

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

HELOISA THOMAZI

**CARACTERIZAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA, SINTOMATOLÓGICA,  
PATOGENICIDADE E BIOCONTROLE DE *Rosellinia bunodes* EM  
ÁLAMO**

CURITIBA

2015

HELOISA THOMAZI

**CARACTERIZAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA, SINTOMATOLÓGICA,  
PATOGENICIDADE E BIOCONTROLE DE *Rosellinia bunodes* EM  
ÁLAMO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Agronomia, Área de Concentração em Produção Vegetal, Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Álvaro Figueredo dos Santos

Co-orientador: Prof. Dr. Henrique da Silva Silveira Duarte

CURITIBA

2015

T465 Thomazi, Heloisa.

Caracterização morfofisiológica, sintomatológica, patogenicidade e biocontrole de *Rosellinia bunodes* em Álamo. / Heloisa Thomazi. – Curitiba : 2015.  
96 f. il.

Orientador: Álvaro Figueiredo dos Santos.  
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná.  
Setor de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Produção Vegetal.

1. Choupo – Doenças e pragas – Controle. 2. Trichoderma.  
I. Santos, Álvaro Figueiredo dos. II. Universidade Federal do Paraná.  
Setor de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Produção Vegetal. III. Título.

CDU 632:582.681.81



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
AGRONOMIA - PRODUÇÃO VEGETAL

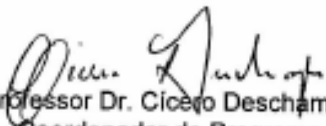


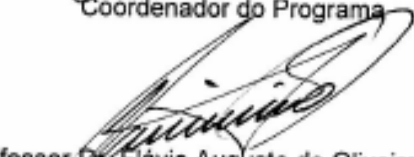
## PARECER

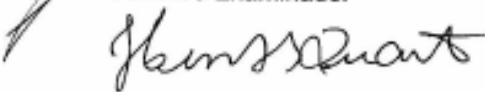
Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Produção Vegetal, reuniram-se para realizar a arguição da Dissertação de MESTRADO, apresentada pela candidata **HELOISA THOMAZI**, sob o título "**CARACTERIZAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA, SINTOMATOLÓGICA, PATOGENICIDADE E BIOCONTROLE DE *Roselinia bunodes* EM ÁLAMO**", para obtenção do grau de Mestre em Ciências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Produção Vegetal do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná.

Após haver analisado o referido trabalho e arguido a candidata são de parecer pela "**APROVAÇÃO**" da Dissertação.

Curitiba, 26 de Fevereiro de 2015.

  
Professor Dr. Cícero Deschamps  
Coordenador do Programa

  
Professor Dr. Flávio Augusto de Oliveira Garcia  
Primeiro Examinador

  
Professor Dr. Henrique da Silva Silveira Duarte  
Segundo Examinador

  
Dr. Alvaro Figueredo dos Santos  
Presidente da Banca e Orientador

Aos meus pais Hilda e Luiz Carlos pelo eterno  
incentivo  
**Ofereço...**

Ao meu noivo Elias, amor da minha vida,  
meu companheiro de todas as horas  
**Dedico...**

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, por mais esta conquista e pela oportunidade por Ele concedida para que tudo isso se concretizasse.

Aos meus familiares, de maneira especial aos meus pais Luiz Carlos e Hilda, por terem me proporcionado uma vida digna, onde pude crescer acreditando que tudo é possível, desde que sejamos honestos e íntegros de caráter.

À minha irmã Patrícia e ao meu cunhado Luis Henrique, por todo amor e carinho oferecido nos momentos de distância.

À meu noivo e melhor amigo Elias, por todo apoio e compreensão ofertado nos momentos de ausência, por todo auxílio, esforço e paciência dedicados para que esse trabalho se consolidasse. Eu te amo.

Aos meus queridos sogros Jorge e Celina, por me acolherem como uma verdadeira filha e por sempre estarem ao meu lado. Minha profunda gratidão.

À minha cunhada Georgia, por ser essa pessoa maravilhosa que alegra meus dias.

Ao meu concunhado e colega de profissão Leonardo, por todas as dicas referentes ao mestrado.

Ao meu orientador Dr. Álvaro Figueredo dos Santos e ao meu co-orientador Dr. Henrique da Silva Silveira Duarte, por toda atenção dirigida, pelo constante estímulo transmitido durante todo o trabalho e principalmente pelo respeito e amizade construídos neste período.

À Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Agrárias e ao Curso de Pós Graduação em Produção Vegetal, pela oportunidade de aprendizado.

À todos os professores do Programa de Pós Graduação Produção Vegetal da Universidade Federal do Paraná, especialmente à professora Dra. Louise Larissa May De Mio por acreditar no meu potencial.

À Embrapa Florestas pelo suporte físico para que meus experimentos pudessem ser concluídos.

Aos funcionários da Embrapa Florestas Caroline e Davi, sem vocês nada disso seria possível.

Aos meus amigos do Laboratório de Patologia Florestal da Embrapa Florestas: Flávia, Ana Lídia, Francine, Heloise, Géssica, Etienne, Renata, Greici, Edson, Tiago e Pedro, por toda ajuda, receptividade e risadas inesquecíveis.

À pós-doutoranda Giselda Alves pela participação e contribuição na banca examinadora de pré-defesa.

Ao professor Dr. Flávio Augusto de Oliveira Garcia da Universidade Estadual do Centro-Oeste por aceitar o convite de ser membro da banca examinadora.

À secretária do Programa de Pós Graduação da UFPR, Lucimara Antunes, por toda ajuda no preenchimento de formulários e documentos.

À empresa Swedish Match pelo envio das mudas de álamo.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa.

À todos que de alguma maneira estiveram contribuindo para que tudo isso se tornasse realidade.

“Não existe verdadeira inteligência sem bondade”

**Ludwig van Beethoven**

## RESUMO

O álamo (*Populus deltoides*) é uma espécie florestal que agrega alto valor econômico devido a qualidade e resistência da sua madeira, destinada principalmente para a fabricação de palitos de fósforo. Na região Sul do Brasil, o álamo é plantado no Vale do Rio Iguaçu (municípios de Porto União (SC), Paula Freitas (PR) e União da Vitória (PR)) atingindo aproximadamente 4300 hectares de área cultivada. Os clones desta espécie são extremamente exigentes em tratamentos culturais e fitossanitários, fazendo com que esta cultura enfrente sérios desafios, no que diz respeito à ocorrência de doenças. O fungo *Rosellinia bunodes*, causador de podridões radiculares, constitui um dos principais problemas fitossanitários em cultivos perenes, pois causa a morte das árvores, ocasionando a improdutividade de áreas por um longo período. A fácil disseminação, a ampla gama de hospedeiros e o pouco conhecimento sobre as características intrínsecas ao patógeno, fazem desta doença uma ameaça aos cultivos de álamo, tornando-se necessário conhecer os aspectos biológicos e morfofisiológicos relacionados ao fungo, que permitam desenhar estratégias efetivas de controle. O biocontrole vem sendo empregado, a fim de se gerar um controle mais eficiente desta doença, com a utilização do fungo *Trichoderma*, considerado um agente biológico potencialmente viável, em consequência da sua ação antagônica e inibitória, desencadeada por mecanismos de antibiose, competição e micoparasitismo. Neste trabalho, objetivou-se realizar a caracterização morfofisiológica, sintomatológica e patogênica de isolados de *R. bunodes* e avaliar o potencial de controle de isolados de *Trichoderma* spp. para este patógeno. O trabalho foi conduzido no Laboratório de Patologia Florestal da Embrapa Florestas, localizado no município de Colombo (PR). Os isolados de *R. bunodes* foram testados quanto à capacidade de crescimento micelial em diferentes meios de cultura e regimes de temperatura. Em casa de vegetação foram realizados testes de patogenicidade dos isolados de *R. bunodes* em mudas de álamo (*Populus deltoides*), araucária (*Araucaria angustifolia*) e erva-mate (*Ilex paraguariensis*). A ação antagônica do fungo *Trichoderma* spp. sobre *R. bunodes* foi avaliada por meio de testes de controle *in vitro* e *in vivo*. De acordo com os resultados, constatou-se que o crescimento micelial de *R. bunodes* ocorreu em todos os meios testados: batata-dextrose-ágar (BDA), V8-ágar, cenoura-ágar (CA) e ágar-água (AA), sendo verificado no meio BDA maior crescimento micelial para os nove isolados de *R. bunodes*. A temperatura média de 24 °C favoreceu o crescimento do fungo em placas de Petri e não foi observado crescimento micelial nas temperaturas de 8 e 32 °C. Entre os hospedeiros avaliados, o álamo demonstrou maior suscetibilidade ao patógeno. Nos testes de inibição *in vitro*, os isolados TRICH 103, TRICH 104, TRICH 112, TRICH 115, AR, LPF8, SP4 e TRE de *Trichoderma* spp. destacaram-se devido a maior ação antagônica ao crescimento micelial de *R. bunodes*. Testes *in vivo* demonstraram que o fungo *Trichoderma* spp. necessita de quatorze dias para estabelecer-se em substrato inoculado com *R. bunodes*. Não foi observada a mortalidade de mudas de álamo nos tratamentos testados para o ensaio de biocontrole devido à elevação das temperaturas dentro da casa de vegetação, não sendo possível constatar o efeito *in vivo* do fungo antagonista *Trichoderma* sobre *R. bunodes*.

Palavras-chave: controle biológico, antagonismo, *Trichoderma*, podridão radicular, hospedeiros florestais.

## ABSTRACT

The poplar (*Populus deltoides*) is a forest species that adds high economic value due to the quality and strength of the wood, primarily intended for the matches manufacture. In southern Brazil, the poplar is planted in the Valley of the Iguazu River (municipalities of Porto União (SC), Paula Freitas (PR) and União da Vitória (PR)) reaching approximately 4300 hectares of cultivated area. Clones of this type are highly demanding in cultural and phytosanitary treatments, making this culture faces serious challenges with regard to the occurrence of diseases. The fungus *Rosellinia bunodes*, which causes root rot, constitute one of a major disease problems in perennial crops, because it is the responsible for the death of trees, leading to areas of unproductive for a long period. The easy dissemination, large circle host range and few knowledges of the pathogen characteristics, make this disease a threat to poplar crops, making necessary to know about morphophysiological and biological aspects related to the fungus, which allow the design of effective control strategies. The biocontrol has been employed in order to generate a more effective control of this disease with the use of *Trichoderma*, considered as a potentially viable biological agent as a consequence of their inhibitory and antagonistic action mechanisms triggered by antibiosis, mycoparasitism and competition. This study aimed to characterize up morphophysiological, symptomatically and pathogenically isolates of *R. bunodes* and assess the potential for control of *Trichoderma* spp. for this pathogen. The experiments was conducted in Forest Pathology Laboratory of Embrapa Forests, located in the city of Colombo (PR). *R. bunodes* isolates were tested for mycelial growth capacity in different culture media and temperature regimes. In greenhouse, pathogenicity tests were conducted using *R. bunodes* isolates in poplar (*Populus deltoides*), araucaria (*Araucaria angustifolia*) and mate (*Ilex paraguariensis*). The antagonistic action of *Trichoderma* spp. on *R. bunodes* was evaluated by *in vitro* and *in vivo* control tests. According to the results, it was found that the mycelial growth of *R. bunodes* occurred in all tested media: potato-dextrose-agar (PDA), V8-agar, carrot agar (CA) and water-agar (WA), being checked in PDA higher mycelial growth for the nine *R. bunodes* isolates. The average temperature of 24° C promoted the growth of the fungus in Petri dishes and mycelial growth was not observed at 8 to 32° C temperatures. Among the evaluated hosts, poplar showed higher sensitivity to the pathogen. *In vitro* inhibition tests, TRICH 103, TRICH 104, TRICH 112, TRICH 115, AR, LPF8, SP4 and TRE *Trichoderma* spp. isolates stood out due to greater antagonistic action to mycelial growth of *R. bunodes*. *In vivo* tests showed that the fungus *Trichoderma* spp. need fourteen days to settle in inoculated substrate with *R. bunodes*. There was no mortality of poplar seedlings in treatments tested for biocontrol test, due by rising temperatures inside the greenhouse, it is not possible to verify the *in vivo* effect of *Trichoderma* antagonistic fungus on *R. bunodes*.

