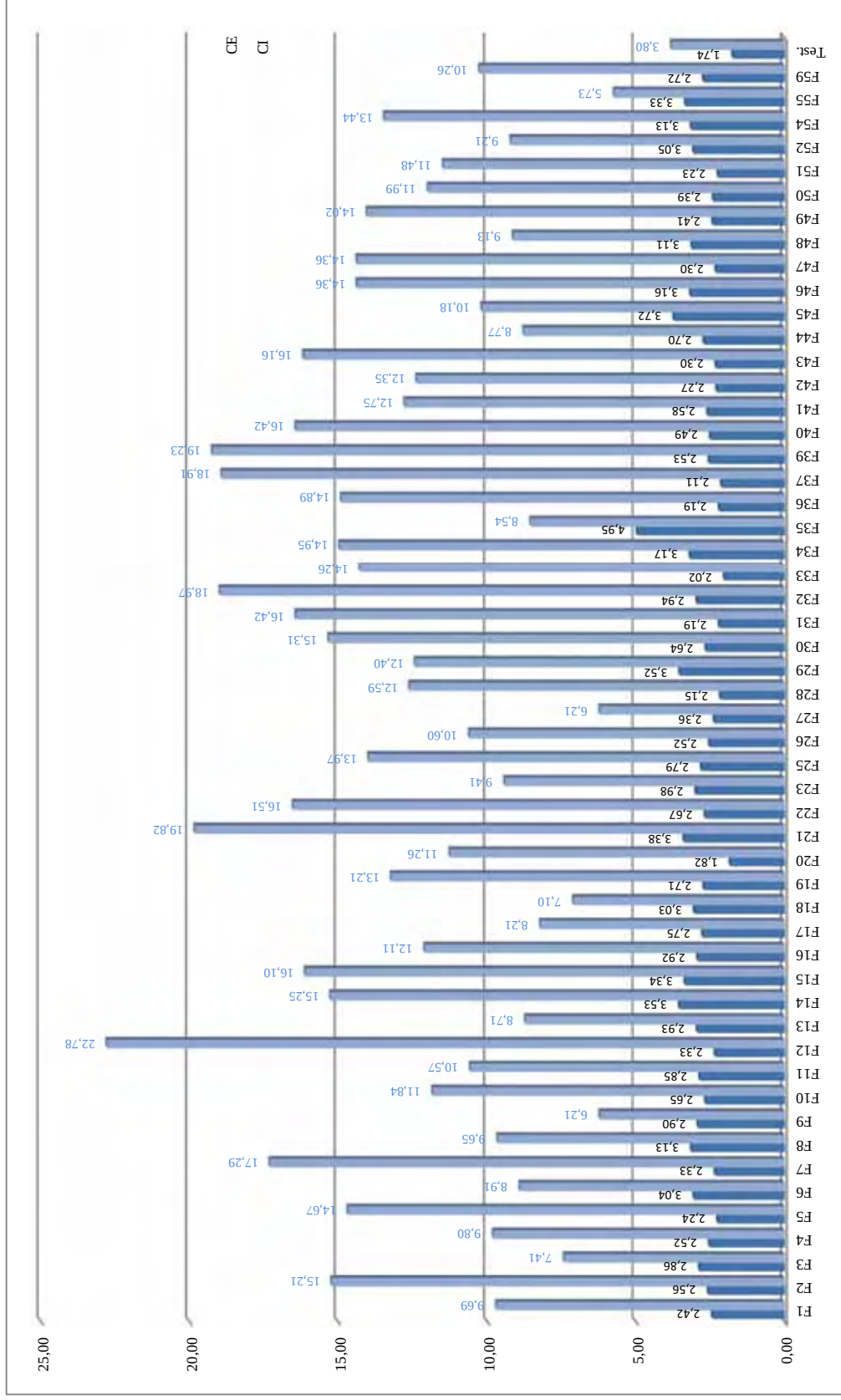


Figura 23: Área da lesão da casca externa (CE) e interna (CI) 120 dias após a inoculação de 54 isolados de *Fusarium* spp. no clone RRIM 600 de seringueira. Botucatu, SP.

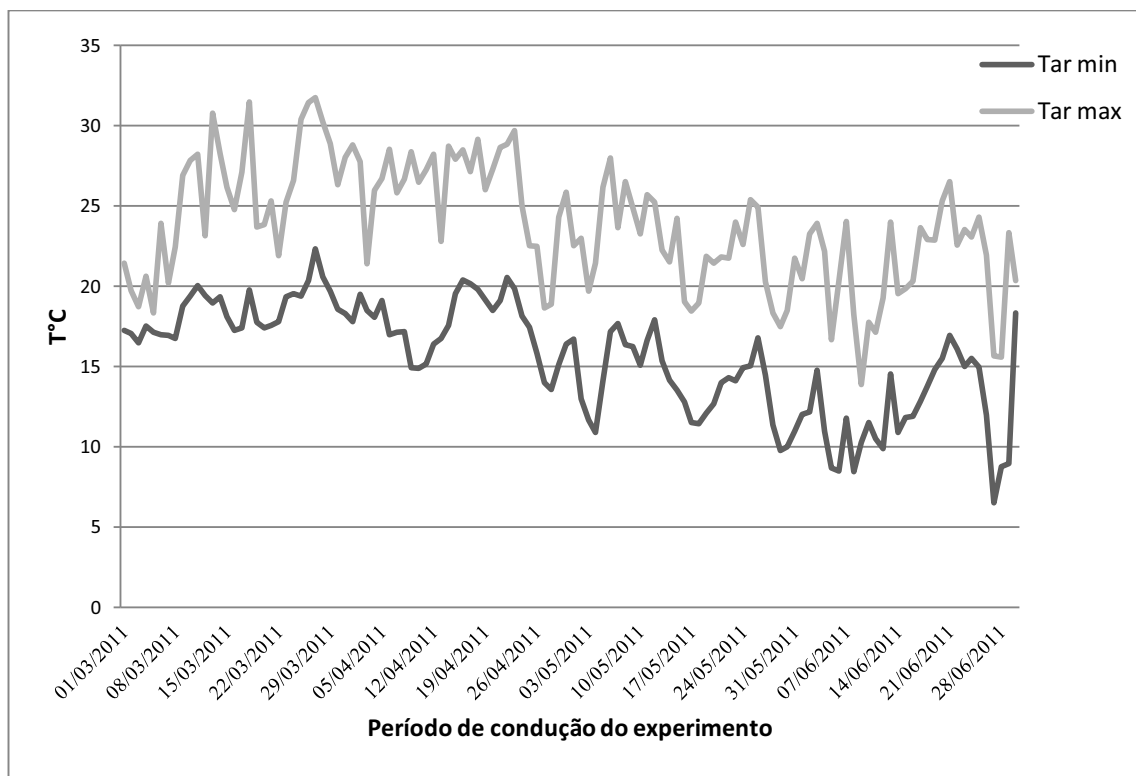


Figura 24: Variação da temperatura durante 120 dias da condução do experimento no jardim clonal de seringueira em Botucatu, SP. Tar min (Temperatura do ar mínima) e Tar Max (Temperatura do ar máxima).

A frequência e a intensidade da doença são significativamente influenciadas pelo grau de desvio de cada condição ambiental do ponto no qual o progresso da doença é máximo. A temperatura e a umidade na superfície da planta são os fatores ambientais que afetam mais intensamente o início e o progresso de doenças infecciosas em plantas. Os patógenos diferem em suas preferências por alta ou baixa temperatura, uma vez que a mesma afeta a germinação de esporos e o número de esporos formados (AGRIOS, 1997).

Baseado nesta prerrogativa, as condições ambientais observadas em Botucatu – SP foram favoráveis ao desenvolvimento da doença. A temperatura diária mínima variou de 6,51 a 20,56°C, sendo que a mínima permaneceu acima de 20°C durante 7 dias. A temperatura máxima variou de 15,57 a 31,74°C. Durante 46 dias a temperatura máxima permaneceu acima de 25°C (Figura 24).

Possivelmente, além de influenciar no metabolismo da seringueira, a temperatura pode ter afetado o metabolismo do patógeno e a cinética das enzimas envolvidas no processo de infecção, que aumentou ou reduziu de atividade conforme as condições ambientais predominantes, afetando o desenvolvimento da doença.

Como as temperaturas permaneceram acima de 25°C durante 39% do tempo do experimento em campo, e apenas quatro dias a temperatura mínima ficou abaixo dos 10°C, podemos afirmar que este fato proporcionou condições ideais de temperatura para a colonização do hospedeiro pelos isolados de *Fusarium* spp.

Oliveira (2007) estudando a influência da temperatura na colonização de frutos de meloeiro por *Fusarium* spp., constatou o não desenvolvimento de sintomas na temperatura de 10°C.

Krugner e Auer (2005) observando o cancro do eucalipto, afirmaram que este é epidemiologicamente importante em regiões onde a temperatura média, na maioria dos meses do ano, é superior a 23°C, e a precipitação média anual de 1200 mm.

Por se tratar de uma enfermidade que também atinge a região cambial, de uma espécie de folhosa, e estarem em região tropical, podemos sugerir que estas condições ambientais podem afetar diretamente o progresso da colonização do *Fusarium* spp. na seringueira.

Mudanças ambientais, além de influenciarem diretamente o desenvolvimento do patógeno, podem comprometer a fisiologia do hospedeiro. As consequências vão desde a inviabilização da produção, simplesmente por não permitir, por exemplo, a produção de látex, até o aumento da incidência de doenças, pelo fato de os hospedeiros se encontrarem debilitados e, portanto, com maior predisposição ao ataque de patógenos (FURTADO, 2008).

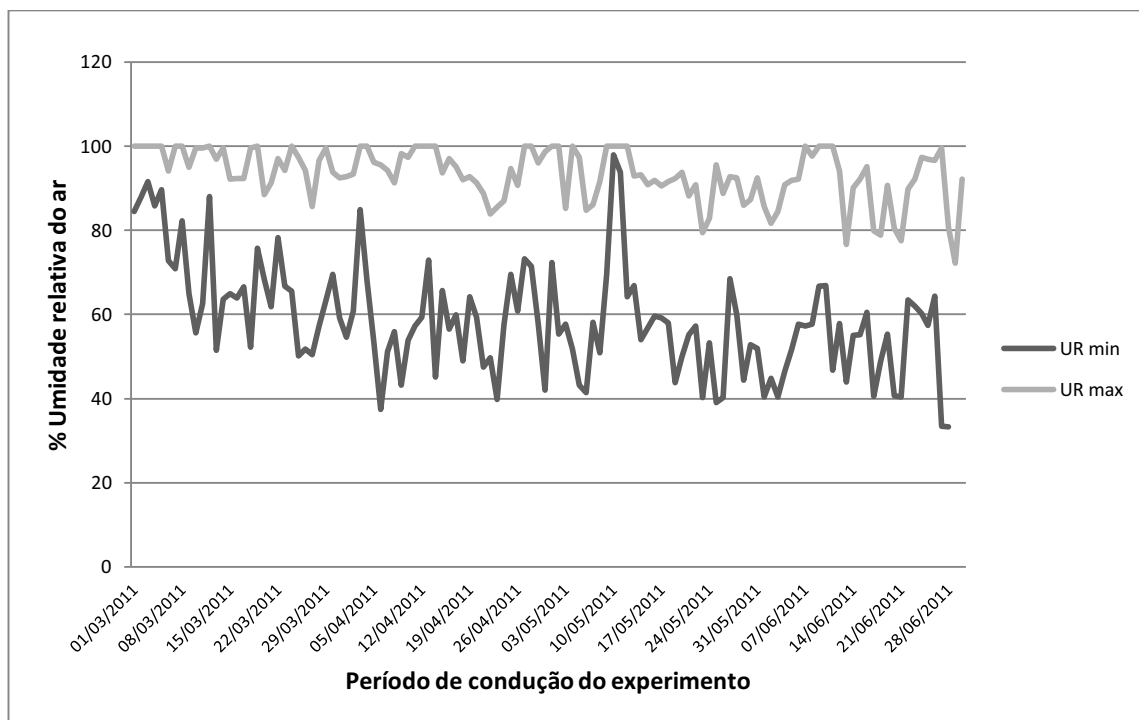


Figura 25: Variação da umidade relativa do ar durante 120 dias da condução do experimento no jardim clonal de seringueira em Botucatu, SP. UR min (Umidade relativa mínima) e UR Max (Umidade Relativa máxima).

A umidade, por sua vez, é indispensável para a germinação da maioria dos esporos fúngicos e para a penetração do tubo germinativo no hospedeiro, além de aumentar a suscetibilidade do hospedeiro a certos patógenos, afetando a incidência e a severidade da doença (AGRIOS, 1997).

A umidade relativa máxima permaneceu acima dos 85% em 110 dias do experimento, proporcionando condições ambientais favoráveis ao desenvolvimento da doença. Não houve teor crítico de umidade relativa do ar em nenhum momento, sendo que o valor mínimo de umidade observada no experimento foi de 33,38%, apenas nos últimos dias (Figura 24).

Estudos de previsões de alterações nos padrões de umidade relativa, temperatura e precipitação sugerem que haverá um aumento na incidência e severidade de fusariose nas várias regiões agrícolas do estado de São Paulo. No modelo climático atual, a

fusariose já está presente nas regiões agrícolas de Araçatuba, Bauru, Campinas, Marília, Presidente Prudente, Ribeirão Preto, São José do Rio Preto e Barretos. Esta será uma das quatro maiores enfermidades tanto em incidência quanto em severidade nos estado para um modelo climático para o ano de 2020. Sendo proposto um clímax de incidência/severidade nos modelos climáticos propostos para os anos de 2050 – 2080 (FURTADO, 2008).

7.5. Teste de resistência clonal aos isolados de *Fusarium* spp.

7.5.1. Avaliação do tamanho da área lesionada em cada clone pelos diferentes isolados de *Fusarium* spp.

Foram testados 27 isolados de *Fusarium* spp., todos provenientes do estado de São Paulo em três diferentes clones, RRIM 600, GT 1 e PR 255. Foram realizadas duas avaliações, sendo a primeira aos 70 e a segunda aos 120 dias após a inoculação.

Em todos os casos foi possível notar que houve um crescente aumento na área lesionada ao longo do tempo. Houve diferença quando observamos as lesões da casca externa e da casca interna, tanto com relação ao tamanho, como em relação à resposta do isolado no clone.

Ao observar a interação clone x isolado, há diferenças no comportamento de cada um deles.

Na avaliação da casca externa, o clone RRIM 600 foi o mais afetado, independente do isolado inoculado. Aos 70 d.a.i. ele apresentou uma área média lesionada com 2,19 cm² e aos 120 d.a.i. sua área média lesionada foi de 2,74 cm². O clone GT 1 e PR 255 não apresentaram diferenças estatísticas entre si, tanto na primeira avaliação (70 d.a.i.) com áreas médias de lesão de 1,7 e 1,74 cm², quanto na segunda avaliação aos 120 d.a.i. com áreas média de lesões de 2,23 e 2,27cm², respectivamente (Figura 26).

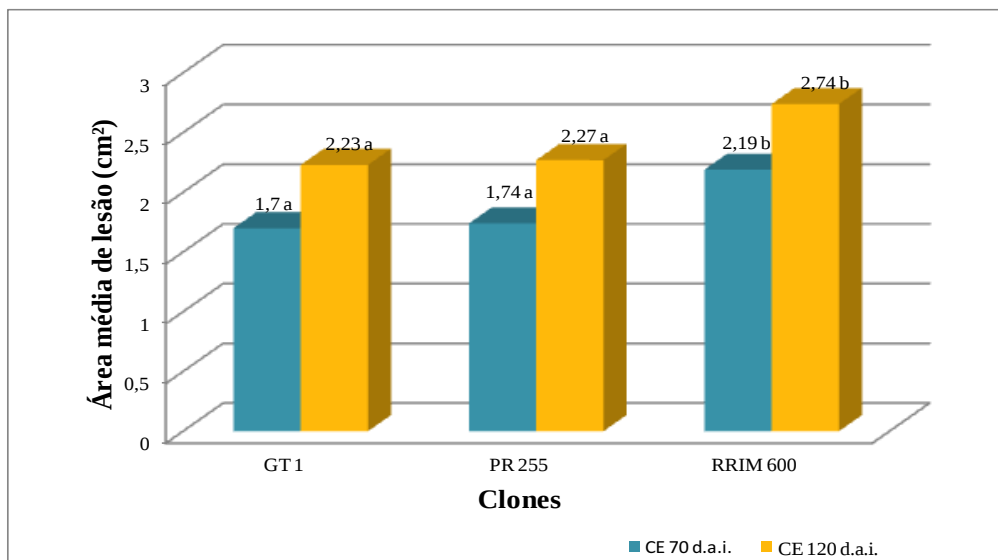


Figura 26: Área média das lesões (cm²) na casca externa do caule nos clones de seringueira GT1, PR 255 e RRIM 600 quando inoculados com os 27 isolados de *Fusarium* spp. Botucatu, SP.

