

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE AGRONOMIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA

SUSCETIBILIDADE DE ESPÉCIES DE *Eucalyptus* AO *Oidium eucalypti* E  
CONTROLE BIOLÓGICO

Marciéli Pitorini Bovolini  
Engenheira Florestal/UFSM

Dissertação apresentada com um dos requisitos à obtenção do Grau de Mestre em  
Fitotecnia  
Área de Concentração: Sanidade Vegetal

Porto Alegre (RS), Brasil.  
Fevereiro de 2017

### CIP - Catalogação na Publicação

Pitorini, Marciéli Bovolini  
Suscetibilidade de espécies de Eucalyptus ao  
Oidium eucalypti e controle biológico / Marciéli  
Bovolini Pitorini. -- 2017.  
74 f.

Orientadora: Marília Lazarotto.  
Coorientador: Roberto Lanna Filho.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Faculdade de Agronomia, Programa  
de Pós-Graduação em Fitotecnia, Porto Alegre, BR-RS,  
2017.

1. patologia florestal. 2. controle biológico. 3.  
viveiro florestal. I. Lazarotto, Marília, orient. II.  
Lanna Filho, Roberto, coorient. III. Título.

MARCIÉLI PITORINI BOVOLINI  
Engenheira Florestal - UFSM

## **DISSERTAÇÃO**

Submetida como parte dos requisitos  
para obtenção do Grau de

### **MESTRE EM FITOTECNIA**

Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia  
Faculdade de Agronomia  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Porto Alegre (RS), Brasil

Aprovado em: 22.02.2017  
Pela Banca Examinadora

Homologado em: 16.05.2017  
Por

MARÍLIA LAZAROTTO  
Orientadora - PPG Fitotecnia

SIMONE MUNDSTOCK JAHNKE  
Coordenadora do Programa de  
Pós-Graduação em Fitotecnia

ROBERTO LANNA FILHO  
Coorientador - PPG Fitotecnia

EDSON BERTOLINI  
PPG Fitotecnia/UFRGS

ANDREIA MARA ROTTA DE OLIVEIRA  
FEPAGRO

CACIARA GONZATTO MACIEL  
UNOESC

CARLOS ALBERTO BISSANI  
Diretor da Faculdade de  
Agronomia

## AGRADECIMENTOS

À Deus pela iluminação, proteção e bênçãos em minha vida.

À Marton Matana (*in memoriam*) quem me deixou além da saudade a maior lição de vida, viver os momentos únicos da vida perto de quem amamos, porque a vida é curta e estamos todos apenas de passagem por aqui.

Ao meu Pai José O. Bovolini, pela vida, pelo amor e apoio incondicional. Melhor pai do mundo, meu maior exemplo de vida, de dedicação, de honestidade e humildade. Por me ensinar a trabalhar com amor e dedicação sempre. Amo-te Pai.

À minha Mãe Marta P. Bovolini, pelo amor, e ensinar-me: a ser organizada, responsável, a perdoar e acreditar em dias melhores. Por todas as orações, dedicação e amor incondicional! Obrigada por ser o exemplo de mulher de fibra. Amo-te Mãe.

À minha irmã Francieli, pela irmandade, apoio, amizade e exemplo de dedicação, inteligência e profissional competente. Amo-te Mana.

Ao meu cunhado Claiton pela amizade, motivação e apoio nos estudos. Adoro-te.

À Janice de Fátima Facco pela amizade e irmandade, pela credibilidade, confiança, apoio, ajuda, motivação e carinho. A distância nunca separa uma amizade verdadeira. Obrigada por tudo minha amiga-irmã amada.

Ao querido Cristiano Dotto, pela amizade, pelo apoio, conselhos e pelas caronas Eldorado-SM sempre regadas a horas de risadas.

Aos queridos Mateus da Costa Mesquita Nunes, Álvaro Luiz Pasquetti Berguetti, Juliana Marquesan, Daniele Brum, Marcieli da Silva dos Santos, Indiará Sartori, Gisele Noal e Mateus da Costa pela amizade, apoio, torcida e emanção de energias positivas.

À minha madrinha do coração Liliane Abrão, por todo o amor, carinho, motivação, apoio, credibilidade e orações de luz. Amo-te Madrinha.

À amada e inesquecível Helana Ortiz Garcia, pela amizade verdadeira, ajuda nas atividades de laboratório, pelas conversas, confiança, carinho, pelos conselhos, dias e horas de trabalho cansativo, mas sempre edificantes e inesquecíveis. Minha amiga-anja.

As queridas Leise Heckler e Indianara Müller pelas conversas, carisma, risadas e horas de convivência no Departamento de Fitossanidade/UFRGS.

À Professora Marlove Fátima Brião Muniz, por ter me recebido com entusiasmo e motivação ainda no 1º semestre da graduação, pela convivência e aprendizados obtidos no Laboratório de Fitopatologia da UFSM.

À querida Caciara Gonzatto Maciel, por ser uma pessoa adorável, pela simplicidade, carisma, dedicação e por me ensinar muito durante os anos que estive no Laboratório Fitopatologia da UFSM. Obrigada por tudo.

À minha orientadora Professora Marília Lazarotto, pela convivência, atenção e ajuda na elaboração dos trabalhos.

Ao meu coorientador Roberto Lanna Filho, pela convivência, ajuda e pela estrutura de laboratório indispensável na execução das atividades.

Aos Professores Edson Bertolini e Rafael Gomes Dionello pela convivência, simplicidade, apoio, ajuda e por serem prestativos e alegres sempre.

Ao Eng. Agrônomo Mateus Pereira Gonzatto pela paciência, simplicidade, disponibilidade e pelas longas horas de ajuda nas análises estatísticas dos dados.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul pela oportunidade de realizar o mestrado.

À Celulose Riograndense pela doação das mudas de eucaliptos e ajuda de custos na execução desse trabalho.

Às queridas Alana Dorigon e Natália Maciel, pelas risadas, horas de descontração, conversas, carinho e convivência diária.

Ao querido Júlio Rieger pelo coleguismo, convivência, paciência, simplicidade e parceria nas execuções de experimentos extras.

Às queridas Mara Winhelmann, Priscila Paris, Marina Martinello, Taís Altemman, Priscila Rollo, Manuela e Vanessa pelas horas de descontração, conversas e carisma.

Aos bolsistas e voluntários de iniciação científica Márcio Hilgert, Carolina Brose, Carolina Bonotto, Larissa de Sá e Bárbara Andrezza pela ajuda na execução das atividades de pesquisa, carisma e por serem prestativos.

Ao técnico administrativo Antônio Vieira Nunes pela disponibilidade, por ser prestativo e pelos muitos causos e risadas nas viagens até Barra do Ribeiro/RS.

Aos técnicos administrativos Marisa, Idenir, Cleusa, Detamar e Ernani por serem simpáticos, prestativos e educados.

À funcionária do Departamento de Fitossanidade Dn. Lorena sempre simpática, prestativa e querida.

À todas as pessoas que mesmo não sendo citadas contribuíram de alguma maneira nesta etapa de minha vida.

**Muito Obrigada!**

# SUSCETIBILIDADE DE ESPÉCIES DE *Eucalyptus* AO *Oidium eucalypti* E CONTROLE BIOLÓGICO<sup>1</sup>

Autora: Marciéli Pitorini Bovolini

Orientadora: Marília Lazarotto

## RESUMO

A utilização de fungicidas químicos para o controle de doenças em plantas tem causado sérios impactos ambientais e ao ser humano. Diante disso, o uso de produtos de controle biológico à base de *Trichoderma* spp. e *Bacillus* spp. tem sido uma alternativa promissora para o controle de fitopatógenos em diversas culturas. Os objetivos deste trabalho foram: identificar o agente causal do oídio do eucalipto, realizar teste de suscetibilidade do agente causal de oídio em quatro clones de *Eucalyptus* spp. e testar e selecionar o agente de controle biológico mais eficaz, quando aplicado de forma preventiva ou curativa, em mudas de *Eucalyptus benthamii* para o seu controle. Para identificação, foi realizado o sequenciamento da região *Internal Transcribed Spacer* (ITS) e a sequência obtida comparada com bancos de dados disponíveis. Para o teste de suscetibilidade foram utilizadas mudas sadias de cada clone, as quais foram previamente inoculadas com oídio e avaliadas semanalmente. Para a seleção do melhor agente de controle biológico, foram realizados oito tratamentos, quatro com espécies de *Trichoderma*, um com *Bacillus* spp., dois com fungicidas químicos (controles positivos) e o tratamento testemunha. Estes foram aplicados preventivamente, sete dias antes da inoculação de oídio; e curativamente, após dez dias da inoculação e aparecimento dos primeiros sinais do patógeno. A avaliação da severidade de oídio nas mudas foi realizada semanalmente com o auxílio de uma escala descritiva de notas. As notas desta escala foram utilizadas para o cálculo do índice de doença (ID). Para análise da suscetibilidade dos clones as variáveis incidência da doença e ID foram submetidas à ajuste não-linear em relação ao tempo, sendo utilizados os modelos matemáticos: monomolecular, logístico e de Gompertz. E para a avaliação de cada tratamento foi realizado o teste de médias utilizando as variáveis: área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), incidência da doença e ID, utilizando o programa estatístico SAS 9.4. A análise molecular confirmou a identidade do fungo como *Oidium eucalypti*. O teste de suscetibilidade mostrou que o fungo foi patogênico para os quatro clones avaliados, sendo mais agressivo a um dos clones de *E. benthamii*. Os melhores tratamentos biológicos como controle preventivo foram obtidos com a aplicação de *Bacillus* spp. e *Trichoderma atroviride* e como tratamento curativo apenas aplicação de *Bacillus* spp. demonstrou efetividade no controle de oídio.

**Palavras-chave:** oídio; *Eucalyptus benthamii*; viveiro florestal.

---

<sup>1</sup> Dissertação de Mestrado em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (74 f.) Fevereiro, 2017.

# SUSCEPTIBILITY OF *Eucalyptus* SPECIES TO *Oidium eucalypti* AND BIOLOGICAL CONTROL<sup>1</sup>

Author: Marciéli Pitorini Bovolini

Orientadora: Marília Lazarotto

## ABSTRACT

The use of chemical fungicides to control plant diseases has caused serious environmental and human impacts. Therefore, the use of biological control products such as *Trichoderma* spp. and *Bacillus* spp. has been an important alternative for phytopathogens control. The objectives of this work were: to identify the causal agent of powdery mildew in eucalyptus, to perform susceptibility test of the causal agent in four different clones of *Eucalyptus* spp. and to test and select the biological control agent applied in a preventive and curative way in *Eucalyptus benthamii* seedlings for its control. For identification, the Internal Transcribed Spacer region (ITS) was sequenced and the sequence obtained was compared to the available databases. For pathogenicity test, healthy seedlings of each clone were used, inoculated with powdery mildew and evaluated weekly. For the selection of more efficient biological control agent, eight treatments were performed, four with *Trichoderma* species, one with *Bacillus* spp., two with chemical fungicides (positive control) and a control treatment with water application only. These were applied preventively, seven days before inoculation of powdery mildew; and curatively, after ten days of inoculation and appearance of powdery mildew. Evaluation of the mildew severity in the seedlings performed weekly with the help of a descriptive scale of notes. The notes of this descriptive scale were used to calculate the disease index (ID). For temporal analysis of the behavior of the disease and each treatment, the variables incidence of the disease and ID were submitted to the non-linear adjustment in relation to time, being used the mathematical models: monomolecular, logistic and Gompertz. For the evaluation of each treatment, the means test was performed using the following variables: area under the disease progress curve (AACPD), disease incidence and ID, using the statistical program SAS 9.4. Molecular analysis confirmed the identity of the fungus as *Oidium eucalypti*. The susceptibility test showed that the fungus was pathogenic for the four evaluated clones, being more aggressive to one of the clones of *E. benthamii*. The best biological treatments as preventative control were obtained with the application of *Bacillus* spp. and *Trichoderma atroviride* and as a curative treatment only application of *Bacillus* spp. demonstrated efficiency in the control of powdery mildew.

**Key - words:** powdery mildew; *Eucalyptus benthamii*; forest nursery.

---

<sup>1</sup> Master's dissertation in Plant Science, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (74 p.) February, 2017.

## SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Referências Bibliográficas.....	4
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	6
2.1 <i>Eucalyptus</i> spp.....	6
2.1.1 <i>Eucalyptus benthamii</i> .....	7
2.1.2 <i>Eucalyptus dunnii</i> .....	8
2.1.3 <i>Eucalyptus globulus</i> .....	9
2.1.4 <i>Eucalyptus urophylla</i> .....	9
2.2 Oídios.....	10
2.3 Controle biológico.....	12
2.3.1 <i>Trichoderma</i> spp. ....	15
2.3.2 <i>Bacillus</i> spp. ....	17
2.4 Referências bibliográficas.....	20
3 CAPÍTULO 1 - Suscetibilidade de clones de <i>Eucalyptus</i> spp. à doença oídio do eucalipto.....	28
4 CAPÍTULO 2 - Controle preventivo e curativo de <i>Oidium eucalypti</i> em mudas clonais de <i>Eucalyptus benthamii</i> .....	47
5 Considerações Gerais.....	64

## RELAÇÃO DAS TABELAS

	Página
<b>CAPÍTULO 1</b>	
1. Coeficientes de determinação (R <sup>2</sup> ) e quadrado médio do erro (QME) dos modelos monomolecular, logístico e de Gompertz, de análise temporal do progresso do índice de doença e da incidência de <i>Oidium eucalypti</i> em mudas de quatro diferentes clones de <i>Eucalyptus</i> spp. Porto Alegre, RS, 2015.....	37
2. Parâmetros <sup>1</sup> estimados pelo modelo de Gompertz para análise temporal do índice de doença e da incidência de <i>Oidium eucalypti</i> em mudas de quatro clones de <i>Eucalyptus</i> spp. Porto Alegre, RS, 2015.....	39
3. Índice de doença final (IDf) e incidência final (If) obtida aos 29 dias de avaliações da doença causada por <i>Oidium eucalypti</i> nos diferentes clones de eucalipto. Porto Alegre, RS, 2015.....	41
<b>CAPÍTULO 2</b>	
1. Descrição dos tratamentos biológicos e químicos utilizados para o controle de oídio em <i>Eucalyptus benthamii</i> . Porto Alegre, RS, 2016.....	53
2. Escala descritiva utilizada para avaliar da severidade do oídio em mudas clonais de <i>Eucalyptus benthamii</i> . Porto Alegre, RS, 2016.....	54
3. Avaliação do Índice de Doença de McKinney final (ID final), da Incidência final (I final) e das Áreas Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD) de ID e I, valores em porcentagem (%) dos tratamentos preventivos aplicados via foliar em mudas clonais de <i>Eucalyptus benthamii</i> para o controle de <i>Oidium eucalypti</i> . Porto Alegre, RS, 2015.....	56
4. Avaliação do Índice de Doença de McKinney final (ID final), da Incidência final (I final) e das Áreas Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD) de ID e I, valores em porcentagem (%), dos tratamentos curativos aplicados via foliar em mudas clonais de <i>Eucalyptus benthamii</i> para o controle de <i>Oidium eucalypti</i> . Porto Alegre, RS, 2015.....	59

## RELAÇÃO DE FIGURAS

Página

### CAPÍTULO 1

1. Dendrograma filogenético construído para o isolado de oídio proveniente de mudas clonais de *Eucalyptus* spp. baseado no método estatístico “Neighbor-joining”, derivado das sequências das regiões ITSr DNA e alinhadas pelo Modelo Tamura-Nei. Porto Alegre, RS, 2015..... 35
2. Sintomas de oídio em mudas clonais de *Eucalyptus* spp. e detalhe da esporulação na folha (A); Conídioforos e conídios de *Oidium eucalypti* (B); conídios de *Oidium eucalypti* onde a régua representa a medida em µm com aumento de 400 x (C). Porto Alegre, RS, 2015..... 36
3. Progresso temporal do índice de doença (ID) e da incidência (I) de epidemias de oídio (*Oidium eucalypti*) em quatro clones de eucalipto conforme Modelo de Gompertz. Porto Alegre, RS, 2015. Sendo: Clone 1 (*Eucalyptus benthamii*), Clone 2 (*E. dunnii*), Clone 3 (*E. benthamii*) e Clone 4 (*E. urophylla* x *E. globulus*)..... 38
4. Correlação dos resíduos entre o índice de doença (ID) e a incidência (I) de *Oidium eucalypti* em quatro clones de eucaliptos. Clone 1 (*Eucalyptus benthamii*); clone 2 (*E. dunnii*); clone 3 (*E. benthamii*); clone 4 (*E. urophylla* x *E. globulus*);\*\*\*\*p<0,0001; r, coeficientes de correlação de Pearson. Porto Alegre, RS, 2015..... 42

## 1 INTRODUÇÃO

As doenças conhecidas como oídios são causadas por fungos que apresentam pulverulência do micélio e seus conídios se desenvolvem em cadeias na superfície dos tecidos atacados. São fungos biotróficos que raramente matam seus hospedeiros, mas utilizam seus nutrientes, reduzem a atividade fotossintética da planta, aumentam a respiração e a transpiração, e, conseqüentemente, reduzem o desenvolvimento e a produção (AGRIOS, 1998).

Em espécies do gênero *Eucalyptus*, o oídio é relatado como uma doença cosmopolita sendo relatada na África do Sul, Argentina, Brasil, Austrália, Europa e Estados Unidos (SILVA *et al.*, 2001) e é considerada a principal doença em viveiros, casas de vegetação e minijardins clonais de diversas espécies do gênero (VALERIANO, 2013). Alfenas *et al.* (2009) relatam que o patógeno tem sido frequentemente encontrado sobre plantas em viveiros, minijardins clonais hidropônicos de inundação temporária ou em canaletões com irrigação por gotejamento, em que há pouco ou nenhum molhamento foliar.

O fungo se dissemina através do vento, respingos de água e pelo contato entre plantas infectadas e sadias (FURTADO *et al.*, 2000). Mucci *et al.* (1980) relacionam a doença ao agente etiológico *Oidium eucalypti* Rostr., entretanto, Brown e Ferreira (2000) relatam que existem mais de sete espécies de oídio associadas à diferentes espécies de *Eucalyptus*. A dificuldade em confirmar a espécie se deve ao fato da fase sexuada dificilmente ser relatada em eucaliptos no Brasil (SANTOS *et al.*, 2001). Porém, Krugner & Auer (2005) identificaram *Sphaerotheca pannosa* (sinonímia: *Podosphaera pannosa*) através de inoculações cruzadas, confirmando a identidade como *Oidium eucalypti*.

A correta identificação da espécie do patógeno é importante para que todas as relações do ciclo patógeno-hospedeiro possam ser compreendidas. O conhecimento dessas interações é imprescindível não só para o conhecimento e entendimento da doença em si, mas, principalmente, para estratégias de controle, visando interferir em seu ciclo (BERGAMIN FILHO & AMORIM, 1996).

A identificação de fungos fitopatogênicos é, muitas vezes, baseada em caracteres morfológicos, porém, em muitos gêneros, tais caracteres são de difícil observação em populações naturais, além da possibilidade de serem afetados pelo ambiente (FALEIRO *et al.*, 2003). De acordo com Lima *et al.* (2008), a classificação ideal deve estar baseada na filogenia dos microrganismos. Uma das técnicas moleculares amplamente utilizadas para a identificação de fungos é a da Reação da Polimerase em Cadeia (PCR), que permite a amplificação de fragmentos específicos de DNA de células fúngicas, vivas ou mortas (PINHEIRO, 2004). Uma das regiões mais utilizadas para a identificação molecular de fungos é a denominada “Internal Transcribed Spacer” (ITS), pois esses genes possuem sequências mais conservadas filogeneticamente e, portanto, são mais adequados para estudos de biodiversidade (REIS JUNIOR *et al.*, 2006). Além disso, na grande maioria das bases de dados de sequências fúngicas, esta região é a mais frequente.

Dentre as espécies de eucalipto hospedeiras do oídio, Alfenas *et al.* (2009) citam *Eucalyptus urophylla*, *E. grandis* e seus híbridos, *E. camaldulensis*, *E. globulus*, *E. nitens*, *E. pellita*, *E. robusta*, *E. saligna*, *E. tereticornis*, *E. viminalis*, *Corymbia citriodora*, *C. maculata* e *C. torelliana*.

Na região sul do Brasil, espécies de eucalipto resistentes ao frio têm sido introduzidas em áreas de plantios que anteriormente eram plantadas com *Pinus* spp. ou mesmo em áreas em que a ocorrência de geadas é frequente. Dentre estas espécies, *E. benthamii* é a espécie mais promissora para localidades com frio intenso, porém mudas dessa espécie são frequentemente atacadas pelo oídio em várias regiões do Paraná e de Santa Catarina (SCHULTZ *et al.*, 2012) e também tem sido encontrado em grandes viveiros de produção desta espécie no Rio Grande do Sul. De acordo com Bizi *et al.* (2008), o patógeno está disseminado nas regiões Sul e Sudeste, de importância localizada e sazonal; e no Paraná, tem-se verificado a sua ocorrência em árvores jovens e em mudas, desde o fim do verão até a primavera, quando há predominância de temperaturas amenas e baixa umidade relativa. Essa doença pode causar danos severos quando não controlada adequadamente (BROWN & FEERREIRA, 2000).

Atualmente, existe apenas um fungicida químico registrado para o controle do oídio em eucaliptos. Mesmo assim, há necessidade de desenvolvimento de novas estratégias e busca por produtos alternativos para o controle deste patógeno que ataca espécies florestais, e conseqüentemente evitar a utilização de fungicidas agressivos ao meio ambiente, especialmente para empresas que possuem certificação florestal, sendo que

muitos produtos que são autorizados para uso no país podem, eventualmente, serem proibidos pela certificação para comercialização externa.

Diante disso, o presente trabalho teve por objetivos:

- Confirmar a identidade de oídio em mudas clonais de *Eucalyptus* spp.;
- Avaliar a suscetibilidade de clones de *Eucalyptus* spp. a doença oídio em minijardim clonal.
- Avaliar a eficiência de produtos biológicos à base de *Trichoderma* spp. e *Bacillus* spp. como tratamentos preventivos para controle de *Oidium eucalypti* em mudas clonais de *E. benthamii*; e
- Avaliar a eficiência de produtos à base de *Trichoderma* spp., e *Bacillus* spp. para controle de *O. eucalypti* em mudas clonais de *E. benthamii* após a inoculação do patógeno.