Key words: biological control, antagonism, *Trichoderma*, root rot, forests hosts.

## LISTA DE FIGURAS

### REVISÃO DE LITERATURA

FIGURA 1 - DISTRIBUIÇÃO MUNDIAL DE *Rosellinia bunodes* (PONTOS VERDES E CÍRCULOS VERMELHOS) *Rosellinia necatrix* (PONTOS LARANJAS) E *Rosellinia pepo* (PONTOS ROXOS). ..... 25

### CAPÍTULO I - CARACTERIZAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA, SINTOMATOLÓGICA E PATOGENICIDADE DE ISOLADOS DE *Rosellinia bunodes* EM ÁLAMO (*Populus deltoides* Batl. ex Marsh.)

FIGURA 1 - VARIAÇÃO DA COLORAÇÃO DE COLÔNIAS MICELIARES DE *Rosellinia bunodes* EM MEIO BATATA-DEXTROSE-ÁGAR (BDA). A) COLÔNIA DE *Rosellinia bunodes* COM APROXIMADAMENTE 10 DIAS DE IDADE. B) COLÔNIA DE *Rosellinia bunodes* COM APROXIMADAMENTE 15 DIAS DE IDADE. C) COLÔNIA DE *Rosellinia bunodes* COM APROXIMADAMENTE 25 DIAS DE IDADE..... 37

FIGURA 2 - CRESCIMENTO MICELIAL DE *Rosellinia bunodes* EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA. A) BATATA-DEXTROSE-ÁGAR (BDA); B) CENOURA-ÁGAR (CA); C) V8-ÁGAR; D) ÁGAR-ÁGUA (AA). COLOMBO (PR), 2013..... 39

FIGURA 3 – CURVA DE CRESCIMENTO MICELIAL (mm) PARA NOVE ISOLADOS DE *Rosellinia bunodes* (R1, R2, R3, R3A, R4, R5, R6, R7 e R8) EM SETE TEMPERATURAS DISTINTAS (8, 12, 16, 20, 24, 28 e 32 °C). COLOMBO (PR), 2013. ..42

FIGURA 4 - CRESCIMENTO MICELIAL DO ISOLADO R2 DE *Rosellinia bunodes* EM TEMPERATURAS DISTINTAS. A) 8 °C; B) 12 °C; C) 16 °C; D) 20 °C; E) 24 °C; F) 28 °C; G) 32 °C. COLOMBO (PR), 2013.....43

FIGURA 5 - HIFAS DE *Rosellinia bunodes* COM SEPTOS PIRIFORMES (SETAS VERMELHAS) EM AUMENTO DE 400X. COLOMBO (PR), 2014..... 45

FIGURA 6 - QUADRO SINTOMATOLÓGICO DE ROSELINIOSE EM MUDAS DE

ÁLAMO. A) TESTEMUNHA: PLANTA SADIA COM 0% DE SEVERIDADE; B) PLANTA AOS 7 DIAS APÓS A INOCULAÇÃO COM 9,41% DE SEVERIDADE; C) PLANTA AOS 14 DIAS APÓS A INOCULAÇÃO COM 30,22% DE SEVERIDADE; D) PLANTA AOS 21 DIAS APÓS A INOCULAÇÃO COM 48,29% DE SEVERIDADE; E) PLANTA AOS 28 DIAS APÓS A INOCULAÇÃO COM 69% DE SEVERIDADE; F) PLANTA AOS 35 DIAS APÓS A INOCULAÇÃO COM 79,2% DE SEVERIDADE. COLOMBO (PR), 2014.....47

FIGURA 7 - SINAIS DE *Rosellinia bunodes* (RIZOMORFAS) (SETAS VERMELHAS). A, B E D) NO COLO DE PLANTAS DE ÁLAMO INFECTADO COM *Rosellinia bunodes*; C) RAÍZES DE PLANTAS DE ÁLAMO INFECTADAS COM *Rosellinia bunodes*. COLOMBO (PR), 2014.....48

FIGURA 8 - INCIDÊNCIA (%) E SEVERIDADE (%) DA ROSELINIOSE EM MUDAS DE ÁLAMO APÓS A INOCULAÇÃO COM O ISOLADO R2 DE *Rosellinia bunodes*. COLOMBO (PR), 2014.....49

FIGURA 9 - ROSELINIOSE EM ESPÉCIES FLORESTAIS: ERVA-MATE: (SADIA – A) E (DOENTE – B); ÁLAMO: (SADIA – C) E (DOENTE – D); ARAUCÁRIA: E) (SADIA – E) E (DOENTE – F); COLOMBO (PR), 2013. ....51

FIGURA 10 - INCIDÊNCIA (%) DE ROSELINIOSE EM MUDAS DE ÁLAMO (*Populus deltoides*) INOCULADAS COM DOIS ISOLADOS DE *Rosellinia bunodes*. COLOMBO (PR), 2013.....52

FIGURA 11 - INCIDÊNCIA (%) DE ROSELINIOSE EM MUDAS DE ARAUCÁRIA (*Araucaria angustifolia*) INOCULADAS COM DOIS ISOLADOS DE *Rosellinia bunodes*. COLOMBO (PR), 2013.....52

FIGURA 12 - INCIDÊNCIA (%) DE ROSELINIOSE EM MUDAS DE ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis*) INOCULADAS COM DOIS ISOLADOS DE *Rosellinia bunodes*. COLOMBO (PR), 2013.....53

## CAPÍTULO II - BIOCONTROLE DE *Rosellinia bunodes* EM ÁLAMO

- FIGURA 1 - INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO MICELIAL *IN VITRO* DE *R. bunodes* PELO MÉTODO DE CULTURAS PAREADAS COM *Trichoderma*. A) TRICH 100; B) TRICH 104; C) AR; D) TRE. COLOMBO (PR), 2014. .... 77
- FIGURA 2 - INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO MICELIAL *IN VITRO* DE *R. bunodes* PELA LIBERAÇÃO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS DE *Trichoderma*. A) TESTEMUNHA; B) TRICH 104; C) AR; D) TRE. COLOMBO (PR), 2014. .... 78
- FIGURA 3 - INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO MICELIAL *IN VITRO* DE *R. bunodes* PELA LIBERAÇÃO DE COMPOSTOS NÃO VOLÁTEIS DE *Trichoderma*. A) TESTEMUNHA; B) TRICH 104; C) AR; D) TRE. COLOMBO (PR), 2014. .... 79
- FIGURA 4 – CURVA DE PROGRESSO DE ROSELINIOSE EM MUDAS DE ÁLAMO MANTIDAS SOB DIFERENTES TRATAMENTOS. COLOMBO (PR), 2014. .... 82
- FIGURA 5 – DADOS METEOROLÓGICOS DE TEMPERATURA (MÁXIMA E MÍNIMA) DIÁRIOS PARA O MUNICÍPIO DE CURITIBA. MÊS DE DEZEMBRO DE 2014. CURITIBA, 2014. .... 83
- FIGURA 6 – DADOS METEOROLÓGICOS DE TEMPERATURA (MÁXIMA E MÍNIMA) DIÁRIOS PARA O MUNICÍPIO DE CURITIBA. MÊS DE JANEIRO DE 2015. CURITIBA, 2015. .... 83

## LISTA DE TABELAS

### **CAPÍTULO I - CARACTERIZAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA, SINTOMATOLÓGICA E PATOGENICIDADE DE ISOLADOS DE *Rosellinia bunodes* EM ÁLAMO (*Populus deltoides* Batl. ex Marsh.)**

TABELA 1 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) PARA A VARIÁVEL DIÂMETRO DE COLÔNIAS (mm) DE *Rosellinia bunodes* EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA. COLOMBO (PR), 2013..... 37

TABELA 2 - DIÂMETRO (mm) DE COLÔNIAS DE NOVE ISOLADOS DE *Rosellinia bunodes* SUBMETIDOS AO CRESCIMENTO EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA. COLOMBO (PR), 2013..... 38

TABELA 3 - INCIDÊNCIA (%) DE ROSELINIOSE EM TRÊS HOSPEDEIROS FLORESTAIS: ÁLAMO (*Populus deltoides*); ARAUCÁRIA (*Araucaria angustifolia*), ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis*). COLOMBO (PR), 2013. .... 50

TABELA 4 - ANÁLISE DA VARIÂNCIA (ANOVA) PARA A VARIÁVEL ÁREA ABAIXO DA CURVA DE PROGRESSO DA DOENÇA (AACPD) PARA TRÊS ESPÉCIES FLORESTAIS INOCULADAS COM OS ISOLADOS R1 E R2 DE *Rosellinia bunodes*. COLOMBO (PR), 2013..... 54

TABELA 5 - ÁREA ABAIXO DA CURVA DE PROGRESSO DA DOENÇA (AACPD) PARA TRÊS ESPÉCIES FLORESTAIS INOCULADAS COM OS ISOLADOS OS ISOLADOS R1 E R2 DE *Rosellinia bunodes*. COLOMBO (PR), 2013. .... 54

### **CAPÍTULO II – BIOCONTROLE DE *Rosellinia bunodes* EM ÁLAMO**

TABELA 1 - PROCEDÊNCIA DOS ISOLADOS DE *Trichoderma* spp. COLOMBO (PR), 2014. .... 63

TABELA 2 - CRESCIMENTO MICELIAL (mm) E PERCENTAGEM DE INIBIÇÃO (%) DE *Rosellinia bunodes* PELO MÉTODO DE CULTURAS PAREADAS com *Trichoderma*.

COLOMBO (PR), 2014..... 70

TABELA 3 - ANÁLISE DA VARIÂNCIA (ANOVA) PARA AS VARIÁVEIS CRESCIMENTO MICELIAL (mm) E PERCENTAGEM DE INIBIÇÃO (%) DE *R. bunodes* PELO MÉTODO DE CULTURAS PAREADAS com *Trichoderma*. COLOMBO (PR), 2014. .... 71

TABELA 4. ANÁLISE DA VARIÂNCIA (ANOVA) PARA AS VARIÁVEIS CRESCIMENTO MICELIAL (MM) E PERCENTAGEM DE INIBIÇÃO (%) DE *Rosellinia bunodes* PELA LIBERAÇÃO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS DE *Trichoderma*. COLOMBO (PR), 2014..... 73

TABELA 5 - CRESCIMENTO MICELIAL (MM) E PERCENTAGEM DE INIBIÇÃO (%) DE *Rosellinia bunodes* PELA LIBERAÇÃO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS DE *Trichoderma*. COLOMBO (PR), 2014..... 74

TABELA 6 - ANÁLISE DA VARIÂNCIA (ANOVA) PARA AS VARIÁVEIS CRESCIMENTO MICELIAL (MM) E PERCENTAGEM DE INIBIÇÃO (%) DE *Rosellinia bunodes* PELA LIBERAÇÃO DE COMPOSTOS NÃO VOLÁTEIS DE *Trichoderma*. COLOMBO (PR), 2014..... 75

TABELA 7 - CRESCIMENTO MICELIAL (MM) E PERCENTAGEM DE INIBIÇÃO (%) DE *Rosellinia bunodes* PELA LIBERAÇÃO DE COMPOSTOS NÃO VOLÁTEIS DE *Trichoderma*. COLOMBO (PR), 2014..... 76