(As análises estatísticas Teste de Tukey *Valores seguidos da mesma letra minúscula na vertical não diferem entre si pelo intervalo de confiança (0,05)); (Coeficiente de variação CE 70 d.a.i.: 7,71%; Coeficiente de variação da CE 120 d.a.i.: 25,77%).

Para as áreas avaliadas na casca interna do caule de seringueira inoculado com os 27 isolados de *Fusarium* spp, houve uma alteração no padrão das áreas médias produzidas. Neste caso, o clone RRIM 600 foi o menos afetado. A área média produzida na primeira avaliação (70 d.a.i.) foi de 6,79 cm², enquanto que na segunda a área média para o mesmo clone foi de 11,73 cm² (Figura 26).

O clone GT1 foi o que apresentou o pior desempenho nesta região do lenho. A área produzida aos 70 d.a.i. foi de 7,55 cm², enquanto que na segunda avaliação (120 d.a.i.), esta área praticamente dobra de valor, ou seja, chegou a marca de 14,56 cm² (Figura 26).

Com um desempenho intermediário, o clone PR 255 apresentou uma área média de lesão de 6,82 cm² aos 70 d.a.i., quando avaliado aos 120 d.a.i., esta área média dobrou de valor, chegando à 13,00 cm² (Figura 27).

É possível observar nesta situação que o *Fusarium* spp. coloniza com maior velocidade o clone GT1, que passa de lesões menos desenvolvidas aos 70 d.a.i. para o

mais lesionado aos 120 d.a.i.. A situação inversa ocorre com o clone RRIM 600, que passa de mais lesionado na primeira avaliação para o menos lesionado na segunda avaliação. Com relação ao clone PR 255, apenas houve um aumento no tamanho da lesão com o passar do tempo, mas sua situação permaneceu intermediária.

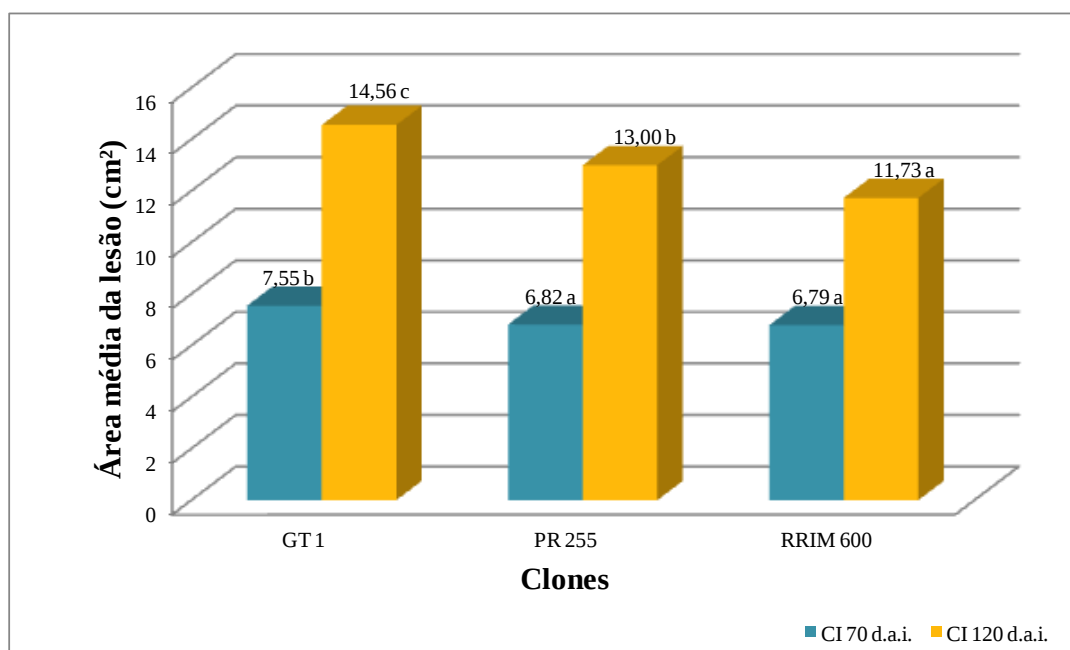


Figura 27: Área média das lesões (cm²) na casca interna do caule nos clones de seringueira GT1, PR 255 e RRIM 600 quando inoculados com os 27 isolados de *Fusarium* spp. Botucatu, SP.

(Teste de Tukey; *Valores seguidos da mesma letra maiúscula na vertical não diferem entre si pelo intervalo de confiança (0,05). (Coeficiente de variação CI 70 d.a.i.: 27,71%; Coeficiente de variação da CI 120 d.a.i.: 25,67%).

Quando observamos o comportamento individual dos isolados, independente do clone inoculado, temos padrões de lesões mais agressivos na inoculação da casca interna, tanto aos 70 d.a.i., quanto aos 120 d.a.i. (Figuras 28 e 29).

Para a casca externa na primeira avaliação, aos 70 d.a.i., os isolados F12, F15 e F41 foram os mais agressivos, produzindo áreas de lesões com 2,19 cm², 2,26 cm² e 2,09 cm², respectivamente. A testemunha na mesma avaliação apresentou uma área de apenas 1,57 cm².

Quando submetidos à segunda avaliação de casca externa, agora com 120 d.a.i., os isolados F6, F12, F15, F16 e F46 foram os mais agressivos. Eles produziram área média de lesões com 2,71, 2,84, 3,17, 2,74 e 2,69 cm², respectivamente. A testemunha na mesma avaliação produziu uma área de apenas 1,66cm².

Para a casca interna, aos 70 d.a.i. os isolados F3, F12, F16 e F41 foram os mais agressivos. O isolado F3 produziu uma área média de lesão com 9,12cm². O isolado F12 ficou com 11,25cm², nesta situação a maior área lesionada. O isolado F16 e o F41 produziram 9,55 e 8,72 cm², respectivamente. A testemunha neste caso ficou com uma área de 2,46 cm².

Os padrões de lesões foram muito maiores com o passar do tempo. Podemos ver claramente o salto nas dimensões das lesões de casca interna, quando esta foi avaliada aos 120 d.a.i. Nesta situação, os isolados F14, F15, F16, F17 e F19, não diferiram estatisticamente entre si no tamanho das lesões produzidas.

Eles produziram as seguintes médias de lesões: F14 (17,3cm²), F15 (16,25cm²), F16 (20,36 cm²), F17 (16,22 cm²) e F19 (16,92cm²). Nesta mesma situação a testemunha produziu uma área de 2,92 cm².

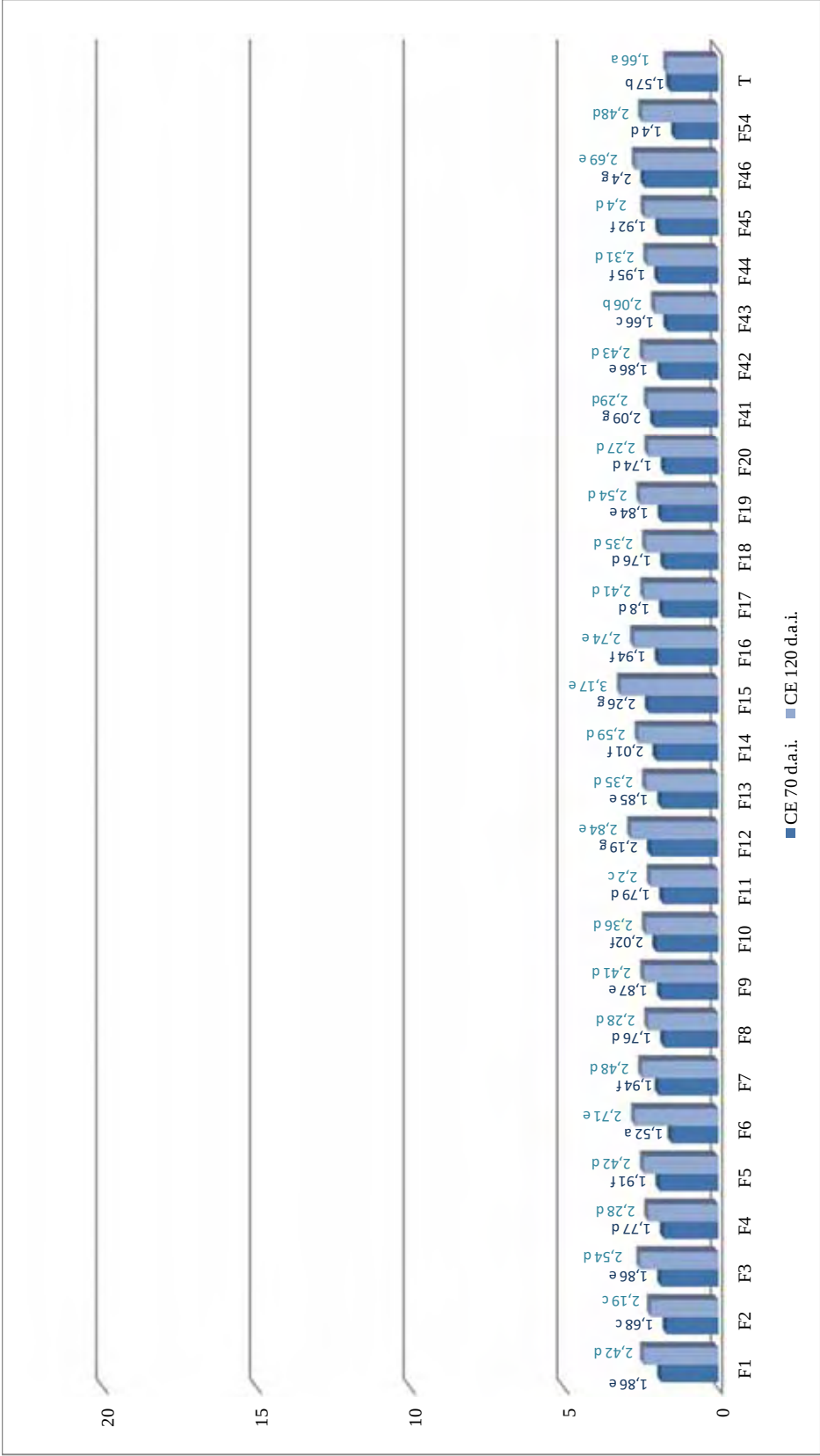


Figura 28: Área média da lesão (cm²) no caule de seringueira que cada isolado de *Fusarium* spp. produziu na casca externa em duas avaliações aos 70 dias após a inoculação (70 d.a.i.) e 120 dias após a inoculação (120 d.a.i.). Letras iguais não diferem entre si Teste de Tukey 5% de probabilidade. Botucatu, SP.

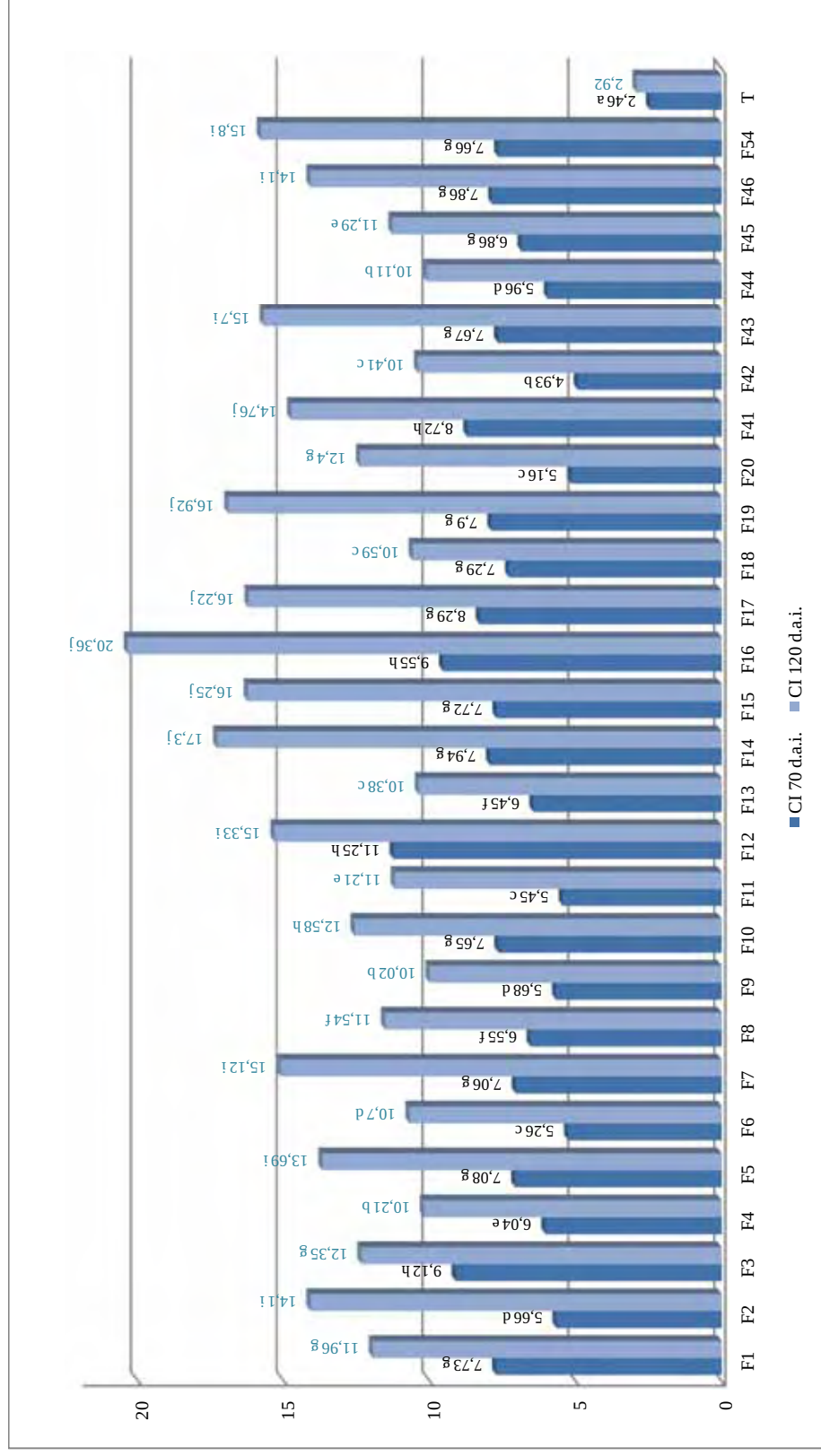


Figura 29: Área média da lesão (cm²) no caule de seringueira que cada isolado de *Fusarium* spp. produziu na casca externa em duas avaliações aos 70 dias após a inoculação (70 d.a.i.) e 120 dias após a inoculação (120 d.a.i.). Letras iguais não diferem entre si Teste de Tukey 5% de probabilidade. Botucatu, SP.

7.5.2. Estimativa dos parâmetros genéticos quantitativos

Os resultados referentes aos parâmetros genéticos para resistência à fusariose para clones de seringueira estão descritos na Tabela 8.

Com base nos coeficientes estimados nos ensaios realizados no campo, Pimentel - Gomes (1985) classificou-os como baixos, quando inferiores a 10 %; médios, quando de 10 a 20; altos, quando de 20 a 30 e muitos altos, quando superiores a 30%.

O coeficiente de variação experimental (CV_{exp}) para suscetibilidade a fusariose, com dados não transformados, apresentou valores de 15,05% e 26,36%, para a casca externa (CE) nas inoculações aos 70 e 120 d.a.i., respectivamente. Para a casca interna (CI), estes valores ficaram em 16,97% e 25,39%, respectivamente para as avaliações aos 70 e 120 d.a.i.. Estes valores são considerados de alta magnitude, segundo proposto por Pimentel-Gomes (1985).