## 1.1 Referências Bibliográficas

- AGRIOS, G.N. **Plant Pathology**. 3th ed. San Diego. Academic. 1998.
- ALFENAS, A.C. et al. **Clonagem e doenças do eucalipto**. 2 ed. Viçosa: Ed. UFV, 2009. 500 p.
- BERGAMIN FILHO, A.; AMORIM, L. **Doenças de plantas tropicais: epidemiologia e controle econômico**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1996. 299p.
- BIZI, R.M. et al. Produtos alternativos no controle do oídio em mudas de eucalipto. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 34, n. 2, p. 144-148, 2008.
- BROWN, B. N.; FERREIRA, F. A. Diseases during propagation of eucalypts. In: KEANE, P. J. et al. (Ed). **Diseases and pathogens of eucalypts**. Collingwood: CSIRO Publish, 2000. p. 119-151.
- FALEIRO, F.G. et al. Uso de marcadores RAPD na classificação de isolados de *Phytophthora* spp. causadores da podridão parda do cacaueiro no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 3, p.312-315, 2003.
- FURTADO, E. L. et al. **Doenças em viveiros de Eucalyptus sp: Diagnóstico e Manejo**. Votorantim / Celulose e Papel. Botucatu, SP, p. 23, 2000.
- KRUGNER, T. L.; AUER, C. G. Doenças dos eucaliptos. In: KIMATI, H. et al. **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 4. ed. São Paulo: Agronômica CERES, 2005, p. 319-332.
- LIMA, A.A. et al. **Identificação molecular de linhagens de fungos pertencentes aos gêneros Aspergillus, Penicillium e Fusarium utilizando marcadores RAPD**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2008. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 218).
- MUCCI, E. S. F.; PITTA, G. P. S.; YOKOMIZO, N. K. S. **O Oídio em mudas de eucalipto**. São Paulo. Instituto Florestal/Instituto Biológico, 1980. (Mimeografado)
- PINHEIRO, M.R.R. **Estudo de variabilidade genética de Aspergillus flavus com base para o desenvolvimento de PCR multiplex para detecção de fungos produtores de aflatoxinas em castanha-do-brasil e castanha-de-caju**. 2004. 149 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Genômicas e Biotecnologia) – Universidade Católica de Brasília, Brasília, 2004.
- REIS JUNIOR, F.B. et al. Restrição do 16S-23S DNAr intergênico para avaliação da diversidade de *Azospirillum amazonense* isolado de *Brachiaria* spp. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 3, p. 431-438, 2006.
- SANTOS, A. F.; AUER, C. G.; GRIGOLETTI JÚNIOR, A. **Doenças do eucalipto no sul do Brasil: identificação e controle**. Colombo; Embrapa Florestas, 2001. (Circular Técnica, n.45)

SCHULTZ, B. et al. Uso do silicato de potássio no controle de oídio em mudas de *Eucalyptus benthamii*. **Pesquisa Florestal Brasileira**. Colombo, v. 32, n.69, p. 93-99, 2012.

SILVA, M.D.D. et al. Etiologia do oídio do eucalipto. **Fitopatologia brasileira**, Brasília, v. 26, n. 2 p. 201-205, 2001.

VALERIANO, R. **Escala diagramática e reação diferencial de clones para oídio do eucalipto**. 2013. 52 p. Dissertação (Mestre em Agronomia/Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 *Eucalyptus* spp.

As espécies pertencentes ao gênero *Eucalyptus* tem origem na Austrália, Indonésia e outras ilhas da Oceania. No Brasil, os primeiros estudos científicos com eucalipto foram iniciados em 1904, pelo Eng. Agrônomo Edmundo Navarro de Andrade, no Horto Florestal de Rio Claro, SP, pertencente à ex-Companhia Paulista de Estradas de Ferro. A partir de então, surgiram diversas pesquisas na área de melhoramento genético do gênero florestal, possibilitando o ganho genético e o aumento na produção de suas espécies. Até os dias atuais, são constantes as pesquisas científicas a fim de buscar melhorias na produtividade e economia do setor florestal.

O avanço das plantações florestais no Brasil e as demandas do mercado interno e externo alavancou o crescimento das áreas de plantios de eucalipto sendo ocupada em 2013 uma área de 309.125 hectares somente no estado do Rio Grande do Sul, com total de 5.558.653 hectares de floresta de eucalipto em todo o país (IBÁ, 2015). Segundo o IBGE (2016) são ao total 7.444.731 hectares de floresta de eucalipto plantada no Brasil, até o ano de 2015.

Atualmente no Brasil, as espécies mais plantadas são: *E. saligna*, *E. urophylla*, *E. grandis*, *E. viminalis*, *Corymbia citriodora*, *E. camaldulensis*, híbridos de *E. grandis* x *E. urophylla* e outros. Estas espécies possuem propriedades e características da madeira desejáveis a produção industrial e madeireira. No entanto, pesquisas com a espécie *E. benthamii* têm sido realizadas devido a sua produtividade e, principalmente, a boa adaptação à climas frios e com ocorrência de geadas.

Entretanto, doenças causadas por fatores bióticos em eucalipto estão entre as principais causas de danos e prejuízos da produção, tanto para pequenos produtores, quanto para as grandes empresas do setor florestal. As principais doenças que atacam mudas de eucaliptos são as causadas pelos fitopatógenos, tais como: mofo-cinzento causado por *Botrytis cinérea*; *Phytophthora* spp., *Pythium* sp. e *Rhizoctonia* spp., que causam tombamentos e podridão de estacas; *Cylindrocladium* spp. que causa a chamada canela-preta; antracnose causada por *Colletotrichum gloeosporioides*; ferrugem causada por

*Puccinia psidii*; manchas foliares causadas por *Quambalaria eucalypti* e oídio do eucalipto causado por *Oidium eucalypti* (ALFENAS *et al.*, 2009).

Dentre estas doenças, o ataque de *Oidium eucalypti* tem ocorrido, com maior frequência, em mudas de *Eucalyptus* spp. em viveiros, principalmente em minijardins clonais em que há ambiente e temperatura favoráveis ao desenvolvimento e disseminação do patógeno. Em minijardins clonais no estado do Rio Grande do Sul, a maior incidência e ataque de oídio tem sido observada em clones de *E. benthamii*. Considerando que esta espécie tem sido plantada na região sul pela expectativa de maior produtividade e também por ser mais resistente ao clima frio, típico da região, há maior preocupação em busca de soluções para controle ou redução do ataque de oídio em mudas desta espécie.

### **2.1.1 *Eucalyptus benthamii***

*Eucalyptus benthamii* Maiden et Cambage é uma espécie arbórea da família Myrtaceae, originária de região fria da Austrália. É encontrado em áreas restritas, ocorrendo ao oeste da cidade de Sydney, em planícies ao longo do rio Nepean e seus tributários (HIGA, 1999). Segundo Higa & Pereira (2003), mesmo apresentando características diferentes, essa espécie faz parte do mesmo grupo botânico do *Eucalyptus viminalis* Labill.

A espécie *E. benthamii* foi introduzida no Sul do Brasil, no final da década de 80 e tornou-se uma das mais promissoras para ser plantada em áreas com ocorrência de geadas severas, que até então, estavam sendo ocupadas com *Eucalyptus dunnii* Maiden, *Eucalyptus grandis* W. Hill e *Eucalyptus saligna* Sm (SCHULTZ, 2011). Apresenta elevada resistência em clima frio, onde ocorrem geadas frequentes, possui crescimento rápido e boa forma de fuste (GRAÇA *et al.*, 1999). A espécie é indicada para plantios em regiões com temperaturas mínimas de até 10 °C negativo, sendo que, em temperaturas menores, podem ocorrer atrasos no desenvolvimento das plantas, porém é pouco expressivo (PALUDZYSZYN FILHO *et al.*, 2006).

De acordo com Higa & Carvalho (1990), em Dois Vizinhos, estado do Paraná, *E. benthamii* aos 45 meses de idade apresentou sobrevivência de 70% com uma altura média de 16 m e diâmetro a altura do peito (DAP) de 15 cm. No estado de Santa Catarina, *E. benthamii* mostrou crescimento satisfatório em plantios experimentais, apresentando boa resistência a geadas (HIGA & PEREIRA, 2003). Os mesmos autores citados também relatam que *E. benthamii*, aos 8 anos de idade, apresentou altura média de 21,7 m e DAP médio de 18,2 cm, em estudo realizado em Colombo, estado do Paraná.

Em estudo referente a técnicas de melhoramento genético de *E. benthamii* verificou-se que a espécie se reproduz bem em sistema de manejo de minicepas em tubete e em cultivo hidropônico, sendo uma alternativa promissora para produção de propágulos vegetativos (CUNHA *et al.*, 2005).

A madeira de *E. benthamii* apresenta baixa resistência, não é aconselhada para serraria por apresentar rachaduras de topo das toras e de tábuas, além de apresentar empenamentos e rachaduras internas durante a secagem (HIGA & PEREIRA, 2003). Segundo os mesmos autores, sua madeira é indicada para produção de lenha, carvão e celulose. Além disso, possui adequação para produção de painel colado lateralmente (MARTINS, 2011).

Segundo Müller *et al.* (2014), nos últimos anos, extensas áreas de produção de *E. benthamii* se concentraram na região sul do Brasil, principalmente em área com maiores ocorrências de geadas. Aliado ao crescimento da produção de mudas e expansão das áreas de plantios de *E. benthamii* para produção de celulose na região sul do Brasil, também é crescente o aumento de problemas fitossanitários.

### **2.1.2 *Eucalyptus dunnii***

A espécie *Eucalyptus dunnii* Maiden é encontrada naturalmente em regiões de baixas altitudes e no fundo de vales em regiões de solos basálticos, e nas bordas de florestas tropicais na Austrália (FAO, 1979). As médias das temperaturas máximas do mês mais quente estão entre 27 e 30 °C, e as médias das mínimas do mês mais frio variam de 0 a 3 °C. A precipitação pluviométrica média anual oscila de 845 a 1950 mm. A planta pode atingir 50 m de altura, e possuir diâmetro à altura do peito entre 1 e 1,5 m (HIGA, 1998; JOVANOVIĆ *et al.*, 2000).

Possui massa específica aparente elevada, alcançando 0,80 g/cm<sup>3</sup> a 12% de umidade (ROCHA, 2000), considerada uma madeira pesada que pode ser utilizada em situações que exigirem maior resistência mecânica. *Eucalyptus dunnii* apresenta elevadas tensões de crescimento, as quais se manifestam na madeira serrada através de rachaduras e empenamentos (ROCHA & TRUGILHO, 2006).

*E. dunnii* tem-se destacado no Brasil pelo rápido crescimento, uniformidade dos talhões, forma das árvores e resistência à geada não muito severa (SCHNEIDER *et al.*, 1997). Por possuir resistência a geadas, é amplamente plantada na região Sul, onde inicialmente também era destinada para a produção de celulose (ROCHA & TRUGILHO, 2006).

### 2.1.3 *Eucalyptus globulus*

*Eucalyptus globulus* Labill é uma espécie com distribuição natural bastante restrita, encontrando-se limitada a pequenas manchas da zona litorânea do Sudeste e Sul da Tasmânia, em altitudes compreendidas entre o nível do mar até 400 metros. A latitude varia para esta espécie de 38 a 43° Sul. O clima de ocorrência natural é temperado frio, uniforme de úmido a subúmido. As temperaturas médias anuais máximas estão em torno de 21°C e as mínimas, 4°C. A precipitação média anual varia entre 500 e 1.500 milímetros (POYNTON, 1979).

Segundo Goes (1991) *Eucalyptus globulus* foi a primeira espécie de eucalipto que se espalhou pelo mundo devido as suas características de rápido crescimento e fácil adaptação, sendo implantada em Portugal, Espanha, Uruguai, Chile, Peru, Equador, Bolívia, Brasil (especialmente no estado do Rio Grande do Sul), Argentina, Estados Unidos e Etiópia. A celulose de *E. globulus* apresenta altos rendimentos e elevada resistência à tração e ao arrebentamento (BARRICHELO & FOELKEL, 1976).

Segundo Assis & Ferreira (1996), *E. globulus* apresenta vantagens industriais em relação a outras espécies, como, o baixo teor de lignina e o alto rendimento em celulose. E como desvantagem, apresenta maior acúmulo de íons na madeira do que as espécies tradicionais. Além disso, as cascas de *E. globulus* têm uma quantidade considerável de ácidos triterpênicos, tais como, ácidos betulínico, ursólico e oleanólico, e também  $\beta$ -amirina, que têm uma gama de atividades biológicas que podem ser exploradas na indústria farmacêutica (PATINHA *et al.*, 2013).

### 2.1.4 *Eucalyptus urophylla*

*Eucalyptus urophylla* ocorre naturalmente em solos vulcânicos em sete ilhas no leste da Indonésia (PEPE *et al.*, 2004), sendo introduzida no Brasil em 1919.

A espécie possui boa produtividade e potencialidade para diversas regiões do Brasil, e possui como grande qualidade a tolerância ao ataque do cancro (*Cryphonectria cubensis*), muito comumente encontrado em condições ambientais sob climas tropicais (MORI *et al.*, 1988).

A madeira de *E. urophylla* é leve, o cerne é claro a castanho-avermelhado, às vezes, marrom avermelhado escuro, o alburno é branco, creme ou rosa-claro tendo de 20-60 mm de espessura, e é distintamente demarcado pelo cerne. As fibras são relativamente curtas, com cerca de 1,0 mm de comprimento. A espécie é extremamente suscetível à competição

nos estágios iniciais e deve ser mantida livre de ervas daninhas por 6-12 meses (RISE, 2009).

Sua madeira é menos densa do que a maioria dos eucaliptos, a densidade básica é de 540-570 g / m<sup>3</sup>, e é adequada para a produção de pasta química branqueada, com um rendimento médio de polpa de 49,5% (RISE, 2009). É usada principalmente para produção de celulose, lenha e carvão vegetal. O outro uso principal da madeira é para tábuas, construção leve e pesada, e para placas de compensados e de aglomerado (PROSEA, 1993).

## 2.2 Oídios

As contaminações e infecções por patógenos no início do desenvolvimento de mudas de espécies florestais podem ocasionar mortalidade e grandes prejuízos na produção, além de comprometer o desenvolvimento das plantas à campo. Um dos grupos de patógenos mais comuns em viveiros de produção de mudas de eucalipto através de minijardins clonais é o dos oídios. Este fungo pertence ao grupo dos ascomicetos, da ordem Erysiphales e família Erysiphaceae, e são reconhecidos por formarem colônias esbranquiçadas pulverulentas na superfície das partes aéreas das plantas (STADNIK & RIVERA, 2001).

Oídios são parasitas biotróficos obrigatórios de plantas, ou seja, dependem de seus hospedeiros vivos para sobreviver e produzem sobre a superfície das folhas, uma rede micelial fina, formando colônias que possuem numerosos haustórios que se depositam no interior das células, retirando nutrientes da planta para a produção de conidióforos e conídios (STADNIK & MAZZAFERA, 2001).

O patógeno, além de retirar os nutrientes da planta, reduz sua fotossíntese, eleva sua respiração e transpiração, reduzindo o desenvolvimento e produtividade da mesma (AGRIOS, 1998). Fungos do grupo dos oídios atacam folhas e brotos jovens, causando deformações do limbo, enrugamentos e superbrotação das plantas (FERREIRA, 1997).

A alta umidade relativa do ar, ausência de água livre no filoplano e temperaturas entre 20-25 °C são condições favoráveis para a ocorrência de *Oidium eucalypti*, encontrado com frequência em minijardins clonais sob teto fixo ou retrátil (ALFENAS *et al.*, 2009). De acordo com Bedendo (2011), em geral, oídios se desenvolvem em condições de elevada umidade relativa do ar e na faixa de temperatura compreendida entre 18 e 22 °C. As temperaturas acima de 30 °C e molhamento foliar são condições desfavoráveis para a disseminação, isso porque os conídios não germinam na presença de água na superfície

foliar. A temperatura ótima para germinação de esporos é de 25 °C, embora estes germinem na superfície da folha a temperaturas entre 6 °C e 33 °C. A rápida germinação e crescimento micelial ocorre entre 21 °C e 30 °C, e a presença da luz tem grande importância na etapa de penetração e formação de conídios (PINTO *et al.*, 2014). Em temperaturas ótimas, o tempo de geração, que é o tempo entre a germinação e produção de novos esporos é de cinco dias. A temperatura desempenha um papel maior no desenvolvimento da doença do que a umidade. A fonte inicial de inóculo mais provável é o micélio, que sobrevive durante o inverno nas gemas (GARRIDO & SÔNEGO, 2003).

Segundo Alves *et al.* (2013), o desenvolvimento de uma doença em plantas resulta da interação entre um hospedeiro suscetível, um agente patogênico e ambiente favorável. Para os mesmos autores, as condições de ambiente podem afetar a disponibilidade, o estágio de crescimento, a suscetibilidade genética do hospedeiro, interferir na sobrevivência, na taxa de multiplicação, na esporulação, na distância de disseminação do patógeno, na taxa de germinação dos esporos e na penetração. Em minijardim clonal, infecções sucessivas nas brotações ocasionam, além do superbrotamento, perda da qualidade da matriz e redução no número de estacas produzidas (VALERIANO, 2013). Segundo este mesmo autor, o ataque de oídio é considerado a principal doença de casas de vegetação, viveiros e minijardins clonais de mudas de eucalipto; a doença pode causar a mortalidade de até 50% das mudas (MUCCI *et al.*, 1980). O sintoma de oídio, quando verificado em campo, leva a muda a perder sua dominância apical, comprometendo a formação do fuste reto (KRUGNER & AUER, 2005), o que é de extrema importância em qualquer uso de madeira serrada.

Considerada doença cosmopolita, a ocorrência de oídio em *Eucalyptus* spp. é relatada na África do Sul, Argentina, Austrália, Europa, no Brasil e nos Estados Unidos. Parasita diferentes espécies, como *Eucalyptus alba* Reinw. ex Blume, *E. camaldulensis* Dehnh, *E. citriodora* Hook, *E. cladocalyx* F. Muell., *E. creba* F. Muell., *E. deanei* Maiden, *E. deglupta* Blume, *E. globulus* Labill., *E. grandis* W. Hill ex Maiden, *E. gunnii* Hook, *E. maculata* Hook, *E. nitens* (Deane & Maid.) Maid., *E. paniculata* Smith, *E. pellita* F. Muell., *E. polyanthemos* Schau., *E. punctata* DC, *E. resinifera* Smith, *E. robusta* Smith, *E. saligna* Smith, *E. tereticornis* Smith, *E. torelliana* F. Muell., *E. urophylla* S. T. Blake, *E. viminalis* Labill. (MUCCI *et al.*, 1980; BOESEWINKEL, 1981; CROUS *et al.*, 1989; FERREIRA, 1989; BLUM *et al.*, 1991; MATHERON; MATEJKA, 1992).

Apenas a fase anamórfica do agente etiológico tem sido encontrada no Brasil, sendo identificada como *Oidium eucalypti* Rostr. (FERREIRA, 1989). Segundo Silva *et al.*

(2001) a inexistência ou dificuldade de obtenção de estruturas sexuais do fungo dificulta sua identificação. No Brasil, a fase teleomórfica de oídio é raramente encontrada, pois o clima das regiões tropicais brasileiras não favorece a formação dos cleistotécios do fungo, o que dificulta a identificação da espécie (SILVA *et al.*, 2001). Auer (2001) afirmou que em eucaliptos a fase teleomórfica de oídio ainda não foi encontrada nas condições brasileiras.

A doença causada por oídio distribui-se entre plantas cultivadas e silvestres, servindo-se de hospedeiros alternativos; a mesma espécie pode infectar vários hospedeiros e um mesmo hospedeiro pode ser infetado por mais de uma espécie deste grupo de patógenos (SILVA *et al.*, 2001).

Além de poucas informações sobre a identificação do patógeno, também é desconhecido material genético de eucalipto resistente ao oídio. Portanto, faz-se necessário a realização de pesquisas em etiologia, epidemiologia e que busquem métodos e tratamentos fitossanitários eficazes e com menor impacto ambiental para o manejo e controle da doença.

### **2.3 Controle biológico**

O uso indiscriminado de agrotóxicos na produção vegetal provocou alterações ambientais e proporcionou a seleção de patógenos resistentes, além da diminuição de microrganismos benéficos, e efeitos nocivos ao homem, aos animais e ao ambiente, através do acúmulo de resíduos químicos no solo, na água e nos alimentos (GRIGOLETTI *et al.*, 2000). Além disso, os riscos de contaminação humana e do meio ambiente, referentes ao uso e aplicação de defensivos agrícolas sintéticos, acentuam a necessidade pela busca de ferramentas naturais ou menos tóxicas ao combate de pragas e doenças.

Uma das alternativas buscadas para a substituição e/ou minimização do uso de fungicidas químicos para o combate de doenças que atacam a produção vegetal mundial tem sido a utilização de agentes de controle biológico.

O controle biológico consiste no controle de doenças pela redução da densidade e/ou potencial de inóculo de um patógeno em estado ativo ou dormente, sendo realizado naturalmente por organismos, ou artificialmente, pela manipulação do ambiente, do hospedeiro ou dos antagonistas (GASPAROTTO *et al.*, 2010).

Quando utiliza-se um microrganismo como agente de biocontrole, há possibilidade de ocorrer o controle biológico clássico, por antagonismo direto do agente de biocontrole sobre o patógeno (TUZUN & KLOEPPER, 1995). Segundo Sticher *et al.* (1997), já

existem resultados de pesquisas que verificaram a ocorrência de biocontrole por antagonismo direto.

O termo controle biológico tem sido aplicado ao uso de produtos naturais ou fermentados extraídos de diversas fontes (COOK, 1993). Estas formulações podem ser misturas simples de componentes naturais com atividades específicas ou misturas complexas com múltiplos efeitos sobre o hospedeiro, bem como a praga alvo ou patógeno.