TABELA 8 - ANÁLISE DA VARIÂNCIA (ANOVA) PARA A VARIÁVEL ÁREA ABAIXO DA CURVA DE PROGRESSO DA DOENÇA PARA OS SEGUINTE TRATAMENTOS: TESTEMUNHA: MUDAS PLANTADAS EM SUBSTRATO CONTENDO SOMENTE O ISOLADO R2 DE *R. bunodes*; TRATAMENTO 1: MUDAS PLANTADAS NO MESMO DIA DA ADIÇÃO DO ISOLADO R2 DE *R. bunodes* E DO ISOLADO AR DE *Trichoderma* sp. AO SUBSTRATO; TRATAMENTO 2: MUDAS PLANTADAS 7 DIAS APÓS A ADIÇÃO DO ISOLADO R2 DE *R. bunodes* E DO ISOLADO AR DE *Trichoderma* sp. AO SUBSTRATO; TRATAMENTO 3: MUDAS PLANTADAS 14 DIAS APÓS A ADIÇÃO DO ISOLADO R2 DE *R. bunodes* E DO

ISOLADO AR DE *Trichoderma* sp. AO SUBSTRATO. COLOMBO (PR), 2014.....81

TABELA 9 - ÁREA ABAIXO DA CURVA DE PROGRESSO DA DOENÇA RELATIVA (AACPD RELATIVA) PARA OS SEGUINTE TRATAMENTOS: TESTEMUNHA: MUDAS PLANTADAS EM SUBSTRATO CONTENDO SOMENTE O ISOLADO R2 DE *R. bunodes*; TRATAMENTO 1: MUDAS PLANTADAS NO MESMO DIA DA ADIÇÃO DO ISOLADO R2 DE *R. bunodes* E DO ISOLADO AR DE *Trichoderma* sp. AO SUBSTRATO; TRATAMENTO 2: MUDAS PLANTADAS 7 DIAS APÓS A ADIÇÃO DO ISOLADO R2 DE *R. bunodes* E DO ISOLADO AR DE *Trichoderma* sp. AO SUBSTRATO; TRATAMENTO 3: MUDAS PLANTADAS 14 DIAS APÓS A ADIÇÃO DO ISOLADO R2 DE *R. bunodes* E DO ISOLADO AR DE *Trichoderma* sp. AO SUBSTRATO. COLOMBO (PR), 2014. 81

## LISTA DE ABREVIATURAS

**AA** – Ágar-água

**AACPD** – Área abaixo da curva de progresso da doença

**ANOVA** – Análise da variância

**BDA** – Batata-dextrose-ágar

**BOD** – Demanda bioquímica de oxigênio

**CA** – Cenoura-ágar

**cm** - centímetros

**CV** – Coeficiente de variação

**EMBRAPA** – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

**F** – Estatística F calculada

**f.s** – forma special

**FV** – Fonte de variação

**g** - Gramas

**GL** – Graus de liberdade

**h** - horas

**Kg** - Kilogramas

**mL** - Mililitro

**mm** – Milímetros

**ns** – Não significativo

**p** - probabilidade

**pH** – Potencial hidrogeniônico

**PR** – Paraná

**QM** – Quadrados médios

**R. bunodes** – *Rosellinia bunodes*

**R. necatrix** – *Rosellinia necatrix*

**R. pepo** – *Rosellinia pepo*

**UFPR** – Universidade Federal do Paraná

**var** - variedade

## LISTA DE SÍMBOLOS

°C Graus Celsius

% Percentagem

> Maior

< Menor

= Igual

+ Mais

- Menos

\* significativo a 5% de probabilidade

\*\* significativo a 1% de probabilidade

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	<b>20</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>22</b>
2.1 A CULTURA DO ÁLAMO .....	22
2.2 PROBLEMAS FITOSSANITÁRIOS .....	23
2.3 O GÊNERO <i>Rosellinia</i> .....	23
2.4 DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA .....	24
2.5 <i>Rosellinia bunodes</i> (Berk et Br.) Sacc. ....	25
2.6 CONTROLE BIOLÓGICO .....	27
<b>CAPÍTULO I - CARACTERIZAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA, SINTOMATOLÓGICA E PATOGENICIDADE DE ISOLADOS DE <i>Rosellinia bunodes</i> EM ÁLAMO (<i>Populus deltoides</i> Batl. ex Marsh.)</b> .....	<b>29</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>29</b>
<b>CHAPTER I – MORPHOPHYSIOLOGICAL, SYMPTOMATOLOGY CHARACTERIZATION AND PATHOGENICITY OF <i>Rosellinia bunodes</i> ISOLATES IN POPLAR (<i>Populus deltoides</i> Batl ex Marsh.)</b> .....	<b>30</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>30</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>31</b>
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>32</b>
2.1 ORIGEM DOS ISOLADOS DE <i>Rosellinia bunodes</i> .....	32
2.2 CARACTERIZAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA DE ISOLADOS DE <i>Rosellinia bunodes</i> .....	32
2.3 CARACTERIZAÇÃO SINTOMATOLÓGICA DA ROSELINIOSE EM ÁLAMO ....	34
2.4 TESTE DE PATOGENICIDADE DE ISOLADOS DE <i>Rosellinia bunodes</i> EM ESPÉCIES FLORESTAIS .....	35
<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>36</b>
3.1 CARACTERIZAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA DE ISOLADOS DE <i>Rosellinia bunodes</i> .....	36
3.2 CARACTERIZAÇÃO SINTOMATOLÓGICA DA ROSELINIOSE EM ÁLAMO ....	45
3.3 TESTE DE PATOGENICIDADE DE ISOLADOS DE <i>Rosellinia bunodes</i> EM ESPÉCIES FLORESTAIS .....	49
<b>4 CONCLUSÕES</b> .....	<b>55</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>56</b>
<b>CAPÍTULO II – BIOCONTROLE DE <i>Rosellinia bunodes</i> EM ÁLAMO</b> .....	<b>59</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>59</b>
<b>CHAPTER II – BIOCONTROL OF <i>Rosellinia bunodes</i> IN POPLAR</b> .....	<b>60</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>60</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>61</b>
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>62</b>
2.1 TESTES <i>IN VITRO</i> .....	62
2.2 TESTES <i>IN VIVO</i> .....	66
<b>3 RESULTADOS</b> .....	<b>69</b>
3.1 TESTES <i>IN VITRO</i> .....	69
3.2 TESTES <i>IN VIVO</i> .....	80
<b>4 DISCUSSÃO</b> .....	<b>84</b>
<b>5 CONCLUSÕES</b> .....	<b>86</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>87</b>
<b>REFERÊNCIAS GERAIS</b> .....	<b>91</b>

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

O álamo (*Populus deltoides* Batl. ex Marsh.), também conhecido como choupo, é originário do Hemisfério Norte, onde há predominância de clima temperado. A alta qualidade da sua madeira, como a coloração esbranquiçada, as fibras retas e a ausência de resinas, fazem do álamo uma cultura de importância econômica mundial, sendo sua produção destinada predominantemente, para a fabricação de palitos de fósforos, móveis e laminados em geral (CORRÊA, 2008).

No Sul do Brasil, o álamo é plantado na região do Vale do Rio Iguaçu (MAY DE MIO; AMORIM, 2000), que engloba os municípios de Porto União (SC), Paula Freitas (PR) e União da Vitória (PR) (SANTOS; MACHADO, 2010), alcançando aproximadamente 4.300 hectares de área cultivada (ABRAF, 2013). Os clones desta espécie são extremamente exigentes em tratamentos culturais e fitossanitários, fazendo com que esta cultura enfrente sérios desafios, no que diz respeito à ocorrência de doenças (MAY DE MIO; AMORIM, 2000). Vários são os relatos de diferentes patógenos na literatura mundial que acometem cultivos perenes de álamo (MAY DE MIO; AMORIM, 2000), dentre eles, *Rosellinia* spp. causador de podridões radiculares (SANTOS et al., 2015).

Os fungos fitopatogênicos do gênero *Rosellinia* são parasitas facultativos e possuem uma ampla gama de hospedeiros (TEN HOOPPEN; KRAUSS, 2006). Este patógeno ataca espécies lenhosas e semilenhosas, embora, também já tenha sido encontrado em bulbos e rizomas (PÉREZ-JIMÉNEZ, 2006). No início da infecção, os sinais localizam-se nas raízes e na base do tronco das árvores, apresentando-se na forma de um micélio esbranquiçado, que com o avanço da colonização torna-se enegrecido, decorrente da formação dos corpos de frutificação. Os sintomas externos manifestam-se somente quando todo o sistema radicular do hospedeiro encontra-se colonizado (FERREIRA, 1989).

Perdas importantes causadas por *Rosellinia* spp. foram descritas por diversos autores em diferentes patossistemas. Castro e Serna (2009) relataram podridão causada por *R. necatrix* em plantios de café na Colômbia. Waterson (1941), Saccas (1956) e Aranzazu et al. (1999) listaram a ocorrência do fungo *R. bunodes* (Berk. & Broome) Sacc., em algumas culturas de importância econômica, como o abacate (*Persea americana* Mill), espécies de bananas triplóides (*Musa* spp.), café (*Coffea* sp.), cacau (*Theobroma cacao* L.), lima (*Citrus aurantifolia* Christm. Swingle), noz-moscada (*Myristica fragrans* Houtt.), mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), macadâmia (*Macadamia integrifolia* Maiden & Betche), ingá (*Inga* spp.),

além de plantas ornamentais, como a corticeira (*Erythrina* sp.).

Segundo o Centro Nacional de Recursos Genéticos (CENARGEN) da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, no Brasil foram encontradas dez espécies do gênero *Rosellinia* associadas à doenças de plantas: *R. arcuata* Petch., *R. bunodes* (Berk. & Broome) Sacc., *R. corticium* (Schwein.) Sacc., *R. emergens* var. *bambusicola* Theiss., *R. necatrix* Berl. ex Prill., *R. pepo* Pat., *R. rosarum* Niessl, *R. smilacina* Speg., *R. sp.* De Not. e *R. subverruculosa* Rehm. (EMBRAPA - CENARGEN, 2014). As espécies *R. necatrix*, *R. pepo* e *R. bunodes* ocorrem com maior frequência, sendo constatadas em diferentes hospedeiros e em diferentes localidades. Na área florestal, há alguns relatos da ocorrência do gênero *Rosellinia* em araucária (*Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze) (OLIVEIRA, 1981), erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) (GRIGOLETTI; AUER, 1996) e pinus (*Pinus* spp.) (AUER; GRIGOLETTI, 1997).

Recentemente, Santos et al. (2015) identificaram isolados da espécie *R. bunodes* como causadora da morte prematura de árvores em plantios de álamo (*Populus deltoides* Batl. ex Marsh.) no Estado do Paraná, sendo este o primeiro relato da ocorrência de *R. bunodes* nesta espécie no Brasil. Estes mesmos isolados mostraram-se patogênicos a mudas de araucária e erva-mate, confirmando a ampla afinidade deste fungo a diversos hospedeiros (THOMAZI et al., 2014). A fácil disseminação, a ampla gama de hospedeiros e o pouco conhecimento sobre as características intrínsecas ao patógeno, fazem desta doença uma ameaça aos cultivos perenes de álamo, tonando-se necessário gerar acerca de alguns aspectos biológicos e morfofisiológicos relacionados ao fungo, que permitam desenhar estratégias efetivas de controle (ORTIZ et al., 2006).

Métodos culturais, como a erradicação de plantas doentes e a remoção de resíduos lenhosos em decomposição, não oferecem eficiência na redução do potencial de inóculo de *R. bunodes* no solo. Como consequência, a utilização de fungos e bactérias antagonistas vem ganhando força nos últimos anos, recebendo o apoio da comunidade científica e de empresas públicas e privadas, que se mostram interessadas no emprego de microrganismos como agentes de biocontrole, em processos que vão desde a prospecção até a validação prática a campo (SANTOS et al., 2007).