Contudo, essa classificação é muito abrangente e não leva em consideração as particularidades da cultura estudada, e principalmente, não faz distinção quanto a natureza do caráter avaliado (Garcia, 1989; Scapim et al., 1995; Costa et al., 2002). Além disso, essa classificação pode variar das condições edafoclimáticas ou ciclo reprodutivo da cultura (Scapim et al., 1995). Num programa de melhoramento genético, a classificação de Coeficiente de Variação pode ser útil, por exemplo, para informar a variação que o clone obteve quanto ao tamanho da lesão de *Fusarium* em clones de seringueira.

As estimativas da herdabilidade individual para a CE foram no sentido restrito 0,549 e 0,666 e herdabilidade média de clones foram 0,93 e 0,95, respectivamente para os testes avaliados aos 70 e 120 d.a.i.. As estimativas da herdabilidade individual para a CI no sentido restrito foram de 0,532 e 0,604 e herdabilidade média de clones foram de 0,92 e 0,94, respectivamente para os testes avaliados aos 70 e 120 d.a.i.. Segundo proposto por Resende et al. (1995), estas foram de magnitude alta, mostrando haver pouca influência do meio na característica avaliada.

A herdabilidade corresponde à proporção da variabilidade total, que é de natureza genética, ou à fração do diferencial de seleção, retida na descendência. Sendo o quociente entre as variâncias genóticas e fenotípicas, por meio dela pode-se medir a eficiência esperada da seleção, no aproveitamento da variabilidade genética. O coeficiente de herdabilidade pode ser no sentido restrito e amplo, este expressa a proporção de variância genética em relação à variância fenotípica total observada, utilizado no melhoramento florestal, quando se está testando material propagado vegetativamente. A herdabilidade no sentido restrito tem a finalidade de orientar o geneticista sobre a quantidade relativa da variância genética que é utilizada no melhoramento. As estimativas de herdabilidade referente aos efeitos de parcela em relação as herdabilidades entre e dentro de famílias, adquirem uma importância maior quando se aumenta o número de indivíduos por parcelas nos testes de clones (ALARD, 1971; FONCECA, 1979; VENCovsky, 1969; RESENDE e FERNANDES, 1999; RESENDE e HIGA, 1993).

De modo geral, as estimativas do coeficiente de variação genética individual (CV_{gi}) para resistência a fusariose, variou de 16,61% e 37,26% para as avaliações aos 70 e 120 d.a.i. na casca externa. Os valores de CV_{gi} foram de 18,12% e 31,41% para as avaliações de 70 e 120 d.a.i. na casca interna. Os valores altos no CV_{gi} mostram potencialidades para a seleção em programas de melhoramento, como por exemplo os obtidos nas avaliações aos 120 d.a.i..

Souza (2008) obteve coeficientes de variação para a área da lesão em *Eucaliptus* causada por *Chrysosporthe cubensis* de 59,06 % na fazenda Baronesa (município de Jacareí -SP) e para a São Joaquim II (município de Jacareí -SP) foi de 44,02 %. O menor coeficiente de variação encontrado foi de 28,22 % para a fazenda São Joaquim I (também no município de Jacareí -SP), indicando que existe uma menor variação das progênes quanto à área da lesão.

A seleção com base em valores genéticos proporciona vantagens práticas que vão desde a concepção dos experimentos até a seleção propriamente dita, pois possibilita selecionar clones pertencentes a várias procedências (populações) (RESENDE e HIGA, 1994).

Em relação aos coeficientes de variação relativa (CV_r), maior os valores encontrados foram de alta magnitude, independente da época ou região de avaliação da área da lesão. De acordo com Vencovsky e Barriga (1992), quanto maior o valor CV_r , o controle dos caracteres, sendo pouco influenciado por fatores ambientais.

As acurácias ($\hat{r}_{aa}$) obtidas nos experimentos foram altas, para todos os testes. Segundo Resende (1995), quanto maior a acurácia, maior a precisão da seleção e, conseqüentemente, maior o ganho genético.

Tabela 8. Estimativas dos parâmetros genéticos de resistência à fusariose nos clones de seringueira RRIM 600, GT1 e PR 255

Parâmetros genéticos	Caracteres analisados aos 70 d.a.i.		Caracteres analisados aos 120 d.a.i.	
	Casca Externa (cm ²)	Casca Interna (cm ²)	Casca Externa (cm ²)	Casca Interna (cm ²)
$\hat{\sigma}_a^2$	0,09	0,19	6,91	16,83
$\hat{\sigma}_c^2$	0,07	0,16	3,46	11,01
$\hat{\sigma}_f^2$	0,17	0,36	10,37	27,84
$\hat{h}^2$	0,549 +- 0,100	0,532 +- 0,099	0,666 +- 0,110	0,604+- 0,105
$\hat{h}_m^2$	0,858	0,850	0,908	0,884
$\hat{r}_{aa}$	0,93	0,92	0,95	0,94
$CV_{gi}\%$	16,61	18,12	37,26	31,41
$CV_{exp}\%$	15,05	16,97	26,36	25,39
CV_r	1,10	1,07	1,41	1,24
Médias	1,88	2,42	7,06	13,06

$\hat{\sigma}_a^2$: variância genética entre clones; $\hat{\sigma}_c^2$: variância ambiental entre parcelas $\hat{\sigma}_f^2$: variância fenotípica individual; $\hat{h}^2$ = herdabilidade individual no sentido restrito; $\hat{h}_m^2$ = herdabilidade entre médias de clones; $\hat{r}_{aa}$ = acurácia seletiva; $CV_{gi}\%$ = coeficiente de variação genética aditiva individual; $CV_{exp}\%$ = coeficiente de variação experimental; $CV_r = CV_p/CV_{exp}$ = coeficiente de variação relativa.

As análises de variância revelaram valores significativos a 1% de probabilidade pelo teste *F* para o efeito de resistência a fusariose entre os clones RRIM 600, PR 255 e GT 1 utilizados no teste, independente da área lesionada produzida e época de avaliação (Tabelas 9, 10, 11 e 12). Essas diferenças demonstram que existe uma alta variabilidade genética para o caráter em estudo, sendo uma população potencial para ganhos por seleção.

Tabela 9. Análise de variância para resistência a fusariose (*Fusarium* spp.) de clones de seringueira – Avaliação da Casca Externa aos 70 d.a.i..

FV	GL	SQ	QM	F
Ef. Fixo	4	1,58	0,40	4,95*
Clone	86	48,63	0,57	7,09**
Resíduo	344	27,44	0,08	-

** Significativo a 1% de probabilidade ;

* Significativo a 5% de probabilidade (RESENDE, 2007).

Tabela 10. Análise de variância para resistência a fusariose (*Fusarium* spp.) de clones de seringueira – Avaliação da Casca Externa aos 120 d.a.i..

FV	GL	SQ	QM	F
Ef. Fixo	4	20,9439	5,23	1,51*
Clone	86	3270,1	38,02	10,98**
Resíduo	344	1190,7	3,46	-

**Significativo a 1% de probabilidade ;

* Significativo a 5% de probabilidade (RESENDE, 2007).

Tabela 11. Análise de variância para resistência a fusariose (*Fusarium* spp.) de clones de seringueira – Avaliação da Casca Interna aos 70 d.a.i..

FV	GL	SQ	QM	F
Ef. Fixo	4	1,46	0,36	2,18*
Clone	86	97,08	1,12	6,70**
Resíduo	344	57,92	0,16	-

**Significativo a 1% de probabilidade ;

* Significativo a 5% de probabilidade (RESENDE, 2007).

Tabela 12. Análise de variância para resistência a fusariose (*Fusarium* spp.) de clones de seringueira – Avaliação da Casca Interna aos 120 d.a.i..

FV	GL	SQ	QM	F
Ef. Fixo	4	134,39	33,59	3,05*
Clone	86	8187,7	95,2	8,64**
Resíduo	344	3786,51	11	-

**Significativo a 1% de probabilidade ;

* Significativo a 5% de probabilidade (RESENDE, 2007).

7.6. Efeito de fungicidas no controle *in vitro* de *Fusarium* spp., agente etiológico da fusariose da seringueira.

Todos os isolados tiveram como ponto de partida 0,7cm referente ao disco de micélio depositado.

Para o isolado F7, em relação às médias os melhores fungicidas foram 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8 (com o melhor controle para este isolado). A partir da dose de 1 µg i.a/mL houve diminuição no crescimento micelial deste isolado. A dose que apresentou a melhor redução no crescimento micelial foi a de 1000 µg i.a/mL. Nenhum dos fungicidas testados atingiu 100% de controle de crescimento micelial para este isolado (Tabela 13) e (Figura 30), durante o período de avaliação do teste (9 dias).

Tabela 13. Crescimento micelial (cm) do isolado F7 de *Fusarium* sp. sob 14 fungicidas em cinco concentrações.

Isolado F7 Fungicidas	Doses ($\mu\text{g i.a/mL}$)					Média
	0	1	10	100	1000	
1 (Clorotalonil + Tiofanato metílico)	6,02 aA	2,88 eA	2,83 cA	2,50defA	2,51cdA	2,67 d
2 (Tebuconazole)	6,02 aA	2,68 eA	2,57 cA	2,54defA	2,50cdA	2,57 d
3 (Captana)	6,02 aA	2,55 eA	2,63 cA	2,45efA	2,45cdA	2,52 d
4 (Mancozeb)	6,02 aA	2,34 eA	2,68 cA	2,32efA	2,17dA	2,38 d
5 (Propiconazol)	6,02 aA	3,05 deA	2,48 cAB	1,87fgB	2,78cdA	2,54 d
6 (Epoconazol+Piraclostrobina)	6,02 aA	3,02 eA	2,65 cAB	2,51defAB	2,24dB	2,60 d
7 (Azoxistrobina + Ciproconazol)	6,02 aA	2,55 eA	2,57cA	2,52 defA	2,52cdA	2,54 d
8 (Fludioxonil +Metalaxil - M)	6,02 aA	4,51 cA	2,29 cB	1,34 gC	1,12eC	2,31 d
9 (Iprodiona)	6,02 aA	4,64 cA	4,51 bA	2,76 cdefB	3,27bcB	3,79 b
10 (Azoxistrobina +Difenoconazol)	6,02 aA	4,34 cA	4,62 bA	3,39bcdB	2,79cdB	3,78 b
11 (Carbedazin)	6,02 aA	5,75 abA	4,39 bB	3,41 bcdC	2,88dC	4,10 b
12 (Procimidona)	6,02 aA	4,09 cAB	4,66 bA	4,09 bAB	3,91 dB	4,19 b
13 (Trifloxistrobina + Tebuconazol)	6,02 aA	3,97 cdA	3,82 bA	2,93cdeB	2,32 dB	3,26 c
14 (Flutriafol)	6,02 aA	4,86 bcA	4,30 bA	3,59bcB	2,15dC	3,72 b
Média	6,02 a	3,82 a	3,53 b	2,95 c	2,77 c	
CV%	10,04					

*Valores seguidos da mesma letra maiúscula na vertical não diferem entre si pelo intervalo de confiança (0,05)

**Valores seguidos da mesma letra minúscula na horizontal não diferem entre si pelo intervalo de confiança (0,05)

Teste Tukey a nível de 5% de probabilidade

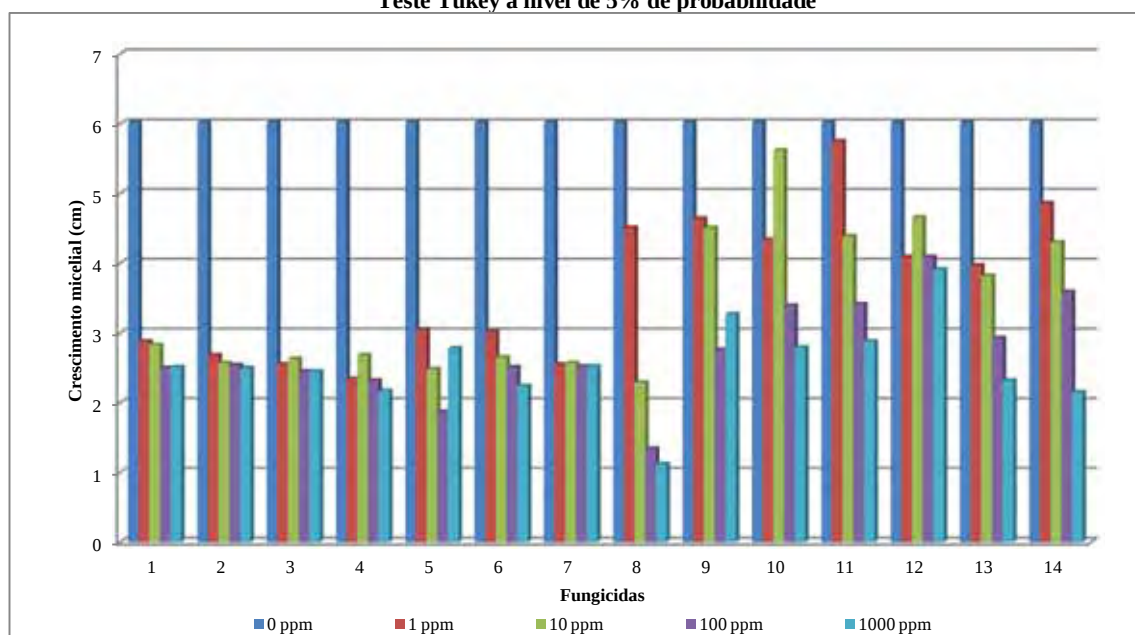


Figura 30: Inibição do crescimento micelial do isolado F7 de *Fusarium* sp. sob 14 fungicidas em cinco concentrações.

(Produtos testados: 1-clorotalonil+tiofanato metílico; 2- tebuconazole; 3- captana; 4- mancozebe; 5- propiconazol; 6- epoxiconazol+piraclostrobina; 7- azoxistrobina+ ciproconazol; 8- fludioxonil+metalaxil-M; 9- iprodiona; 10- azoxistrobina + difenoconazol; 11- carbendazin; 12- procimidona; 13- trifloxistrobina+ tebuconazol; e 14- flutriafol)

Para o isolado F37, em relação às médias, os melhores fungicidas foram 1, 2, 5, 8, 9, 10, 11, 13 e 14, e em relação as doses, a de 1000 µg i.a/mL. A partir da dose de 1 µg i.a/mL houve diminuição no crescimento micelial deste isolado. A dose que apresentou a melhor redução no crescimento micelial foi a de 1000 µg i.a/mL. Nenhum dos fungicidas testados atingiu 100% de controle de crescimento micelial para este isolado, uma vez que o ponto de partida para este ensaio foi de 0,7cm (Tabela 14) e (Figura 31).