O antagonismo direto resulta do contato físico com o patógeno pelos mecanismos ativos expressos pelo microrganismo de biocontrole. Nesse tipo de interação, o hiperparasitismo seria considerado o tipo de mecanismo mais direto (HARMAN *et al.*, 2004). Segundo Benítez *et al.* (2004) *Trichoderma* spp. pode exercer o biocontrole de fungos fitopatogênicos, indiretamente, pela competição por espaço e nutrientes, modificações das condições ambientais, estimulando o crescimento das plantas e seus mecanismos de defesa ou produzindo antibióticos, ou agindo diretamente através do micoparasitismo.

O histórico das pesquisas com controle biológico no Brasil é relativamente curto. O primeiro artigo intitulado: Inativação do vírus do mosaico comum do fumo pelo filtrado de culturas de *Trichoderma* sp., foi publicado em 1950 por Reinaldo Foster, pesquisador do Instituto Agrônomo de Campinas. Após esta publicação, nos anos de 1986 e 1987 ocorreu em Piracicaba/SP a primeira e a segunda Reunião Brasileira sobre Controle Biológico de Doenças de Plantas, marcando assim a estruturação da área. Ainda em 1987, foi lançado o primeiro produto biológico comercial à base de *Trichoderma viride*, para o controle da *Phytophthora cactorum* causadora da podridão de raízes e colo da macieira (VALDEBENITO-SANHUEZA, 1991).

Maiores informações sobre o tema foram lançadas com a publicação em 1991, do primeiro livro “Controle biológico de Doenças de Plantas”, publicado pelo Centro Nacional de Pesquisa de Defesa da Agricultura, da Embrapa Meio Ambiente. Em 1992, foram apresentados os primeiros trabalhos sobre controle biológico, no Congresso de Fitopatologia que aconteceu em Gramado/RS. Neste mesmo ano, foi criada a primeira empresa BIOAGRO ALAM LTDA, incubada no Departamento de Fitossanidade da Faculdade de Agronomia/UFRGS, especializada na produção e comercialização de *Trichoderma* (BETTIOL & MORANDI, 2009).

Ainda, segundo os autores citados em parágrafo anterior, com o passar dos anos, foi despertado o interesse econômico voltado para pesquisas e desenvolvimento de produtos biológicos os quais obtivessem resultados significativos e eficientes para o controle de

doenças fitopatogênicas. Dados de levantamentos confirmam a existência de mais de 20 marcas comerciais de agentes de controle biológico de fitopatógenos disponibilizadas no mercado.

Segundo Bettiol *et al.* (2008), *Trichoderma* é o agente biológico de doenças de plantas mais estudado e utilizado no Brasil e em outros países da América Latina. No ano de 2008, foram identificadas 13 empresas que produzem e comercializam *Trichoderma* estando estas em seis estados da região centro-sul do Brasil; todas as empresas utilizam a técnica de fermentação sólida em grãos de arroz, milho e outros cereais, que gira torno de 550 t/ano de grãos, para produção de *Trichoderma*. As principais espécies de agente de biocontrole comercializadas são: *Trichoderma asperellum*, *T. harzianum*, *T. astromaticum* e *T. viride*, e alguns produtos não possuem identificação das espécies. Esses produtos controlam alguns patógenos de culturas agrícolas, e alguns deles são indicados para o tratamento de sementes e substratos (BETTIOL & MORANDI, 2009).

Além de fungos do gênero *Trichoderma*, algumas bactérias também são intensamente utilizadas para controle biológico. *Pseudomonas* sp. e *Bacillus* sp. possuem capacidade antagonista a fitopatógenos e são encontradas naturalmente no solo (WELLER *et al.* 2002; BETTIOL & GHINI, 2005). Segundo Petras & Casida (1985) as bactérias do gênero *Bacillus* possuem alto potencial para serem utilizadas como agentes de controle biológico, pois mantêm sua viabilidade quando estocadas por longos períodos. Diferentes espécies de *Bacillus* são antagonistas de fungos fitopatogênicos e podem ser usadas no controle biológico (ANGONESE *et al.*, 2009). Segundo Bettiol & Morandi (2009), dentro do gênero *Bacillus*, as espécies *Bacillus subtilis* e *B. pumilus* são capazes de inibir bactérias e fungos fitopatogênicos. Em vários estudos *Bacillus subtilis* apresentou resultados positivos como agente de biocontrole, podendo ser encontrada como rizobactéria promotora de crescimento em plantas, bactérias epifíticas e endofíticas (ONGENA *et al.*, 2005). A antibiose é o principal mecanismo de ação do antagonismo de bactérias do gênero *Bacillus* (SANTOS *et al.*, 2006). Essa bactéria tem sido usada comercialmente para o biocontrole de doenças de plantas, e também para aumentar a produtividade de culturas (NGUGIA *et al.*, 2005; YAO *et al.*, 2006). Segundo Bacon *et al.* (2001), *Bacillus subtilis* reduziu níveis de micotoxinas acumuladas em sementes de milho por *Fusarium moniliforme*. Para várias espécies cultivadas *B. subtilis*, apresenta atividade *in vitro* contra diferentes tipos de patógenos, por meio da produção de antibióticos como iturina A e surfactina, capazes de inibir o crescimento micelial de fungos (ASAKA & SHODA, 1996).

De acordo com Kupper *et al.* (2003), isolados de *Bacillus* spp. inibiram o crescimento de *Colletotrichum acutatum*, fungo causador da queda prematura dos frutos cítricos, tanto sob condições de laboratório como nas condições de campo. Pereira *et al.* (2008) encontraram *Bacillus subtilis* e *B. megaterium* no solo sob plantio de *Eucalyptus* sp., essa ocorrência poderia indicar uma afinidade com a rizosfera de árvores do gênero, já que ela não aparece no solo sob mata nativa.

Nesse contexto, Raasch *et al.* (2013) realizaram a inoculação do produto Rizolyptus<sup>®</sup> (*Bacillus subtilis*) em miniestacas de eucalipto e verificaram a promoção da emissão de raízes, melhoria na qualidade do sistema radicular e incremento no crescimento das mudas e diminuição da mortalidade. Ainda Raasch *et al.* (2012) verificaram interação entre o inoculante biológico Rizolyptus<sup>®</sup> e clones de eucalipto no controle de *Puccinia psidii* e de fitopatógenos causadores de manchas foliares. Para estes últimos, apresentou resultado potencial, promovendo resistência sistêmica induzida no hospedeiro, e assim, diminuiu a severidade e incidência das doenças.

Carvalho Filho (2008) selecionou isolados de *Trichoderma asperellum*, *T. pseudokoningii*, *T. harzianum* e *T. atroviride* para supressão de mancha-foliar causada por *Cylindrocladium scoparium* em mudas de *Eucalyptus urophylla*. Maciel *et al.* (2012) obtiveram resultados positivos na redução dos danos causados pelo fungo *Cylindrocladium candelabrum* em mudas de *Eucalyptus saligna*, com a utilização do produto comercial Trichodel<sup>®</sup> a base de *Trichoderma* spp.

Molina Mercader *et al.* (2006) estudando *Clonostachys* spp. e *Trichoderma* spp. contra *Botrytis cinerea* em mudas de *Eucalyptus globulus*, comprovaram redução média significativa de 85% da doença. Sbravati Junior *et al.* (2016) utilizando *Trichoderma atroviride* obtiveram redução significativa (83,5 %) da severidade da doença causada por *Botrytis cinerea* em mudas de *Eucalyptus benthamii*, esta redução foi similar a obtida com o uso do fungicida iprodione (87,8 %).

### **2.3.1 *Trichoderma* spp.**

Dentre os agentes biológicos de controle de doenças, o fungo *Trichoderma* destaca-se como sendo um dos microrganismos mais pesquisados nos últimos anos. *Trichoderma* spp. é um fungo encontrado naturalmente no solo, é antagonista de diversos fungos fitopatogênicos, além disso, possui importante função ecológica pois participa da decomposição e mineralização de resíduos vegetais, contribuindo para a disponibilização de nutrientes para as plantas (MENEZES *et al.*, 2010)

O fungo possui tolerância às diversas faixas de temperatura (MCBEATH & ADELMAN, 1991), mas relatos verificam ser mais efetivo em temperaturas próximas a 25°C (HJELJORD *et al.*, 2001). A sua sobrevivência em solos naturais ou infestados é influenciada pela temperatura, umidade, nutrientes, tipo de solo, microbiota, aeração, pH e teor de matéria orgânica (COOK & BAKER, 1983; ETHUR *et al.*, 2001; HOWELL, 2003). Odor característico a coco é liberado por algumas espécies de *Trichoderma* quando houver a produção da substância volátil 6-pentil-alfa-pirona (BROTMAN *et al.*, 2010).

*Trichoderma* possui diversos mecanismos de ação, os quais o capacitam para o controle de fungos fitopatogênicos, proporciona melhoria no desenvolvimento da planta e aumenta sua resistência ao ataque e danos causados por agentes bióticos e abióticos. Os principais mecanismos de ação de *Trichoderma* são antibiose, competição por nutrientes ou espaço, micoparasitismo e indução de resistência do hospedeiro, além da colonização do sistema radicular e promoção de crescimento de diversas espécies de plantas (HARMAN *et al.*, 2004; WOO *et al.*, 2006). A antibiose ocorre quando o antagonista inibe a ação do fitopatógeno pela produção de substâncias e antibióticos voláteis e não-voláteis.

A competição é o processo de interação com dois ou mais organismos os quais estão comprometidos na mesma ação, competição por nutrientes, espaço e oxigênio. Este mecanismo de ação constitui-se em uma das principais características de espécies de *Trichoderma* usadas como biocontroladoras, pois somente assim terão capacidade de se desenvolver na rizosfera (HOWELL, 2003).

O micoparasitismo ocorre quando o antagonista utiliza o patógeno como alimento, após enrolar e penetrar suas hifas sobre o patógeno, *Trichoderma* secreta enzimas líticas como quitinases, celulasas, glucanases e proteases causando a degradação e assim alimentando-se. *Trichoderma* é capaz de inibir patógenos de plantas através da produção de metabolitos secundários como, antibióticos (HOWELL, 2003) e enzimas de degradação da parede celular como as quitinases (DE LA CRUZ *et al.*, 1992), b-1,3-glucanases (LORITO *et al.*, 1994), as celulasas (KOVÁCS *et al.*, 2009) e as proteases (DE MARCO *et al.*, 2002).

Diversas espécies de *Trichoderma* produzem metabolitos tóxicos voláteis e não-voláteis tais como antibióticos, ácido harziânico, alameticinas, tricholinas, 6- pentil-pirano, viridinas, gliovirinas, glisopreninas, ácido heptelídico e outros. Quando há combinação das enzimas hidrolíticas e antibióticos o resultado é o aumento de antagonismo quando comparado a ação destes isoladamente (HOWELL, 1998).

A indução de resistência ocorre pela capacidade de algumas espécies de *Trichoderma* desencadear alterações morfológicas e bioquímicas na planta, levando a planta a ativação de seus mecanismos de defesa contra diversos fitopatógenos. Algumas espécies de *Trichoderma* têm capacidade de colonizar por semanas ou meses a superfície das raízes das plantas, o que resulta da liberação de elicitores e, a consequência disso, resulta na indução da resistência na planta (HARMAN *et al.*, 2004; WOO *et al.*, 2006). Segundo Harman *et al.*, (2004) estão envolvidos na indução de resistência, o ácido salicílico e o ácido jasmônico, junto com o etileno ou óxido nitroso, os quais induzem a uma cascata de eventos que provoca a produção de grande quantidade de metabólitos e proteínas com diversas funções na planta.

Algumas espécies de *Trichoderma* são capazes de produzir enzimas que degradam as paredes celulares de outros fungos e também produzem substâncias antifúngicas (como os antibióticos), além de apresentarem estratégias de sobrevivência tornando-as altamente competitivas no ambiente e com enorme capacidade de proliferação na rizosfera (RESENDE *et al.*, 2004).

Além disso, alguns isolados de *Trichoderma* possuem resistência a fungicidas, característica que os fazem potenciais agentes biorremediadores (MELO, 1996; RESENDE *et al.*, 2004). Pesquisas demonstram que espécies de *Trichoderma* têm potencial de aplicação no biocontrole tanto de patógenos radiculares quanto de patógenos foliares (LOUZADA *et al.*, 2009).

### **2.3.2 *Bacillus* spp.**

*Bacillus* é um gênero de espécies bactérias que possuem grande potencial como agentes de controle biológico (PETRAS & CASIDA, 1985). Segundo Angonese *et al.* (2009) diversas espécies do gênero *Bacillus* têm potencial para utilização em programas de controle biológico, pois são antagonistas de fungos fitopatogênicos.

O gênero *Bacillus* apresenta grande vantagem em relação a outros agentes de controle biológico, pois sua capacidade de formar esporos, sendo estes resistentes a condições ambientais adversas, ainda são de fácil formulação e permitem o armazenamento (SCHALLMEY *et al.*, 2004). Segundo Lanna Filho *et al.* (2010), *Bacillus* spp. formam endósporos e possuem diversos mecanismos antagônicos, o que permite sua sobrevivência e manutenção em nichos ecológicos específicos.

A alta capacidade de sobrevivência é uma habilidade competitiva, mas o que caracteriza alguns *Bacillus* como ótimos agentes de biocontrole é a capacidade de

produção de diversos metabólitos que possuem atividade antimicrobiana (PÉREZ-GARCÍA *et al.*, 2011). A espécie de *Bacillus subtilis* possui de 4 a 5% de seu genoma dedicado a síntese de antibióticos e, além disso, tem o potencial de produzir mais de duas dúzias de compostos antimicrobianos estruturalmente diversos (STEIN, 2005). Entre estes compostos produzidos por este gênero, destaca-se os lipopeptídeos cíclicos, sufactinas, fengicinas e as iturinas. A atividade antifúngica destes compostos está relacionada a sua estrutura química que é capaz de se ligar na membrana celular fúngica e formar poros o que leva ao extravasamento do citoplasma e assim a morte celular, caracterizando desta forma a atividade antifúngica (BONMATIN *et al.* 2003).

Os biopesticidas à base de *Bacillus* são amplamente utilizados na agricultura convencional sendo comercializados como pesticidas microbianos, fungicidas ou fertilizantes. As espécies *B. amyloliquefaciens*, *B. pumilus* e *B. licheniformis* são utilizadas nos bioformulados comerciais, sendo conhecidas pelo grande potencial antifúngico. (PÉREZ-GARCÍA *et al.*, 2011). As bactérias antagonicas, como *B. subtilis*, de maneira geral agem significativamente por antibiose e, ocasionalmente, por parasitismo e competição (ARRAS & ARRU, 1997). De acordo com Kupper *et al.* (2003), os microrganismos que agem por antibiose, possuem amplo espectro de ação, de modo que na inibição dos fungos a produção de substâncias tóxicas é mais efetiva do que qualquer outro mecanismo de ação envolvido.

Relatos da literatura mostram que bactérias do gênero *Bacillus* têm capacidade de controlar doenças de plantas causadoras de sérios prejuízos econômicos. Como exemplos, Hang *et al.* (2005) citam *Bacillus subtilis* S1-0210 utilizado como agente biocontrole de *Botrytis cinerea* em morangos. Dong *et al.* (2004) relataram que *Bacillus thuringiensis* promoveu o silenciamento de um agrupamento gênico do patógeno *Erwinia carotovora* e com isso realiza o biocontrole da enfermidade. *Bacillus cereus* atuou na inibição *in vitro* o crescimento de fungos e bactérias patogênicas ao tomateiro (VIEIRA *et al.*, 2004).

Devido suas características, *Bacillus subtilis* tem sido utilizada comercialmente para o controle biológico de doenças de plantas, e também para aumentar a produtividade de culturas (NGUGIA *et al.*, 2005; YAO *et al.*, 2006).

*Bacillus subtilis*, estirpe UK-9, antagonista da mancha foliar de *Alternaria* da mostarda, reduziu a germinação de esporos nas folhas e a incidência da doença, e além disso demonstrou capacidade de promoção do crescimento das plantas (SHARMA & SHARMA, 2008). Isolados de *Bacillus* foram eficientes no controle do oídio da abóbora

(*Podosphaera fusca*) e permaneceram viável no filoplano durante 16 dias (ROMERO *et al.*, 2004).

## 2.4 Referências bibliográficas

- AGRIOS, G.N. **Plant Pathology**. 3th ed. San Diego. Academic. 1998.
- ALFENAS, A.C. et al. **Clonagem e doenças do eucalipto**. 2 ed. Viçosa: Ed. UFV, 2009. 500 p.
- ALVES, E. S. et al. Interação das condições edafoclimáticas com a resinose do cajueiro. **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, v. 9, n. 16, p. 1320-1345, 2013.
- ANGONESE, M. T. et al. Fungistatic effect of *Bacillus* spp on plant pathogenic fungi. **Revista Brasileira de Agroecologia**, Porto Alegre, v. 4, n. 2, p. 97-100, 2009.
- ARRAS, G.; ARRU, S. Mechanism of action of some microbial antagonists against fungal pathogens. **Annali di Microbiologia ed Enzimologia**, Milano, v. 47, p. 97-120, 1997.
- ASAKA, O.; SHODA, M. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off of tomato with *Bacillus subtilis* RB14. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, p. 4081-4085, 1996.
- ASSIS, T.F.; FERREIRA, G.W. **A situação do Eucalyptus globulus na Riocell**. Guaíba: RIOCELL, 1996. 6 p. (Relatório Técnico, 1330).
- AUER, C. G. Oídios de espécies florestais. In: STADNIK, M. J.; RIVERA, M. C. Oídios. Jaguariuna, SP: Embrapa Meio Ambiente. 2001. p. 391-418.
- BACON, C. W. et al. Biological control of *Fusarium moniliforme* in maize. **Environmental Health Perspectives**, Research Triangle Park, v. 109, Suplemento 2, p. 325-332, 2001.
- BARRICHELO, L. E. G.; FOELKEL, C. E. B. Estudos para a produção de celulose sulfato de seis espécies de eucalipto. **IPEF**, v. 1, n.12, p. 77-95, 1976.
- BEDENDO, I. P. Oídios. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. Manual de Fitopatologia. São Paulo: Ceres, 2011. p. 473 – 477.
- BENÍTEZ, T. et al. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. **International Microbiology**, Madrid, v.7, p.249-260, 2004.
- BERGAMIN FILHO, A.; AMORIM, L. **Doenças de plantas tropicais: epidemiologia e controle econômico**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1996. 299p.
- BETTIOL, W.; GHINI, R. Solos supressivos. In: Ecologia e manejo de patógenos radiculares em solos tropicais. Recife; Imprensa Universitária da Universidade Federal Rural de Pernambuco. 2005. p. 125-152.
- BETTIOL, W. et al. Controle biológico de doenças de plantas na América Latina. In: Controle microbiano de pragas na América Latina - Avanços e desafios. Piracicaba. FEALQ. 2008. p.303-331.

- BETTIOL, W.; MORANDI, M.A.B. Controle biológico de plantas no Brasil. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M.A.B. (Org). **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna-SP: Embrapa Meio Ambiente, 2009. 341p.
- BIZI, R.M.; JUNIOR, A.G.; AUER, C.G.; MIO, L.L.M.D. Produtos alternativos no controle do oídio em mudas de eucalipto. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 34, n. 2, p. 144-148, 2008.
- BLUM, L.E.B. et al. Seleção de procedências de eucalipto resistentes a oídio em casa de vegetação. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.16, p. 214-217, 1991.
- BOESEWINKEL, H.J. A first recording of rose mildew, *Sphaerotheca pannosa* on three species of *Eucalyptus*. **Nova Hedwigia**, Berlin, v.34, p.321-430, 1981.
- BONMATIN, J.M.; LAPRÉVOTE, O.; PEYPOUX, F. Diversity among microbial cyclic lipopeptides: iturins and surfactins. Activity-structure relationships to design new bioactive agents. **Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening**, Hilversum, v. 6, n.6, p. 541-556, 2003.
- BROTMAN, Y.; GUPTA, K.; VITERBO, A. Quick guide - Trichoderma. **Magazine Current Biology**, London, v.20, p. 1-2 , 2010.
- BROWN, B. N.; FERREIRA, F. A. Diseases during propagation of eucalypts. In: KEANE, P. J. et al. (Ed). **Diseases and pathogens of eucalypts**. Collingwood: CSIRO Publish, 2000. p. 119-151.
- CARVALHO FILHO, M. **Trichoderma spp. como agentes de controle de *Cylindrocladium scoparium* e como promotores de crescimento em mudas de eucalipto**. 2008. 86f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade de Brasília, Brasília, 2008.
- CROUS, P.W., KNOX-DAVIES, P.S., WINGFIELD, M.J. A list of *Eucalyptus* leaf fungi and their potential importance to South Africa. **South African Forestry Journal**, Pretoria, v.149, p.17-29, 1989.
- COOK, R.J.; BAKER, K.F. The Nature and Practice of Biological Control of Plant Pathogens. St. Paul: **American Phytopathological Society**, 1983.
- COOK, R.J. Making greater use of introduced microorganisms for biological control of plant pathogens. **Annual Review Phytopathology**, Palo Alto, v. 31, p. 53-80, 1993.
- CUNHA, A. C. M. C. M.; WENDLING, I.; SOUZA JÚNIOR, L. Produtividade e sobrevivência de minicepas de *Eucalyptus benthamii* Maiden et Cambage em sistema de hidroponia e em tubete, **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 15, n. 3, p. 307-310, 2005.
- DE LA CRUZ, J. et al. Isolation and characterization of three chitinases from *Trichoderma harzianum*. **European Journal of Biochemistry**, Oxford, v. 206, p. 859-867, 1992.