Espécies do gênero *Trichoderma* têm recebido atenção científica e agroeconômica (SANTOS et al., 2007) por apresentarem características desejáveis, como parasitismo, antibiose e competição (KUBICEK, 1992), além de serem considerados indutores da resistência e promotores do crescimento vegetal (MONTALVÃO, 2012).

Neste trabalho, objetivou-se realizar a caracterização morfofisiológica, sintomatológica e patogênica de isolados de *R. bunodes* e avaliar o potencial de controle de isolados de *Trichoderma* spp. para este patógeno em mudas de álamo.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 A CULTURA DO ÁLAMO

O álamo (*Populus deltoides* Batl. ex Marsh.) é uma espécie florestal originária da região Leste da América do Norte, que possui uma ampla distribuição geográfica devido seu rápido estabelecimento (DICKMANN, 2001), fácil adaptação à regiões frias, áreas ribeirinhas e várzeas (FAO, 2011). Também conhecido como choupo, essa árvore pertence à Família Salicaceae, caracterizando-se por ser dióica, com folhas quase sempre alternas, frutos em forma de cápsula e sementes, muitas vezes, estéreis (OLIVER, 1988). Devido a rápida perda da capacidade de germinação das sementes, o álamo é facilmente propagado vegetativamente.

Dados da FAO (2011) indicam que a maior ocorrência de florestas nativas de álamo encontra-se no Canadá, Federação Russa e Estados Unidos da América, por outro lado, a China, a Índia e a França possuem as maiores áreas plantadas desta espécie. Mundialmente, cerca de 70 milhões de hectares são destinados aos plantios de álamo na forma de bosques naturais e 5,3 milhões de hectares à florestas plantadas, sistemas-agroflorestais e ornamentais.

A alta qualidade da sua madeira, como a coloração esbranquiçada, as fibras retas e a ausência de resinas em sua composição, fazem desta espécie uma cultura de importância econômica mundial, sendo sua produção destinada predominantemente para a fabricação de palitos de fósforos, móveis e laminados (CORRÊA, 2008), podendo ser utilizada como quebra-vento em pomares (ABRAF, 2013) e em sistemas de integração lavoura-pecuária-floresta (OTTO; MOTTA; REISSMAN, 2007). Esta espécie também possui aptidão para programas de reflorestamento, pois apresenta ciclo curto, grande tolerância à enchentes, além de ser considerada um biofiltro natural no tratamento de águas poluídas (JAVARINI, 2011).

Os primeiros plantios de álamo no Brasil ocorreram no município de Curitiba entre os anos de 1905 e 1910, com mudas provenientes dos Estados Unidos, enviadas também para a cidade de Caieiras em São Paulo. A principal espécie cultivada nesta época foi *Populus deltoides* var. *carolinensis*. Somente em 1959, clones de álamo provindos da Argentina e da

Itália chegaram ao Brasil, porém, devido problemas de adaptação com relação às exigências climáticas da cultura, empresas fabricantes de palitos de fósforo não despertaram interesse para o cultivo desta espécie. Em 1980, a implantação de novas técnicas e a disponibilidade de clones mais adaptados, promoveram uma expansão da cultura, principalmente na região Sul do País (MAY DE MIO; AMORIM, 2000).

Em resumo, o cultivo comercial de álamo no Brasil iniciou-se na década de 1960, no entanto, foi somente no início de 1990 que áreas mais extensas foram implantadas. No Sul do Brasil, o álamo é cultivado predominantemente na região do Vale do Rio Iguaçu (MAY DE MIO; AMORIM, 2000) que engloba os municípios de Porto União (SC), Paula Freitas (PR) e União da Vitória (PR), alcançando aproximadamente 4.300 hectares de área cultivada (ABRAF, 2013).

## 2.2 PROBLEMAS FITOSSANITÁRIOS

Por se tratar de uma espécie exótica no Brasil, os clones de álamo enfrentam diversos problemas fitossanitários. A família Salicaceae atua como hospedeira de um grande número de insetos que podem ser divididos em quatro grupos: brocas, desfoliadores, sugadores e os formadores de galhas (FAO, 1979).

No que diz respeito à ocorrência de doenças, vários são os relatos de diferentes patógenos na literatura mundial que acometem cultivos perenes de álamo (MAY DE MIO; AMORIM, 2000). As doenças que ocorrem com maior frequência são a ferrugem (*Melampsora medusae* Thuem.) (SANTOS; MACHADO, 2010), (MAY DE MIO; RUARO, 2008) e a septoriose (*Septoria musiva* Peck.) (SANTOS et al., 2006), no entanto, desde 2012 tem-se verificado o aparecimento de podridão radicular e morte de árvores em plantios comerciais no estado do Paraná, ocasionados pelo fungo *Rosellinia bunodes* (SANTOS et al., 2015).

## 2.3 O GÊNERO *Rosellinia*

Diversos relatos da ocorrência do gênero *Rosellinia* foram registrados em todo o

mundo. Muitas espécies ocorrem como saprófitas e apenas algumas são consideradas patógenos radiculares. Embora este patógeno seja encontrado a mais de 130 anos causando prejuízos em inúmeras culturas de importância econômica, como espécies florestais, frutíferas e ornamentais, ainda há pouca informação sobre o fungo (TEN HOOPPEN; KRAUSS, 2006).

O gênero *Rosellinia* está inserido na subdivisão Ascomycotina, classe Euascomycetes, subclasse Pyrenomycetes, ordem Sphaeriales ou Xylariales (TEN HOOPPEN; KRAUSS, 2006), sendo descrito pela primeira vez por De Notaris em 1844 (PÉREZ-JIMÉNEZ, 2006). Relatado na literatura como sendo um dos principais causadores de podridões radiculares, o fungo *Rosellinia* spp. tem sua distribuição generalizada pelo mundo. Este gênero inclui aproximadamente 100 espécies já catalogadas (PLIEGO et al., 2012), algumas com maior destaque, como *R. necatrix* Prill e *R. desmazieresii* ocorrendo em zonas temperadas e *R. bunodes*, *R. pepo* e *R. arcuata* Petch mais conhecidas em regiões tropicais (TEN HOOPPEN; KRAUSS, 2006). *Rosellinia necatrix*, *R. pepo* e *R. bunodes* são consideradas as espécies de ataque mais severo ao sistema radicular de plantas, quando comparadas a outras espécies do mesmo gênero.

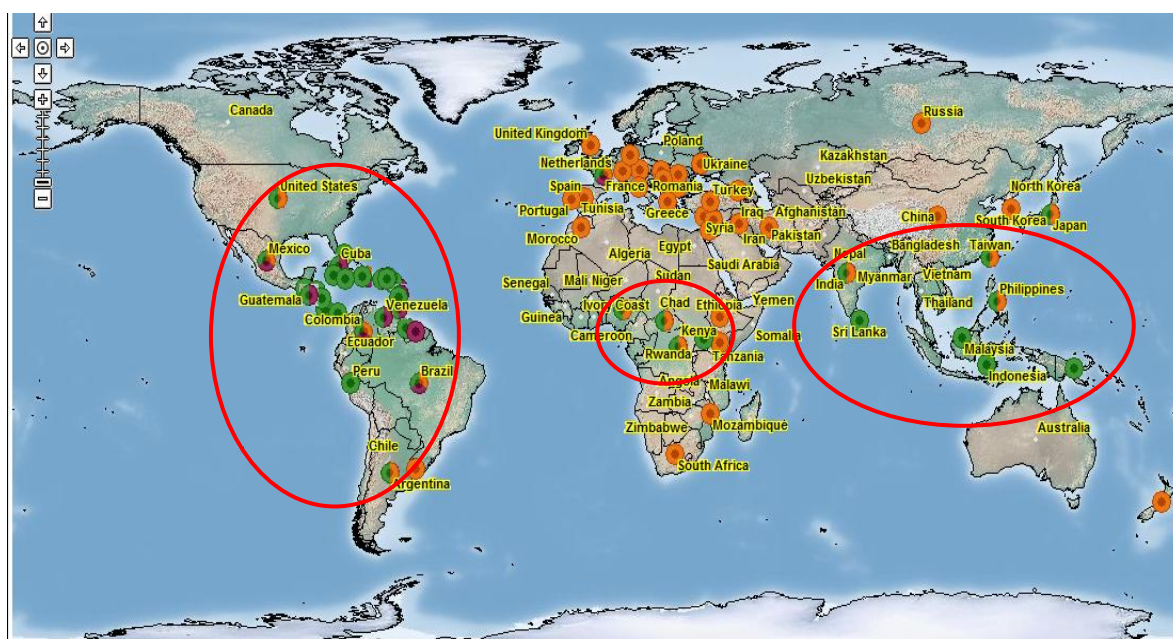
Como característica principal deste grupo, as hifas apresentam-se com inchaços piriformes nos septos (SZTEJNBERG et al., 1980). Segundo Castaño (1953), a reprodução assexuada ocorre por meio da presença de estruturas, como rizomorfas, escleródios e conídios. A fase assexuada é descrita como *Demotophora* (SIVANESAN; HOLLIDAY, 1972) ou *Graphium* (BOOTH; HAWKSWORTH, 1972). Os conídios de *Graphium* são pardo escuros elipsoides, de parede lisa, variando de 6,0-7,0 µm x 3,0-3,5 µm. Por outro lado, as estruturas assexuais de *Demotophora*, conhecidas como sinêmios, variam de 1,5 mm por 40,0 – 140,0 µm, possuem conídios pardo claros, hialinos, ovoides e de parede lisa (BERMUDEZ; CARRANZA-MORSE, 1991).

A reprodução sexual se efetua mediante o aparecimento de peritécios superficiais sobre o córtex. Os peritécios, quando presentes, são subglobosos, lisos, enegrecidos com ostíolos papilares, já os ascos possuem anel apical bem desenvolvido e ascósporos negros não septados (DENNIS, 1978).

## 2.4 DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA

Reportada em todo o mundo, as espécies de *Rosellinia* ocorrem com grande frequência

em regiões de climas tropicais e temperados (PETRINI, 1993). Acredita-se que *R. necatrix* encontra-se disseminada em todos os cinco continentes (SACCAS, 1956; SIVANESAN e HOLLIDAY, 1972; BEHDAD, 1975; PETRINI, 1993), sendo considerada a espécie mais comum deste gênero, ao contrário de *R. bunodes* e *R. pepo* que são mais restritas a regiões tropicais, com relatos na América Central e do Sul, Oeste da África e na Ásia (TEN HOOPPEN; KRAUSS, 2006) (Figura 1).



FONTE: PLANTWISE (2013)

FIGURA 1 - DISTRIBUIÇÃO MUNDIAL DE *Rosellinia bunodes* (PONTOS VERDES E CÍRCULOS VERMELHOS) *Rosellinia necatrix* (PONTOS LARANJAS) E *Rosellinia pepo* (PONTOS ROXOS).

## 2.5 *Rosellinia bunodes* (Berk et Br.) Sacc.

O fungo *R. bunodes* foi detectado pela primeira vez em fragmentos de raízes provenientes do Ceilão (atual Sri Lanka) em 1870 (SACCAS, 1956). Descrito pela primeira vez em 1873, com a denominação de *Sphaeria bunodes* Berk, somente no ano de 1882, este patógeno ficou conhecido como *R. bunodes* (Berk et Br.) Sacc. (SACCAS, 1956).

Este ascomiceto possui capacidade anaeróbica, sobrevivendo durante anos no solo e em materiais vegetais em decomposição. Patógeno oportunista, *R. bunodes* penetra nas raízes como invasor secundário, afetando as plantas que já estão debilitadas por ataques de pragas primárias ou desequilibradas nutricionalmente (TEN HOOPPEN; KRAUSS, 2006), tornando

esta doença de difícil diagnose e manejo.

Segundo Oliveira (1992) este patógeno é favorecido pela presença de raízes em processo de decomposição, pelo conteúdo de matéria orgânica na superfície do solo e pela frequência contínua das chuvas, sendo detectada maior incidência em áreas em que o índice pluviométrico é elevado e a luminosidade reduzida.