Tabela 14. Crescimento micelial (cm) do isolado F37 de *Fusarium* sp. sob 14 fungicidas em cinco concentrações

Isolado F37	Doses					
Fungicidas	0	1	10	100	1000	Média
1 (Clorotalonil + Tiofanato metílico)	8,00 aA	3,81 deA	3,51cdeA	3,36bcdA	2,92bcA	3,40de
2 (Tebuconazole)	8,00 aA	3,83 deA	2,89defA	1,57fB	1,80cdB	2,52 fg
3 (Captana)	8,00 aA	4,44 bcdA	4,13bcdA	4,53bA	2,75bcB	3,96 bcd
4 (Mancozeb)	8,00 aA	4,79bcdA	4,24bcAB	4,16bcAB	3,51 bB	4,17 b
5 (Propiconazol)	8,00 aA	4,11bcdA	3,46cdeAB	2,5defBC	1,89cdC	2,99 ef
6 (Epoconazole+Piraclostrobina)	8,00 aA	4,01cdA	3,68cdeA	3,46bcdAB	2,62bcB	3,44 cde
7 (Azoxistrobina + Ciproconazol)	8,00 aA	4,33bcdA	3,83bcdA	3,78bcdA	2,37bcdB	3,58 bcde
8 (Fludioxonil +Metalaxil - M)	8,00 aA	2,69 efA	1,79fgA	1,88efA	1,91cdA	2,07 gh
9 (Ipridiona)	8,00 aA	5,29 bA	3,88bcdB	2,02efC	2,10cdC	3,32 de
10 (Azoxistrobina +Difenoconazol)	8,00 aA	1,69 fA	1,59gA	1,93efA	1,90cdA	1,78 h
11 (Carbedazin)	8,00 aA	8,00 aA	2,95defB	1,23fC	1,19 dC	3,35 de
12 (Procimidona)	8,00 aA	5,13 bcA	5,03bA	3,11cdeB	2,92bcB	4,05 bc
13 (Trifloxistrobina + Tebuconazol)	8,00 aA	2,67 efA	2,51efgA	1,78efB	2,33bcdB	2,32 gh
14 (Flutriafol)	8,00 aA	4,07bcdA	1,93fgB	1,89efB	2,83bcdB	2,56 fg
Média	8,00 a	4,46 a	3,56 b	3,01 c	2,71 d	

*Valores seguidos da mesma letra maiúscula na vertical não diferem entre si pelo intervalo de confiança (0,05)

**Valores seguidos da mesma letra minúscula na horizontal não diferem entre si pelo intervalo de confiança (0,05)

Teste Tukey a nível de 5% de probabilidade

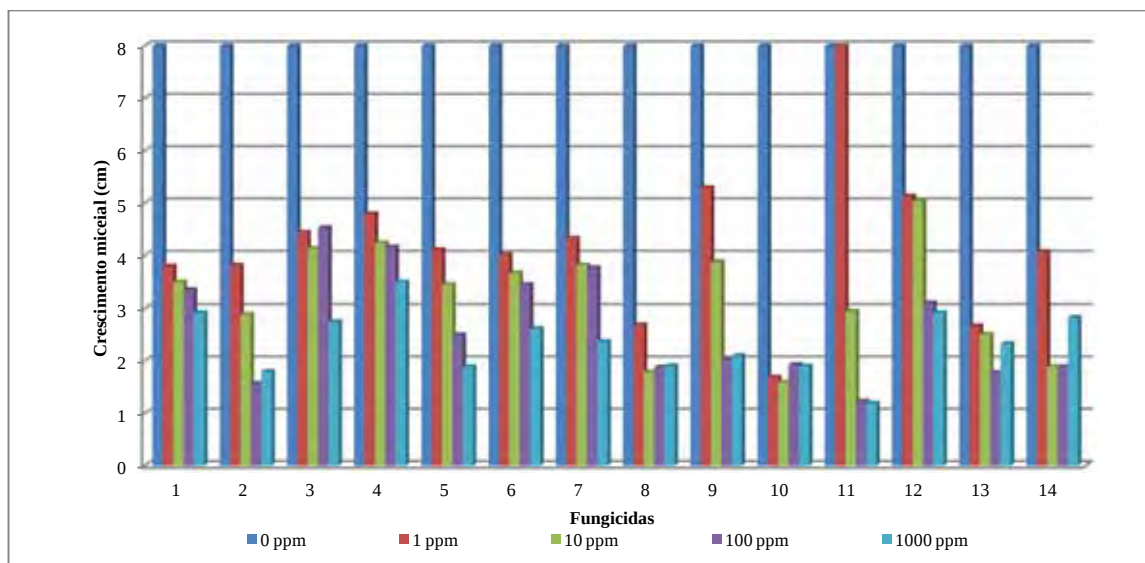


Figura 31: Inibição do crescimento micelial do isolado F37 de *Fusarium* sp. sob 14 fungicidas em cinco concentrações.

(Produtos testados: 1-clorotalonil+tiofanato metílico; 2- tebuconazole; 3- captana; 4- mancozebe; 5- propiconazol; 6- epoxiconazol+piraclostrobina; 7- azoxistrobina+ ciproconazol; 8- fludioxonil+metalaxil-M; 9- iprodiona; 10- azoxistrobina + difenoconazol; 11- carbendazin; 12- procimidona; 13- trifloxistrobina+ tebuconazol; e 14- flutriafol).

Para o isolado F54, em relação às médias os melhores fungicidas foram 1, 2, 6, 7, 8, 11 e 13 e em relação às doses a de 1000 μg i.a/mL. A partir da dose de 1 μg i.a/mL houve diminuição no crescimento micelial deste isolado. A dose que apresentou a melhor redução no crescimento micelial foi a de 1000 μg i.a/mL. Nenhum dos fungicidas testados atingiu 100% de controle de crescimento micelial para este isolado, uma vez que o ponto de partida para este ensaio foi de 0,7cm, porém o Tebuconazole e o Carbendazim na dosagem de 1000 μg i.a/mL chegou próximo à inibição total (Tabela 15) e (Figura 32).

Tabela 15. Crescimento micelial (cm) do isolado F54 de *Fusarium* sp. sob 14 fungicidas em cinco concentrações

Isolado F54 Fungicidas	Doses					Média
	0	1	10	100	1000	
1 (Clorotalonil + Tiofanato metílico)	7,60 aA	2,96 gA	3,24 ghA	3,09 deA	2,92 cdA	3,05 fg
2 (Tebuconazole)	7,60 aA	3,66 fgA	2,26 jB	1,35 gC	0,94 hC	2,05 h
3 (Captana)	7,60 aA	3,78 fA	3,81 defgA	3,96 bcA	2,53 deB	3,52de
4 (Mancozeb)	7,60 aA	4,14 defA	4,10 cdefA	3,63 bcdeAB	3,29 cB	3,79 cd
5 (Propiconazol)	7,60 aA	3,81 fA	3,04 hiB	2,19fC	1,69 fghC	2,68 g
6 (Epoconazol+Piraclostrobina)	7,60 aA	3,81 fA	3,49 fghAB	3,05 deBC	2,52 deC	3,22 ef
7 (Azoxistrobina + Ciproconazol)	7,60 aA	3,79 fA	3,66 efghA	3,09 deB	2,32 defC	3,21 ef
8 (Fludioxonil +Metalaxil - M)	7,60 aA	4,12 defA	2,37cdeB	1,38 gC	1,3 hC	2,29 h
9 (Iprodiona)	7,60 aA	4,83 cdA	4,25 cdeB	3,14 deC	2,99 cdC	3,80 cd
10 (Azoxistrobina +Difenoconazol)	7,60 aA	4,34 cdefA	4,41 cdA	3,52 cdeB	2,79 cdeC	3,76 cd
11 (Carbedazin)	7,60 aA	6,69 bA	3,30 ghB	1,24 gC	1,04 hC	3,07 f
12 (Procimidona)	7,60 aA	4,98 cA	4,79 bcAB	4,30 bB	4,33 bB	4,60 b
13 (Trifloxistrobina + Tebuconazol)	7,60 aA	3,99efA	3,90 defgA	2,94 efB	1,52 ghC	3,09 f
14 (Flutriafol)	7,60 aA	4,70cdeB	5,27 bA	3,74 bcdC	2,13 efgD	3,96 c
Média	7,60 a	4,48 a	3,97 b	3,21 c	2,66 d	
CV%	7,36					

*Valores seguidos da mesma letra maiúscula na vertical não diferem entre si pelo intervalo de confiança (0,05)

**Valores seguidos da mesma letra minúscula na horizontal não diferem entre si pelo intervalo de confiança (0,05)

Teste Tukey a nível de 5% de probabilidade

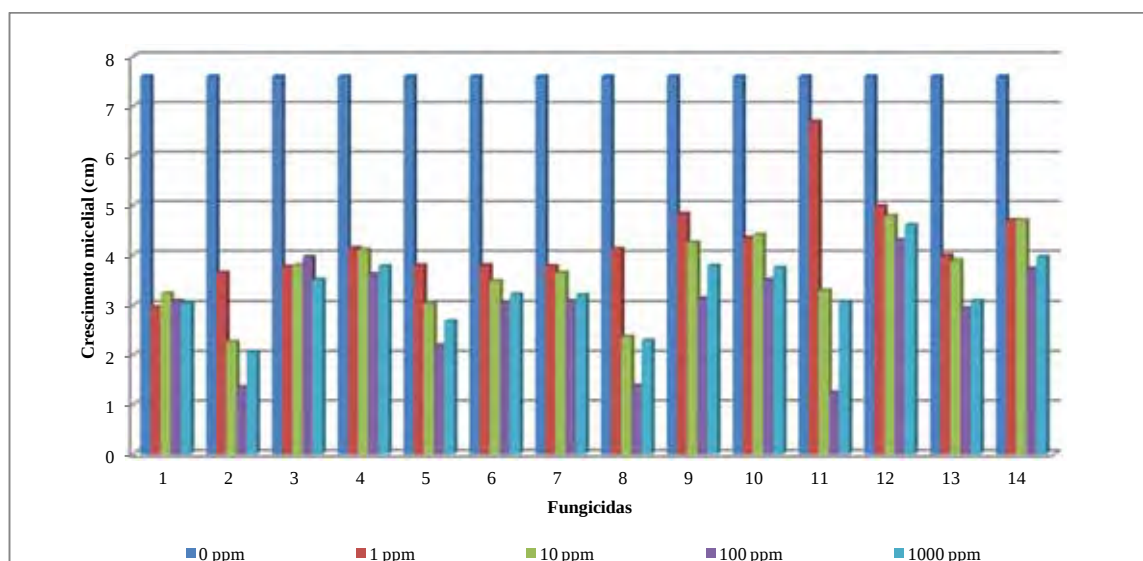


Figura 32: Inibição do crescimento micelial do isolado F54 de *Fusarium* sp. sob 14 fungicidas em cinco concentrações.

(Produtos testados: 1-clorotalonil+tiofanato metílico; 2- tebuconazole; 3- captana; 4- mancozebe; 5- propiconazol; 6- epoxiconazol+piraclostrobina; 7- azoxistrobina+ ciproconazol; 8- fludioxonil+metalaxil-M; 9- iprodiona; 10- azoxistrobina + difenoconazol; 11- carbendazin; 12- procimidona; 13- trifloxistrobina+ tebuconazol; e 14- flutriafol).

Os fungicidas clorotalonil + tiofanato metílico e tebuconazole apresentaram alta eficiência no controle *in vitro* dos três isolados de *Fusarium* testados.

A concentração suficiente para inibir o crescimento micelial em 50% ficou na dosagem de 1 ppm. Os fungicidas azoxistrobina + difenoconazol, carbendazin, procimidona e flutriafol foram ineficientes para o controle, como pode ser observado na Tabela 16.

De forma geral, os isolados tiveram comportamento similar na presença dos fungicidas testados. Com exceção para o fungicida captana, que foi eficiente no controle do crescimento micelial do isolado 7, e ineficiente para os isolados 37 e 54. Este fato pode ser justificado pelos isolados terem origens geográficas diferentes, ou ainda, por apresentarem níveis diferentes de agressividade quando testados em campo. O isolado 7 é o menos agressivo quando comparado aos demais. Enquanto os isolados 37 e 54 apresentam níveis similares de agressividade no mesmo hospedeiro, neste caso o clone RRIM 600.

Para o controle da antracnose no painel de sangria são indicados os seguintes fungicidas: Clorotalonil, Tiofanato metílico + Clorotalonil e Benomyl. (FURTADO e SILVEIRA, 1990). Bernardes et al. (1995) recomendaram para o controle da antracnose do painel de sangria os seguintes fungicidas: Clorotalonil + Tiofanato metílico, Zineb, Clorotalonil, Propiconazole e Tebuconazole.

A indicação do Clorotalonil + Tiofanato metílico pode ser mantida também com o objetivo do controle da fusariose, uma vez que estes fungicidas apresentaram bom desempenho na inibição do crescimento micelial “*in vitro*”. O tebuconazole pode ser uma alternativa interessante para que não haja o desenvolvimento de resistência por parte do patógeno ao ingrediente ativo utilizado.

Tabela 16. Valores médios de ED50 (concentração suficiente para inibir 50% do crescimento micelial), eficiência e sensibilidade de *Fusarium* spp. a fungicidas.

Fungicida	Isolado 7			Isolado 37			Isolado 54		
	ED50	S ^a	E ^b	ED50	S ^a	E ^b	ED50	S ^a	E ^b
1	< 1	AS	AE	< 1	AS	AE	< 1	AS	AE
2	< 1	AS	AE	< 1	AS	AE	< 1	AS	AE
3	< 1	AS	AE	100-1000	I	I	100-1000	I	I
4	< 1	AS	AE	100-1000	I	I	1-10	MS	ME
5	1-10	MS	ME	1-10	MS	ME	1-10	MS	ME
6	1-10	MS	ME	1-10	MS	ME	1-10	MS	ME
7	< 1	AS	AE	1-10	MS	ME	1-10	MS	ME
8	1-10	MS	ME	< 1	AS	AE	1-10	MS	ME
9	10-100	BS	BE	1-10	MS	ME	10-100	BS	BE
10	100-1000	I	I	< 1	AS	AE	10-100	BS	BE
11	100-1000	I	I	1-10	MS	ME	1-10	MS	ME
12	100-1000	I	I	1-10	MS	ME	10-100	BS	BE
13	10-100	BS	BE	< 1	AS	AE	10-100	BS	BE
14	100-1000	I	I	1-10	MS	ME	10-100	BS	BE

Produtos testados: 1-clorotalonil + tiofanato metílico; 2- tebuconazole; 3- captana; 4- mancozebe; 5- propiconazol; 6- epoxiconazol+piraclostrobina; 7- azoxistrobina+ ciproconazol; 8- fludioxonil+metalaxil-M; 9- iprodiona; 10- azoxistrobina + difenoconazol; 11- carbendazin; 12- procimidona; 13- trifloxistrobina+ tebuconazol; e 14- flutriafol.

^a Sensibilidade do *Fusarium* spp. ao fungicida; ^b Eficiência do fungicida sobre *Fusarium* spp.

^a AS (alta sensibilidade), MS (moderada sensibilidade), BS (baixa sensibilidade), I (insensível)

^b AE (alta eficiência), ME (moderada eficiência), BE (baixa eficiência), I (ineficiente)

7.7 Extração de DNA

A extração de DNA genômico total de todos os isolados foi realizada utilizando-se o Kit Plant/Fungi DNA isolation (cat. #26200) da Norgen ®. Extraíram-se DNA dos discos de micélio da cultura monospórica de *Fusarium* spp. Após a extração, cada amostra do DNA teve sua concentração e pureza determinadas através das leituras de absorbância em 260 nm e 280 nm em nanodrop. Em seguida, as amostras foram submetidas à reação de PCR com os primer ITS 1 e ITS 4. Após a reação de PCR, podemos observar a presença de uma banda com aproximadamente 500 bp (Figura 33).

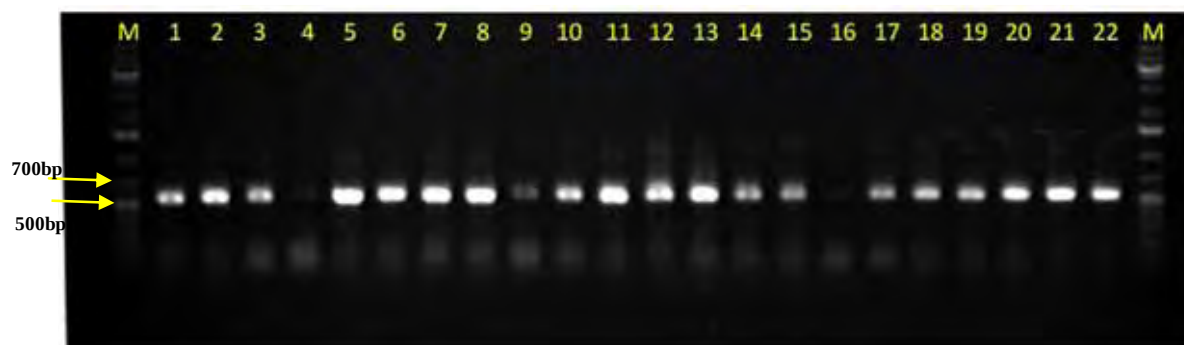


Figura 33: Gel de agarose 0,8% com amostras das reações de PCR – ITS 1,4 de 22 isolados de *Fusarium* spp.