- DE MARCO, J.L.; FELIX, C.R. Characterization of a protease produced by a *Trichoderma harzianum* isolate which controls cocoa plant witches'broom disease. **BMC Biochemistry**, London, v. 3, p. 1-7, 2002.
- DONG, Y.H. et al. Insecticidal *Bacillus thuringiensis* silences *Erwinia carotovora* virulence by a new form of microbial antagonism, signal interference. **Applied and environmental microbiology**, Washington, v. 70, n.2, p. 954-960, 2004.
- ETHUR, L. Z.; CEMBRANEL, C. Z.; SILVA, A. C. F. Seleção de *Trichoderma* spp. visando ao controle de *Sclerotinia sclerotiorum*, in vitro. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.31, n.5, 2001.
- FALEIRO, F.G. et al. Uso de marcadores RAPD na classificação de isolados de *Phytophthora* spp. causadores da podridão parda do cacauzeiro no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 3, p.312-315, 2003.
- FAO. **Eucalyptus for planting**. Roma: 1979. 677 p.
- FERREIRA, F. A. Eucalipto (*Eucalyptus* spp.): controle de doenças. In: VALE, F. X. R. do; ZAMBOLIM, L. (Ed.). **Controle de doenças de plantas: grandes culturas**, Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, v. 2, p. 925-951, 1997.
- FERREIRA, F.A. **Patologia Florestal: Principais Doenças Florestais no Brasil**. Viçosa. SIF. 1989.
- FURTADO, E. L. et al. **Doenças em viveiros de Eucalyptus sp: Diagnóstico e Manejo**. Botucatu, SP: Votorantim / Celulose e Papel. 2000. p. 23
- GASPAROTTO, L. et al. **Glossário de fitopatologia**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2010. 431 p.
- GOES, E. **A floresta portuguesa: sua importância e descrição das espécies de maior interesse**. Portugal: Portucel, 1991, 259 p.
- GRAÇA, M. E. C. et al. Capacidade de rebrota de *Eucalyptus benthamii*. **Boletim de pesquisa Florestal**, Colombo, n. 39, p. 135-138, 1999.
- GRIGOLETTI Jr, A.; SANTOS, A. F.; AUER, C. G. Perspectivas do uso do controle biológico contra doenças florestais. **Revista Floresta**, v. 30. Edição especial. 200p. 2000.
- HANG, T.T. et al. *Bacillus subtilis* S1-0210 as a biocontrol agent against *Botrytis cinerea* in strawberries nguyen. **The Plant Patology Journal**, Seoul, v.21, n.1, p. 59-63, 2005.
- HARMAN, G.E. et al. *Trichoderma* species—opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature Reviews Microbiology**, London, v.2, p.43- 56, 2004.
- HIGA, A.R.; CARVALHO, P.E.R. de. Sobrevivência e crescimento de doze espécies de eucalipto em Dois Vizinhos, Paraná. In: CONGRESSO FLORESTAL BRASILEIRO 6, 1990, Campos do Jordão. **Anais**. São Paulo: SBS, 1990. p.459- 461. (Publicado em *Silvicultura*, v.3, n.42, 1990)

HIGA, R. C. V. Aspectos ecológicos e silviculturais do *Eucalyptus benthamii* Maiden et Cambage. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, n. 38, p. 121-123, 1999.

HIGA, R. C. V.; PEREIRA, J. C. D. Usos potenciais do *Eucalyptus benthamii* Maiden et Cambage. Colombo: Embrapa Florestas, 2003. 4p. (Comunicado Técnico no. 100)

HIGA, R.C.V. **Avaliação e recuperação de *Eucalyptus dunnii* Maiden atingidos por geadas em campo Tenente, Paraná.** 1998. 100f. Tese (Doutorado em Ciências Florestais) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1998.

HJELJORD, L. G.; STENSVAND, A.; TRONSMO, A. Antagonism of nutriente-activated conidia of *Trichoderma harzianum* (atroviride) P1 against *Botrytis cinerea*. **Phytopathology**, St. Paul, v.91, n.12, p. 1172-1180, 2001.

HOWELL, C.R. The role of antibiosis in biocontrol. In: KUBICEK, C.P.; HARMAN, G.E.(Ed). **Trichoderma & Gliocladium v.2**. London: Taylor e Francis, 1998. p.173-184.

HOWELL, C.R. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. **Plant Disease**, St. Paul, v. 87, n. 4, p. 10, 2003.

IBA – Indústria Brasileira de Árvores.[**Relatório Anual 2016**]. 2016. 2016.<[http://iba.org/images/shared/Biblioteca/IBA\\_RelatorioAnual2016\\_.pdf](http://iba.org/images/shared/Biblioteca/IBA_RelatorioAnual2016_.pdf)>. Acesso em: 12 dez. 2016.

SNIF - Serviço Nacional de Informações Florestais. **Florestas plantadas**. 2016. <<http://www.florestal.gov.br/snif/recursos-florestais/as-florestas-plantadas>>. Acesso em: 11 dez. 2016.

JOVANOVIC, T.; ARNOLD, R.; BOOTH, T. Determining the climatic suitability of *Eucalyptus dunnii* for plantations in Australia, China and Central and South America. **New Forests**, Dordrecht, v.19, n.3, p.215-226, 2000.

KRUGNER, T. L.; AUER, C. G. Doenças dos eucaliptos. In: KIMATI, H. et al. **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 4. ed. São Paulo: Agronômica CERES, 2005. p. 319-332.

KOVÁCS K., SZAKÁCS G., ZACCHI G. Enzymatic hydrolysis and simultaneous saccharification and fermentation of steam-pretreated spruce using crude *Trichoderma reesei* and *Trichoderma atroviride* enzymes. **Process Biochem**, London, v. 44, n.12, p. 1323–1329, 2009.

KUPPER, K. C.; GIMENES-FERNANDES, N.; GOES, A. Controle biológico de *Colletotrichum acutatum*, agente causal da queda prematura dos frutos cítricos. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 3, p. 251-257, 2003.

LANNA FILHO, R.; FERRO, H.M.; PINHO, R.S.C. Controle biológico mediado por *Bacillus subtilis*. **Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas**, Chapadina, v. 4, n. 2, p. 12-20, 2010.

LIMA, A.A. et al. **Identificação molecular de linhagens de fungos pertencentes aos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* utilizando marcadores RAPD**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. 2008. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 218).

LORITO, M. et al. Synergistic interaction between fungal cell wall degrading enzymes and different antifungal compounds enhances inhibition of spore germination. **Microbiology**, Washington, v.140, p.623-629, 1994.

LOUZADA, G. A. S. et al. Potencial antagônico de *Trichoderma* spp. originários de diferentes agroecossistemas contra *Sclerotinia sclerotiorum* e *Fusarium solani*. **Biota Neotropica**, Campinas, v.9, n.3, p. 145-149, 2009.

MACIEL, C. G. et al. *Trichoderma* spp no biocontrole de *Cylindrocladium candelabrum* em mudas de *Eucalyptus saligna*. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 36, n.5, p.825-832, 2012.

MARTINS, S.A. **Adequação tecnológica da madeira de *Eucalyptus benthamii* Maiden et Cambage para produção de painéis colados lateralmente**. 2011. 114 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) Universidade de Brasília – Brasília, 2011.

MATHERON, M.E.; MATEJKA, J.C. Powdery mildew caused by *Erysiphe cichoracearum* on 5 new *Eucalyptus* hosts in Arizona. **Plant Disease**, St. Paul, v. 76, p.1077, 1992.

MCBEATH, J; ADELMAN, M. Taxonomy of a new *Trichoderma* found in Alaska. Abstract. **Phytopathology**, St. Paul, v.81, n.10, p. 1151, 1991.

MELO, I. S. *Trichoderma* e *Gliocladium* como bioprotetores de plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 4, n. 1, p.261-295, 1996.

MENEZES, J. P. et al. Toxicologia do biopreparado a base de *Trichoderma* sp. (isolado UFSM T17) administrado em mamífero. **Revista da FZVA**, Uruguaiana, v.17, n.1, p. 38–50, 2010.

MOLINA MERCADER. G. et al. Selección de hongos antagonistas para el control biológico de *Botrytis cinerea* en viveros forestales en Chile. **Bosque**, Valdivia, v. 27, n. 2, p. 126-134, 2006

MORI, E. S.; KAGEYAMA, P. Y.; FERREIRA, M. Variação genética e interação progênes x locais em *Eucalyptus urophylla*. **IPEF**, Piracicaba, n. 39, p. 53-63, 1988.

MUCCI, E. S. F.; PITTA, G. P. S.; YOKOMIZO, N. K. S. **O Oídio em mudas de eucalipto**. São Paulo. Instituto Florestal/Instituto Biológico, 1980. (Mimeografado)

- MÜLLER, B.V. et al. Avaliação das principais propriedades físicas e mecânicas da madeira de *Eucalyptus benthamii* Maiden et Cambage. **Floresta e Ambiente**, Rio de Janeiro, v.21, n.4, p. 535-542, 2014.
- NGUGIA, H.K. et al. Effect of flower-applied Serenade biofungicide (*Bacillus subtilis*) on pollination-related variables in rabbiteye blueberry. **Biological Control**, Orlando, v.33, p.32-38, 2005.
- ONGENA, M. et al. *Bacillus subtilis* M4 decreases plant susceptibility towards fungal pathogens by increasing host resistance associated with differential gene expression. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v.67, 692-698, 2005.
- PALUDZYSZYN FILHO, E.; SANTOS, P.E.T.; FERREIRA, C.A. **Eucaliptos indicado para plantio no estado do Paraná**. Colombo: Embrapa Florestas, 2006. 45 p.
- PATINHA, D. J. S. et al. Lipophilic extractives from the bark of *Eucalyptus grandis* x *E. globulus*, a rich source of methyl morolate: Selective extraction with supercritical CO<sub>2</sub>. **Industrial Crops and Products**, Oxford, v. 43, p. 340- 348, 2013.
- PEPE, B. et al. Conservation status of natural populations of *Eucalyptus urophylla* in Indonesia and international efforts to protect dwindling gene pools. **Forest Genetic Resources**, Rome, n.31, p. 62-64, 2004.
- PROSEA. Timber trees: Minor commercial timbers. In: SOERIANEGARA, I.; LEMMENS, R. H. M. J. (Ed.) **Plant resources of South-East Asia**. Wageningen, Netherlands, 1993.
- PEREIRA, R. M. et al. Avaliação de populações de possíveis rizobactérias em solos sob espécies florestais. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, Viçosa, v.32, p.1921-1927, 2008.
- PETRAS, S. F.; CASIDA, L. E. J. Survival of *Bacillus thuringiensis* spores in soil. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 50, p. 1496-1501, 1985.
- PÉREZ-GARCÍA, A.; ROMERO, D.; VICENTE, A, de. Plant protection and growth stimulation by microorganisms: biotechnological applications of Bacilli in agriculture. **Current Opinion Biotechnology**, Oxford, v.22, n.2, p. 187–193, 2011.
- PINHEIRO, M. R. R. **Estudo de variabilidade genética de *Aspergillus flavus* com base para o desenvolvimento de PCR multiplex para detecção de fungos produtores de aflatoxinas em castanha-do-brasil e castanha-de-caju**. 2004. 149 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Genômicas e Biotecnologia) – Universidade Católica de Brasília, Brasília, 2004.
- PINTO, O. R. O. et al. Importância do oídio em plantas cultivadas: abordagem em frutíferas e olerícolas. **Enciclopédia biosfera**, Goiânia, v.10, n.18, p. 1929-1945, 2014.
- POYNTON, R.J. **Tree planting in Southern Africa: the Eucalyptus**. Republic of South Africa. v.2, 1979. 882 p.

RAASCH, L.D.; BONALDO, S.M.; OLIVEIRA, A.A.F. Rizolyptus<sup>®</sup> na proteção de miniestacas de eucalipto contra Puccinia psidi. **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, v.8, n.14; p.854-864, 2012.

RAASCH, L.D.; BONALDO, S.M.; OLIVEIRA, A.A.F. Bacillus subtilis: enraizamento e crescimento de miniestacas de eucalipto em sinop, norte de Mato Grosso, Brasil. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 29, Supplement 1, p. 1446-1457, 2013.

REIS JUNIOR, F.B. et al. Restrição do 16S-23S DNAr intergênico para avaliação da diversidade de Azospirillum amazonense isolado de Brachiaria spp. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 3, p. 431-438, 2006.

RESENDE, M.L. et al. Inoculação de sementes de milho utilizando o Trichoderma harzianum como promotor de crescimento. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 28, n. 4, p. 793-798, 2004.

RISE. Eucalyptus urophylla and Acacia mangium. Laguna, Philippines, v. 21, n.1, 2009.

ROCHA, M. P. **Eucalyptus grandis Hill ex Maiden e Eucalyptus dunnii Maiden como fontes de matéria prima para serrarias**. 2000. 185 f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2000.

ROCHA, M. P.; TRUGILHO, P. F. Qualidade de madeira serrada de Eucalyptus dunnii em função do método de desdobro e condição de umidade. **Cerne**, v. 12, n. 4, p. 314-321, Lavras, 2006.

ROMERO, D. et al. Isolation and evaluation of antagonistic bacteria towards the cucurbit powdery mildew fungus Podosphaera fusca. **Applied Microbiology Biotechnology**, Secaucus, v. 64, n.2, p. 263-269, 2004.

SANTOS, A. F.; AUER, C. G.; GRIGOLETTI JÚNIOR, A. **Doenças do eucalipto no sul do Brasil: identificação e controle**. Colombo: Embrapa Florestas, 2001. (Circular técnica, n. 45)

SANTOS, E.R. et al. Controle biológico da mancha aquosa do melão por compostos bioativos produzidos por Bacillus spp. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 32, p. 376-378, 2006.

SBRAVATTI JUNIOR, J.A. et al. Redução da severidade do mofo cinzento em mudas de Eucalyptus benthamii tratadas com Trichoderma atroviride. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.42, n.4, p.363-365, 2016.

SCHALLMEY, M.; SINGH, A.; WARD, O.P. Developments in the use of Bacillus species for industrial production. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.50, n.1, p.1-17, 2004.

SCHNEIDER, P.R. et al. Equações de volume para Eucalyptus dunnii Maiden, determinadas para a depressão central do estado do Rio Grande do Sul. **Ciência Rural**, Santa Maria v.27, n.3, 1997.

SCHULTZ, B. **Levantamento de doenças bióticas e abióticas em Eucalyptus benthamii Maiden nos estados do Paraná e Santa Catarina**. 2011.104 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal do Paraná, Paraná, 2011.

SCHULTZ, B. et al. Uso do silicato de potássio no controle de oídio em mudas de Eucalyptus benthamii. **Pesquisa Florestal Brasileira**. Colombo, v. 32, n.69, p. 93-99, 2012.

SHARMA, N.; SHARMA, S. Control of foliar diseases of mustard by Bacillus from reclaimed soil. **Microbiological Research**, Jena, v.163, n.4, p.408-413, 2008.

SILVA, M. D. D. et al. Etiologia do oídio do eucalipto. **Fitopatologia brasileira**, Brasília, v. 26, n. 2 p. 201-205, 2001.

STADNIK, M. J.; MAZZAFERA, P. Interações Oídio-Hospedeiro. In: STADNIK, M. J.; RIVERA, M. C. **Oídios**. Jaguariuna, SP: Embrapa Meio Ambiente. p. 79-118. 2001.

STADINIK, M. J., RIVERA, M. C. **Oídios**. Jaguariúna, SP: Embrapa Meio Ambiente, p. 328-330. 484p. 2001. Capítulo 3.

STEIN, T. Bacillus subtilis antibiotics: structures, syntheses and specific functions. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 56, p. 845–857, 2005.

TUZUN, S.; KLOEPPER, J. Practical application and implementation of induced resistance. In: KUC, J. (Ed.). **Induced resistance to diseases in plants**. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Press, p. 152-68, 1995.

VALERIANO, R. **Escala diagramática e reação diferencial de clones para oídio do eucalipto**. 2013. 52 p. Dissertação (Mestre em Agronomia/Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013.

VALDEBENITO-SANHUEZA, R. M. Possibilidades do controle biológico de Phytophthora em macieira. In: Bettiol, W. (Ed.) **Controle biológico de doenças de plantas**. Jaguariúna. Embrapa-CNPMA. 1991. p. 303-305.

VIEIRA, B.A.H.; ROMEIRO, R.S.; MIZUBUTI, E.S.G. Métodos de isolamento de bactérias do filoplano de tomateiro visando populações epifíticas e implicações como agentes de biocontrole. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.29, p. 638-643, 2004.

WELLER, D.M. et al. Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 40, p. 309-348, 2002.

WOO, S. L. et al. The molecular biology of the interactions between Trichoderma spp., pathogenic fungi and plants. **Phytopathology**, St. Paul, v.96, p.181-185, 2006.

YAO, A. et al. Effect of fzb 24<sup>®</sup> Bacillus subtilis as a biofertilizer on cotton yields in field tests. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, Berlin, v.39, p.323-328, 2006.

### 3 CAPÍTULO 1 - SUSCETIBILIDADE DE CLONES DE *Eucalyptus* spp. À DOENÇA OÍDIO DO EUCALIPTO

#### RESUMO

A doença oídio do eucalipto, causada por *Oidium eucalypti*, é um dos principais problemas fitossanitários em minijardins clonais e casas de vegetação de produção de mudas de eucalipto no estado do Rio Grande do Sul. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivos: a) confirmar a identidade do agente causal do oídio em mudas clonais de *Eucalyptus* spp.; e b) avaliar a suscetibilidade de clones de *Eucalyptus* spp. a doença oídio do eucalipto em minijardim clonal por meio de análise temporal. Para tanto, foi realizada coleta de conídios em minicepas de quatro clones com sintomas da doença a fim de realizar a identificação molecular do patógeno. A identificação foi realizada através de sequenciamento da região *Internal Transcribed Spacer* (ITS). Para a avaliação da suscetibilidade, quatro clones foram testados: Clone 1 (*Eucalyptus benthamii*), Clone 2 (*E. dunnii*), Clone 3 (*E. benthamii*) e Clone 4 (*E. urophylla* X *E. globulus*). Foi utilizada uma escala de classes para posterior cálculo do Índice da Doença (ID) e Incidência final ( $I_f$ ). Foram utilizadas 40 mudas de cada clone para a realização do teste de suscetibilidade e análises posteriores. Foram testados para análise temporal os modelos: monomolecular, logístico e de Gompertz. A identificação molecular confirmou a identidade para os 4 isolados, sendo aproximada a *Podosphaera pannosa* (sinonímia: *Sphaerotheca pannosa*) fase sexuada de *Oidium eucalypti*. Na análise temporal, o modelo de Gompertz foi o que melhor se ajustou aos dados de severidade e incidência de oídio, porém apenas os dados de incidência da doença diferiram significativamente. O clone 1 de *Eucalyptus benthamii* e o clone 2 de *E. dunnii* apresentaram maior suscetibilidade ao agente causal *Oidium eucalypti*, causador de oídio em eucalipto.

**Palavras-chave:** minijardim clonal; *Oidium eucalypti*; Incidência.

## SUSCEPTIBILITY OF CLONAL SEEDLINGS OF *Eucalyptus* spp. TO POWDERY MILDEW DISEASE

### ABSTRACT

The powdery mildew disease in *Eucalyptus* spp. caused by *Oidium eucalypti* is one of the main sanitary problems in clonal nurseries of eucalyptus species in the state of Rio Grande do Sul. In this context, the present work had as objectives: a) confirm the identity of powdery mildew in clonal seedlings of *Eucalyptus* spp.; and b) to evaluate the susceptibility of clones of *Eucalyptus* spp. the powdery mildew disease in clonal mini garden by temporal analysis. For this purpose, conidia were collected from ministumps of four clonal material with disease symptoms in order to carry out the molecular identification of the pathogen. Identification was performed by sequencing the Internal Transcribed Spacer (ITS) region. For susceptibility, four clones were tested: Clone 1 (*Eucalyptus benthamii*), Clone 2 (*E. dunnii*), Clone 3 (*E. benthamii*) and Clone 4 (*E. urophylla* X *E. globulus*). An adapted scale of four classes was used for subsequent calculation of the Disease Index (ID) and Final Incidence ( $I_f$ ), 40 seedlings of each were used to perform the susceptibility test and subsequent analyzes. The models were tested for temporal analysis: monomolecular, logistic and Gompertz. The molecular identification confirmed the identification of the oidio disease species as the same for the 4 isolates, aligned as *Podosphaera pannosa* (synonymy: *Sphaerotheca pannosa*), sexed phase of *Oidium eucalypti*, thus identifying the fungus. In the temporal analysis, the Gompertz model was the one that best fit the data of severity and incidence of powdery mildew, but only the incidence data of the disease differed significantly. Clone 1 of *Eucalyptus benthamii* and clone 2 of *E. dunnii* showed a higher susceptibility to the causal agent *Oidium eucalypti*, causer of powdery mildew.

**Key-words:** clonal nursery; *Oidium eucalypti*; Incidence.

## INTRODUÇÃO

As doenças conhecidas como oídios são causadas por fungos que apresentam pulverulência do micélio e seus conídios se desenvolvem em cadeias na superfície dos tecidos atacados. São fungos biotróficos que, raramente, matam seus hospedeiros, mas utilizam seus nutrientes, reduzem a atividade fotossintética, aumentam a respiração e a transpiração e, conseqüentemente, reduzem o desenvolvimento e a produção (AGRIOS, 1998).

Em espécies do gênero *Eucalyptus*, é considerada uma doença cosmopolita, sendo relatada na África do Sul, Argentina, Brasil, Austrália, Europa e Estados Unidos (SILVA *et al.*, 2001), além de ser considerada a principal doença em viveiros, casa de vegetação e minijardins clonais de diversas espécies do gênero (VALERIANO, 2013). Alfenas *et al.* (2009) relatam que o patógeno tem sido frequentemente encontrado sobre plantas em viveiros, minijardins clonais hidropônicos de inundação temporária ou em canaletões com irrigação por gotejamento, em que há pouco ou nenhum molhamento foliar. Dentre as espécies de eucalipto existentes, Alfenas *et al.* (2009) citam *Eucalyptus urophylla*, *E. grandis* e seus híbridos, *E. camaldulensis*, *E. globulus*, *E. nitens*, *E. pellita*, *E. robusta*, *E. saligna*, *E. tereticornis*, *E. viminalis*, *Corymbia citriodora*, *C. maculatae* *C. torelliana* como as principais hospedeiras de oídio.

O fungo se dissemina através do vento, respingos de água e pelo contato entre plantas infectadas e sadias (FURTADO *et al.*, 2000). Mucci *et al.* (1980) relacionam a doença ao agente etiológico *Oidium eucalypti* Rostr.. Krugner & Auer (2005) identificaram *Sphaerotheca pannosa* (sinonímia: *Podosphaera pannosa*) através de inoculações cruzadas, confirmando a identidade como *Oidium eucalypti*.