A espécie *R. bunodes* possui ampla gama de hospedeiros e distribuição mais generalizada quando comparada à *R. pepo* (HOLLIDAY, 1980). Outra particularidade de *R. bunodes* é a sua maior agressividade equiparando à outras espécies do mesmo gênero, sendo beneficiada em solos com elevado teor de umidade (50 a 70%) e pH de 5,2 (GIBSON, 1978).

A presença do patógeno pode ser evidenciada na forma de micélio esbranquiçado, escurecimento do lenho e podridão radicular. Em cortes longitudinais de raízes doentes é comum se observar estrias de coloração mais escura do que quando contrastadas com tecidos saudáveis do hospedeiro. Com a colonização de *R. bunodes* nas raízes, o primeiro sintoma visível na parte aérea é a clorose generalizada das folhas, juntamente com a murcha e secamento de ramos, que com o passar do tempo, progridem para a morte prematura da planta (MAY DE MIO; AMORIM, 2000). Em consequência do comprometimento de todo o sistema radicular e região do coleto, há a redução do transporte de seiva para o dossel vegetal, o que contribui para debilidade e fragilidade da planta infectada.

Com um número mais restrito de hospedeiros do que *R. necatrix*, a espécie *R. bunodes* ataca culturas perenes de importância econômica, como abacate (*Persea americana* Mill), espécies de bananas triploides (*Musa* AAB), café (*Coffea* sp.), cacau (*Theobroma cacao* L.), lima (*Citrus aurantifolia* Christm. Swingle), noz-moscada (*Myristica fragrans* Houtt.), mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), macadâmia (*Macadamia integrifolia* Maiden & Betche), ingá (*Inga* spp.), além de plantas com valor ornamental e paisagístico, como a corticeira (*Erythrina* sp.) (WATERSON, 1941; SACCAS, 1956; ARANZAZU et al., 1999).

No Brasil, alguns relatos da ocorrência do gênero *Rosellinia* foram verificados em espécies exóticas e nativas na área florestal. Em trabalho publicado sobre os danos causados por fungos em árvores adultas de araucária, Oliveira (1981) cita os principais métodos de controle para *R. bunodes*. Grigoletti e Auer (1996; 1997) verificaram o aparecimento de *Rosellinia* spp. em plantas de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) e pinus (*Pinus elliottii* var. *elliottii*). Santos et al. (2015) constataram a incidência deste fungo em plantios comerciais de álamo (*Populus deltoides*) no estado do Paraná.

## 2.6 CONTROLE BIOLÓGICO

O conceito de controle biológico, segundo Baker e Cook (1974), é definido como “a redução da densidade de inóculo ou das atividades determinantes da doença causada por patógenos ou parasitas nos seus estados de atividade ou dormência, por um ou mais organismos antagonicos, realizada tanto naturalmente, como através da manipulação do ambiente, hospedeiro ou antagonista, e ainda, por introdução em massa de um ou mais antagonistas”. Ainda de acordo com estes autores, essa vertente da fitopatologia teve seu início no ano de 1926, com estudos sobre o agente causal da sarna comum da batata, a bactéria *Streptomyces scabies*.

Diversos fungos, como *Trichoderma* spp., *Chaetomium* spp., *Gliocladium* spp., *Penicillium* spp. e bactérias do gênero *Bacillus* spp., *Streptomyces* spp., *Pseudomonas* spp., entre outras, possuem potencial para serem empregados como agentes de controle biológico (BETTIOL; MORANDI, 2009), pois dispõem de ações de antagonismo, como o parasitismo, a antibiose e a competição.

Com relação ao controle biológico de *R. bunodes*, inúmeros pesquisadores relataram a redução do crescimento micelial utilizando isolados de *Trichoderma* spp. (CASTRO, 1995; ESQUIVEL et al, 1992; RUIZ; LEGUIZAMÓN, 1996). Na Colômbia, o produto comercial composto a partir de conídios de *Trichoderma harzianum* “Ago Biocontrol *Trichoderma* 50 “ foi desenvolvido para o controle de fungos do gênero *Rosellinia* em café (SOCIETY OF INVERTEBRATE PATHOLOGY, 2003). Misturas de *Clonostachys mycoparasitic* e espécies de *Trichoderma* mostraram-se eficazes contra *R. bunodes* em casa-de-vegetação (MENDOZA et al., 2003).

A eficácia do controle biológico utilizando-se *Trichoderma* spp. depende diretamente do pH e da quantidade de matéria orgânica associada ao solo. Deste modo, Mendoza et al. (2003), recomenda que a aplicação de misturas de agentes de biocontrole deve ser acompanhada pela adição de calcário, visando a elevação do pH e a redução do material orgânico do solo.

Em virtude da fabricação comercial de produtos à base de microrganismos benéficos, atualmente o uso do biocontrole vem ganhando destaque em diversos setores da agricultura, como uma alternativa à redução da elevada demanda por fungicidas sintéticos, especialmente no que se refere às culturas anuais. Porém, em se tratando de espécies perenes, a carência de informações sobre o assunto ainda gera numerosos questionamentos.

### 2.6.1 O Gênero *Trichoderma*

Considerado um fungo cosmopolita (GAMS; BISSET, 1998), as espécies de *Trichoderma* são encontradas naturalmente em solos de regiões de clima temperado e tropical (MACHADO et al., 2012). De acordo com Samuel e Hadavi (1996), este gênero corresponde à fase anamórfica do gênero *Hypocrea*.

Em seu trabalho, Domsch et al. (1980) descreve as principais características morfológicas deste fungo, salientando a presença de um micélio esbranquiçado que com o passar do tempo torna-se cotonoso e compacto, assumindo colorações que variam de tons de verde a tons mais claros, como o branco.

Este microrganismo participa ativamente dos processos de mineralização dos restos vegetais em decomposição, auxiliando na manutenção do equilíbrio ambiental (GAMS; BISSET, 1998). Por possuir a vantagem de crescer e se estabelecer rapidamente, este antagonista apresenta aptidão para ser utilizado como agente de biocontrole em larga escala, tornando-se um dos fungos mais pesquisados do Brasil (SAITO et al., 2009).

Os fungos deste gênero possuem a capacidade de atuar contra diversos fitopatógenos de solo, tais como: *R. bunodes* (VALENCIA; CASTRO, 2004), *Rhizoctonia solani* (LUCON et al., 2009), *Fusarium* sp. (SILVA, 2013), *Sclerotium rolfsii* (AULER et al., 2013), *Sclerotinia sclerotiorum* (BRAÚNA, 2011), dentre outros.

Espécies do gênero *Trichoderma* têm recebido atenção científica e agroeconômica (SANTOS et al., 2007) por apresentarem qualidades desejáveis, como sua versatilidade de comportamento, estímulo de processos de parasitismo, antibiose e competição (KUBICEK, 1992), indução da resistência e promoção do crescimento vegetal (MONTALVÃO, 2012). Estes fungos destacam-se também, por produzirem uma ampla gama de antibióticos e substâncias capazes de parasitar outros fungos (SIVASITHAMPARAM; GHISALBERTI, 1998).

Pesquisas voltadas ao crescimento, morfogênese e esporulação de *Trichoderma in vitro* podem ser de grande valia para o desenvolvimento de técnicas de produção massal deste fungo antagonista, utilizadas no controle biológico.

## **CAPÍTULO I - CARACTERIZAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA, SINTOMATOLÓGICA E PATOGENICIDADE DE ISOLADOS DE *Rosellinia bunodes* EM ÁLAMO (*Populus deltoides* Batl. ex Marsh.)**

**RESUMO** – O álamo (*Populus deltoides*) é uma espécie florestal originária da região Leste da América do Norte, considerada uma espécie exótica no Brasil. Os clones de álamo enfrentam diversos problemas fitossanitários, como a ocorrência de manchas foliares, ferrugem e podridões radiculares. Desde 2012 tem-se verificado a morte de árvores em plantios comerciais de álamo no estado do Paraná, ocasionados pelo fungo *Rosellinia bunodes*. Devido a carência de informações sobre este patógeno no Brasil, objetivou-se com esse capítulo, realizar a caracterização morfofisiológica, sintomatológica e patogênica de isolados do fungo *R. bunodes* em três espécies florestais: álamo (*Populus deltoides*), araucária (*Araucaria angustifolia*) e erva-mate (*Ilex paraguayensis*). Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Patologia Florestal da Embrapa Florestas, localizada no município de Colombo (PR). Os isolados de *R. bunodes* foram obtidos a partir do isolamento de mudas de álamo com sintomas da doença. O crescimento micelial de nove isolados de *R. bunodes* foi avaliado em quatro meios de cultura (BDA, V8-ágar, CA e AA) e sete diferentes temperaturas de incubação (8, 12, 16, 20, 24, 28, 32°C). Foi realizada a caracterização sintomatológica da roseliniose em plantas de álamo. A patogenicidade dos isolados R1 e R2 de *R. bunodes* foi testada em plantas de álamo, araucária e erva-mate. O maior crescimento micelial de *R. bunodes* foi observado em meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA) em temperatura ótima de 20,76 °C. Ambos os isolados de *R. bunodes* testados mostraram-se patogênicos às três espécies florestais, sendo o álamo mais suscetível ao ataque de *R. bunodes*. Os sintomas de murchamento e clorose das folhas tornaram-se visíveis quatorze dias após a inoculação, por outro lado, os sinais do patógeno já mostravam-se aparentes ao sétimo dia após a implantação do experimento. Não se observou a presença de estruturas reprodutivas sexuadas e assexuadas de *R. bunodes*.

Palavras-chave: podridão radicular, hospedeiros florestais, crescimento micelial.

**CHAPTER I – MORPHOPHYSIOLOGICAL, SYMPTOMATOLOGY  
CHARACTERIZATION AND PATHOGENICITY OF *Rosellinia bunodes* ISOLATES IN  
POPLAR (*Populus deltoides* Batl ex Marsh.)**

**ABSTRACT** – The poplar (*Populus deltoides*) is a forest species from the eastern region of North America, considered an exotic species in Brazil. The poplar clones face several phytosanitary problems such as the occurrence of leaf spot, rust and root rot. Since 2012 there has been the death of trees in commercial poplar plantations in the state of Paraná, caused by the fungus *Rosellinia bunodes*. Due to lack of information about this pathogen in Brazil, aimed with this chapter, to characterize morphophysiological, symptomatically and pathogenically isolates of the fungus *R. bunodes* in three tree species: poplar (*Populus deltoides*), “araucaria” (*Araucaria angustifolia*) and “erva-mate” (*Ilex paraguariensis*). The experiments were conducted in Forest Pathology Laboratory of Embrapa Forests, located in the city of Colombo (PR). The isolates were obtained from *R. bunodes* isolation from poplar plants with symptoms of the disease. The mycelial growth of the nine isolates from *R. bunodes* was evaluated in four culture media (PDA, V8 agar, CA and AA) and seven different incubation temperatures (8, 12, 16, 20, 24, 28, 32° C). The symptomatology characterization of roseliniose in poplar plants was performed. The pathogenicity of *R. bunodes* isolates R1 and R2 was tested in poplar, “araucaria” and “erva-mate” plants. The largest mycelial growth of *R. bunodes* was observed in the potato-dextrose agar culture (BDA) at optimum temperature of 24° C. Both isolates of *R. bunodes* tested proved to be pathogenic to three tree species, the most susceptible to poplar *R. bunodes* attack. The symptoms of wilting and chlorosis of the leaves become visible fourteen days after inoculation, on the other hand, the signs of the pathogens already showed up apparent on the seventh day after the implementation of the experiment. There was no presence of sexual and asexual reproductive structures of *R. bunodes*.

Key words: root rot, forest hosts, mycelial growth.