7.8. Sequenciamento da região ITS 5.8 dos isolados de *Fusarium* spp.

Foram sorteados ao acaso 14 isolados de *Fusarium* spp. que foram submetidos ao sequenciamento do DNA. Assim como pode ser visto na Figura 34 a árvore filogenética foi montada com base na sequência de DNA de alguns isolados representantes de cada região coletada.

Com base nas sequências de DNA obtidas da região ITS-5.8S rDNA dos isolados de *Fusarium* trabalhados, foi possível concluir que os isolados de seringueira, pertencem às espécies *Nectria rigidiuscula*, *Albonectria albosuccinea* e *Fusarium solani*.

É possível notar, na árvore filogenética (Figura 34) a formação de três grupos. No primeiro grupo encontra-se o isolado de *Albonectria albosuccinea*, representado pelo isolado F25 (isolado do clone RRIM 600 x PA 31, proveniente da cidade de Pontes e Lacerda –MT).

No segundo grupo está o isolado de *Fusarium solani* representado pelo isolado F2 (isolado do clone PB 235, proveniente da cidade de Nhandeara – SP).

No terceiro grupo estão a maioria dos isolados de *Nectria rigidiuscula*, neste caso representado pelos isolados F5, F7, F10, F20, F31, F33, F34, F37, F43, F44, F46 e F59. Dentro deste grupo há um grupamento secundário, que é representado pelos isolados F7, F31, F43, F5 e F37.

Há necessidade do sequenciamento de outras regiões do genoma, tais como a β -tubulina e alfa elongase para um agrupamento filogenético mais eficaz.

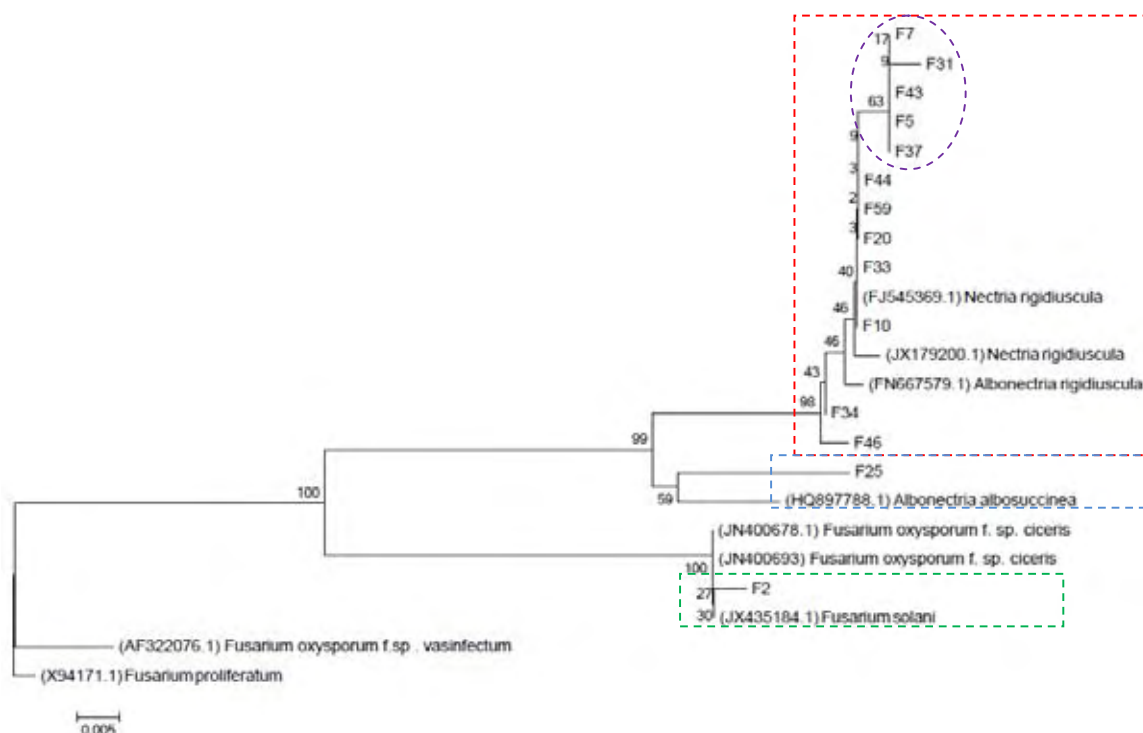


Figura 34: Árvore filogenética construída com base na sequência de DNA obtidas da região ITS 5.8 r DNA dos isolados de *Fusarium* spp. trabalhados.

7.9. Produção de enzimas extracelulares *in vitro* por isolados de *Fusarium* spp.

Todos os isolados de *Fusarium* sp. testados produziram a enzima amilase. Seguindo o proposto por Bastos (2005) que estudou o perfil de produção de enzimas extracelulares de *Crinipellis pernicioso*, a população de *Fusarium* spp. provavelmente utiliza amido como fonte primária de energia. Estes resultados corroboram com Bueno Jr. et al. (2009) que, observando o comportamento de *Fusarium solani*, verificaram a produção das mesmas enzimas. Link e Onofre (2010) verificaram, em meio sólido, a atividade amilolítica de fungos do gênero *Penicillium* e *Fusarium* isolados de ramos de vassourinha (*Baccharis dracunculifolia* DC.).

Houve diferença significativa no índice enzimático de caseinase produzida pelos isolados. Os maiores índices foram proporcionados pelos isolados F10 e F54. Índices medianos foram obtidos pelos isolados F26 e F30. Os isolados F17, F22, F35 e F59 tiveram uma menor produção da caseinase. Bueno Jr. et al. (2009) também obteve diferentes intensidades de produção da caseinase.

O gênero *Fusarium* tem sido reportado como um grande produtor de enzimas pectinolíticas. Gómez et al. (2005), comunicam a presença de pectato-liase e endopoligalacturonases em *Fusarium oxysporum*. Estas enzimas são produzidas por fungos fitopatogênicos para romper e atacar a parede celular e a lamela média. A presença da pectinase indica a capacidade do fungo colonizar a planta. Neste caso, todos os isolados produziram a enzima no teste *in vitro*. Porém três deles, F10, F35 e F59 produziram-na de maneira mais intensa.

Os microrganismos fitopatogênicos, produzem proteases extracelulares ativas que, em conjunto com outras enzimas como poligalacturonases, pectoliasas e xilanases, exercem um importante papel na patogênese (VALUEVA e MOSOLOV, 2004). As enzimas proteolíticas produzidas por microrganismos podem atuar na hidrólise de proteínas da membrana e da parede celular de plantas hospedeiras, facilitando a penetração e a infecção.

Cinco isolados produziram a protease de forma intensa, sendo eles F10, F20, F22, F26 e F54. O isolado F17 não produziu a enzima. Os demais isolados (F4, F30, F35 e F59) produziram pouca enzima, não diferindo estatisticamente do F17.

Com relação à enzima celulase, os isolados F20, F22, F30 e F35 foram os que mais produziram a enzima. Os isolados F26, F54 e F59 produziram uma quantidade intermediária de celulase, enquanto os isolados F4, F10 e F17 produziram pouca celulase. Nicole et al. (1992) observaram que no processo de necrose do floema em seringueira há alterações na parede celular, indicando a degradação da celulose durante o processo, sugerindo que as celulasas estejam envolvidas neste processo, ou seja, que microorganismos estejam envolvidos direta ou indiretamente neste processo. Roncero et al. (2003) afirma que as celulasas fazem parte das enzimas que degradam a parede celular, e estão associadas à fitopatogenicidade deste gênero. Segundo Ruegger e Tauk-Tornisielo (2004), os fungos que decompõem substâncias celulósicas geralmente ocorrem no solo, colonizando vegetais, suas raízes e resíduos, com importante função de reciclagem de nutrientes.

A catalase diferenciou em intensidade nos diferentes isolados. De forma intensa foi produzida pelos isolados F17, F35 e F54. De maneira intermediária pelos isolados F22 e F26. Com fraca intensidade pelos isolados F4, F10, F20, F30 e F59. Silva et al. (2011) observaram que *Fusarium lateritium* e *F. oxysporum* apresentaram os maiores índices

enzimáticos para celulase e protease em comparação à amilase, a qual não foi produzida por estes fungos.

As ligninas peroxidases são produzidas por fungos degradadores de madeira. A constatação da produção de lignina peroxidase e lacase vem a ser muito importante, pois estas enzimas estão envolvidas na degradação da lignina (LEONOWICZ et al., 2001).

Estas enzimas são descritas como importantes para os microrganismos fitopatogênicos, pois é através destas que eles se tornam capazes de superar a resistência natural dos componentes da madeira, em especial a lignina, que é constituída por uma estrutura aromática complexa (GRIFFIN, 1994 apud GIELE et al., 2004; MESSERSCHMIDT, 1997 apud GIELE et al., 2004).

Os isolados apresentaram atividade fenol-oxidase, pois produzem a enzima lacase (oxidase) (Tabela 17). Os isolados F4, F10, F20, F22, F26, F30, F54 e F59 produziram a lacase de forma mais intensa. Os isolados F17 e F54 produziram pouca lacase. Para a enzima ligninase, os isolados F4, F10, F20, F22, F26 e F54 não produziram a mesma. Os isolados F17, F30, F35 e F59 produziram a enzima ligninase. A quantidade produzida desta última enzima não foi mensurada.

Nas condições do presente trabalho, os isolados de *Fusarium* spp. isolados do painel de seringueira, produzem as enzimas extracelulares amilase, celulase, proteases (caseinase), lacase (oxidase) e catalase. No entanto, a quantidade produzida de cada enzima é significativamente diferente entre os isolados, com exceção da amilase (Tabela 17) e (Figura 35).

Tabela 17. Produção de enzimas extracelulares de *Fusarium* spp. isolados de painel de seringueira, em meios de cultura específicos.

Isolado ¹	Enzimas Extracelulares							
	Índice Enzimático (IE) ²						Símbolos ³	
	Amilase	Proteinase (Caseinase)	Lacase (Oxidase)	Pectinase	Protease	Celulase	Catalase	Ligninase
F4	0,90 ⁴ a ⁵	0 d	0,64 b	0,53 b	0,82 a	0,92 a	+	-
F10	0,84 a	0,33 c	0,74 b	0,73 a	0,71 b	0,91 a	+	-
F17	0,80 a	0,87 a	0,90 a	0,64 b	1,00 a	0,87 a	+++	+
F20	0,81 a	0 d	0,62 b	0,65 b	0,72 b	0,68 c	+	-
F22	0,79 a	0,84 a	0,71 b	0,61 b	0,53 b	0,71 c	++	-
F26	0,84 a	0,55 b	0,66 b	0,58 b	0,69 b	0,86 b	++	-
F30	0,86 a	0,72 b	0,62 b	0,57 b	0,85 a	0,77 c	+	+
F35	0,80 a	0,82 a	0,85 a	0,89 a	0,94 a	0,74 c	+++	+
F54	0,66 a	0,45 c	0,60 b	0,44 b	0,66 b	0,84 b	+++	-
F59	0,80 a	0,89 a	0,66 b	0,76 a	0,87 a	0,81 b	+	+
CV%	11,13	21,08	7,77	18,94	11,43	4,99		

1- Isolados ; 2- Índice Enzimático (IE) = diâmetro da colônia (cm) / diâmetro do halo formado (cm). Os isolados com maior índice são os que possuem menor atividade enzimática; 3+++ (intensa); ++ (moderada); + (fraca) e - (ausência de alteração de cor no meio de cultura); 4- Média de três repetições; 5-Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem significativamente, segundo teste de Scott-Knott a 5%. Dados não transformados.

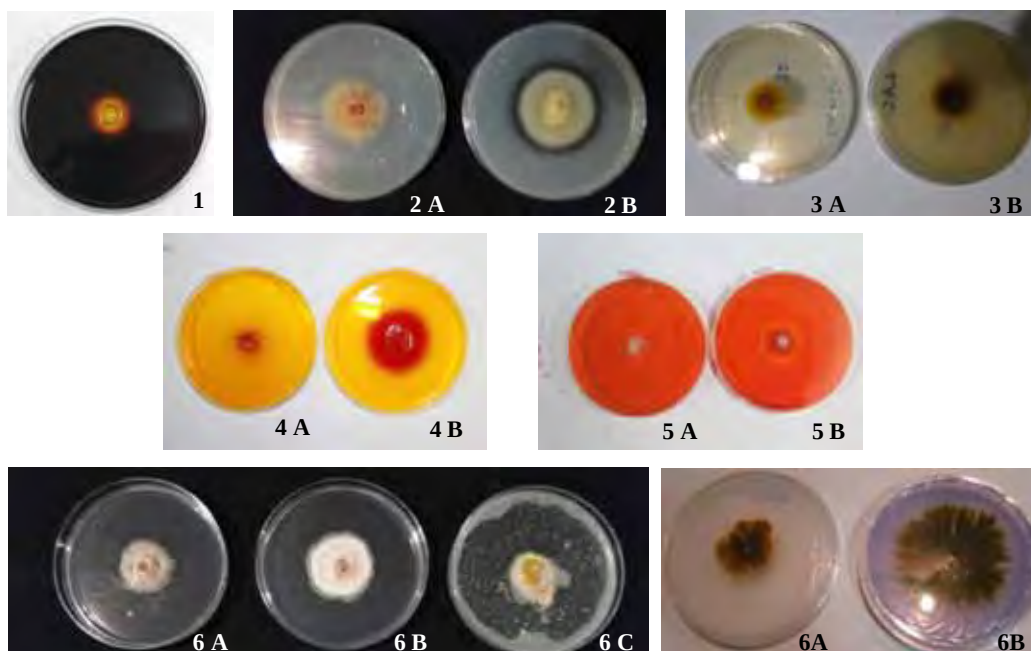


Figura 35: 1. Meio para detecção da amilase reação (+); 2. Meio para a detecção da caseinase. (2a. reação negativa e 2b)reação positiva); 3.Meio para a detecção da lacase (3a. reação negativa e 3b. reação positiva); 4. Meio para a detecção da protease (4a. reação negativa e 4b. reação positiva); 5. Meio para a detecção da celulase (5a. reação negativa e 5b. reação positiva); 6. Meio para a detecção da catalase (6a. reação de intensidade +; 6b. reação de intensidade ++ e 6c. reação de intensidade +++); 7. Meio para a detecção da ligninase (7a. reação positiva e 7b. reação negativa).

8. CONCLUSÃO

- ✓ A fusariose está presente nos estados de São Paulo, Mato Grosso e Bahia;
- ✓ O clone RRIM 600 apresenta a maior incidência da doença nas áreas visitadas;
- ✓ A maior severidade da fusariose (Nota 4) ocorre nos clones RRIM 600 (1,2%), IAN 717 (2%) e Mix clones (4%);
- ✓ As características morfológicas e culturais foram variadas para os isolados de fusariose estudados;
- ✓ 13,78% dos isolados foram classificados como *Fusarium verticiloides* enquanto 86,28% dos isolados se enquadram na espécie *Fusarium decemcellulare*;
- ✓ A temperatura ótima para o crescimento micelial da maioria dos isolados foi de 30°C;
- ✓ O isolado mais agressivo para o clone RRIM 600 foi o F12 (*Fusarium verticiloides*) tanto na avaliação aos 70 d.a.i., como aos 120 d.a.i;

- ✓ O clone com maior resistência ao *Fusarium* sp. foi o GT1 para a avaliação aos 70 d.a.i.; e o RRIM 600 para a avaliação aos 120 d.a.i.;
- ✓ Os fungicidas clorotalonil + tiofanato metílico e tebuconazole foram altamente eficientes no controle “*in vitro*” para os isolados testados;
- ✓ Houve a amplificação de fragmentos de 500 bp aproximadamente nas reações de PCR utilizando os primers ITS 1 e ITS4;
- ✓ Após sequenciamento da região ITS 5.8 ficou confirmado a presença das espécies de *Fusarium solani*, *Albonectria rigidiuscula* e *Nectria rigidiuscula*;
- ✓ Os isolados de *Fusarium* spp. isolados de painel de seringueira, produzem as enzimas extracelulares amilase, celulase, protease (caseinase), lacase (oxidase) e catalase;

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADIS, J., FONSECA, O. J. M.; STRASSEN, R. Z. Athrips as vector of the “supersprouting” fungus disease in guarana plants of the Central Amazon. **Fitopatologia Brasileira** v.10, p. 677-679, 1985.
- AGRIANUAL 2012: Anuário da Agricultura Brasileira. **Seringueira**. São Paulo, p.411-414, 2012.
- AGRIOS, G.N. Plant Pathology. 4th ed. San Diego. Academic Press. 1997.
- AGROFIT. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2012. In:<
<http://www.agricultura.gov.br/servicos-e-sistemas/sistemas/agrofit>>
- ALARD, R.W. **Princípios do melhoramento genético das plantas**. Trad BLUMENSCHNEIN, A.; PATENIANI, E.; GURGEL, J.T.A.; VENCOSKY, R. São Paulo: Edgard Blucher, 1971. 381p.
- ALBUQUERQUE, J.M. **Botânica da seringueira**. In. Curso de especialização em heveicultura, 16. Belém, 1985. Belém, SUDHEVEA/FCAP, 1985. 15p.
- ALVARENGA, A.P.; CARMO, C.A.F. de S. **Seringueira**. Viçosa, MG, EPAMIG-Viçosa, 2008, 894p.
- AYLIFFE, M.A.; DODDS, P.N.; LAURENCE, G.J. Characterization of a β -tubulin gene from *Melampsora lini* and comparison of fungal β -tubulin genes. **Mycological Research**, v.105, n.7, p.818-826, 2001.
- BARBEE, J.G. Development of Fusarium canker of black poplars. **Phytopathology** v.52, p.724, 1962.
- BASTOS, C.N. Produção de enzimas extracelulares por *Crinipellis pernicioso*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, n.30, p. 286-288, 2005.
- BERNARDES, M.S. *et al.* **Manual de sangria da seringueira**. Bridgestone/Firestone, São José do Rio Preto, p. 17, 1995
- BETELONI, F. G.; DÓRIA, K. M. A. B. V. S.; SIERRA-HAYER, J.F.; BUENO, C. J.; FURTADO, E.L. *Fusarium moniliforme*, novo patógeno no painel da seringueira, no estado de São Paulo. **Summa Phytopathologica**, v.35, p.35, 2009. (Resumo).