A correta identificação da espécie do patógeno é importante para que todas as relações do ciclo patógeno-hospedeiro possam ser compreendidas. O conhecimento dessas interações é imprescindível, não só para o conhecimento e entendimento da doença em si, mas, principalmente, para estratégias de controle, visando interferir em seu ciclo (BERGAMIN FILHO & AMORIM, 1996). A identificação de fungos fitopatogênicos é, muitas vezes, baseada em caracteres morfológicos, porém, em muitos gêneros, tais caracteres são de difícil observação em populações naturais, além de, muitas vezes, serem afetados pelo ambiente (FALEIRO *et al.*, 2003).

De acordo com Lima *et al.* (2008), a classificação ideal deve estar baseada na filogenia dos microrganismos. Uma das técnicas moleculares amplamente utilizadas para a identificação de fungos é a da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), que permite a amplificação de fragmentos específicos de DNA de células fúngicas, vivas ou mortas (PINHEIRO, 2004). Uma das regiões mais utilizadas para a identificação molecular de fungos é a denominada “Internal Transcribed Spacer” (ITS), pois a região possui sequências mais conservadas filogeneticamente e, portanto, são mais adequados para estudos de biodiversidade (REIS JUNIOR *et al.*, 2006). Além disso, na grande maioria das bases de dados de sequências fúngicas, esta região é a mais frequente.

A epidemiologia comparativa objetiva a identificação de similaridades ou de diferenças entre epidemias, baseadas na natureza ou no comportamento da curva de progresso da doença. A curva de progresso da doença integra os efeitos do patógeno, do hospedeiro e do ambiente em um único gráfico. Na análise temporal de epidemias, um aspecto importante é a seleção de um modelo matemático apropriado para descrever a curva de progresso da doença, sendo que esta seleção objetiva estimar parâmetros que são utilizados na análise estatística para a comparação entre curvas (MADDEN *et al.*, 2007). A interpretação das formas das curvas e a determinação de seus componentes, tais como: o inóculo inicial da doença, a taxa de progresso, índice final da doença e a área sob a curva de progresso são essenciais para o controle de epidemias (BERGAMIN FILHO, 1995).

Dentro deste contexto, o conhecimento da epidemiologia de *Oidium eucalypti* é importante para que medidas de controle sejam estabelecidas no momento certo e com técnicas adequadas ao manejo da doença em minijardins clonais, casas de vegetação e viveiros de produção de mudas. Assim os objetivos deste trabalho foram: a) confirmar a identidade do agente causal de oídio em mudas clonais de *Eucalyptus* spp.; e b) avaliar a suscetibilidade de clones de *Eucalyptus* spp. ao agente causal da doença oídio.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Origem das mudas e fonte de inóculo**

Este trabalho foi realizado no laboratório de Bacteriologia do Departamento de Fitossanidade da Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, sendo as mudas de quatro materiais genéticos distintos, dois clones de *Eucalyptus benthamii*, um clone de *E.dunnii* e um clone de *E.urophylla* x

*E.globulus*, e o patógeno obtidos através de doação da empresa CMPC - Celulose Riograndense, situada no município de Guaíba – RS. O material foi coletado no Horto Barba Negra (30° 20'41.8" S 51°14'42.2" O), pertencente ao município de Barra do Ribeiro, RS.

### **Caracterização morfológica dos conídios e identificação molecular**

Inicialmente, foi realizada a caracterização morfológica do fungo, sendo avaliados 200 conídios (BOESEWINKEL, 1980; BRAUN, 1987; GORTER, 1988) obtidos de mudas clonais de *Eucalyptus* spp. com infecção natural. Os conídios coletados em um mesmo clone foram considerados como um único isolado. A partir de lâminas microscópicas de colônias esporuladas, realizou-se a observação do formato e medição de comprimento e largura dos conídios em microscópio óptico (400 X), modelo MD50 e marca Olympus, contendo ocular com régua micrométrica.

Para a identificação molecular do agente causal do oídio de eucalipto, foi realizada a coleta de conídios do fungo sobre a superfície das folhas de minicepas em minijardim clonal de quatro clones de *Eucalyptus* spp. Os conídios foram sugados com auxílio de uma bomba à vácuo e transferidos para tubo de microcentrífuga eppendoff contendo etanol 70%. Estes tubos contendo o fungo foram identificados conforme a coleta realizada em cada clone e enviados para o Instituto Biológico de São Paulo para a extração de DNA e sequenciamento. Foi realizada a extração de DNA do patógeno, conforme método CTAB, descrito por Doyle & Doyle (1991). As amostras de DNA genômico extraídas foram submetidas à Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), para a amplificação da região ITS do rDNA com os oligonucleotídeos iniciadores ITS1 e ITS4 (WHITE *et al.*, 1990). Os produtos da PCR foram purificados e, nas reações de sequenciamento, foram utilizados os oligonucleotídeos ITS1 e ITS4. Os fragmentos sequenciados foram então analisados utilizando-se o programa BioEdit (HALL, 1999). As sequências de nucleotídeos obtidas foram comparadas com as já existentes no GenBank, para os patógenos isolados. As sequências do GenBank que apresentaram os maiores scores foram selecionadas e alinhadas, juntamente com as sequências obtidas no sequenciamento pelo algoritmo ClustalW. A análise filogenética foi conduzida com 1000 replicatas, pelo programa MEGA versão 4 (TAMURA *et al.*, 2007). A similaridade das sequências de nucleotídeos entre os isolados foi calculada através do procedimento Basic Local Alignment Search Tool –

BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). Foi utilizada uma sequência disponível do oídio da videira (*Uncinula necator*) como “sistergroup” na construção do dendrograma filogenético.

### **Teste de suscetibilidade de clones de *Eucalyptus* spp. ao agente causal do oídio**

Primeiramente foi realizada a coleta de folhas de eucaliptos das minicepas contendo conídios de oídio (fonte de inóculo) no minijardim clonal da empresa que cedeu o material. Após, foi realizada a inoculação do agente causal do oídio por meio de raspagem dos conídios presentes na superfície das folhas com o auxílio de um pincel pequeno com cerdas macias, transferindo os conídios do fungo para as superfícies adaxiais do terço superior das folhas das minicepas. Estas minicepas inoculadas foram mantidas em câmara de crescimento a 25 °C com fotoperíodo de 12 h como fonte permanente de inóculo para as inoculações subsequentes.

O teste de suscetibilidade foi realizado com mudas clonais (obtidas por meio de técnica de miniestaquia) de quatro clones: Clone 1 (*Eucalyptus benthamii*), Clone 2 (*E. dunnii*), Clone 3 (*E. benthamii*) e Clone 4 (*E. urophylla* X *E. globulus*) com 90 dias de idade, aproximadamente. Para cada tratamento, foram utilizadas 40 mudas de cada clone, divididas em 4 repetições de 10 mudas. A inoculação das mudas foi realizada como descrito no parágrafo anterior para a inoculação das minicepas. As mudas inoculadas foram mantidas em câmara de crescimento a 25 °C com fotoperíodo de 12 h por 29 dias. A irrigação das mudas e das minicepas (fonte de inóculo) foi realizada diariamente e manualmente com auxílio de pisseta graduada, umedecendo apenas o substrato.

### **Avaliações e análise estatística**

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado. Para avaliação da Incidência (I), foi contabilizado semanalmente o número de mudas que apresentavam os sintomas de *Oidium eucalypti* em cada tratamento.

Foi construída uma escala para avaliação da severidade, utilizando-se para tanto, uma escala descritiva contendo quatro classes, sendo elas: 0 = ausência de sintomas; 1 = infecção leve (presença do micélio do fungo nas folhas, sem esporulação); 2 = infecção média (esporulação sobre os primeiros pares de folhas); e 3 = infecção alta (deformação da folha, enrolamento do primeiro par de folhas e queda das folhas). As notas desta escala

descritiva foram utilizadas para o cálculo do índice de doença (ID), na proporção de 0 a 1, expresso pela equação:

$$ID = \frac{\sum(Y * X_y)}{X_t * h}$$

em que Y é a nota obtida na escala, X<sub>y</sub> é número de plantas com nota Y, X<sub>t</sub> é o número total de plantas e h é o valor máximo da escala (MCKINNEY, 1923).

Para análise temporal do comportamento da doença para cada um dos clones, as variáveis I e ID foram submetidas à ajuste não-linear em relação ao tempo para cada um dos clones. Para tanto, utilizaram-se os seguintes modelos recomendados para doenças policíclicas: logístico  $[y = \frac{y_{max}}{1 + ((y_{max} - y_0)/y_0)e^{-rt}}]$ ; e de Gompertz  $[y = y_{max}(e^{\ln(y_0/y_{max})e^{-rt}})]$ . Estes modelos são compostos de três parâmetros:  $y_0$ , o índice de doença inicial,  $y_{max}$ , o índice máximo (assintótico) de doença, e  $r$ , a taxa de progresso da epidemia. Os modelos foram ajustados por meio de método não linear, com uso da rotina PROC NLIN, pelo pacote estatístico SAS 9.4<sup>®</sup>. A escolha do modelo mais apropriado foi feita pelo maior valor do coeficiente de determinação (R<sup>2</sup>). Os parâmetros estimados dos modelos foram comparados entre os clones, aos pares, com auxílio de seus erros, via teste  $t$  (MADDEN *et al.*, 2007). Utilizou-se também a análise de correlação dos resíduos para relacionar os dados de ID e I (SPOLTI *et al.*, 2015).

Adicionalmente, os dados de I e ID foram analisados via modelos mistos, pelo método de medidas repetidas. A estrutura de covariâncias que apresentou o melhor ajuste foi selecionada de acordo com os critérios de informação de Akaike & Bayesiano (SILVA *et al.*, 2015). As médias foram comparadas pelo teste de Tukey, a 5 % de probabilidade. Apresentam-se apenas as médias da avaliação final, aos 29 dias.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O agente causal do oídio do eucalipto em clones avaliados neste estudo teve sua identidade confirmada como *Oidium eucalypti*, através da identificação molecular por sequenciamento da região ITS. Os quatro isolados sequenciados foram idênticos molecularmente apresentando tamanho de fragmento de 516 pb, portanto optou-se pela apresentação de apenas uma sequência. Esta alinhou-se a sequências existentes no *GenBank* correspondentes à espécie *Podosphaera pannosa* (Figura 1). Silva & Alfenas

(1994) verificaram que o *Oidium* do eucalipto é similar ao *Oidium* da Roseira, o qual é descrito como *Sphaerotheca pannosa* (Vallr. ex. Fr.) Lev.

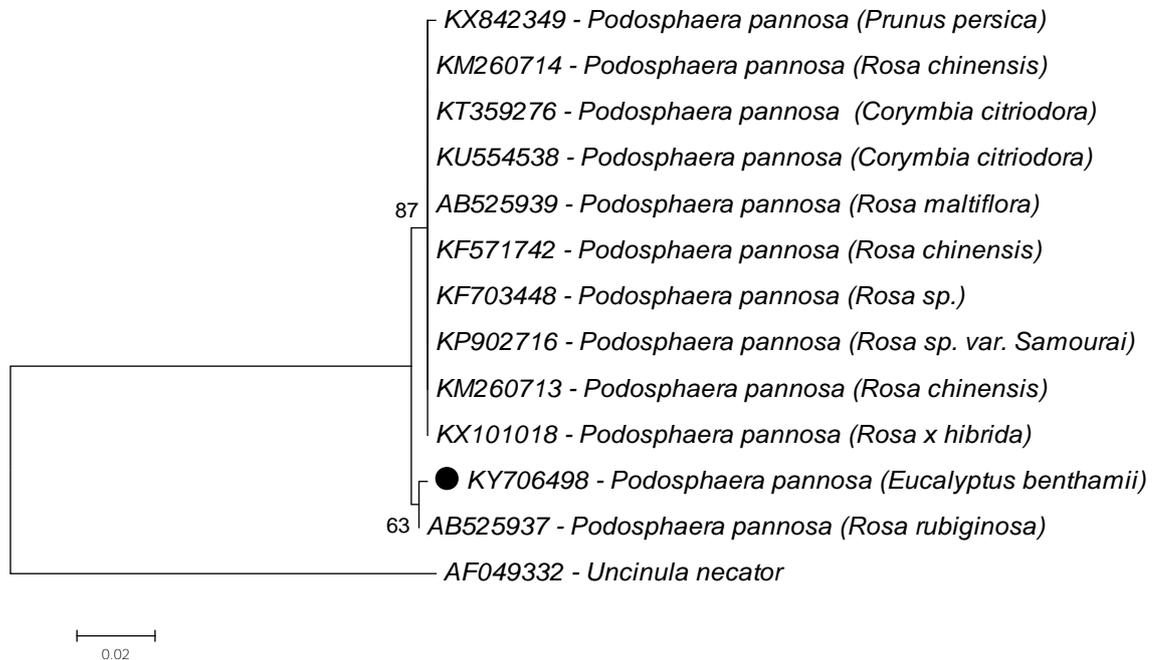


FIGURA 1. Dendrograma filogenético construído para o isolado de oídio proveniente de mudas clonais de *Eucalyptus* spp. baseado no método estatístico “Neighbor-joining”, derivado das sequências das regiões ITSr DNA e alinhadas pelo Modelo tamura-Nei. Porto Alegre, RS, 2015.

O resultado apresentado na identificação mostrou similaridade com outros autores como descrito por Silva *et al.* (2003) que observou na fase de viveiro na região de Minas Gerais a doença oídio ocorrendo em mudas de *Eucalyptus citriodora* e em outras espécies do mesmo gênero, sendo causada pelo fungo *Sphaerotheca pannosa* (sinonímia: *Podosphaera pannosa*), o qual é descrito como a fase sexual de *O. eucalypti* (Figura 2). No Brasil, em eucaliptos apenas a fase anamórfica do agente etiológico tem sido encontrada e identificada como *Oidium eucalypti* Rostrup. (FERREIRA, 1989). Em 2014, na Coreia, foi identificada pela primeira vez a ocorrência de oídio causado por *Podosphaera pannosa* em *Corymbia citriodora* (CHO *et al.*, 2016).

A manifestação de oídio em mudas de eucalipto pode ser atribuída à sua alta suscetibilidade à doença, às condições favoráveis de ambiente e à disponibilidade de inóculo (SILVA *et al.*, 2001). Conforme apresentado no dendrograma filogenético (Figura 2) verifica-se que já existe registros anteriores de *Podosphaera pannosa* ocorrendo em

outras espécies de *Eucalyptus* e de *Rosa*. Isto corrobora com a identificação molecular obtida neste presente estudo, o qual identificou o isolado de oídio de eucaliptos como *P. pannosa*.

As características dos sintomas e a estrutura de oídio em mudas clonais de eucalipto podem ser visualizadas na Figura 2. O formato dos conídios variou de elipsóides a ovóides, em isolados de *Oidium eucalypti*. A formação conidial em cadeia foi observada nos quatro isolados estudados. Os valores médios dos 200 conídios avaliados foram de 32,5 X 20,7  $\mu\text{m}$  (comprimento x largura), sendo o valor máximo de 40 X 22,5  $\mu\text{m}$  e mínimo de 27,5 X 17,5  $\mu\text{m}$ .



FIGURA 2. Sintomas de oídio em mudas clonais de *Eucalyptus* spp. e detalhe da esporulação na folha (A); Conídioforos e conídios de *Oidium eucalypti* (B); conídios de *Oidium eucalypti* onde a régua representa a medida em  $\mu\text{m}$  com aumento de 400 x (C). Porto Alegre, RS, 2015.

Em estudo realizado por Silva *et al.* (2001), isolados de oídio presentes em *Eucalyptus urophylla* e *Rosa* sp. apresentaram formato de seus conídios como elipsóide-ovóide e tamanhos médios de 26,2 X 14,2  $\mu\text{m}$  e 27,2 X 14,2  $\mu\text{m}$ , respectivamente. Já para *Dhalia* sp. os mesmos autores encontraram formato de conídios ovoide-cilíndrico e tamanho médio de 32 X 16,8  $\mu\text{m}$ . No presente estudo obteve-se resultados semelhantes a morfologia dos conídios de oídio observando-se similaridade de comprimento e largura ao oídio da *Dhalia* sp. e mesmo formato ao oídio de *E. urophylla* e *Rosa* sp. Mucci *et al.* (1980) encontraram conídios de *Oidium* originários do eucalipto, com dimensões que

variaram de 21-35,75 x 13-20  $\mu\text{m}$ . Isto demonstra que a morfologia dos conídios de *O. eucalypti* obtidos neste estudo são similares, tanto no formato quanto no tamanho de conídios do fungo, apresentado por outros autores.

Com o teste de suscetibilidade, todos os clones estudados apresentavam-se como suscetíveis sendo possível a observação dos sintomas causados pelo patógeno. Dos modelos matemáticos testados, o que melhor ajustou-se as curvas de progresso tanto para os dados de incidência (I) como de índice de doença (ID) para os quatro clones foi o modelo de Gompertz (Tabela 1), o que já era esperado, visto que a doença causada por *Oidium eucalypti* trata-se de uma moléstia policíclica, na qual o potencial de inóculo do patógeno durante o ciclo da cultura é um dos principais fatores que determinam o grau de incidência e severidade da doença, sendo ainda mais importante no início do desenvolvimento das plantas (BERGAMIN FILHO, 1995).

No modelo de Gompertz, a taxa de crescimento é acentuada no início da doença e muda rapidamente para um crescimento mais lento (MADDEN *et al.*, 2007). Nos clones estudados evidenciou-se comportamento semelhante. Os coeficientes de determinação ( $R^2$ ) significativos obtidos ficaram entre 0,78 e 0,96 para o índice de doença, e entre 0,78 e 0,97 para incidência mostrando um bom ajuste. Chelal & Hau (2015) utilizaram-se deste mesmo modelo para a análise do comportamento de mudas de tomateiro infectadas com *Oidium neolycopersici*, obtendo valores elevados (maiores que 0,98).

TABELA 1. Coeficientes de determinação ( $R^2$ ) e quadrado médio do erro (QME) dos modelos monomolecular, logístico e de Gompertz, de análise temporal do progresso do índice de doença e da incidência de *Oidium eucalypti* em mudas de quatro diferentes clones de *Eucalyptus* spp.. Porto Alegre, RS, 2015.

Clone*	Modelos matemáticos	Índice da doença		Incidência	
		$R^2$	QME	$R^2$	QME
1	Logístico	0,85****	0,0106	0,92****	0,0152
	Gompertz	0,85****	0,0105	0,93****	0,0151
2	Logístico	0,95****	0,0028	0,97****	0,0151
	Gompertz	0,96****	0,0026	0,97****	0,0132
3	Logístico	0,92****	0,0019	0,92****	0,0166
	Gompertz	0,92****	0,0019	0,92****	0,0175
4	Logístico	0,05 <sup>ns</sup>	0,0078	0,02 <sup>ns</sup>	0,0726
	Gompertz	0,78****	0,0019	0,78****	0,0171

\* Clone 1 (*Eucalyptus benthamii*); clone 2 (*E. dunnii*); clone 3 (*E. benthamii*); clone 4 (*E. urophylla* X *E. globulus*); \*\*\*\* p < 0,0001; <sup>ns</sup> Não significativo.

As curvas de incidência (I) e de índice de doença (ID), produzidas pelo modelo de Gompertz, apresentaram comportamento diferente para os quatro clones avaliados (Figura 3).

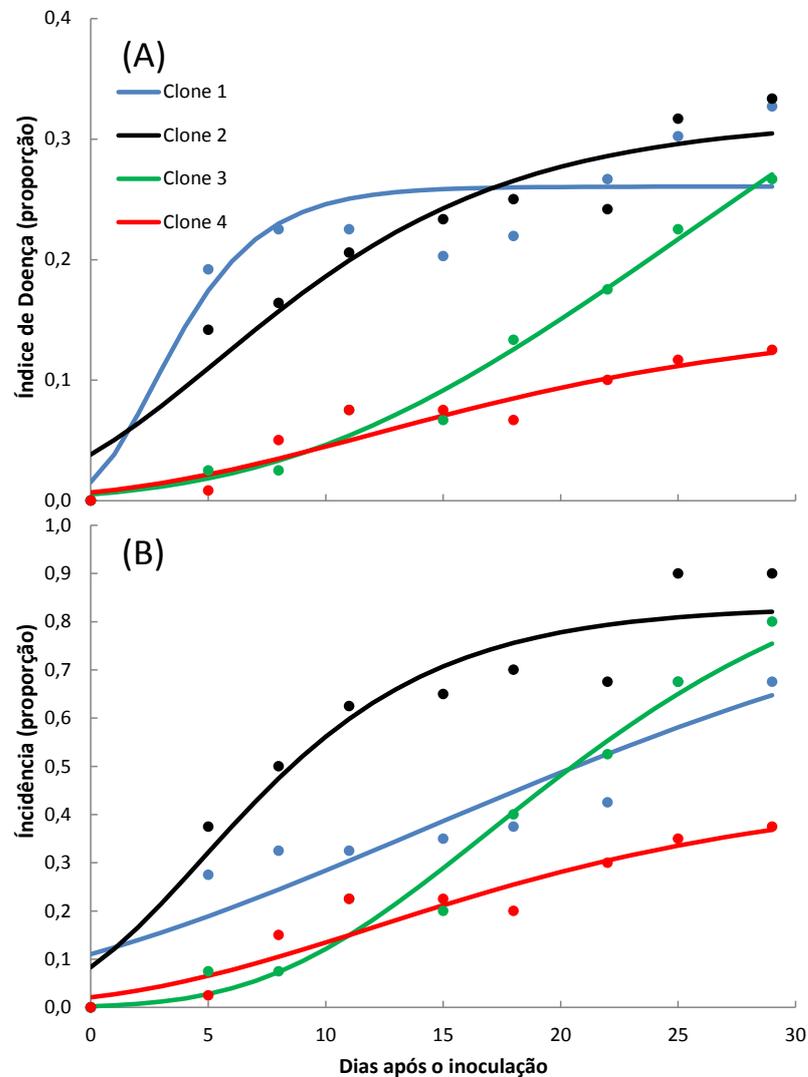


FIGURA 3. Progresso temporal do índice de doença (ID) e da incidência (I) de epidemias de oídio (*Oidium eucalypti*) em quatro clones de eucalipto conforme Modelo de Gompertz. Porto Alegre, RS, 2015. Sendo: Clone 1 (*Eucalyptus benthamii*), Clone 2 (*E. dunni*), Clone 3 (*E. benthamii*) e Clone 4 (*E. urophylla* X *E. globulus*)

Observa-se que o ID do clone 1 (*E. benthamii*) apresentou uma maior taxa de progresso da doença nos primeiros dias após a inoculação de oídio (Figura 3a), e com o passar dos dias, a tendência da doença foi estabilizar-se, o que indica que o patógeno teve maior facilidade de colonizar o tecido inicialmente, mostrando-se mais danoso nas plantas que foram infectadas nesse clone. Posteriormente, os valores de ID estabilizaram-se ( $y$  máx

= 0,261), conforme Tabela 2. Na curva do clone 2 (*E. dunnii*) a doença também incrementou sua intensidade com o passar do tempo, destacando-se por apresentar o maior índice de doença. As curvas dos clones 3 (*E. benthamii*) e 4 (*E.urophylla* x *E. globulus*) inicialmente apresentaram baixos valores de incidência e severidade de doença, porém a partir de 12 dias após a inoculação, nota-se que para o clone 3 o ID tendeu ao aumento da doença, enquanto para o clone 4 a houve tendência a estabilização da doença (Figura 3).