## 1 INTRODUÇÃO

O álamo (*Populus deltoides* Batl. ex Marsh.) é uma espécie florestal originária da região Leste da América do Norte. Esta cultura destaca-se por possuir uma madeira clara e resistente, o que agrega alto valor econômico na fabricação de palitos de fósforo (MAY DE MIO; AMORIM, 2000) e na indústria moveleira. No Brasil, os cultivos comerciais estão localizados no vale do Iguaçu (Estado do Paraná e Santa Catarina) (MAY DE MIO; AMORIM, 2000), abrangendo aproximadamente 4.300 hectares (ABRAF, 2013).

Por se tratar de uma espécie exótica, os clones de álamo enfrentam diversos problemas fitossanitários. As doenças que ocorrem com maior frequência são a ferrugem (*Melampsora medusae* Thuem.) (SANTOS; MACHADO, 2010), (MAY DE MIO; RUARO, 2008) e a septoriose (*Septoria musiva* Peck.) (SANTOS et al., 2006). Porém, desde 2012 tem-se verificado o aparecimento de podridão radicular e morte das árvores em plantios comerciais no estado do Paraná, ocasionados pelo fungo *Rosellinia bunodes* (SANTOS et al., 2015).

*Rosellinia bunodes* é considerado um fungo polífago, que permanece viável no solo por vários anos. Esta espécie possui uma ampla gama de hospedeiros e distribuição mais generalizada quando comparada a outras espécies do mesmo gênero, ocorrendo sobretudo na América, África, Índia, Indonésia, Filipinas e Sri Lanka (HOLLIDAY, 1980). Segundo Oliveira (1992) este patógeno é favorecido pela presença de árvores com raízes em processo de decomposição, pelo conteúdo de matéria orgânica na superfície do solo e pela frequência contínua das chuvas, sendo detectada maior incidência em áreas em que o índice pluviométrico é elevado e a luminosidade reduzida.

As hifas deste fungo apresentam-se com inchaços piriformes nos septos (SZTEJNBERG et al., 1980). Segundo Castaño (1953), a reprodução assexuada ocorre por meio da presença de estruturas, como rizomorfos, escleródios e conídios, este último relatado como sendo do tipo *Dematophora* (SIVANESAN; HOLLIDAY, 1972).

No Brasil, este patógeno já foi encontrado causando danos em inúmeras culturas de importância econômica, como café (*Coffea* spp.) (VENTURA et al., 2007), soja (*Glycine max* (L.) Merr (VALE; ZAMBOLIM, 1997), figo (*Ficus carica* L.) e mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) (PONTE, 1996), comprovando a ampla gama de hospedeiros deste fitopatógeno.

Até o presente momento, não há relatos de trabalhos publicados no Brasil que englobem estudos morfofisiológicos e de patogenicidade deste fitopatógeno na cultura do

álamo, portanto, objetivou-se com este trabalho realizar a caracterização morfofisiológica, sintomatológica e patogênica de isolados do fungo *R. bunodes* em mudas de álamo.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Patologia Florestal da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Florestas), localizada no município de Colombo (PR), no período de outubro de 2013 a outubro de 2014.

### 2.1 ORIGEM DOS ISOLADOS DE *Rosellinia bunodes*

Os isolados de *R. bunodes* foram obtidos da coleção do Laboratório de Patologia Florestal da Embrapa Florestas. Foram utilizados nove isolados de *R. bunodes* (R1, R2, R3, R3A, R4, R5, R6, R7 e R8) todos provenientes de isolamento de raízes de álamo com sintomas de podridão radicular, coletadas em plantio comercial do município de Paula Freitas (PR). Estes isolados foram preservados por meio de repicagens periódicas em meio batata-dextrose-ágar (BDA) e pelo método Castellani (CASTELLANI, 1939 *apud* DHINGRA; SINCLAIR, 1995).

### 2.2 CARACTERIZAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA DE ISOLADOS DE *Rosellinia bunodes*

#### 2.1.1 Crescimento micelial de *Rosellinia bunodes* em diferentes meios de cultura

Nove isolados de *R. bunodes* provenientes de culturas puras foram testados quanto o crescimento micelial em placa de Petri, utilizando-se quatro meios de cultivo: a) batata-dextrose-ágar (BDA) (39 g de BDA em pó, 1 L de água destilada); b) V8-ágar (200 mL de suco V8-ágar, 4 g de CaCO<sub>3</sub>, 18 g de ágar e 800 mL de água destilada); c) cenoura-ágar (CA) (200 g de cenoura raspada e cortada em fatias, 500 ml de água destilada) e d) ágar-água (AA)

(20g de ágar bacteriológico, 1 L água destilada). Todos os meios foram autoclavados a 120 °C por 30 minutos.

Em seguida, os meios de cultura foram vertidos para placas de Petri, repicando-se discos de 5 mm de diâmetro dos isolados de *R. bunodes*, depositados no centro de cada placa. As placas de Petri foram mantidas em câmara de crescimento tipo BOD à 24 °C sob escuro contínuo por um período de 7 dias.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 9 x 4 (9 isolados x 4 meios de cultura) com 3 repetições, cada repetição foi composta por uma placa de Petri. A avaliação consistiu na mensuração de duas medidas diametralmente opostas com o auxílio de paquímetro digital a cada dois dias, a partir do terceiro até o sétimo dia após a instalação do experimento.

A homogeneidade da variância dos dados foi verificada pelo teste de Bartlett e a normalidade do erro pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Os dados foram submetidos à análise da variância pelo teste F e quando significativos foram comparados pelo teste de Tukey (5% de significância). As análises estatísticas foram realizadas através do programa ASSISTAT 7.7 beta (SILVA; AZEVEDO, 2006).

### 2.2.1 Crescimento micelial de *Rosellinia bunodes* em diferentes intervalos de temperatura

Discos de BDA (5 mm de diâmetro) com crescimento micelial ativo de nove isolados de *R. bunodes* foram repicados para o centro de placas de Petri contendo o meio de cultura BDA e incubados em câmara de crescimento tipo BOD em escuro contínuo sob sete diferentes temperaturas: 8, 12, 16, 20, 24, 28 e 32 °C.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com 3 repetições por isolado, cada repetição foi composta por uma placa de Petri. A avaliação consistiu na mensuração de duas medidas diametralmente opostas com o auxílio de paquímetro digital a cada dois dias, a partir do terceiro até o sétimo dia após a instalação do experimento.

Os dados foram submetidos à análise de regressão polinomial. Para a verificação da temperatura ótima de crescimento micelial de *R. bunodes*, as equações de cada curva foram obtidas por meio da derivada da primeira.

### 2.2.2 Caracterização morfológica de *Rosellinia bunodes*

Para a verificação de estruturas morfológicas do patógeno, lâminas microscópicas (25,4 x 76,2 mm) foram confeccionadas a partir de fragmentos de raízes de mudas de álamo com sinais de *R. bunodes*. Pequenas porções de micélio fúngico foram raspadas e depositadas no centro de lâminas com auxílio de um estilete previamente flambado. Posteriormente, adicionou-se o líquido de montagem (azul de metileno) com a lamínula, retirando-se o excesso com papel toalha macio. As lâminas foram vedadas com esmalte incolor e visualizadas em microscópio de luz, modelo Olympus CH30, em objetiva de 40 vezes.

### 2.3 CARACTERIZAÇÃO SINTOMATOLÓGICA DA ROSELINIOSE EM ÁLAMO

Em frascos de vidro transparente de 500 mL (14,5 cm de altura e 5 mm de diâmetro) foram acondicionadas 80 g de grãos de sorgo com adição de 40 mL de água destilada. Esse material foi autoclavado a 120 °C por 30 minutos. Em seguida, em cada frasco foram adicionados 7 discos com 8 mm de diâmetro de meio de cultura BDA com crescimento micelial ativo do isolado R2 de *R. bunodes*. Este material foi incubado a 24 °C no escuro por 17 dias. Diariamente procedeu-se a agitação manual dos frascos para melhor distribuição dos discos e uniformização do crescimento micelial nos grãos de sorgo.

Após 17 dias de incubação, procedeu-se a mistura com o substrato comercial, na proporção de 1 kg de substrato para 32 g de grãos de sorgo colonizadas com o fungo (SANTOS, 2014, informação verbal<sup>1</sup>). Esta mistura foi colocada em 25 vasos plásticos com capacidade de 700 g, e em seguida, foram transplantadas mudas de álamo com seis meses de idade.

Durante cinco semanas, foram realizadas análises de incidência externa, incidência interna e severidade interna para o mesmo grupo de plantas. Na avaliação de incidência externa foi contabilizada a presença de plantas com sintomas na parte aérea. A análise de incidência interna considerou a presença de estruturas do patógeno em tecidos internos às mudas. A análise de severidade interna foi efetuada por meio de avaliações destrutivas

---

<sup>1</sup> Entrevista concedida pelo engenheiro agrônomo Álvaro Figueredo dos Santos, da Embrapa-Florestas, Colombo (PR), à engenheira agrônoma Heloisa Thomazi, estudante de mestrado, bolsista CAPES, em 20.11.2013.

semanais, que consistiam no arranquio de 5 mudas em cada data de avaliação, foram feitos cortes longitudinais no colo das plantas para a verificação de sinais e sintomas no interior do caule. Através de fotografias, a severidade real foi mensurada a partir do software Quant (VALE et al., 2003).

#### 2.4 TESTE DE PATOGENICIDADE DE ISOLADOS DE *Rosellinia bunodes* EM ESPÉCIES FLORESTAIS

Em frascos de vidro transparente de 500 mL (14,5 cm de altura e 5 mm de diâmetro) foram acondicionadas 80 g de grãos de sorgo com adição de 40 mL de água destilada. Esse material foi autoclavado a 120 °C por 30 minutos. Em seguida, foram adicionados 7 discos com 8 mm de diâmetro de meio de cultura BDA com crescimento micelial ativo dos isolados R1 e R2 de *R.bunodes* em cada frasco. Este material foi incubado a 24 °C em escuro por 17 dias. Diariamente procedeu-se a agitação manual dos frascos para melhor distribuição dos discos e uniformização do crescimento micelial nos grãos de sorgo.

Após 17 dias de incubação, o conteúdo dos frascos foi misturado com substrato comercial na proporção de 1 kg de substrato para 32 g de grãos de sorgo colonizados com o fungo (SANTOS, 2014, informação verbal<sup>2</sup>). Esta mistura foi acondicionada em vasos plásticos com capacidade de 700 g, e em seguida, foram transplantadas mudas de álamo com seis meses de idade.

Para as mudas de araucária e erva-mate, que já encontravam-se plantadas em vasos plásticos, a inoculação com *R. bunodes* no substrato foi realizada com a utilização de um furador de rolhas (13 mm de diâmetro, 9 cm de profundidade e 11,93 cm<sup>3</sup> de volume). Foram realizados quatro orifícios por vaso totalizando 37,8 g de grãos de sorgo colonizadas com o fungo. Todas as mudas foram mantidas em casa de vegetação, onde receberam irrigação diária.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 3 x 2 (3 espécies florestais: álamo, araucária e erva-mate) x 2 isolados (R1 e R2) com 10 repetições, sendo cada repetição composta por uma muda. Durante onze semanas foi

---

<sup>2</sup> Entrevista concedida pelo engenheiro agrônomo Álvaro Figueredo dos Santos, da Embrapa-Florestas, Colombo (PR), à engenheira agrônoma Heloisa Thomazi, estudante de mestrado, bolsista CAPES, em 20.11.2013.

registrada a incidência de plantas sintomática nos seis tratamentos, sendo eles: T1: Inoculação do isolado R1 de *R. bunodes* em mudas de álamo; T2: Inoculação do isolado R2 de *R. bunodes* em mudas de álamo; T3: Inoculação do isolado R1 de *R. bunodes* em mudas de araucária. T4: Inoculação do isolado R2 de *R. bunodes* em mudas de araucária. T5: Inoculação do isolado R1 de *R. bunodes* em mudas de erva-mate. T6: Inoculação do isolado R2 de *R. bunodes* em mudas de erva-mate.