BOCCHESE CAC, MARTINELLI JA, MATSUMURA ATS, FEDERIZZI LC, PRESTES AM. Virulência, atividade enzimática e padrões de isoesterases de isolados de *Pyrenophora chaetomioides*, agente etiológico da mancha de grãos e folhas de aveia. **Fitopatologia Brasileira** v. 28, n.1, p. 11-16, 2003.

BOOTH, C. The genus *Fusarium*, 1971. Apud. DEMIRCI, F.; MADEN, S. A severe dieback of box elder (*Acer negundo*) caused by *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. In Turkey. **Australasian Plant Disease Notes**, v.1, p.13-15, 2006.

BOREM, A.; MIRANDA, G.V. Melhoramento de plantas. 4 ed. Viçosa: Editora UFV, 2005, 525p.

BOYER, M.G. A *Fusarium* canker disease of *Populus deltoids* Marsh. **Canadian Journal of Botany**, v.39, p.1195–1204, 1961.

BUENO JR, C.; FISCHER, I.H.; ROSA, D.D.; FURTADO, E.L. Produção de enzimas extracelulares por *Fusarium solani* de maracujazeiro amarelo. **Tropical Plant Pathology**, v. 35, n.5, p.343-346, 2009.

BURGESS, L. W.; SUMMERELL, B. A.; BULLOCK, S.; GOTT, K. P.; e BACKHOUSE, D. **Laboratory Manual for Fusarium Research**, 3rd ed. University of Sydney/Royal Botanic Gardens, Sydney, Australia. (P, 4, 8, 9), 1994.

BY DO, F.C.; et al. Spatial distribution of *Hevea brasiliensis* trunk phloem necrosis within a plot aggregation by no evidence of constraint on cumulated growth. **Forest Pathology**, v.41, p.90-100, 2011.

CAMARGO, L. E. A.; BERGAMIN FILHO, A. Controle Genético. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.) **Manual de fitopatologia. v.1: Princípios e Conceitos**. 3ed., São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. p. 729-758.

CHEN, W; STEWART, W. J. First report of stem canker of English walnut caused by *Fusarium solani* in South Africa. **Plant Disease** v.84, p.592, 2000.

COOLEY, R.N.; CATEN, C.E. Molecular analysis of the *Septoria nodorum* β -tubulin gene and characterization of a benomyl-resistance mutation. **Molecular and General Genetics**, v.237, n.1-2, p.58-64, 1993.

COSTA, N. H. de A. D.; SERAPHIN, J. C.; ZIMMERMANN, F. J. P. Novo método de classificação de coeficientes de variação para a cultura do arroz de terras altas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, n. 3, p. 243-249, mar. 2002.

DARVAS, J. M.; KOTZE, J. M. Fungi associated with pre- and postharvest diseases of avocado fruit at Westfalia Estate, South Africa. **Phytophylactica** v.19, p.83-86, 1987.

DEAN, W. **A luta pela borracha no Brasil**. São Paulo, 1989. 286 p.

DEMIRCI, F.; MADEN, S. A severe dieback of box elder (*Acer negundo*) caused by *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. In Turkey. **Australasian Plant Disease Notes**, v.1, p.13-15, 2006.

DOCHINGER, L.S., SELISKAR, C.E. *Fusarium* canker found on yellow poplar. **Journal of Forestry**, v. 60, p. 331–333, 1962.

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

FALCONER, D.S. **Introdução à genética quantitativa**. Viçosa, MG: UFV, 1987. 279p.

FERNANDES, M. R. **Manual para laboratório de fitopatologia**. Passo Fundo: Embrapa-CNPT. 1993. 128 p.

FISCHER, I.H.; KIMATI, H.; REZENDE, J.A.M. Doenças do maracujazeiro (*Passiflora* spp.). In: Kimati, H. et al. (Ed.) **Manual de fitopatologia**. v.2: Doenças das Plantas Cultivadas. 4ed., São Paulo. Agronômica Ceres. p.467-474, 2005.

FONCECA, S.M. Estimativa e interpretação dos componentes da variação total em experimentos de melhoramento florestal. In: **Curso prático experimentais em silvicultura**. Piracicaba: IPEF, 1979

FUENTEFRIA, A.M. **Identificação e avaliação do potencial biotecnológico de leveduras e fungos semelhantes a leveduras isolados de filoplano do *Hibiscus rosa-sinensis***. Dissertação. 120 p. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2004.

FUNGARO, M.H.P. PCR na micologia. **Biotecnologia Ciência e Tecnologia**. v.14, p.12-16, 2000.

FURTADO, E.L. & TRINDADE, D.R. Doenças da seringueira (*Hevea* spp.). In: Kimati, H. et al. (Ed.) **Manual de fitopatologia**. v.2: Doenças das Plantas Cultivadas. 4ed., São Paulo. Agronômica Ceres. 2005. p.477-488.

FURTADO, E.L.; ALFENAS, A.C.; HARRINGTON, T.C.; BAKER, C. *Fusarium solani*, novo patógeno causando mofo cinzento em painel de seringueira, no Estado de São Paulo. **Fitopatologia Brasileira**, v.26, p.439, 2001.

FURTADO, E.L; SILVEIRA, A.P. **Doenças do painel de sangria da seringueira**. In: BERNARDES, M.S. Sangria da seringueira. ESALQ/USP: FEALQ, Piracicaba, 1990. p. 111-125.

FURTADO, E.L. Impacto potencial das mudanças climáticas sobre as doenças da seringueira no Estado de São Paulo p.257-272 in: Ghini, R.; Hamada, E. **Mudanças climáticas: Impacto sobre as doenças de plantas no Brasil**. Embrapa, Brasília-DF, 2008.

GARCIA, C. H. **Tabelas para classificação do coeficiente de variação**. Piracicaba: Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais, 1989. 12 p. (Circular Técnica, 171).

GIELE, E. C. et al. Influencia de Tween na producao de lacases constitutivas e indutivas pelo *Botryosphaeria* sp. **Acta Scientiarum: biological sciences**, Maringa, v. 26, p. 463-470, 2004.

GONÇALVES, P.de S.; MARQUES, J.R.B. Clones de seringueira: influência dos fatores ambientais na produção e recomendação para plantio. p. 401-498. In: ALVARENGA, A.P.; CARMO, C.A.F. de S. **Seringueira**. Viçosa, MG, EPAMIG-Viçosa, 2008.

HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S.L. The use for detection of enzyme production by fungi. **Micology**, v.67, n.3, 1975.

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

HOCKING, D. Stem canker and pink stain of Teak in Tanzania associated with *Fusarium solani*. **Plant Disease Reporter** v.52, n.8, p.628–629, 1968.

INSTITUTO AGRONÔMICO DE CAMPINAS (IAC) - **Programa Seringueira: importância da cultura**. Disponível em: <http://www.iac.sp.gov.br>. Acesso 16 out de 2008.

INTERNATIONAL RUBBER STUDY GROUP (IRSG) – Rubber Statistical Bulletin, Wembley – Englad, IRSG, Banco de dados. In: <<http://www.rubberstudy.com>>.

JESUS JUNIOR, W.C.; VALE, F.X.R.; BERGAMIN FILHO, A. Quantificação de danos e perdas. In: VALE, F.X.R.; JESUS JUNIOR, W.C.; ZAMBOLIM, L. (Ed.). **Epidemiologia aplicada ao manejo de doenças de plantas**. Viçosa: Perfíl Editora, 2004. p. 273-292.

KAWCHUK, L.M.; HUTCHISON, L.J.; VERHAEGHE, C.A.; LYNCH, D.R.; BAINS, P.S.; HOLLEY, J.D. Isolation of the β -tubulin gene and characterization of thiabendazole resistance in *Gibberella pulicaris*. **Plant Pathology**, v.24, n. 2, p.233-238, 2002.

KLITTICH, C. J. R.; LESLIE, J. F.. Identification of a second mating population within the *Fusarium moniliforme* anamorph of *Gibberella fujikuroi*. **Mycologia**, v.84, p. 541-547, 1992.

KLITTICH, C. J. R., LESLIE, J. F.; NELSON, P. E.; MARASAS, W. F. O. *Fusarium thapsinum* (*Gibberella thapsina*): a new species in section *Liseola* from sorghum. **Mycologia**, v.89, p. 643-652, 1997.

KLOCK, U. et al. Química da madeira. Universidade Federal do Paraná. 3º edição revisada. 86 p. In: <<http://www.madeira.ufpr.br/disciplinasklock/quimicadamadeira/quimicadamadeira.pdf>>

KRUGNER, T.L & AUER, C. G. Doenças dos Eucaliptos. In: Kimati, H.; Amorim, L.; Rezende, J.A. M.; Bergamin Filho, A. **Manual de Fitopatologia: Doenças das plantas cultivadas**, 4a ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2., 320-333. 2005.

LEAL-JUNIOR, G.A. Diagnóstico de *Crinipellis pernicioso*, em tecidos de *Theobroma cacao* e caracterização molecular e serológica de isolados coletados de vários hospedeiros. Piracicaba,

2002. 136p. Dissertação (Mestrado). Centro de Energia Nuclear na Agricultura – Universidade de São Paulo.

LESLIE, J. F.; SUMMERELL, B. A. **The Fusarium Laboratory Manual** – Blackwell Publishing, Oxford, UK; 2006.

LEONOWICZ, A. et al. Fungal laccase: properties and activity on lignin. **Journal Basic Microbiology**, Berlin, v. 41, p. 185- 227, 2001.

LINK, S.; ONOFRE, S. B. Microrganismos epifíticos da vassourinha – *Baccharis dracunculifolia* D. C. (Asteraceae). **Revista em Agronegócios e Meio Ambiente** v. 3, p.131-143, 2010.

LOMBRAD, L. et al. A new bark canker disease of the tropical hardwood tree *Cedrelinga cateniformis* in Ecuador. **Fungal Diversity**, v. 31, p. 72 -81, 2008.

LORI, G. A., SANCHEZ, J. V. ; STEHR, A. M.. *Fusarium decemcellulare*: Causal agent of gall nuts in Australian cedar (*Toona ciliata*). **Fitopatologia Brasileira** v.19, p. 476- 478., 1994

MAINI, J.S.; DANCE, B.W. Temperature relationships of blight attributed to *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. on trembling aspen suckers. **Canadian Department of Forest Rural Development Bi-Monthly Research Notes**, v.21, n.2, p.2, 1965.

MARASAS, W. F. O.; NELSON, P. E.; TOUSSOUN, T. A. Toxigenic *Fusarium* Species: Identity and Mycotoxicology. The Pennsylvania State University Press, University Park, Pennsylvania, 1984.

MAY-de MIO, L. L.; AMORIM, L. Doenças do álamo. **Floresta**, v.30, n.1, p.139-153, 2000.

MEI, L.Y.; MING, T.C.; QIN, G.A.; NA, Z. A study on the Pathogen for canker of *Tapiscia sinensis*. **Journal of NorthwestForestry University**, v.14, p.53–58,1999.

MENTEN, J.O.M. et al. Efeito de alguns fungicidas no crescimento micelial da *Macrophomina phaseolina in vitro*. **Fitopatologia Brasileira**, v.1, p.57-66, 1976.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E DA PESCA – MAPA In: <
http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/camaras_setoriais/Borracha_natural/21RO/App_Borracha_Natural.pdf>

NANDRIS, D.; CHRESTIN, H.; GEIGER, J. P.; NICOLE, M.; Thouvenel, J. C. Occurrence of a phloem necrosis on the trunk of rubber tree. In: **Proceedings** of the 75th Annual Conference of Rubber Research in Sri Lanka, September 1984, Colombo, p. 59, 1984.

NANDRIS, D.; CHRESTIN, H.; NOIROT, M.; NICOLE, M.; THOUVENEL, J. C.; GEIGER, J. P., La Nécrose du Phloème du Tronc de l'Hévéa en Côte d'Ivoire: 1. Symptomatologie et caractéristiques biochimiques, **European Journal of Forest Pathology**. v.21, p.325–339, 1991.

- NICOLE, M., et al. Cellulose is degraded during phloem necrosis of *Hevea brasiliensis*. **European Journal of Forest Pathology**, v.22, n.5, p. 266-277, 1992.
- NIRENBERG, H. I.; O'DONNELL, K. New *Fusarium* species and combinations within the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia*, New York, v. 90, n. 3, p. 434-458, 1998.
- OLIVEIRA, M. J. de. EPIDEMIOLOGIA DA PODRIDÃO-DE-FUSÁRIO EM FRUTOS DE MELOEIRO. **Dissertação**. 87 p. 2007.UFRPE. Recife – PE.
- PARISI, J.J.D. **Sensibilidade *in vitro* de *Phomopsis sojae* e *Phomopsis phaseoli* f. sp. meridionalis a fungicidas e efeito do tratamento de sementes de soja (*Glicine max*) inoculados com patógenos** 1997. 61p. Dissertação (Mestrado em Micologia Agrícola) – Escola Superior de Agronomia “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 1997.
- PELLEGRIN, F.; DURAN-VILA, N.; VAN MUNSTER, M.; NANDRIS, D. Trunk Phloem Necrosis in rubber tree (*Hevea brasiliensis*): etiological investigations failed to confirm any biotic causal agent, **Forest Pathology**. v.37, p.9–21, 2007
- PEREIRA, O.A.P.; CARVALHO, R.V. & CAMARGO, L.E.A. Doenças do milho (*Zea mays* L.). In: Kimati, H. et al. (Ed.) **Manual de fitopatologia**. v.2: Doenças das Plantas Cultivadas. 4ed., São Paulo. Agronômica Ceres. 2005. p.559-568.
- PEREIRA, W. V. Caracterização e identificação molecular de espécies de *Colletotrichum* associadas a antracnose da goiaba no estado de São Paulo. **Dissertação**. 80 p. ESALQ/USP. Piracicaba, 2009.
- PEYRARD, N. et al. Statistical analysis of the spatio-temporal dynamics of rubber tree (*Hevea brasiliensis*) trunk phloem necrosis: no evidence of pathogen transmission. **Forest Pathology**, v.36, n.5, p. 360 – 371, 2006.
- PILOTTI, M.; PONZIO, V.; MOTTA, E. Disorders of *Platanus x acerifolia* in Italy associated with *Fusarium solani*. **Forest Pathology**. v.32, p.249-264, 2002.
- PIMENTEL-GOMES, F. **Curso de estatística experimental**. São Paulo: Esalq, 1985. 467 p.
- PIRES, J.M. ; SECCO, R.S., GOMES, J.I. **Taxonomia e fitogeografia das seringueiras (*Hevea* spp.)**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2002. 103p.
- PLOETZ, R., VAZQUEZ, A.; BENSCHER, D. First report of *Fusarium decemcellulare* as a pathogen of mango in the United States. **Plant Disease**, v.80, p.1207, 1996.
- PODESTÀ, I.; MUNIZ, L. Governo estimula produção de borracha para atender crescente demanda interna.23/01/2011. In: <<http://www.seringueira.com.br/governo-estimula-producao-de-borracha-para-atender-crescente-demanda-interna/>>. Acesso em: 25/02/2011.
- POLETTI, I. et al. Zoneamento e identificação de *Fusarium* spp. causadores de podridão de raízes em plantios de erva mate (*Illex paraguariensis* A. St. –Hil.) na região do vale do Taquari RS. 2006.