Em contraste, as curvas de I apresentaram comportamento diferente quando comparadas com as curvas de ID. A incidência do agente causal de oídio no clone 2 (*E. dunnii*) foi a maior comparativamente aos demais clones, além de atingir maiores taxas de incidência em menor tempo. Propensão ao aumento da incidência da doença também é observada com o comportamento das curvas dos clones 1 e 3 ambos os clones de *E. benthamii*. Isto condiz com a observação realizada nos minijardins clonais e casas de vegetação onde a incidência de oídio é alta tanto nos materiais genéticos de *E. dunnii* quanto nos de *E. benthamii*.

TABELA 2. Parâmetros<sup>1</sup> estimados pelo modelo de Gompertz para análise temporal do índice de doença e da incidência de *Oidium eucalypti* em mudas de quatro clones de *Eucalyptus* spp. Porto Alegre, RS, 2015.

Análises	Clone	Parâmetros estimados pelo modelo de Gompertz									
		$R^2$	$y_0$	$\pm$ erro		$r$	$\pm$ erro		$y_{max}$	$\pm$ erro	
<b>Índice de doença</b>	1 <sup>2</sup>	0,85****	0,015	0,048	ns	0,390	0,240	ns	0,261	0,022	ns
	2	0,96****	0,038	0,018		0,138	0,038		0,317	0,027	
	3	0,92****	0,005	0,000		0,062	0,034		0,597	0,446	
	4	0,78****	0,007	0,010		0,094	0,071		0,151	0,070	
<b>Incidência</b>	1	0,93****	0,110	0,032	A*	0,056	0,077	B*	1,000	0,000	A*
	2	0,97****	0,084	0,044	AB	0,177	0,038	A	0,832	0,044	B
	3	0,92****	0,002	0,004	B	0,106	0,014	A	1,000	0,000	A
	4	0,78****	0,021	0,021	AB	0,094	0,071	AB	0,452	0,210	B

<sup>1</sup> Coeficientes de determinação ( $R^2$ ), índice de doença inicial ( $y_0$ ) e assintótico ( $y_{max}$ ), e taxa de progresso da epidemia ( $r$ ) estimados pelo modelo de Gompertz; <sup>2</sup>Clone 1 (*Eucalyptus benthamii*); clone 2 (*E. dunnii*); clone 3 (*E.benthamii*); clone 4 (*E.urophylla* X *E.globulus*); \*\*\*\* p<0.0001; ns, Não significativo; \* Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste *t* a 5% de probabilidade. Sendo: Clone 1 (*Eucalyptus benthamii*), Clone 2 (*E. dunnii*), Clone 3 (*E. benthamii*) e Clone 4 (*E. urophylla* X *E. globulus*)

Ainda na Figura 3, o clone 4 (*E. urophylla* x *E. globulus*) foi o que apresentou menor ID e I da doença, dessa maneira considerado o clone menos suscetível a oídio em comparação aos demais avaliados neste estudo (Tabela 3). Silva *et al.* (2014), em estudo

avaliando a resistência parcial da ferrugem do eucalipto (*Puccinia psidii*) em diferentes espécies de *Eucalyptus* observaram que *Eucalyptus urograndis* (*E. grandis* x *E. urophylla*) apresentou um menor número médio de pústulas por folíolo, menor severidade, maior período latente médio e valores menores da área abaixo da curva do progresso da doença, tendo dessa forma maior resistência parcial à ferrugem. Isto demonstra que um híbrido de eucalipto pode apresentar maior resistência e menor incidência a doenças fúngicas, como por exemplo, ao híbrido *E.urophylla* X *E. globulus* que apresentou menor incidência e severidade ao fungo biotrófico *O. eucalypti*.

A avaliação da incidência e da severidade da mancha foliar causada por *Cylindrocladium candelabrum* em plantios jovens de *E. benthamii* demonstrou incidência da doença em árvores de 2,6 até 43,8 % e dados médios de severidade entre 1,2 e 2,9 (SCHULTZ *et al.*, 2015). Neste mesmo estudo, foi também avaliada a incidência de doença causada por *Pestalotiopsis sp.*, *Botrytis cinerea*, *Rhizoctonia sp.* em mudas desse mesmo clone, sendo os resultados de incidências de 61,3%, 2,9% e 31,9%, respectivamente. Isso demonstra que *E.benthamii* possui suscetibilidade a incidência de doenças causadas por outros fungos além de *Oidium eucalypti*, detectado neste estudo.

Os parâmetros  $y_0$ ,  $r$  e  $y_{\text{máx}}$  estimados pelo modelo de Gompertz para as epidemias de *O. eucalypti* sobre os diferentes clones avaliados apresentaram diferença significativa apenas para os dados de incidência (Tabela 2). O clone 1 apresentou maior índice inicial da doença ( $y_0 = 0,110$ ) diferindo significativamente do clone 3 ( $y_0 = 0,002$ ). As taxas de progresso da epidemia foram maiores para os clones 2 ( $r = 0,177$ ) e 3 ( $r = 0,106$ ), e analisando o parâmetro  $y_{\text{máx}}$  nota-se que os clones 1 e 3 apresentaram 100 % de incidência. Estes valores obtidos estão de acordo com o comportamento das curvas representadas pelo modelo em que os clones de *E. benthamii* e *E. dunnii* mostraram alta incidência de oídio. A expressão dos sintomas de oídio está diretamente relacionada com as diferenças genéticas de cada clone de eucalipto. Grigoletti Junior *et al.* (2005), relataram *E. benthamii* como uma das espécies altamente suscetíveis a *Oidium sp.* em condições de viveiro e casas de vegetação.

Com relação à *E. dunnii*, foi detectada alta variabilidade genética para resistência à ferrugem causada por *Puccinia psidii*, apresentando coeficiente de variação genética de 36,07% e 70% das progênies avaliadas sendo estas imunes a ferrugem (PINTO *et al.*, 2014). Entretanto, com os resultados obtidos por este estudo, verifica-se que *E. dunnii* apresenta-se com alta incidência a oídio apresentando baixa resistência ao ataque deste patógeno.

Márquez *et al.* (2010), estudando a ocorrência de espécies fúngicas em folhas juvenis e adultas de plantações de *E. globulus* observaram que, em geral, as folhas juvenis são mais propensas à infecção por fungos, patógenos e endófitos do que as folhas adultas. Segundo James & Bell (2001), folhas adultas de *E. globulus* e de outras espécies têm cutículas mais espessas e baixa densidade estomática do que as folhas juvenis. Em estudos comparativos com folhas juvenis de genótipos suscetíveis e resistentes de *E. globulus* demonstraram que as características anatômicas como densidade de mesófilos de paliçada, espessura de cutícula e cobertura de cera de estômatos, estão associadas à resistência (SMITH *et al.*, 2006). Essas características podem explicar a menor suscetibilidade à severidade e a incidência de oídio pelo clone híbrido (*E.urophylla* x *E. globulus*).

Observando-se a proporção da doença tanto para os valores de  $ID_f$  quanto de  $I_f$  verifica-se que o clone 4 (híbrido) apresentou diferença significativa em relação aos outros clones, com proporção de  $ID_f$  e  $I_f$  de 0,1250 e 0,3750, respectivamente. Sendo assim, esse clone destaca-se como o menos suscetível à doença. Já os clones 1 e 3 de *E. benthamii* e o clone 2 de *E. dunnii*, foram os mais suscetíveis, apresentando proporções elevadas superando o valor de 0,6000 quando avaliados quanto a incidência final da doença (Tabela 3).

TABELA 3. Índice de doença final ( $ID_f$ ) e incidência final ( $I_f$ ) obtida aos 29 dias de avaliações da doença causada por *Oidium eucalypti* nos diferentes clones de eucalipto. Porto Alegre, RS, 2015.

Clone	$ID_f$	$I_f$
<i>Eucalyptus benthamii</i> (Clone 1) <sup>1</sup>	0,3267 A	0,6750 A
<i>Eucalyptus dunnii</i> (Clone 2)	0,3333 A	0,9000 A
<i>Eucalyptus benthamii</i> (Clone 3)	0,2667 AB	0,8000 A
<i>E.urophylla</i> x <i>E.globulus</i> (Clone 4)	0,1250 B	0,3750 B
Causa de variação	<b>probabilidade (teste F)</b>	
<b>Clone</b>	0,0018	<0,0001
<b>Tempo</b>	<0,0001	<0,0001
<b>Clone x Tempo</b>	0,0529	0,0454

<sup>1</sup>Clone 1 (*Eucalyptus benthamii*); clone 2 (*E. dunnii*); clone 3 (*E.benthamii*); clone 4 (*E.urophylla* X *E.globulus*).

Relacionando os dados de ID e I ao longo do experimento, verificou-se que o clone 1 atingiu ao longo das avaliações maiores proporções de ID sendo maior que 0,4 e uma proporção máxima de incidência de 0,8. Este clone desenvolveu ID maiores e I menores na

primeira metade do período avaliado, o que justifica a maior inclinação da reta (Figura 4). Em contraste o clone 2 apresentou valores baixos de ID, porém apresentou maiores valores de I ao longo das avaliações, chegando a atingir a proporção 1. O clone 3 também apresentou valores altos de I atingindo proporção maior que 0,8. Já o clone 4 apresentou valores inferiores a 0,3 para ID e inferiores a 0,8 para I (Figura 4). Esta comparação entre as proporções da doença entre os clones mais uma vez reforça a suscetibilidade dos clones 1 e 2 à doença.

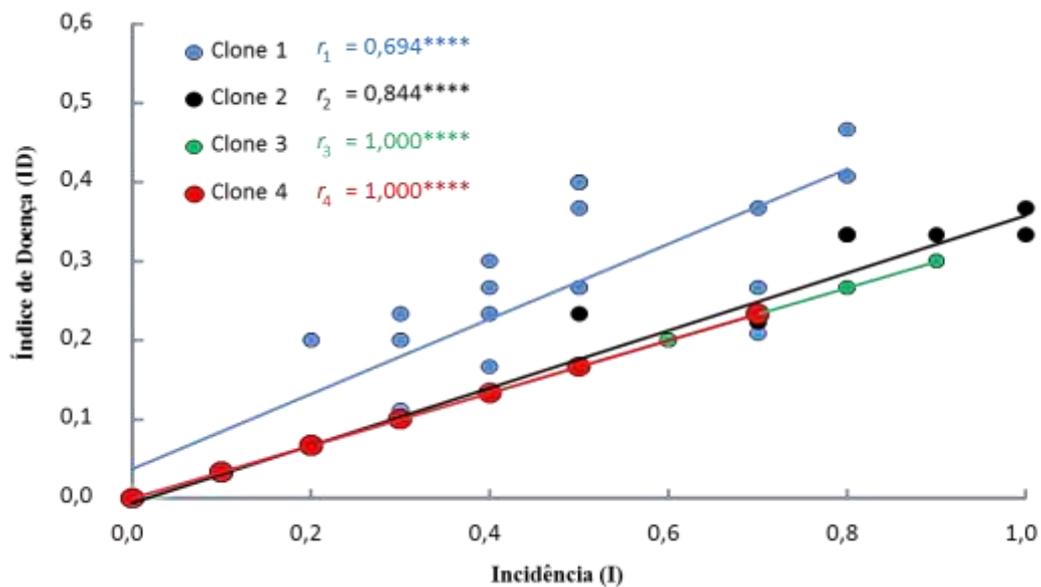


FIGURA 4. Correlação dos resíduos entre o índice de doença (ID) e a incidência (I) de *Oidium eucalypti* em quatro clones de eucaliptos. Clone 1 (*Eucalyptus benthamii*); clone 2 (*E. dunnii*); clone 3 (*E. benthamii*); clone 4 (*E. urophylla* X *E. globulus*);\*\*\*\*p<0,0001; r, coeficientes de correlação de Pearson. Porto Alegre, RS, 2015.

Mafia *et al.* (2012) avaliaram os coeficientes de correlação de Pearson obtidos entre os valores de severidade da ferrugem do eucalipto (*Puccinia psidii*) avaliada *ex vitro* aos 20 dias e de incidência da doença com o patógeno inoculado em explantes *in vitro* foram de 0,93; 0,98; e 0,98% para 7, 11 e 14 dias após a inoculação, respectivamente. Os autores observaram comportamento diferente entre os clones de eucaliptos perceberam que os clones mais resistentes obtiveram mesmo comportamento entre os intervalos das avaliações.

Valeriano *et al.* (2015) obtiveram diferença significativa em cinco diferentes clones de *E. urograndis* a partir da primeira avaliação de incidência de oídio aos 7 dias,

verificando menor incidência do patógeno em dois clones com a última avaliação 35 dias após o aparecimento da doença.

Com os dados obtidos no presente estudo e com resultados obtidos por outros pesquisadores constata-se a existência de variabilidade nos materiais genéticos e a resistência de clones de eucaliptos a determinada doença deve ser observada, pois certamente a utilização de clones resistentes pode evitar a incidência de doenças contribuindo para o sucesso no manejo de doenças em mudas desta espécie florestal.

## CONCLUSÃO

*Oidium eucalypti* é o agente causal da doença do oídio em mudas clonais de *Eucalyptus*, confirmado através de análise molecular.

O clone 1 (*Eucalyptus benthamii*), o clone 2 (*E. dunnii*) e o clone 3 (*E. benthamii*) são considerados mais suscetíveis a oídio e o clone 4 (*E. urophylla* x *E. globulus*) é menos suscetível, sendo o último com mais baixo índice da doença ao final da avaliação deste estudo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRIOS, G.N. **Plant Pathology**. 3th ed. San Diego. Academic. 1998.

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

BERGAMIN FILHO, A. Curvas de progresso da doença. In: BERGAMIM FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIN, L. **Manual de fitopatologia**. São Paulo: Ceres, 1995, v.1, cap.30, p.602-626.

BERGAMIN FILHO, A.; AMORIM, L. **Doenças de plantas tropicais: epidemiologia e controle econômico**. São Paulo: Ceres, 1996. 299 p.

BRAUN, U. **A monograph of the Erysiphales (Powdery Mildews)**. Berlin. J. Cramer, 1987.

BOESEWINKEL, H. J. The morfology of the imperfect states of powdery mildews (Erysiphaceae). **The Botanical Review**, Bronx, v. 46, p. 167-224, 1980.

- CHELAL, J.; HAU, B. Temporal Dynamics of Powdery Mildew (*Oidium neolycopersici*) and its Effects on the Host Growth Dynamics of Tomato. **Journaul of Phytopathology**, Berlin, v. 163, p. 711–722, 2015.
- CHO, S. E. et al. Occurrence of powdery mildew caused by *Podosphaera pannosa* on lemon eucalyptus. **Forest pathology**, Berlin, v. 46, n.3, p.264-266, 2016.
- DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, Rosario, v.1, 13-15, 1991.
- FALEIRO, F. G. et al. Uso de marcadores RAPD na classificação de isolados de *Phytophthora* spp. causadores da podridão parda do cacaueteiro no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 3, p.312-315, 2003.
- FERREIRA, F. A. **Patologia florestal**: principais doenças florestais no Brasil. Viçosa, MG, SIF, 1989.
- FURTADO, E. L. et al. **Doenças em viveiros de Eucalyptus sp**: diagnóstico e manejo. Botucatu, SP, Votorantim / Celulose e Papel. 2000. p. 23
- GORTER, G. J. M. A. Identification of South African Erysiphaceae with a key to the species. **Phytophylactica**, Pretoria, v. 20, p. 113-119. 1988.
- GRIGOLETTI JUNIOR, A.; BIZI, R. M.; AUER, C. G. **Oidium sp. em mudas de eucalipto**. Colombo, PR, 2005. (Comunicado Técnico 144)
- HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium**, Oxford, n. 41, 1999. p. 95 – 98.
- JAMES, A. S.; BELL, D. T. Leaf morphological and anatomical characteristics of heteroblastic *Eucalyptus globulus* ssp. *globulus* (Myrtaceae). **Australian Journal Botany**, Collingwood, v. 49, p.259–269, 2001.
- KRUGNER, T. L.; AUER, C. G. Doenças dos eucaliptos. In: KIMATI, H. et al. **Manual de fitopatologia**: doenças das plantas cultivadas. 4. ed. São Paulo: Agronômica CERES, 2005, p. 319-332.
- LIMA, A.A. et al. **Identificação molecular de linhagens de fungos pertencentes aos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* utilizando marcadores RAPD**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2008. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 218)
- MADDEN; L.V.; G. HUGHES, G.; VAN DEN BOSCH, F. The Study of Plant Disease Epidemics. **APS Press- American Phytopathological Society**, St. Paul, 2007.
- MÁRQUEZ, S. S.; BILLS, G. F.; ZABALGOGEAZCOA, I. Fungal species diversity in juvenile and adult leaves of *Eucalyptus globulus* from plantations affected by *Mycosphaerella* leaf disease. **Annals of Applied Biology**, Warwickshire, v. 158, n.2, p.177-187, 2010.

MCKINNEY, H.H. Influence of soil, temperature and moisture on infection of wheat seedlings by *Helminthosporium sativum*. **Journal of Agricultural Research**, Washington, v.26, p.195-217, 1923.

MAFIA, R.G.; MARCHESI, H.P.; AUN, C.P. Avaliação de clones de eucalipto para resistência à ferrugem em condições de micropropagação. **Revista Árvore**, Viçosa, v.36, n.5, p.843-849, 2012.

MUCCI, E. S. F.; PITTA, G. P. S.; YOKOMIZO, N. K. S. **O Oídio em mudas de eucalipto**. São Paulo: Instituto Florestal/Instituto Biológico, 1980. (Mimeografado)

PINHEIRO, M. R. R. **Estudo de variabilidade genética de *Aspergillus flavus* com base para o desenvolvimento de PCR multiplex para detecção de fungos produtores de aflatoxinas em castanha-do-brasil e castanha-de-caju**. 2004. 149 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Genômicas e Biotecnologia) – Universidade Católica de Brasília, Brasília, 2004.

PINTO, C.S. et al. Genetic variability in progenies of *Eucalyptus dunnii* Maiden for resistance to *Puccinia psidii*. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Viçosa, v. 14, n.3, p. 187-193, 2014.

REIS JUNIOR, F.B. et al. Restrição do 16S-23S DNAr intergênico para avaliação da diversidade de *Azospirillum amazonense* isolado de *Brachiaria* spp. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 3, p. 431-438, 2006.

SCHULTZ, B. et al. Impacto damancha foliar causada por *Cylindrocladium candelabrum* em plantios jovens de *Eucalyptus benthamii* em Rio Negrinho – SC. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 25, n. 2, p. 307-316, 2015.

SILVA, D. E. M.; AZEVEDO, L. A. S.; POLTRONIERI, T. P. S. Avaliação da resistência de espécies de eucalipto à ferrugem (*Puccinia psidii* Winter). **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.40, n.1, p.54-62, 2014.

SILVA, E. N.; DUARTE, J. B.; REIS, A. J. S. Seleção da matriz de variância-covariância residual na análise de ensaios varietais com medidas repetidas em cana-de-açúcar. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.45, n.6, p.993-999, 2015.

SILVA, M. D. D. et al. Etiologia do oídio do eucalipto. **Fitopatologia Brasileira**, Viçosa, v. 26, n.2, 2001.

SILVA, M. D. D. et al. Germinação de conídios de *Sphaerotheca pannosa* obtidos de eucalipto. **Fitopatologia Brasileira**, Viçosa, v.28, n.6, p. 674-681, 2003.

SILVA, M. D. D.; ALFENAS, A. C. Identificação de *Oidium* originário do eucalipto, feijoeiro e urucunzeiro, e influência de fatores do ambiente na germinação de conídios de *Sphaerotheca pannosa*. In: Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 27. 1994. **Suplemento. Fitopatologia Brasileira**, v. 19, 1994. p. 154.

SMITH, A. H. **The development of strategies for the management and research of foliar pathogens on eucalypt plantations: using Mycosphaerella as a case study.** 2006. 216 f. Tese (Doctor of Philosophy) University of Tasmania, Tasmania, 2006.

SPOLTI, P. et al. Disease Risk , Spatial Patterns , and Incidence-Severity Relationships of Fusarium Head Blight in No-till Spring Wheat Following Maize or Soybean. **Plant Disease**, St. Paul, v. 99, n. 10, p. 1360–1366, 2015.

TAMURA, K. et. al. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v. 24, p.1596-1599, 2007.

VALERIANO, R. **Escala diagramática e reação diferencial de clones para oídio do eucalipto.** 2013. 52 p. Dissertação (Mestre em Agronomia/Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013.

VALERIANO, R. et al. Escala diagramática e reação diferencial de clones para Oídio do Eucalipto. **Scientia Forestales**, Piracicaba, v. 43, n. 105, p. 51-61, 2015.