As avaliações foram realizadas aos 6, 13, 20, 27, 34, 41, 48, 55, 62, 69 e 76 dias após a inoculação. A partir dos dados de incidência, calculou-se a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) (SHANER; FINNEY, 1977) baseado na fórmula:  $AACPD = \sum (y_i + y_{i+1}) / 2 * (t_{i+1} - t_i)$ , onde  $i$  = número de avaliações;  $y$  = incidência da Roseliniose;  $t$  = tempo (dias).

A homogeneidade da variância dos dados foi verificada pelo teste de Bartlett e a normalidade do erro pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Os valores de AACPD foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, com a utilização do programa ASSISTAT, versão 7.7 beta (SILVA; AZEVEDO, 2006).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 CARACTERIZAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA DE ISOLADOS DE *Rosellinia bunodes*

##### 3.1.1 Crescimento micelial de *Rosellinia bunodes* em diferentes meios de cultura

Em todos os meios de cultura testados, as colônias mais jovens de *R. bunodes* destacaram-se por apresentar coloração branca algodosa (Figura 1A). À medida que este micélio envelhecia, a tonalidade parda tornava-se predominante sobre o meio (Figura 1B e 1C).

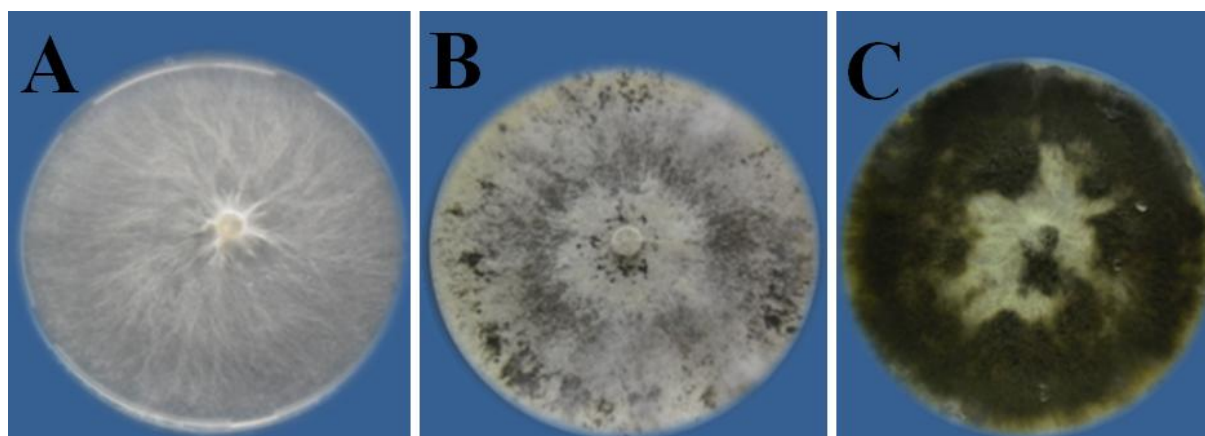
De acordo com a ANOVA, verificou-se a ocorrência de interação significativa entre os fatores “Isolados” e “Meios de cultura”, ao nível de 1% de probabilidade ( $p < 0,01$ ) (Tabela 1).

TABELA 1 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) PARA A VARIÁVEL DIÂMETRO DE COLÔNIAS (mm) DE *Rosellinia bunodes* EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA. COLOMBO (PR), 2013.

FV	GL	SQ	QM	F
Isolados de <i>Rosellinia bunodes</i>	8	4929,33	616,16	13,42**
Meios de cultura	3	52815,89	17605,29	383,66**
Isolados de <i>Rosellinia bunodes</i> x Meios de cultura	24	3911,32	162,97	3,55**
Tratamentos	35	61656,55	1761,61	38,39**
Resíduo	72	3303,83	45,88	
<b>Total</b>	<b>107</b>	<b>64960,39</b>		

\*\*significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < 0,01$ ); \*significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $0,01 < p < 0,05$ ); ns não significativo ( $p > 0,05$ ); FV: Fonte de variação; GL: Graus de liberdade; SQ: Soma dos quadrados; QM: Quadrado médio; F: Estatística F calculada.

FONTE: O autor (2013).



FONTE: O autor (2013)

FIGURA 1 - VARIAÇÃO DA COLORAÇÃO DE COLÔNIAS MICELIARES DE *Rosellinia bunodes* EM MEIO BATATA-DEXTROSE-ÁGAR (BDA). A) COLÔNIA DE *Rosellinia bunodes* COM APROXIMADAMENTE 10 DIAS DE IDADE. B) COLÔNIA DE *Rosellinia bunodes* com APROXIMADAMENTE 15 DIAS DE IDADE. C) COLÔNIA DE *Rosellinia bunodes* COM APROXIMADAMENTE 25 DIAS DE IDADE.

Houve crescimento micelial nos quatro meios de cultura testados. Todavia, diferenças significativas foram observadas entre os isolados de *R. bunodes* e os meios de cultura utilizados. Para o meio BDA, o crescimento micelial foi similar para todos os isolados (Tabela 2). Para o meio V8-água, os isolados R7 e R8 de *R. bunodes* tiveram crescimento inferior quando comparados aos demais (Tabela 2). Em meio CA, o maior crescimento micelial ocorreu nos isolados R2, R3, R3A, R5 e R6, por outro lado, no meio AA, estes mesmos isolados obtiveram o menor crescimento micelial em relação aos outros meios testados (Tabela 2). Os isolados R1 e R4 tiveram maior crescimento em meio BDA e V8-água. Os

isolados R6 e R7 apresentaram maior crescimento micelial quando crescidos em meio BDA, seguido de V8-ágar e CA, e por último, AA (Tabela 2). Tal fato comprova as informações explicitadas por Moore-Landecker (1972), que assegura que os meios com alta concentração de carboidratos estimulam o crescimento micelial de inúmeros fitopatógenos.

O meio BDA proporcionou as melhores condições de crescimento micelial para os nove isolados de *R. bunodes* utilizados (Tabela 2), corroborando com Bermúdez e Carranza-Morse (1992), que constataram que o crescimento de *R. bunodes* em meio BDA foi superior quando contraposto aos meios ágar-água, extrato de malte-ágar, suco de vegetais com ágar e sem ágar (V-8), extrato de milho-ágar e extrato de macerado de raízes de café-ágar. Por outro lado, o meio de cultura AA demonstrou-se inadequado ao crescimento micelial da espécie de fungo estudada neste trabalho (Figura 2). Segundo Dhingra e Sinclair (1995), a composição do meio de cultura é elemento fundamental que determinará a quantidade e a qualidade do crescimento e esporulação de fitopatógenos. Para Menezes e Silva-Hanlin (1997), o ótimo desenvolvimento de um fungo em um substrato e o menor crescimento em outro, está ligado a presença de metabólitos específicos.

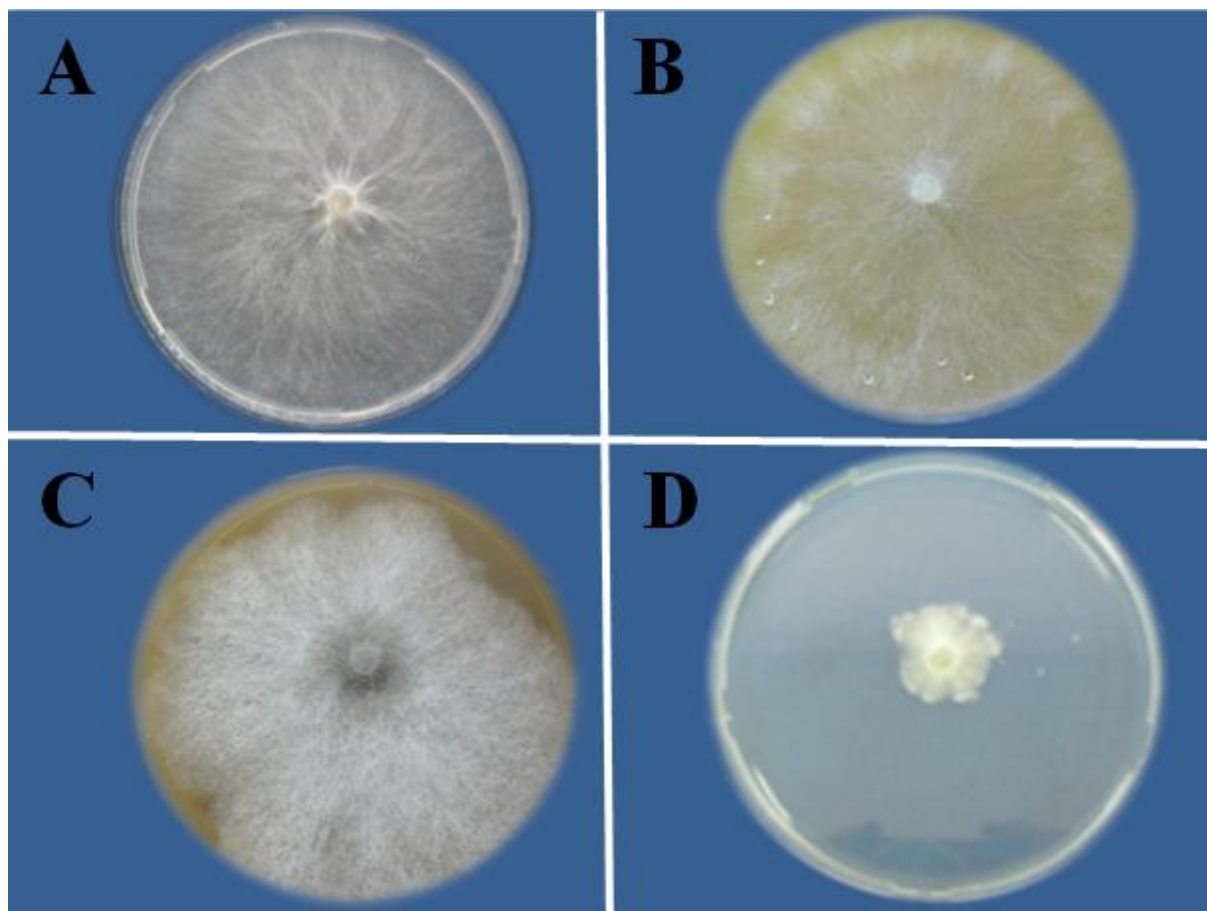
Os meios V8-ágar e CA apresentaram desempenho satisfatório com relação ao crescimento de *R. bunodes*, exibindo valores de diâmetro consideravelmente elevados para todos os isolados. Portanto, pode-se concluir que os meios que dispõem em sua composição de decoctos, extratos e sucos de folhas ou de partes vegetais promovem o crescimento micelial de uma ampla gama de fungos (DHINGRA; SINCLAIR, 1995).

TABELA 2 - DIÂMETRO (mm) DE COLÔNIAS DE NOVE ISOLADOS DE *Rosellinia bunodes* SUBMETIDOS AO CRESCIMENTO EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA. COLOMBO (PR), 2013.

ISOLADOS DE <i>Rosellinia bunodes</i>	MEIOS DE CULTURA **			
	BDA	V8-ágar	CA	AA
R1	82,6* aA	79,9 abA	56,8 cB	22,0 bC
R2	90,0 aA	90,0 aA	83,0 abA	31,6 abB
R3	90,0 aA	90,0 aA	90,0 aA	37,5 abB
R3A	90,0 aA	90,0 aA	90,0 aA	42,1 aB
R4	90,0 aA	90,0 aA	69,7 bcB	33,7 abC
R5	90,0 aA	90,0 aA	90,0 aA	28,1 abB
R6	90,0 aA	90,0 aA	90,0 aA	32,4 abB
R7	90,0 aA	71,7 bB	66,3 bcB	36,4 abC
R8	84,6 aA	65,2 bB	52,5 cB	32,5 abC
CV(%)	9.60			

\*Médias seguidas de letras maiúsculas na linha e minúsculas na coluna diferem entre si pelo Teste Tukey a 5% de significância; \*\*Meios de cultura: BDA: Batata-dextrose-ágar; CA: Cenoura-ágar.; AA: ágar-água; CV: Coeficiente de variação.