PRIYADARSHAN, P.M.; CLEMENT-DEMANGE, A. Breeding Hevea Rubber: Formal and Molecular Genetics. **Advances in Genetics**, v.52, p.51-105, 2004.

RESENDE, M. D. V. **SELEGEN-REML/BLUP: Sistema estatístico e seleção genética computadorizada via modelos lineares mistos**. Colombo: Embrapa Florestas, 2007. 359p.

RESENDE, M.D.V.; ARAÚJO, A.J.; SAMPAIO, P.T.B.; WIECHETECK, M.S.S. Acurácia seletiva, intervalos de confiança e intervalos de ganhos genéticos associados a 22 métodos de seleção em *Pinus caribaea* var. *hondurensis*. **Floresta**, Curitiba, v.25, n.1-2, p.3-16, 1995.

RESENDE, M.D.V.; FERNANDES, J.S.C. Pocedimento BLUP individual para delineamentos experimentais aplicados ao melhoramento florestal. **Revista de Matemática e Estatística**, Marília, v.17, p.87-109, 1999.

RESENDE, M.D.V.; HIGA, A.R. Estimação de valores genéticos no melhoramento de *Eucalyptus*: seleção em um caráter com base em informações do indivíduo e de seus parentes. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, n.28-29, p.11-36, 1994.

RESENDE, M.D.V.; HIGA, A.R. Maximização da eficiência da seleção em testes de progênies de *Eucalyptus* através da utilização de blocos de todos os efeitos do modelo matemático. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, 1993

ROCQUE, C. **Grande Enciclopédia da Amazônia**. Belém: AMEL/Amazônia Ed., 1967. v.1, p.302-304

RONCERO MI, et al. A. Fusarium as a Model for Studying Virulence in Soilborne Plant Pathogens. **Physiological and Molecular Plant Pathology**. v.62, p. 87-98, 2003.

RONDON, G. A.; MATERAN. M.. Onoto and mammon – new hosts of *Fusarium decemcellulare* in Venezuela. **Fitopatologia Venezolana** v.3, p. 27-28, 1990.

ROSA, D.D.; KURAMAE, E.E.; FENILLE, R.C.; SOUZA, N.L. Caracterização citomorfológica, molecular e patogênica de isolados de *Rhizoctonia solani* na cultura da batata (*Solanum tuberosum*). **Summa Phytopathologica**, v. 31, n. 2, p.133-141, 2005.

RUEGGER, M.J.S.; TAUKE-TORNISIELO, S.M. Atividade da celulase de fungos isolados do solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins, São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica** v.27, p.205-211, 2004.

SANTOS, E. S. Microorganismos promissores para a degradação de compostos fenólicos presentes em bagaço de cana, lodo e águas residuárias de agroindústria sucro-alcooleira. Dissertação. 73 p. Maceió, 2007.

SCAPIM, C. A. S.; CARVALHO, C. G. P. de; CRUZ, C. D. Uma proposta de classificação dos coeficientes de variação para a cultura do milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 5, p. 683-686, maio 1995.

SECCO, R. de S. A Botânica da seringueira [*Hevea brasiliensis* (Willd. ex Adr. Jussieu) Muell. Arg (Euphorbiaceae). p. 1-24. In: ALVARENGA, A.P.; CARMO, C.A.F. de S. **Seringueira**. Viçosa, MG, EPAMIG-Viçosa, 2008, 894p.

SEIFERT, K. A., et al. The name *Fusarium moniliforme* should no longer be used. **Mycological Research** v.107, p. 643-644, 2003.

SHIN, K.-S.; KIM, C-J., Decolorisation of artificial dyes by peroxidase from the white-rot fungus, *Pleurotus ostreatus*. **Biotechnology Letters** v.20, n. 6, p.569-572, 1998

SILVA, D.C. et AL. Isolamento e seleção de fungos filamentosos do solo de sistemas agroflorestais do Município de Bom Jardim (PE) com base na capacidade de produção de enzimas hidrolíticas. **Revista Brasileira de Botânica**, v.34, n.4, p.607-610, 2011.

SKOUBOE, P.; FRISVAD, J.C.; TAYLOR, J.W.; LAURITSEN, D.; BOYSEN, M.; ROSSEN, L. Phylogenetic analysis of nucleotide sequences from the ITS region of terverticillate *Penicillium* species. **Mycological Research**, v. 103, n.7, p. 873-881, 1999.

SOUZA, H.G. **Resistência do eucalipto ao cancro de *Chrysoporthe cubensis* e *Botryosphaeria* sp.** 2008. 107 f. Dissertação (Mestre em Agronomia – Proteção de Plantas) – Universidade Estadual Paulista, Botucatu – SP.

SOUZA, I.A. **Avaliação de clones de seringueira (*Hevea* spp.) em Piracicaba-SP.** 2007. 72f. Dissertação (Mestrado em Agronomia - Fitotecnia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba-SP.

STANFORD, T.L.M.; ARAÚJO, J.M.; STANFORD, M.P. Atividade enzimática de microorganismos isolados de jacupé (*Pachyrhizus erosus* L. Urban). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.18, p.382-385, 1998.

STEFAN, G.R.W.; RALF, T.V.; RETO, B.; KURT, W.M. Cloning of *b*-tubulin and succinate dehydrogenase genes from *Uromyces fabae* and establishing selection conditions for their use in transformation. **Plant Pathology**, v.110, n.8, p.767-777, 2004.

STRADIOTO, M.F.; FURTADO, E.L.; MENTEN, J.O.M.; CARDOSO, R.M.G. *Fusarium moniliforme*, patógeno da seringueira na região de S.J. do Rio Preto-SP. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.13, n.2, p.283, 1988.

TOGAWA, M.; NOMURA, A. Dieback of Atemoya caused by *Fusarium decemcellulare* Brick. **Annals of the Phytopathological Society of Japan** v.64, p. 217-220, 1998.

TOOLE, R.E. Stem canker of red oaks caused by *Fusarium solani*. **Plant Disease Reporter** v.50, p.160–161,1966.

VALUEVA, T. A.; MOSOLOV, V. V. Role of inhibitors of proteolytic enzymes in plant defense against phytopathogenic microorganisms. **Biochemistry**, New York, v. 69, n. 1, p. 1305-1309, 2004.

VAN DER MERWE, M.; ERICSON, L.; WALKER, J. Evolutionary relationships among species of Puccinia and Uromyces (Pucciniaceae, Uredinales) inferred from partial protein coding gene phylogenies. **Mycological Research**, v. 111, n.2, p.163-175, 2007.

VENCOVSKY, R. Genética quantitativa. In: KERR, W.E. Melhoramento e genética. São Paulo, Melhoramentos, 1969, p. 17-37.

VENCOVSKY, R.; BARRIGA, P. **Genética biométrica no fitomelhoramento**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1992. 486p.

VENTURA, J. A. Taxonomia de *Fusarium* e seus segregados: I – História, meios e procedimentos de cultivo. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 7, p. 271-297.1999.

WEBSTER, C.C.; PAARDEKOOPE, E.C. The botany of the rubber tree. In: Webster, C.C.; Baulkwill, W.J. (Ed.) **Rubber**. New York: Longman, p.57-84, 1989.

WINDELS, C. E. *Fusarium*. In: SINGLETON, L. L.; MIHAIL, J. D.; RUSH, C. M. (Ed.). **Methods for research on soilborne phytopathogenic fungi**. St. Paul: The American Phytopathological Society, 266 p., 1992.

WYCHERLEY, P.R. The genus *Hevea*. In: Workshop on international collaboration hevea breeding and the selection and establishment of materials from the neo-tropic, Kuala Lumpur, 1977. 2p.

10. APÊNDICES

Tabela 17. Área das lesões (cm²) na casca externa (CE) e interna (CI) do clone GT 1 em duas avaliações 70 d.a.i. e 120 d.a.i.

Identificação	1 Av. (70 d.a.i.)				2 Av. (120 d.a.i.)			
	CE (cm ²)		CI(cm ²)		CE (cm ²)		CI(cm ²)	
F1	1,60	c	8,72	g	1,99	a	12,01	c
F2	1,25	b	1,47	a	2,05	b	12,96	d
F3	1,93	d	9,78	h	2,99	c	16,48	e
F4	1,45	b	6,79	f	1,91	a	11,47	c
F5	1,79	d	7,80	f	2,46	b	14,22	e
F6	1,26	a	6,89	f	1,85	a	15,99	e
F7	1,63	c	9,35	h	2,05	b	14,88	e
F8	1,68	d	7,87	f	2,03	b	13,72	e
F9	1,55	c	7,41	f	1,89	a	11,22	c
F10	1,87	d	9,32	h	2,21	b	14,37	e
F11	1,60	c	3,97	c	1,91	a	11,40	c
F12	2,11	d	12,23	i	2,65	c	15,30	e
F13	1,48	c	8,84	g	2,43	b	12,91	d
F14	1,79	d	9,64	h	2,46	b	18,00	e
F15	2,35	e	8,68	g	3,61	c	14,02	e
F16	1,91	d	15,48	i	2,48	b	28,49	f
F17	1,78	d	8,16	g	2,23	b	21,40	f
F18	1,56	c	6,67	f	2,04	b	10,68	b
F19	1,69	d	7,47	f	2,35	b	20,82	f
F20	1,53	c	4,34	d	2,00	a	10,96	b
F41	1,83	d	8,41	g	2,64	c	15,51	e
F42	1,58	c	2,43	b	1,88	a	12,20	c
F43	1,61	c	5,32	e	1,91	a	10,01	b
F44	1,96	d	7,82	f	2,42	b	13,20	d
F45	1,77	d	6,98	f	2,26	b	11,61	c
F46	1,86	d	6,47	f	2,23	b	15,62	e
F54	1,76	d	13,24	i	2,22	b	19,17	e
T	1,57	c	2,11	a	1,74	a	3,11	a
CV %	14,07		27,68		17,25		24,61	

Tabela 18. Área das lesões (cm²) na casca externa (CE) e interna (CI) do clone PR 255 em duas avaliações, aos 70 d.a.i. e 120 d.a.i.

Identificação	1 Av. (70 d.a.i.)				2 Av. (120 d.a.i.)			
	CE (cm ²)		CI(cm ²)		CE (cm ²)		CI(cm ²)	
F1	1,76	b	7,67	f	2,22	c	14,17	h
F2	1,65	a	7,97	f	2,09	c	14,13	h
F3	1,59	a	12,67	g	2,06	c	13,17	h
F4	1,71	b	5,06	c	2,08	c	9,37	d
F5	1,91	b	4,82	c	2,27	c	12,17	f
F6	1,37	a	4,49	c	4,03	d	7,19	c
F7	1,85	b	6,42	d	2,35	c	13,39	h
F8	1,78	b	6,26	d	2,48	c	11,23	f
F9	1,71	b	6,93	e	2,21	c	12,62	g
F10	1,72	b	6,56	d	1,97	b	11,53	f
F11	1,51	a	5,79	d	2,03	b	11,69	f
F12	2,35	c	4,88	c	3,02	c	7,93	c
F13	2,01	b	5,08	c	2,28	c	9,60	d
F14	1,84	b	9,71	g	2,34	c	18,67	h
F15	2,00	b	7,95	f	2,36	c	18,64	h
F16	1,69	b	7,04	e	2,38	c	20,47	h
F17	1,47	a	11,59	g	2,09	c	19,07	h
F18	1,56	a	11,09	g	2,26	c	13,99	h
F19	1,85	b	9,65	g	2,24	c	16,71	h
F20	1,51	a	4,46	c	2,09	c	15,00	h
F41	2,05	b	8,22	f	1,74	a	16,04	h
F42	1,86	b	4,11	c	2,83	c	6,68	b
F43	1,49	a	7,37	f	1,99	b	20,94	h
F44	1,87	b	4,60	c	2,20	c	8,35	d
F45	1,75	b	7,47	f	2,22	c	12,07	f
F46	1,90	b	6,91	e	2,10	c	12,25	f
F54	1,60	a	3,17	b	2,18	c	14,78	h
T	1,37	a	2,23	a	1,55	a	1,86	a
CV %	14,07		27,68		17,25		24,61	

Tabela 19. Área das lesões (cm²) na casca externa (CE) e interna (CI) do clone RRIM 600 em duas avaliações, aos 70 d.a.i. e aos 120 d.a.i.

Identificação	1 Av. (70 d.a.i.)				2 Av. (120 d.a.i.)			
	CE (cm ²)		CI (cm ²)		CE (cm ²)		CI (cm ²)	
F1	2,22	a	6,80	g	3,04	e	9,69	f
F2	2,12	a	7,55	g	2,42	c	15,21	g
F3	2,05	a	4,90	d	2,56	d	7,41	d
F4	2,15	a	6,30	g	2,86	e	9,80	f
F5	2,04	a	8,63	g	2,52	c	14,67	f
F6	2,06	a	4,65	d	2,25	b	8,91	e
F7	2,36	a	5,40	f	3,04	e	17,29	g
F8	1,81	a	5,53	f	2,33	b	9,66	f
F9	2,35	a	2,72	a	3,13	e	6,22	b
F10	2,44	a	7,07	g	2,90	e	11,84	f
F11	2,25	a	6,61	g	2,66	d	10,57	f
F12	2,1	a	16,67	h	2,85	e	22,78	g
F13	2,04	a	5,42	f	2,34	b	8,65	e
F14	2,41	a	4,48	d	2,93	e	15,25	g
F15	2,42	a	6,52	g	3,54	e	16,10	g
F16	2,20	a	6,15	g	3,35	e	12,11	f
F17	2,15	a	5,11	e	2,92	e	8,21	e
F18	2,15	a	4,10	c	2,75	d	7,10	c
F19	1,98	a	6,59	g	3,03	e	13,21	f
F20	2,19	a	6,71	g	2,71	d	11,25	f
F41	2,38	a	9,53	g	2,50	c	12,76	f
F42	2,15	a	8,26	g	2,59	d	12,35	f
F43	1,87	a	10,33	g	2,27	b	16,16	g
F44	2,01	a	5,47	f	2,31	b	8,77	e
F45	2,23	a	6,16	g	2,71	d	10,18	f
F46	3,44	b	10,21	g	3,73	e	14,36	f
F54	2,07	a	6,58	g	3,05	e	13,44	f
T	1,77	a	3,04	b	1,70	a	3,81	a
CV %	14,07		27,68		17,25		24,61	

Tabela 20. Componentes de Média (BLUP individual). Dados relativos à interação Genótipo x Isolado. Casca Externa (70 d.a.i.). Genótipo (1- GT1) (2-PR255) (3-RRIM 600).