WHITE, T. et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M. A. et al. Comparative evolutionary analysis of rDNA ITS regions in Drosophila. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v. 11, n. 3, p. 513- 522, 1990.

.

## 4 CAPÍTULO 2 - CONTROLE PREVENTIVO E CURATIVO DE *Oidium eucalypti* EM MUDAS CLONAIIS DE *Eucalyptus benthamii*

### RESUMO

O *Eucalyptus benthamii* é uma das principais espécies de eucalipto plantadas na região Sul do Brasil, especialmente devido à sua resistência ao clima frio, sua rusticidade e seu crescimento. Uma das principais doenças ocorrentes em minijardins clonais, casas de vegetação e viveiros florestais é o oídio, causado pelo fungo *Oidium eucalypti*. Alternativas ao controle químico vêm sendo objeto de pesquisas para o controle dessa doença. Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência de produtos biológicos à base de *Trichoderma* spp. e *Bacillus* spp. aplicados como tratamentos preventivos e curativos para controle de *O. eucalypti* em mudas clonais de *E. benthamii*. Os tratamentos preventivos e curativos foram a base de: *Trichoderma harzianum* (THP), *T. atroviride* (TAI), *T. harzianum* (THE), *Trichoderma* spp. (TTA), *Bacillus* spp. (BNE), Enxofre (KUM), Difenconazol (SCO) e água destilada - testemunha (AD). Foi realizada a aplicação de forma preventiva por pulverização de todos os tratamentos sete dias antes da inoculação do patógeno, e de forma curativa, dez dias após a inoculação do patógeno. As mudas dos tratamentos preventivos foram mantidas durante 56 dias em câmara de crescimento com temperatura de  $23 \pm 2^\circ\text{C}$  e fotoperíodo de 12 h e, durante 37 dias em casa de vegetação, as referentes aos tratamentos curativos, sendo realizadas avaliações semanais de incidência e severidade da doença com auxílio de uma escala descritiva para ambos os tratamentos. As variáveis analisadas foram Índice da Doença (ID) e Incidência (I), sendo calculadas com base nessas variáveis a área abaixo da curva da doença (AACPD) para cada tratamento. Os resultados evidenciaram como tratamentos preventivos eficazes o BNE (*Bacillus* spp.) e TAI (isolado *T. atroviride*) e como tratamento curativo mais eficaz BNE (*Bacillus* spp.) para controle biológico do *O. eucalypti* em mudas de *E. benthamii*.

Este estudo comprova que tratamentos à base de produtos biológicos podem ser eficazes para controle do oídio do eucalipto em viveiros e minijardins clonais.

**Palavras-chave:** Oídio; *Trichoderma* spp.; *Bacillus* spp.; produção florestal.

## **PREVENTIVE AND CURATIVE CONTROL OF *Oidium eucalypti* IN *Eucalyptus benthamii* CLONAL SEEDLINGS**

### **ABSTRACT**

*Eucalyptus benthamii* is one of the main eucalyptus species planted in the southern region of Brazil, especially due to resistance to cold weather, rusticity and growth. In the production of seedlings, one of the main diseases occurring in clonal nurseries is powdery mildew caused by the fungus *Oidium eucalypti*. Alternatives to chemical control have been the object of research to control this disease. The objective of this work was to evaluate the efficiency of biological products based on *Trichoderma* spp. and *Bacillus* spp. applied as preventive and curative treatments for control of *Oidium eucalypti* in clonal seedlings of *E. benthamii*. Preventive and curative treatments were based on: *Trichoderma harzianum* (THP), *T. atroviride* (TAI), *T. harzianum* (THE), *Trichoderma* spp. (TTA), *Bacillus* spp. (BNE), Sulfur (KUM), Difenoconazol (SCO) and distilled water – control (AD). It was applied preventively by spraying all treatments seven days before inoculation of the pathogen, and in a curative way, ten days after inoculation of the pathogen. The seedlings belonging to the preventive treatments were maintained for 56 days in a growth chamber with temperature of  $23 \pm 2^\circ\text{C}$  and 12 h of photoperiod; and during 37 days in the greenhouse of the curative treatments. Weekly evaluations of the incidence and severity of the disease were carried out using a descriptive scale for both treatments. The variables analyzed were Disease Index (ID) and Incidence (I), being calculated based on these variables the area below the disease curve (AACPD) for each treatment. The results evidenced effective BNE (*Bacillus* spp.) and TAI (isolated *T. atroviride*) as effective preventive treatments and BNE treatment (*Bacillus* spp.) applied as curative treatment for

biological control of *O. eucalypti* in *E. benthamii* seedlings. This study proves that treatments based on biological products may be effective for controlling eucalyptus powdery mildew in clonal nurseries.

**Key-words:** power mildew; *Bacillus* spp.; *Trichoderma* spp.; forest production.

## INTRODUÇÃO

No Brasil, a cultura do eucalipto é intensiva e, no estado do Rio Grande do Sul, vem ocupando áreas significativas de produção. Os plantios são estabelecidos principalmente com mudas clonais formadas a partir de árvores matrizes selecionadas por meio de critérios que expressem elevada produtividade média. Segundo relatório da Indústria Brasileira de Árvores (2016), no Brasil, a área total de árvores plantadas totalizou 7,8 milhões de ha em 2015, com crescimento de 0,8% em relação ao ano anterior. Segundo o mesmo relatório, os plantios de eucalipto ocupam 5,6 milhões de ha da área de árvores plantadas no país e, últimos cinco anos, o crescimento da área de eucalipto foi de 2,8% ao ano.

Dentre as espécies plantadas no país, *Eucalyptus benthamii* apresenta como características peculiares, sua resistência à geada, boa forma do fuste, rusticidade e rapidez de crescimento, destacando-se nos plantios de florestas clonais na região sul do Brasil. Suas características intensificaram a demanda por mudas e, com isso, houve o estímulo por estudos aprofundados sobre os aspectos relevantes ao desenvolvimento da espécie em condições de viveiro (SCHULTZ, 2011). Durante a produção de mudas de eucalipto em viveiros florestais, ataques de patógenos são frequentes, principalmente àqueles causados por fungos, os quais reduzem a produção de mudas, causando prejuízos econômicos, dependendo da espécie atacada, da época do ano (SANTOS *et al.*, 2001) e do estágio de desenvolvimento das mudas.

Uma das principais doenças que se destaca como causadora de danos em minijardins clonais de *E. benthamii* é o ataque de oídio causado pelo fungo *Oidium eucalypti*. Este patógeno tem maior incidência em folhas e brotos jovens, ocorrendo principalmente em casa de vegetação e minijardim clonal, causando encarquilhamento e superbrotação das plantas, ocasionando, em casos mais severos, a morte de mudas (KRUGNER & AUER, 2005). Pela alta capacidade de disseminação de conídios, esse

fungo infecta rapidamente minicepas sadias, causando infestação em todo o minijardim clonal.

Recentemente foi registrado no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, o fungicida Priori Top<sup>®</sup> composto por azoxistrobina e difenoconazol, para o controle de *O. eucalypti* na cultura do eucalipto. Entretanto, segundo Campanhola e Bettiol (2003), já foram propostas alternativas de controle cultural, genético e com produtos naturais. Desse modo, outras formas de controle também podem ser utilizadas, como alternativa ou em uso conjunto, já que a melhor maneira de manter uma população de patógeno controlada é a combinação de técnicas, ou seja, manejo integrado.

Uma alternativa ao controle químico, por exemplo, é o uso de agentes de controle biológico como *Trichoderma* spp. e *Bacillus* spp., que têm sido recomendados como potenciais biocontroladores de diversos patógenos causadores de doenças de plantas, especialmente nas últimas décadas. A capacidade de *Trichoderma* spp. de atuar como agente de biocontrole é relatada na literatura há mais de 60 anos, sendo que muitos isolados são classificados como simbiossiontes de plantas e atuadores no controle de fitopatógenos (BROTMAN *et al.*, 2010).

As espécies do gênero *Trichoderma* estão entre os antagonistas mais estudados e são encontradas naturalmente em diversos tipos de solo. Agem contra fitopatógenos por diferentes mecanismos de ação, tais como: antibiose, competição por nutrientes e substrato, micoparasitismo, produção de enzimas degradadoras de parede celular, promoção do crescimento das plantas e indutores de resistência (HARMAN *et al.*, 2004; SHORESH *et al.*, 2005; VITERBO *et al.*, 2005; VINALE *et al.*, 2008). *Trichoderma* spp. é utilizado no controle de doenças importantes como as causadas por *Botrytis cinerea* (SANZ *et al.*, 2005), *Rhizoctonia solani* (RUOCCO *et al.*, 2009), *Pythium ultimum* (MONTERO *et al.*, 2011), *Fusarium oxysporum* (CARVALHO *et al.*, 2011) e *Moniliophthora perniciosa* (SIMÕES *et al.*, 2012).

Já espécies de *Bacillus* são antagonistas de fungos fitopatogênicos e podem ser usadas no controle biológico (ANGONESE *et al.*, 2009). Segundo Bettiol & Morandi (2009), dentro do gênero *Bacillus*, as espécies *Bacillus subtilis* e *B. pumilus* são capazes de inibir bactérias e fungos fitopatogênicos. *Bacillus* spp. tem a capacidade de controlar doenças causadas por *Fusarium moniliforme* (BACON *et al.*, 2001), *Colletotrichum acutatum* (KUPPER *et al.*, 2003), *Erwinia carotovora* (DONG *et al.*, 2004), *Botrytis cinerea* (HANG *et al.*, 2005) e *Puccinia psidii* (RAASCH *et al.*, 2012), que causam grandes prejuízos aos cultivos afetados.

O objetivo do trabalho foi avaliar a eficiência de produtos biológicos à base de *Trichoderma* spp. e *Bacillus* spp. aplicados de forma preventiva e curativa para controle de *Oidium eucalypti* em mudas clonais de *E. benthamii*.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Local dos experimentos, procedência das mudas e inóculo**

Os ensaios foram realizados nos meses de janeiro a março de 2016 em casa de vegetação pertencente ao Laboratório de Bacteriologia Vegetal do Departamento de Fitossanidade da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), em Porto Alegre - RS.

Foram utilizadas mudas clonais de *Eucalyptus benthamii* com aproximadamente 90 dias de idade, fornecidas pelo viveiro da empresa CMPC - Celulose Riograndense, localizado em Barra do Ribeiro, RS (Coordenadas geográficas: 30°20'38.3" S 51°14'43.9" O). As mudas foram imediatamente trazidas para a casa de vegetação da UFRGS, onde foram acondicionadas em bandejas para tubetes de 50 cm<sup>3</sup> e mantidas com a irrigação manual diária, umedecendo-se apenas o substrato, durante a execução do experimento.

O isolado de *Oidium eucalypti* foi obtido no minijardim clonal, fonte natural de ocorrência do patógeno, pertencente à mesma empresa fornecedora das mudas. O inóculo foi mantido em minicepas que permaneceram em sala climatizada 23±2°C e fotoperíodo de 12 h. Para o procedimento de inoculação, tanto nas minicepas quanto nas mudas que receberam os tratamentos, conídios de oídio foram coletados de folhas infectadas naturalmente em minijardim clonal e retirados através de raspagem superficial com auxílio de um pincel, sendo inoculados no terço superior de mudas saudáveis.

### **Tratamentos preventivos e curativos**

Foram testados como tratamentos para o controle preventivo e curativo cinco agentes de controle biológico: Predatox<sup>®</sup> composto por *Trichoderma* spp.; Ecotrich<sup>®</sup> composto de *Trichoderma harzianum*; Trichodel aéreo<sup>®</sup> composto de *Trichoderma harzianum*; Nemathel<sup>®</sup> composto de *Bacillus* spp. e *Trichoderma atroviride* suspensão líquida de conídios. Este último foi isolado de madeira de *Pinus* sp. em laboratório em estudo realizado por Lazarotto *et al.* (2016). Para todos os agentes de biocontrole, utilizou-

se a concentração de  $10^7$  conídios/mL ou UFC/mL. Dois fungicidas foram utilizados como controles positivos para comparar a eficácia dos agentes de biocontrole: Kumulus<sup>®</sup>, composto de enxofre (0,3 g/100 mL de água destilada); e Score<sup>®</sup>, composto por difenoconazol (0,03 mL/100 mL de água destilada), bem como um tratamento testemunha com a aplicação de somente água (Tabela 1). Os tratamentos preventivos foram compostos por 4 repetições de 6 mudas para cada tratamento testado e os tratamentos curativos foram compostos por 4 repetições de 10 mudas para cada tratamento testado, sendo ambos mantidos em delineamento inteiramente casualizado.

TABELA 1. Descrição dos tratamentos biológicos e químicos utilizados para o controle de oídio em *Eucalyptus benthamii*. Porto Alegre, RS, 2016.

Tratamento	Abreviatura	Composição	Nome comum
<b>Biológico</b>	THP	<i>Trichoderma harzianum</i>	Predatox <sup>®</sup>
	THE	<i>Trichoderma harzianum</i>	Ecotrich <sup>®</sup>
	TTA	<i>Trichoderma</i> spp.	Trichodel aéreo <sup>®</sup>
	TAI	<i>Trichoderma atroviride</i>	Isolado próprio
	BNE	<i>Bacillus</i> spp.	Nemathel <sup>®</sup>
<b>Químico</b>	KUM	Enxofre	Kumulus <sup>®</sup>
	SCO	Difenoconazol	Score <sup>®</sup>
<b>Controle</b>	AD	Água destilada	Testemunha

<sup>®</sup>Nome comercial registrado do produto.

Utilizou-se o mesmo volume de suspensão na concentração de  $10^7$  conídios ou células/mL e adicionou-se uma gota de Tween 80. A diluição de cada produto foi determinada a partir da concentração estabelecida nos rótulos, com exceção da suspensão de conídios de *T. atroviride*, que foi submetida a contagem em câmara de Neubauer. Já para os fungicidas, utilizou-se a dose recomendada do rótulo, sendo utilizada a dose recomendada para oídio da roseira (*Sphaerotheca panossa*) de Score<sup>®</sup> (30 mL / 100 L de água) e a recomendação de Alfenas *et al.* (2009) para oídio do eucalipto para o Kumulus<sup>®</sup> (3 g / L de água).

A aplicação dos tratamentos preventivos e curativos foi realizada através de pulverização com auxílio de borrifadores manuais individuais para cada produto testado. Os tratamentos foram pulverizados de forma preventiva, sete dias antes da inoculação do patógeno, na parte adaxial e abaxial de todas as folhas até o ponto de escorrimento. Após uma semana, inoculou-se o patógeno com auxílio de um pincel através de raspagem de conídios presentes em folhas infectadas e estes foram transferidos para o terço superior das mudas. As mudas permaneceram em câmara de crescimento com temperatura de  $23\pm 2^{\circ}\text{C}$  e fotoperíodo de 12 h, por 56 dias.

Para a aplicação dos tratamentos curativos realizou-se o mesmo procedimento de inoculação, sendo esta realizada 10 dias antes da primeira aplicação dos tratamentos. Os tratamentos curativos foram aplicados na parte adaxial e abaxial de todas as folhas até o ponto de escorrimento, e as mudas permaneceram em casa de vegetação em condições de temperatura ambiente, por 37 dias.

A severidade da doença nas mudas de eucalipto foi avaliada semanalmente, em intervalos de sete dias. Para mensuração da severidade, utilizou-se a escala descritiva apresentada na Tabela 2.

TABELA 2. Escala descritiva utilizada para avaliar da severidade do oídio em mudas clonais de *Eucalyptus benthamii*. Porto Alegre, RS, 2016.

Nota	Quantificação da severidade	Sintomas visuais
0	Ausência de Sintomas	Ausentes
1	Infecção Leve	Presença de micélio do fungo nas folhas, sem esporulação
2	Infecção Média	Esporulação sobre os primeiros pares de folhas
3	Infecção Alta	Deformação, enrolamento e queda das folhas

As notas desta escala descritiva foram utilizadas para o cálculo do índice de doença (ID, proporção de 0 a 1), expresso pela equação:

$$\text{ID} = \frac{\sum(Y * X_y)}{X_t * h}$$

em que Y é a nota obtida na escala,  $X_y$  é número de plantas com nota Y,  $X_t$  é o número total de plantas e h é o valor máximo da escala (MCKINNEY, 1923).

A incidência da doença foi contabilizada pela contagem do número de mudas infectadas semanalmente. Os valores de severidade e incidência de cada tratamento foram

utilizados para o cálculo da área abaixo da curva de progresso da doença (AADPC) (CAMPBELL & MADDEN, 1990), conforme a fórmula abaixo:

$$AACPD = \sum \left[ \left( \frac{y_1 + y_2}{2} \right) * (t_2 - t_1) \right]$$

$y_1$ : nota de avaliação no tempo  $t_1$

$y_2$ : nota de avaliação consecutiva no tempo  $t_2$

$t_2 - t_1$ : intervalo em dias entre duas avaliações consecutivas

Para cada variável analisada foi calculada a média dos dados e verificada a normalidade dos dados sendo a análise de variância realizada por meio do teste Tukey a 5 % de probabilidade usando o programa SAS 9.4.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com os tratamentos preventivos, conforme dados descritos na Tabela 3, observa-se uma redução significativa do ID com os tratamentos TAI (*Trichoderma atroviride*) e BNE (*Bacillus* spp.). Para AACPD, todos os tratamentos reduziram a incidência da doença, exceto TTA para AACPD (ID), e os tratamentos TTA e THP que foram estatisticamente iguais para AACPD (I).

Com relação à Incidência final, avaliada aos 56 dias, o tratamento testemunha (AD) apresentou alta incidência da doença (83,3 %), sendo estatisticamente igual aos tratamentos SCO (87,5 %) e TTA (95,8%). Os tratamentos com menor Incidência final observada foram TAI (29,2%), tratamento à base de *T. atroviride*, e BNE (41,7% ), tratamento à base de *Bacillus* spp. Isto demonstra que mesmo que o fungicida (SCO) seja recomendado para o controle de outras espécies de oídios, não foi efetivo para o controle preventivo do oídio do eucalipto, já o tratamento KUM, com recomendação na literatura para controle de oídio de eucalipto reduziu a incidência, em relação ao controle, entretanto foi menos efetivo que os tratamentos biológicos destacados anteriormente.

O tratamento TTA (produto a base de *Trichoderma* spp.) obteve os maiores valores de AACPD (800,1 % e 1677,1 %) para dados de severidade e incidência da doença (53,6 % e 95,8 %, respectivamente), não apresentando diferença significativa comparada aos tratamentos preventivos biológicos à base de *Trichoderma*, exceto do TAI (*Trichoderma*

*atroviride*). Isso evidencia que há efeitos diferentes na ação e efetividade de agentes biológicos mesmo que estes sejam antagonistas de mesmo gênero, como no caso do gênero *Trichoderma*.

TABELA 3. Avaliação do Índice de Doença de McKinney final (ID final), da Incidência final (I final) e das Áreas Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD) de ID e I, valores em porcentagem (%) dos tratamentos preventivos aplicados via foliar em mudas clonais de *Eucalyptus benthamii* para o controle de *Oidium eucalypti*. Porto Alegre, RS, 2015.

Tratamento	ID final		AACPD (ID)		AACPD (I)		I final	
AD	49,2	A	694,7	AB*	1560,4	A	83,3	A
KUM	45,5	A	566,8	ABC	1137,5	AB	66,7	AB
SCO	51,4	A	422,9	BCD	918,8	ABC	87,5	A
THP	46,4	A	771,5	AB	1647,9	A	70,8	AB
THE	44,4	A	481,3	ABCD	1108,3	ABC	75,0	AB
BNE	24,0	B	278,5	CD	612,5	BC	41,7	BC
TTA	53,6	A	800,1	A	1677,1	A	95,8	A
TAI	12,2	B	126,4	D	335,4	C	29,2	C
<b>p Valor</b>	< 0,0001		< 0,0001		< 0,0001		< 0,0001	

\*Médias seguidas de mesmas letras ou “ns” nas colunas não diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% de significância pelo teste de Tukey. Sendo: AD: Controle; KUM: fungicida Kumulus®; SCO: fungicida Score®; THP: Predatox® (*T. harzianum*); THE: Ecotrich® (*T. harzianum*); BNE: Nemathel® (*Bacillus* spp.); TTA: Trichodel Aéreo® (*Trichoderma* spp.); TAI: *T. atroviride*.

Os efeitos preventivos e curativos significativos dos tratamentos biológicos TAI e BNE aplicados para o controle de *Oidium eucalypti* possibilita estabelecer alternativas para o controle deste patógeno em mudas de *Eucalyptus benthamii*. A eficiência do tratamento BNE (*Bacillus* spp.) em controlar de forma preventiva e curativa oídio do eucalipto, pode estar associada à ação de antibiose, à produção de antimicrobianos, como os lipopeptídeos que podem ser de três tipos: fengicinas, iturinase e surfactinas (ONGENA & JACQUES, 2008) e de diversas substâncias que inibem outros microrganismos (BETTIOL *et al.*, 2005).

*Bacillus subtilis* atua de forma direta ou indireta no controle de fitomoléstias (ONGENA *et al.*, 2007; LEELASUPHAKUL *et al.*, 2008). A atuação do antagonismo direto exercido contra fitopatógenos ocorre através da antibiose, síntese de substâncias antimicrobianas, parasitismo, competição por espaço e nutrientes e a síntese de compostos voláteis (LEELASUPHAKUL *et al.*, 2008). Isso pode explicar a ação do tratamento BNE composto por *Bacillus* spp. no controle preventivo de oídio do eucalipto. Espécies de

*Bacillus* tem capacidade de produzir endósporos que são resistentes a temperaturas elevadas e sobrevivem em condições ambientais adversas, (COLLINS & JACOBSEN, 2003), propiciando sua ação como agentes de controle biológico. Segundo Kupper *et al.* (2003), os microrganismos que agem por antibiose, geralmente têm amplo espectro de ação, de forma que na inibição de fungos a produção de substâncias tóxicas é mais efetiva do que qualquer outro mecanismo de ação envolvido.

Para espécies de eucalipto, a redução na incidência da doença causada por *Puccinia psidii* em dois híbridos de *E. urophylla* e *E. grandis* foi significativa para um dos clones utilizando tratamentos com inoculação de Rizolyptus<sup>®</sup> (*Bacillus subtilis*) em miniestaca e no substrato com redução de 28,1 e 40,1 % da doença comparados com o tratamento testemunha. E para a severidade da doença a redução foi obtida para os dois clones sendo de 45,9 % para um clone e variando de 65,7 a 70,9 % para o outro clone (RAASCH *et al.*, 2012).

Estudo realizado por Romero *et al.* (2004), relatou quatro cepas de *Bacillus subtilis* como potenciais agentes biocontroladores contra o oídio causado por *Podosphaera fusca*, patógeno de cucurbitáceas. Foi demonstrado papel relevante das iturinas e fengicinas na atividade antifúngica e no controle do oídio de cucurbitáceas por essas mesmas cepas (ROMERO *et al.*, 2007). Além disso, estas cepas controlaram bem o oídio em condições de casa de vegetação e demonstraram o seu potencial de fermentação para produção em larga escala (ROMERO *et al.*, 2007a). Segundo Ashwini & Srividya (2014), *Bacillus subtilis* não só produz antibiótico como também produz diferentes tipos de enzimas como a glucanase, a quitinase, a celulase, que também desempenham um papel muito importante na propriedade antagonística por meio do mecanismo mediado por de enzimas líticas.

Os menores valores de AACPD, de severidade e baixa incidência observada pelo tratamento TAI (*Trichoderma atroviride*) comprova sua eficiência no controle de oídio do eucalipto, quando utilizado de forma preventiva (Tabela 3). As formas de ação deste tratamento podem ser atribuídas aos diferentes mecanismos de ação referentes a este agente de biocontrole. Espécies do gênero *Trichoderma* são capazes de agir através de competição por espaço e nutrientes, produção de antibióticos voláteis e enzimas hidrolíticas como a quitinase e a  $\beta$ -1,3-glucanase (CHUTRAKUL *et al.*, 2008; SHARMA *et al.*, 2009). As enzimas hidrolíticas degradam parcialmente a parede celular do patógeno e conduzem ao parasitismo (KUBICEK *et al.*, 2001). Também pode haver uma interação direta entre o próprio patógeno e o agente de biocontrole, no caso ação de micoparasitismo, que envolve contato físico e síntese de enzimas hidrolíticas, compostos tóxicos e/ou

antibióticos que agem sinergicamente com as enzimas. Fungos do gênero *Trichoderma* podem até mesmo exercer efeitos positivos sobre as plantas com o aumento no crescimento das mesmas, em caso de aplicação por biofertilização, e também pela estimulação do mecanismo de defesa das plantas (BENITÉZ *et al.*, 2004).

Agentes de controle biológico são organismos vivos e suas atividades dependem principalmente das diferentes condições físico-químicas que são submetidos. A compreensão da diversidade genética intraespecífica de *Trichoderma* e seus mecanismos de biocontrole resultam na melhor aplicação das dos isolados selecionados como agentes de biocontrole (BENITÉZ *et al.*, 2004). Isolados de *Trichoderma* spp., selecionados em testes *in vitro* e *in vivo*, são considerados excelentes agentes de biocontrole e possuem a vantagem de serem inócuos ao ser humano (MELO, 1996) e não causarem impacto negativo ao meio ambiente (PATRÍCIO *et al.*, 2001), diferentes da ação tóxica causada pelos fungicidas químicos. Esses estudos reiteram os resultados de controle obtidos com o presente estudo em que o tratamento TAI (*T. atroviride*) demonstrou maior eficiência no controle de oídio do eucalipto aplicado preventivamente (Tabela 3).

Para os resultados obtidos com os tratamentos curativos para o controle da doença causada por *Oidium eucalypti*, observou-se que o tratamento BNE (*Bacillus* spp.) demonstrou maior eficiência no controle (Tabela 4). Este apresentou os menores valores de AACPD para dados de severidade (394,2 %) e de incidência (798,8 %), para esta última variável, igualou-se estatisticamente ao tratamento químico KUM. Além disso, apresentou menor incidência final da doença (10 %) diferindo significativamente da testemunha e dos tratamentos THP, TTA e TAI (Tabela 4). Ressalta-se aqui diferença no comportamento de TAI (*Trichoderma atroviride*), pois não obteve eficiência como controle curativo, sendo que este mesmo tratamento apresentou semelhança de eficiência de controle com a aplicação de BNE de forma preventiva.

Apesar de os tratamentos biológicos THE, TTA, TAI, THP e do fungicida químico SCO não apresentarem diferença significativa comparados com a testemunha, os primeiros são, ainda assim, mais vantajosos, uma vez que se pode tirar proveito dos efeitos de promoção de crescimento pelo fungo *Trichoderma* spp. já evidenciados em diversos trabalhos. FILHO *et al.* (2008) concluíram que o isolado CEN 262 de *Trichoderma* spp. proporcionou maior índice de desenvolvimento de partes aéreas de mudas de eucalipto. Alguns isolados de *Trichoderma* possuem a capacidade de colonizar, endofiticamente, diferentes órgãos da planta (RUBINI *et al.*, 2005; SILVA *et al.*, 2006). Além de conseguir controlar a doença, seria possível um aumento na produção de miniestacas em minijardins

clonais de eucaliptos, efeito este que não ocorre com o uso de fungicidas químicos. Outra vantagem dos tratamentos biológicos a base de *Trichoderma* spp., é a inocuidade à saúde do homem e ao ambiente.

TABELA 4. Avaliação do Índice de Doença de McKinney final (ID final), da Incidência final (I final) e das Áreas Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD) de ID e I, valores em porcentagem (%), dos tratamentos curativos aplicados via foliar em mudas clonais de *Eucalyptus benthamii* para o controle de *Oidium eucalypti*. Porto Alegre, RS, 2015.

Tratamento	ID final		AACPD (ID)		AACPD (I)		I final	
<b>AD</b>	19,2	ns	789,6*	AB	1743,8	AB	52,5	A
<b>SCO</b>	16,7		685,0	AB	1355,0	ABC	30,0	ABC
<b>KUM</b>	12,5		512,1	AB	913,8	C	17,5	BC
<b>THP</b>	20,8		790,4	AB	1981,3	AB	57,5	A
<b>THE</b>	16,7		654,6	AB	1300,0	BC	35,0	ABC
<b>BNE</b>	6,7		394,2	B	798,8	C	10,0	C
<b>TTA</b>	18,3		846,3	AB	1953,8	AB	45,0	AB
<b>TAI</b>	24,2		966,3	A	2011,3	A	52,5	A
<b>p Valor</b>	0,1774		0,0228		<0,0001		<0,0002	

\*Médias seguidas de mesmas letras ou “ns” nas colunas não diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% de significância pelo teste de Tukey. Sendo: AD: Controle; KUM: fungicida Kumulus®; SCO: fungicida Score®; THP: Predatox® (*T. harzianum*); THE: Ecotrich® (*T. harzianum*); BNE: Nemathel® (*Bacillus* spp.); TTA: Trichodel Aéreo® (*Trichoderma* spp.); TAI: *T. atroviride*.

Todos os tratamentos biológicos tanto aplicados de forma preventiva como curativa, reduziram a AACPD, a severidade e a incidência de oídio quando comparados à testemunha (Tabela 3 e 4). Estudo realizado por Belan *et al.* (2013) utilizando tratamentos alternativos para o controle de oídio do pepino (*Cucumis sativus* L.), observaram que o tratamento com água destilada usado como controle negativo obteve a menor redução do fungo, exceto quando comparada ao tratamento extrato alcoólico de própolis.

Os tratamentos fungicidas, SCO e KUM, também reduziram a incidência e/ou severidade do oídio em mudas de eucalipto, embora, quando eficientes não apresentaram diferença significativa dos tratamentos biológicos. Os resultados obtidos com este presente trabalho trazem alternativas de utilização de tratamentos biológicos para o controle de *Oidium eucalypti* em substituição aos fungicidas químicos que ocasionam resistência genética a patógenos devido sua frequente utilização ao combate de determinado microrganismo, além de levarem a efeitos nocivos residuais para a saúde do homem e para o ambiente.

Diversos estudos ressaltam que os químicos não são tão efetivos para o controle de doenças causadas por *Oidium eucalypti*. Picinini *et al.* (2003) utilizando diferentes fungicidas para o tratamento de sementes de trigo, observaram que difenoconazole aplicado na dose de 30 g.i.a/100 Kg sementes apresentou maior severidade de oídio (*Blumeria graminis* f. sp. *tritici*) aos 60 dias após a emergência das plantas. Isso demonstra que fungicida químico a base de difenoconazole não possui eficiência no controle de *Oidium eucalypti* e também de outras espécies do fungo. Já para Pavanello *et al.* (2015) o fungicida difenoconazol controlou a podridão parda causada pelo fungo *Monilinia fructicola* até o momento da colheita, apresentando 0,84 % de incidência de podridões causadas pelo fungo, enquanto que a testemunha apresentou 10,2 %.

Os resultados do presente estudo sugerem que é possível optar pela utilização de tratamentos preventivos e curativos à base de agentes antagonistas biológicos em detrimento de um tratamento químico, que, pode favorecer o aumento da incidência da doença no decorrer do ciclo de desenvolvimento das mudas. O controle biológico por meio de pulverização de agentes de controle biológico pode ser considerado uma alternativa viável para o controle de oídios, como de *Oidium eucalypti*.

## CONCLUSÃO

Os tratamentos biológicos compostos por *Trichoderma atroviride* e *Bacillus* spp. podem ser aplicados preventivamente, e o tratamento a base de *Bacillus* spp. pode ser aplicado após o aparecimento de sintomas da doença para controle de *Oidium eucalypti* em mudas clonais de *Eucalyptus benthamii* em condições de ambiente controlado e em casa de vegetação.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASHWINI, N.; SRIVIDYA, S. Potentiality of *Bacillus subtilis* as biocontrol agent for management of anthracnose disease of chilli caused by *Colletotrichum gloeosporioides* OGC1. **3 Biotech**, Bangalore, v.4, n.2, p.127–136, 2014.

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

- ANGONESE, M. T. et al. Fungistatic effect of *Bacillus* spp. on plant pathogenic fungi. **Revista Brasileira de Agroecologia**, Porto Alegre, v.4, n.2, p. 97-100, 2009.
- BACON, C. W. et al. Biological control of *Fusarium moniliforme* in maize. **Environmental Health Perspectives**, Georgia, v. 109, Suplemento 2, p. 325-332, 2001.
- BELAN, L.L. et al. Manejo alternativo do oídio na cultura do pepino em ambiente protegido. **Revista Acadêmica Ciências Agrárias e Ambientais**, Curitiba, v. 11, Suplemento. 2, p. S103-S112, 2013.
- BENÍTEZ, T. et al. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. **International Microbiology**, Barcelona, v.7, n.4, p.249-260, 2004.
- BETTIOL, W.; GHINI, R.; MORANDI, M. A. B. Alguns métodos alternativos para o controle de doenças de plantas disponíveis no Brasil. In: VENZON, M.; PAULA JÚNIOR, T. J. DE; PALLINI, A. (Ed.). **Controle alternativo de pragas e doenças**. Viçosa/MG: EPAMIG/CTZM, 2005. p. 163-183.
- BETTIOL, W.; MORANDI, M.A.B. (Org). **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna-SP: Embrapa Meio Ambiente, 2009. 341p.
- BROTMAN, Y.; GUPTA, K.J.; VITERBO, A. *Trichoderma*. **Current Biology**, London, v.20, p.R390-R391, 2010.
- CAMPBELL, C.L.; MADDEN, L.V. (Ed.). Introduction to plant disease epidemiology. New York: Wiley, 1990. 532p.
- CAMPANHOLA, C.; BETTIOL, W. **Métodos alternativos de controle fitossanitário**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2003. 279 p.
- CARVALHO, D.C.D. et al. Controle de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* in vitro e em sementes, e promoção do crescimento inicial do feijoeiro comum por *Trichoderma harzianum*. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 36, n.1, p. 028-034, 2011.
- CHUTRAKUL, C. et al. The production and characterization of Trichotoxin peptaibols by *Trichoderma asperellum*. **Chemistry and Biodiversity**, Nottingham, v.5, n.9, p.1694-1706, 2008.
- COLLINS, C.; JACOBSEN, B.J. Optimizing a *Bacillus subtilis* isolate for biological control of sugar beet cercospora leaf spot. **Biological Control**, Orlando, v.26, n.2, p.153-161, 2003.
- DONG, Y.H. et al. Insecticidal *Bacillus thuringiensis* silences *Erwinia carotovora* virulence by a new form of microbial antagonism, signal interference. **Applied and environmental microbiology**, Washington, v. 70, n.2, p. 954-960, 2004.
- HANG, T.T. et al. *Bacillus subtilis* S1-0210 as a biocontrol agent against *Botrytis cinerea* in strawberries nguyen. **The Plant Patology Journal**, Seoul, v.21, n.1, p. 59-63, 2005.

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

IBA – Indústria Brasileira de Árvores.[**Relatório Anual 2016**]. 2016. 2016.<[http://iba.org/images/shared/Biblioteca/IBA\\_RelatorioAnual2016\\_.pdf](http://iba.org/images/shared/Biblioteca/IBA_RelatorioAnual2016_.pdf)>. Acesso em: 12 dez. 2016.

KRUGNER, T.L.; AUER, C.G. **Doenças do eucalipto**. In: KIMATI, H. (Ed.). Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas. 4 ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. p.319-332.

KUBICEK, C.P. et al. Trichoderma: From genes to biocontrol. **Journal of Plant Pathology**, Pisa, v.83, n.2, p.11-23, 2001.

KUPPER, K. C.; GIMENES-FERNANDES, N.; GOES, A. Controle biológico de *Colletotrichum acutatum*, agente causal da queda prematura dos frutos cítricos. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 3, p. 251-257, 2003.

LAZAROTTO, M. et al. Identificação de fungos emboloradores em madeira de *Pinus* spp. em laboratório. **Floresta e Ambiente**, Rio de Janeiro, v.23, n.4, p.602-605, 2016.

MCKINNEY, H.H. Influence of soil, temperature and moisture on infection of wheat seedlings by *Helminthosporium sativum*. **Journal of Agricultural Research**, Washington, v.26, p.195-217, 1923.

LEELASUPHAKUL, W.; HEMMANEE, P.; CHUENCHITT, S. Growth inhibitory properties of *Bacillus subtilis* strains and their metabolites against the green mold pathogen (*Penicillium digitatum* Sacc.) of citrus fruit. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 48, n. 1, p. 113-121, 2008.

MELO, I. S. Trichoderma e *Gliocladium* como bioprotetores de plantas. **Revisão Anual de Patógenos de Plantas**, Passo Fundo, v.4, n.9, p. 261-295, 1996.

MONTERO, M. B. et al. Functional Analysis of the *Trichoderma harzianum* nox1 Gene, Encoding an NADPH Oxidase, Relates Production of Reactive Oxygen Species to Specific Biocontrol Activity against *Pythium ultimum*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 77, n.9, p. 3009–3016, 2011.

ONGENA, M.; JACQUES, P. *Bacillus* lipopeptides: Versatile weapons for plant disease control. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v.16, n.3, p.115-125, 2008.

ONGENA, M. et al. Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. **Environmental Microbiology**, Wageningen, v.9, n.4, p.1084-1090, 2007.

PAVANELLO, E.P. et al. Eficiência de fungicidas no controle da podridão parda do pessegueiro e sua relação com parâmetros fisiológicos dos frutos. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 36, n. 1, p. 67-76, 2015.

- PATRÍCIO, F. R. A.; KIMATI, H.; BARROS, B. C. Seleção de isolados de *Trichoderma* spp. antagônicos a *Pythium aphanidermatum* e *Rhizoctonia solani*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 27, p. 223-229, 2001.
- PICININI, E. C.; FERNANDES, J. M. C. Efeito do tratamento de sementes com fungicida sobre o controle de doenças na parte aérea do trigo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n.5, p. 515-520, 2003.
- RAASCH, L.D.; BONALDO, S.M.; OLIVEIRA, A.A.F. Rizolyptus<sup>®</sup> na proteção de miniestacas de eucalipto contra *Puccinia psidi*. **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, v.8, n.14, p.854-864, 2012.
- ROMERO, D. et al. Isolation and evaluation of antagonistic bacteria towards the cucurbit powdery mildew fungus *Podosphaera fusca*. **Applied Microbiology Biotechnology**, Secaucus, v. 64, n.2, p. 263-269, 2004.
- ROMERO, D. et al. The iturin and fengycin families of lipopeptides are key factors in antagonism of *Bacillus subtilis* toward *Podosphaera fusca*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v. 20, n.4, p. 430-440, 2007.
- ROMERO, D. et al. Evaluation of biological control agents for managing cucurbit powdery mildew on greenhouse-grown melon. **Plant Pathology**, [S.l.], v.56, n.6, p.976-986, 2007a.
- RUBINI, M.R. et al. Diversity of endophytic fungal community of cacao (*Theobroma cacao* L.) and biological control of *Crinipellis perniciosus*, causal agent of Witches' Broom Disease. **International Journal Biology Science**, Bethesda, v.1, p. 24-33, 2005.
- RUOCCO, M. et al. Identification of a New Biocontrol Gene in *Trichoderma atroviride*: The Role of an ABC Transporter Membrane Pump in the Interaction with Different Plant-Pathogenic Fungi. **Molecular Plant Microbe Interactions**, St. Paul, v. 22, n. 3, p.291-301, 2009.
- SANTOS, A. F.; AUER, C. G.; GRIGOLETTI JÚNIOR, A. **Doenças do eucalipto no sul do Brasil**: identificação e controle. Colombo; Embrapa Florestas, 2001. (Circular Técnica, n. 45)
- SANZ, L. et al. Expression of an  $\alpha$ -1,3-glucanase during mycoparasitic interaction of *Trichoderma asperellum*. **The FEBS Journal**, Oxford, v.272, n.2, p. 493-499, 2005.
- SCHULTZ, B. **Levantamento de doenças bióticas e abióticas em *Eucalyptus benthamii* Maiden nos estados do Paraná e Santa Catarina**. 2011.104 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal do Paraná, Paraná, 2011.
- SILVA, R. L. O. et al. Fungos endofíticos em *Annona* spp.: isolamento, caracterização enzimática e promoção de crescimento em mudas de pinha. **Acta Botânica Brasileira**, São Paulo, v. 23, p.649-655, 2006.

SHARMA, K.; KUMAR, M.; MISRA, R. M.. Morphological, biochemical and molecular characterization of *Trichoderma harzianum* isolates for their efficacy as biocontrol agents. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v.157, n.1, p. 51-56, 2009.

SHORESH, M.; YEDIDIA, I.; CHET, I. Involvement of jasmonic acid/ethylene signaling pathway in the systemic resistance induced in cucumber by *Trichoderma asperellum* T203. **Phytopathology**, St. Paul, v.95, n.1, p.76-84, 2005.

SIMÕES, M. L. G. Evaluation of *Trichoderma* spp. for the Biocontrol of *Moniliophthora perniciosa* Subgroup 1441. **Journal of Biology and Life Science**, Las Vegas, v.3, n.1, p. 18-36, 2012.

VINALE, F. et al. A novel role for *Trichoderma* secondary metabolites in the interactions with plants. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, Maryland Heights, v.72, n.1-3, p.80-86, 2008.

VITERBO, A. et al. *Trichoderma* mitogen-activated protein kinase signaling is involved in induction of plant systemic resistance. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.71, n.10, p.6241-6246, 2005.

## 5 CONSIDERAÇÕES GERAIS

A utilização de agentes de controle biológicos como ferramentas para o controle de doenças fitopatogênicas e diminuição e/ou eliminação do uso de fungicidas químicos na produção de mudas de espécies florestais e agrícolas é uma alternativa promissora.

É restrito o número de fungicidas químicos registrados para a produção de mudas de eucalipto, como pode ser constatado para controle de oídio, doença alvo deste estudo, em que apenas um fungicida químico (Priori Top®) é registrado, o que torna imprescindível a busca por alternativas para o controle de patógenos que causam sérias doenças na produção de mudas. Os agentes de biocontrole, especialmente algumas espécies de *Trichoderma* e *Bacillus*, são microrganismos potenciais, tanto para o controle de fitopatógenos, quanto para estímulo e promoção do crescimento de vegetais.

Para que a aplicação de agentes de biocontrole se torne uma realidade, especialmente na produção de mudas clonais de *Eucalyptus* spp., alguns aspectos ainda precisam serem aprofundados e bem avaliados, tais como: avaliação de bioformulados e aplicação destes em testes realizados em laboratório, em condições controladas e, em sequência, em condições ambientais reais de produção (condições a campo); contabilização da duração (tempo) de efeito do controle pelas agentes de biocontrole quando aplicados tanto de forma curativa quanto de forma preventiva à determinada doença; verificação de qual ou quais espécie (s) de agente (s) de controle biológico são efetivas no controle de doença em condições ambientais adversas; avaliação de possíveis benefícios para a planta com o uso dos biocontroladores, já que algumas espécies já destes são também consideradas promotores de crescimento e indutores de resistência.

Atualmente existem diversas pesquisas com enfoque nos agentes de controle biológicos de doenças fitopatogênicas, porém poucas pesquisas conseguem alcançar a extensão de avaliações em condições reais de ocorrência da doença (em campo) e/ou em produção em larga escala em ambiente protegido. Sabe-se que existem dificuldades para a execução de trabalhos em campo ou que demandem extensas áreas de produção, porém a

avaliação de resultados positivos para aplicação efetiva no caso de produção em larga escala é fundamental para que o uso destes biocontroladores se tornem uma rotina de baixo impacto ambiental.

Acredita-se que os agentes de controle biológico dos gêneros *Trichoderma* e *Bacillus* possuem mecanismos de ação e características suficientes para uma ampla e promissora aplicação na produção de espécies, especialmente na produção de mudas de eucaliptos. Desta maneira, há necessidade de pesquisas mais aprofundadas que enfoquem a efetivação e solidez na aplicação de biocontroladores como uma alternativa de controle de doenças em substituição a aplicação de fungicidas químicos. Entretanto, com os resultados deste estudo, podemos observar as primeiras constatações de que estes agentes têm ação sobre o patógeno causador do oídio do eucalipto em minijardins clonais.