Genótipo	Isolado	g	$\mu+g$	Ganho	Nova Média
3	46	1,34	3,22	1,34	3,21
3	10	0,49	2,36	0,91	2,79
3	15	0,47	2,35	0,76	2,64
3	14	0,46	2,34	0,69	2,56
3	41	0,43	2,31	0,63	2,51
3	7	0,42	2,29	0,6	2,47
2	12	0,41	2,29	0,57	2,45
3	9	0,41	2,28	0,55	2,43
1	15	0,41	2,28	0,54	2,41
3	11	0,32	2,19	0,52	2,39
3	45	0,31	2,18	0,49	2,37
3	1	0,29	2,17	0,48	2,36
3	16	0,28	2,15	0,46	2,34
3	20	0,27	2,15	0,45	2,33
3	4	0,24	2,11	0,44	2,31
3	42	0,24	2,11	0,42	2,3
3	18	0,23	2,11	0,41	2,29
3	17	0,23	2,11	0,4	2,27
3	2	0,21	2,09	0,39	2,27
1	12	0,2	2,07	0,38	2,26
3	12	0,19	2,07	0,37	2,25
3	54	0,17	2,05	0,36	2,24
3	3	0,15	2,03	0,36	2,23
3	6	0,15	2,03	0,35	2,22
2	41	0,15	2,02	0,34	2,22
3	T	0,15	2,03	0,33	2,21
3	5	0,15	2,02	0,32	2,2
3	13	0,14	2,02	0,32	2,19
2	13	0,012	1,99	0,31	2,19
3	44	0,12	1,99	0,31	2,18
2	15	0,11	1,98	0,3	2,17
3	19	0,09	1,97	0,29	2,17
1	44	0,007	1,94	0,29	2,16
1	3	0,004	1,92	0,28	2,15
1	16	0,03	1,91	0,27	2,14
2	5	0,03	1,9	0,26	2,14
2	46	0,02	1,9	0,26	2,13

Continua...

Genótipo	Isolado	g	$\mu+g$	Ganho	Nova Média
3	43	-0,0002	1,88	0,25	2,12
2	44	-0,0037	1,87	0,24	2,12
1	10	-0,008	1,86	0,24	2,11
1	46	-0,01	1,86	0,24	2,11
2	42	-0,01	1,86	0,23	2,1
2	27	-0,02	1,85	0,22	2,09
2	19	-0,02	1,85	0,21	2,09
2	14	-0,03	1,84	0,21	2,08
1	41	-0,04	1,83	0,2	2,08
3	8	-0,05	1,82	0,19	2,07
1	14	-0,07	1,8	0,19	2,07
2	8	-0,07	1,79	0,18	2,06
1	17	-0,08	1,79	0,18	2,05
1	5	-0,08	1,79	0,17	2,05
3	T	-0,08	1,78	0,17	2,04
1	45	-0,09	1,78	0,16	2,04
1	54	-0,09	1,77	0,16	2,03
2	21	-0,1	1,77	0,15	2,03
2	45	-0,1	1,76	0,15	2,02
2	10	-0,11	1,76	0,14	2,02
2	9	-0,13	1,74	0,14	2,01
2	4	-0,14	1,73	0,13	2,01
2	55	-0,14	1,73	0,13	2
2	16	-0,15	1,72	0,13	2
1	19	-0,16	1,71	0,12	2
1	8	-0,16	1,71	0,11	1,99
2	2	-0,19	1,67	0,11	1,99
1	7	-0,21	1,66	0,11	1,98
1	43	-0,23	1,64	0,1	1,98
1	11	-0,23	1,64	0,09	1,97
2	54	-0,23	1,64	0,09	1,97
1	1	-0,23	1,64	0,08	1,96
2	3	-0,24	1,63	0,08	1,96
1	42	-0,25	1,62	0,08	1,95
1	T	-0,26	1,61	0,07	1,95
2	18	-0,26	1,61	0,07	1,94
1	18	-0,26	1,6	0,06	1,94
1	55	-0,27	1,56	0,06	1,93
1	9	-0,28	1,59	0,05	1,93
1	20	-0,3	1,57	0,05	1,92

Continua...

Genótipo	Isolado	g	$\mu+g$	Ganho	Nova Média
2	20	-0,31	1,56.	0,04	1,92
2	11	-0,31	1,56	0,04	1,91
2	43	-0,32	1,55	0,03	1,91
1	13	-0,34	1,53	0,03	1,91
2	17	-0,34	1,52	0,02	1,9
1	4	-0,36	1,5	0,02	1,9
2	T	-0,43	1,44	0,01	1,89
2	6	-0,43	1,43	0,01	1,88
1	2	-0,53	1,34	0,007	1,88
1	6	-0,61	1,26	0	1,87

Tabela 21. Componentes de Média (BLUP individual). Dados relativos à interação Genótipo x Isolado. (Casca interna 70 d.a.i.) Genótipo (1- GT1) (2-PR255) (3-RRIM 600).

Genótipo	Isolado	g	$\mu+g$	Ganho	Nova Média
3	12	8,73	15,79	8,73	15,79
1	16	7,66	14,71	8,19	15,25
1	54	5,62	12,67	7,33	14,39
2	3	5,1	12,15	6,77	13,83
1	12	4,7	11,75	6,36	13,41
2	17	4,12	11,18	5,99	13,04
2	18	3,66	10,72	5,65	12,71
3	43	2,97	10,03	5,32	12,38
3	46	2,86	9,92	5,05	12,1
1	3	2,47	9,53	4,79	11,84
2	14	2,41	9,46	4,57	11,63
2	19	2,35	9,41	4,39	11,44
1	14	2,35	9,41	4,23	11,29
3	41	2,24	9,3	4,09	11,14
3	55	2,11	9,16	3,96	11,01
1	7	2,08	9,14	3,84	10,89
1	10	2,05	9,11	3,74	10,79
1	13	1,62	8,68	3,62	10,67
1	1	1,51	8,57	3,51	10,57
1	15	1,47	8,53	3,4	10,46
3	5	1,43	8,48	3,31	10,37
1	41	1,22	8,28	3,21	10,27
3	42	1,09	8,14	3,12	10,18
2	41	1,06	8,11	3,04	10,09
1	17	1	8,06	2,95	10,01
2	2	0,82	7,88	2,88	9,93
2	15	0,81	7,87	2,8	9,86
1	8	0,74	7,79	2,72	9,78
1	44	0,69	7,75	2,65	9,71
1	5	0,68	7,73	2,59	9,64
2	55	0,58	7,63	2,52	9,58
2	6	-2,33	4,72	0,6	7,65

Continua...

Genótipo	Isolado	g	$\mu+g$	Ganho	Nova Média
3	14	-2,34	4,71	0,56	7,62
2	20	-2,35	4,69	0,52	7,58
1	20	-2,47	4,58	0,048	7,54
2	42	-2,67	4,38	0,44	7,5
3	18	-2,68	4,37	0,41	7,46
1	11	-2,81	4,24	0,36	7,42
2	54	-3,53	3,52	0,31	7,37
3	56	-3,64	3,4	0,26	7,32
3	9	-3,93	3,12	0,22	7,27
1	42	-4,2	2,85	0,16	7,22
2	56	-4,38	2,66	0,11	7,16
1	56	-4,49	2,56	0,05	7,11
1	2	-5,08	1,97	0	7,05

Tabela 22. Componentes de Média (BLUP individual). Dados relativos à interação Genótipo x Isolado. (Casca externa 120 d.a.i.) Genótipo (1- GT1) (2-PR255) (3-RRIM 600).

Genótipo	Isolado	g	$\mu+g$	Ganho	Nova Média
1	26	1,36	3,78	1,36	3,78
3	46	1,11	3,53	1,24	3,65
1	15	1,01	3,43	1,16	3,58
3	15	0,95	3,36	1,11	3,53
3	16	0,79	3,2	1,05	3,46
3	9	0,6	3,02	0,97	3,39
3	54	0,54	2,95	0,91	3,33
3	7	0,53	2,94	0,86	3,28
3	1	0,53	2,94	0,82	3,24
3	19	0,52	2,94	0,79	3,21
2	12	0,51	2,93	0,77	3,19
1	3	0,48	2,9	0,74	3,16
3	14	0,43	2,85	0,72	3,14
3	17	0,43	2,84	0,7	3,12
3	10	0,41	2,82	0,68	3,1
3	4	0,37	1,79	0,66	3,08
3	12	0,36	2,78	0,64	3,06
2	42	0,35	2,77	0,63	3,04
3	18	0,28	2,7	0,61	3,03
3	55	0,25	2,67	0,59	3,01
3	20	0,25	2,66	0,57	2,99

Continua...

Genótipo	Isolado	g	$\mu+g$	Ganho	Nova Média
3	45	0,24	2,66	0,56	2,98
3	11	0,2	2,62	0,54	2,96
1	12	0,19	2,61	0,53	2,95
1	41	0,19	2,61	0,51	2,93
3	42	0,15	2,56	0,5	2,92
3	3	0,12	2,54	0,49	2,91
3	5	0,08	2,5	0,47	2,89
3	41	0,06	2,48	0,46	2,88
1	16	0,05	2,46	0,44	2,86
2	8	0,05	2,46	0,43	2,85
1	5	0,03	2,45	0,42	2,84
1	14	0,03	2,45	0,41	2,82
1	13	0,01	2,42	0,4	2,81
3	2	0,005	2,42	0,38	2,8
1	44	0	2,41	0,37	2,79
2	16	-0,02	2,38	0,36	2,78
2	15	-0,04	2,37	0,35	2,77
2	7	-0,05	2,36	0,34	2,76
1	19	-0,06	2,35	0,033	2,75
2	14	-0,06	2,35	0,32	2,74
3	13	-0,06	2,34	0,31	2,73
3	8	-0,07	2,34	0,03	2,72
3	44	-0,09	2,32	0,29	2,71
2	13	-0,11	2,3	0,28	2,7
2	5	-0,12	2,29	0,27	2,69
3	43	-0,12	2,29	0,27	2,68
1	45	-0,13	2,28	0,26	2,68
2	18	-0,13	2,28	0,25	2,67
3	6	-0,14	2,27	0,24	2,66
2	19	-0,15	2,26	0,23	2,65
1	17	-0,15	2,25	0,23	2,64
1	46	-0,15	2,25	0,22	2,64
1	54	-0,16	2,25	0,21	2,63
2	45	-0,16	2,25	0,021	2,62
2	1	-0,16	2,24	0,2	2,62
2	9	-0,17	2,24	0,19	2,61
1	10	-0,18	2,23	0,18	2,6
2	44	-0,18	2,23	0,18	2,6
2	54	-0,2	2,21	0,17	2,59
2	55	-0,25	2,15	0,16	2,59

Continua...

Genótipo	Isolado	g	$\mu+g$	Ganho	Nova Média
2	46	-0,26	2,14	0,16	2,58
2	20	-0,27	2,13	0,15	2,57
2	2	-0,28	2,14	0,14	2,56
2	17	-0,28	2,13	0,14	2,56
2	4	-0,28	2,12	0,13	2,55
2	3	-0,3	2,11	0,12	2,54
1	2	-0,31	2,1	0,12	2,54
1	7	-0,31	2,1	0,11	2,53
1	18	-0,32	2,09	0,11	2,52
2	11	-0,32	2,09	0,1	2,52
1	8	-0,33	2,08	0,09	2,51
1	20	-0,35	2,06	0,09	2,51
1	1	-0,36	2,05	0,08	2,5
2	43	-0,36	2,05	0,07	2,49
2	10	-0,37	2,04	0,07	2,49
1	55	-0,41	2	0,06	2,48
1	11	-0,42	1,98	0,06	2,48
1	43	-0,42	1,98	0,05	2,47
1	4	-0,42	1,98	0,04	2,46
1	9	-0,44	1,97	0,04	2,46
1	42	-0,45	1,96	0,03	2,45
1	6	-0,47	1,93	0,03	2,44
1	56	-0,58	1,83	0,02	2,44
2	41	-0,58	1,83	0,01	2,43
3	56	-0,61	1,8	0,008	2,42
2	56	-0,73	1,68	0	2,41

Tabela 23. Componentes de Média (BLUP individual). Dados relativos à interação Genótipo x Isolado. (Casca interna 120 d.a.i.) Genótipo (1- GT1) (2-PR255) (3-RRIM 600).

Genótipo	Isolado	g	$\mu+g$	Ganho	Nova Média
1	16	13,64	26,7	13,64	26,7
3	12	8,59	21,65	11,11	24,18
1	17	7,37	20,43	9,87	22,93
2	43	6,97	20,03	9,14	22,2
1	19	6,85	19,92	8,68	21,74
2	16	6,55	19,61	8,33	21,39
1	54	5,4	18,46	7,91	20,97
2	17	5,31	18,37	7,58	20,65
2	14	4,95	18,01	7,29	20,35
2	15	4,93	17,99	7,05	20,12
1	14	4,37	17,43	6,81	19,88
1	55	3,93	16,99	6,57	19,63
3	7	3,73	16,8	6,35	19,41
2	19	3,22	16,29	6,13	19,19
1	3	3,02	16,08	5,92	18,99
3	43	2,74	15,8	5,72	18,78
3	15	2,69	15,75	5,54	18,61
2	41	2,63	15,69	5,83	18,44
1	6	2,59	15,65	5,24	18,3
1	46	2,26	15,32	2,09	18,15
1	41	2,16	15,23	4,95	18,01
1	12	1,97	15,04	4,81	17,88
3	14	1,92	14,99	4,68	17,75
3	2	1,89	14,96	4,57	17,63
2	20	1,71	14,78	4,45	17,52
1	7	1,6	14,67	4,34	17,41
2	54	1,52	14,58	4,24	17,31
3	5	1,42	14,48	4,14	17,21
1	10	1,15	14,22	4,04	17,1
3	46	1,15	14,21	3,94	17,01
1	5	1,01	14,08	3,84	16,91
2	1	0,98	14,04	3,76	16,82
2	2	0,94	14,01	3,76	16,73
1	15	0,84	13,9	3,59	16,65

Continua...

Genótipo	Isolado	g	$\mu+g$	Ganho	Nova Média
2	18	0,82	13,88	3,51	16,57
1	8	0,58	13,65	3,43	16,49
2	55	0,44	13,51	3,35	16,41
3	54	0,34	13,4	3,27	16,33
3	19	0,14	13,2	3,19	16,25
1	44	0,12	13,19	3,11	16,18
2	7	0,11	13,17	3,04	16,1
2	3	0,09	13,15	2,97	16,03
1	2	-0,09	12,97	2,89	15,96
1	13	-0,14	12,92	2,83	15,89
3	41	-0,27	12,79	2,76	15,82
2	9	-0,39	12,67	2,69	15,75
3	55	-0,53	12,53	2,62	15,69
3	42	-0,63	12,43	2,55	15,62
2	46	-0,72	12,34	2,48	15,55
1	42	-0,77	12,29	2,42	15,49
2	5	-0,78	12,27	2,36	15,42
3	16	-0,84	12,22	2,29	15,36
2	45	-0,87	12,18	2,24	15,3
1	1	-0,93	12,13	2,18	15,24
3	10	-1,08	11,98	2,12	15,18
2	11	-1,21	11,84	2,06	15,12
1	45	-1,28	11,78	2	15,07
2	10	-1,36	11,7	1,94	15,01
1	4	-1,41	11,65	1,89	14,95
1	11	-1,47	11,58	1,83	14,89
3	20	-1,6	11,46	1,77	14,84
2	8	-1,62	11,44	1,72	14,78
1	9	-1,63	11,43	1,67	14,73
1	20	-1,86	11,2	1,61	14,68
1	18	-2,11	10,95	1,56	14,62
3	11	-2,2	10,86	1,5	14,56
3	45	-2,54	10,51	1,43	14,5
1	43	-2,7	10,35	1,38	14,44
3	4	-2,88	10,18	1,31	14,37
3	1	-2,98	10,08	1,25	14,32
3	8	-3,01	10,05	1,19	14,26
2	13	-3,07	9,99	1,13	14,19

 Continua...

Genótipo	Isolado	g	$\mu+g$	Ganho	Nova Média
2	4	-3,27	9,79	1,07	14,13
3	6	-3,67	9,38	1,01	14,07
3	44	-3,79	9,26	0,94	14,01
3	13	-3,9	9,16	0,88	13,94
2	44	-4,17	8,89	0,81	13,88
3	17	-4,29	8,76	0,75	13,81
2	12	-4,54	8,52	0,68	13,74
3	3	-4,99	8,06	0,61	13,67
2	6	-5,19	7,87	0,54	13,6
3	18	-5,27	7,78	0,47	13,53
2	42	-5,64	7,41	0,39	13,46
3	9	-6,05	7,01	0,32	13,38
3	56	-8,18	4,87	0,22	13,28
1	56	-8,8	4,26	0,11	13,18
2	56	-9,91	3,15	0	13,06