FONTE: O autor (2013).



FONTE: O autor (2013)

FIGURA 2 - CRESCIMENTO MICELIAL DE *Rosellinia bunodes* EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA. A) BATATA-DEXTROSE-ÁGAR (BDA); B) CENOURA-ÁGAR (CA); C) V8-ÁGAR; D) ÁGAR-ÁGUA (AA). COLOMBO (PR), 2013.

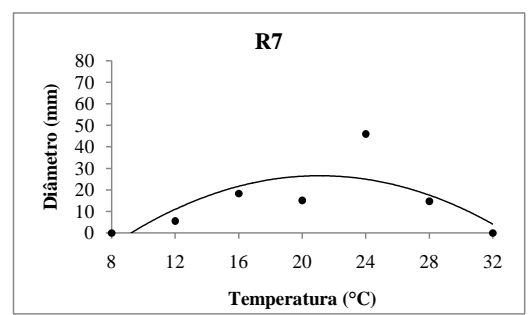
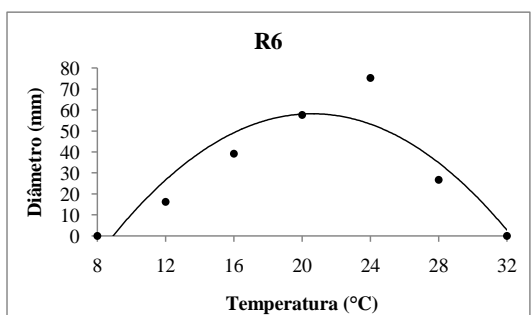
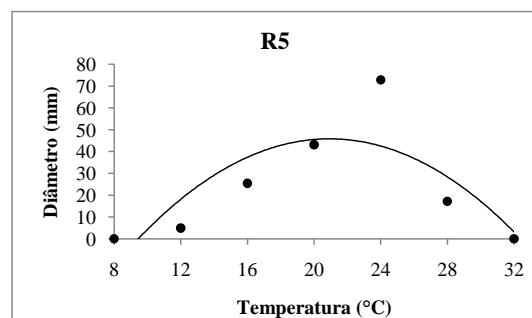
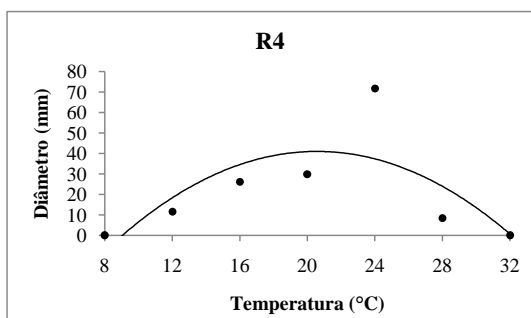
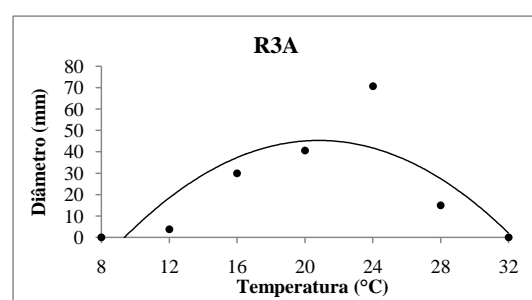
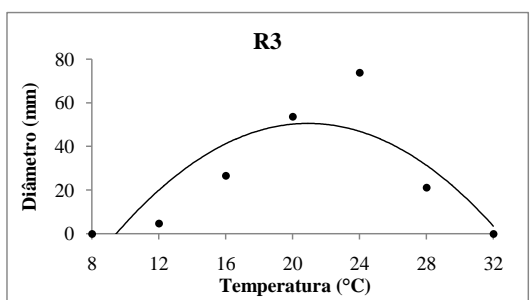
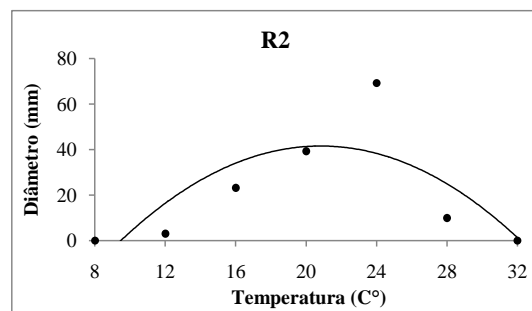
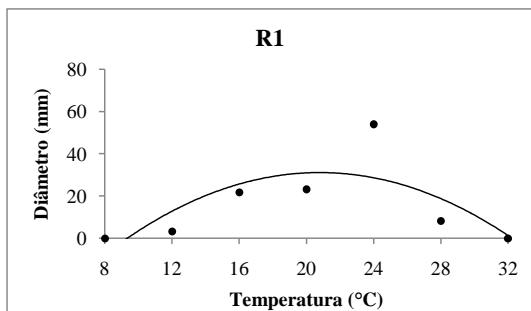
### 3.1.2 Crescimento micelial de *Rosellinia bunodes* em diferentes intervalos de temperatura

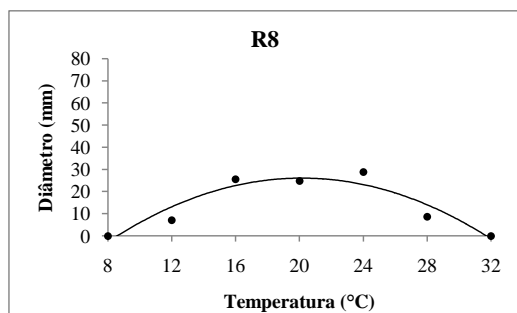
Em conformidade com os dados apresentados nas curvas de crescimento micelial (Figura 3), verificou-se que os maiores valores de crescimento micelial para a espécie de fungo *R. bunodes* encontraram-se na temperatura de 24 °C. Ruano-Rosa et al. (2003) em estudo sobre as condições térmicas adequadas para o crescimento *in vitro* de *R. necatrix*, atestaram que a temperatura ideal de crescimento para esta espécie é de 25 °C. Já para Bermúdez e Carranza-Morse (1992), a temperatura de 27 °C foi a mais eficiente para o crescimento vegetativo de *R. bunodes* em meio BDA. Segundo Rivera (1940), processos infectivos também são influenciados diretamente pela temperatura. Este autor cita que a infecção de raízes mais jovens de cultivares específicas de videira por *R. necatrix* mostrava-se

completa 24 horas após a inoculação experimental à 25 °C, porém, a 8 °C foi observada a ausência de infecção.

Para a temperatura de 20°C foi observado crescimento micelial satisfatório, confirmando as informações contidas nos trabalhos de Duque (1951) e López-Duque e Fernández (1966) em que ensaios *in vitro* demonstraram que temperaturas localizadas entre 20 e 23 °C são consideradas ideais para o desenvolvimento de *R. bunodes* e *R. pepo*.

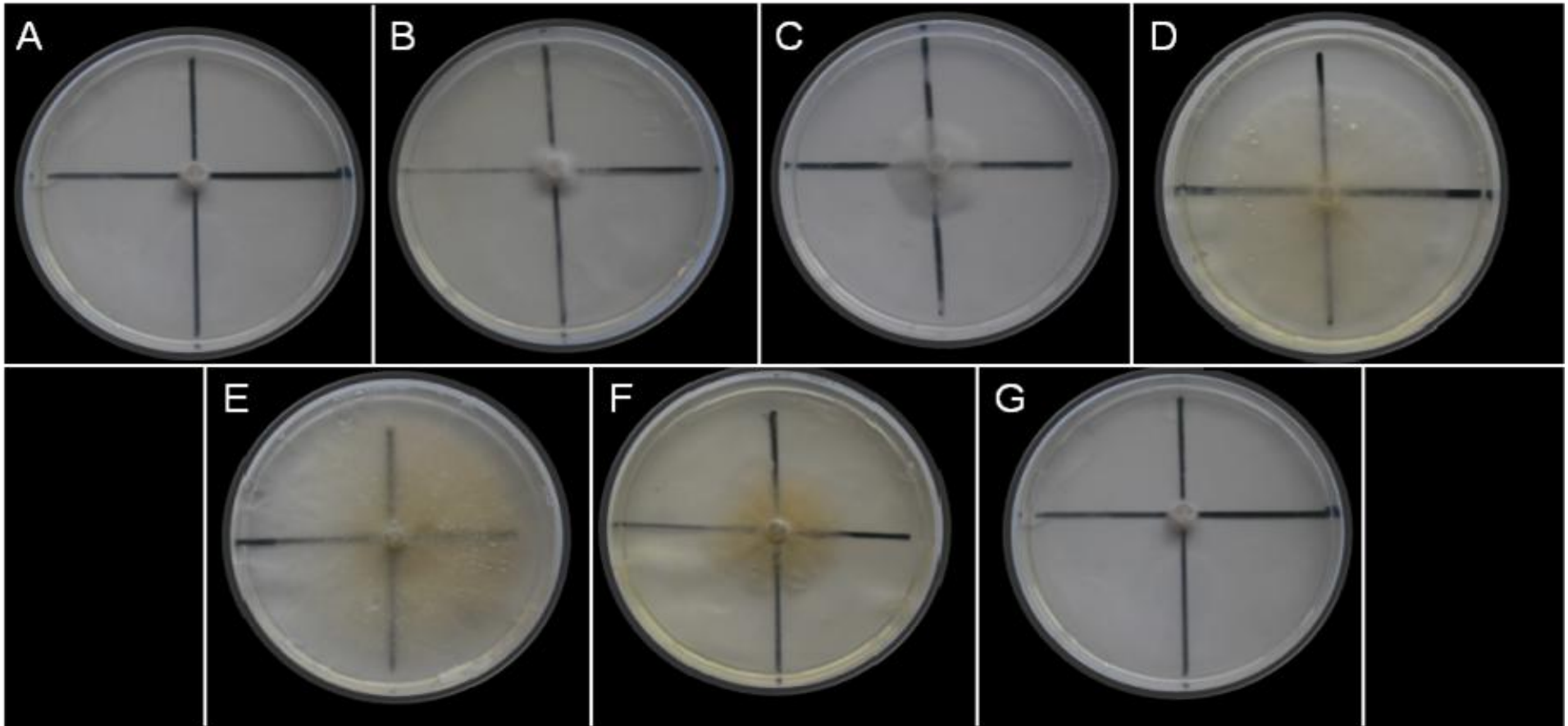
Para as temperaturas de 12, 16 e 28 °C houve crescimento moderado para os oito isolados de *R. bunodes* (Figura 3), por outro lado, não foi observado crescimento micelial nas temperaturas de 8 e 32 °C (Figura 4), corroborando com resultados obtidos por Gutreund et al. (2012) em experimento com *R. bunodes*, evidenciando que faixas extremas de temperatura impedem a propagação deste patógeno. De acordo com Bermúdez e Carranza-Morse (1992) uma diminuição perceptível de crescimento de *R. bunodes* foi constatada em temperaturas superiores à 30 °C e crescimento nulo acima de 35 °C, reforçando os resultados obtidos neste experimento. Rivera (1940), também não visualizou crescimento micelial de *R. necatrix* em temperatura de 8 °C, embora o fungo ainda estivesse viável.





FONTE - O autor (2013)

FIGURA 3 – CURVA DE CRESCIMENTO MICELIAL (mm) PARA NOVE ISOLADOS DE *Rosellinia bunodes* (R1, R2, R3, R3A, R4, R5, R6, R7 e R8) EM SETE TEMPERATURAS DISTINTAS (8, 12, 16, 20, 24, 28 e 32 °C). COLOMBO (PR), 2013.



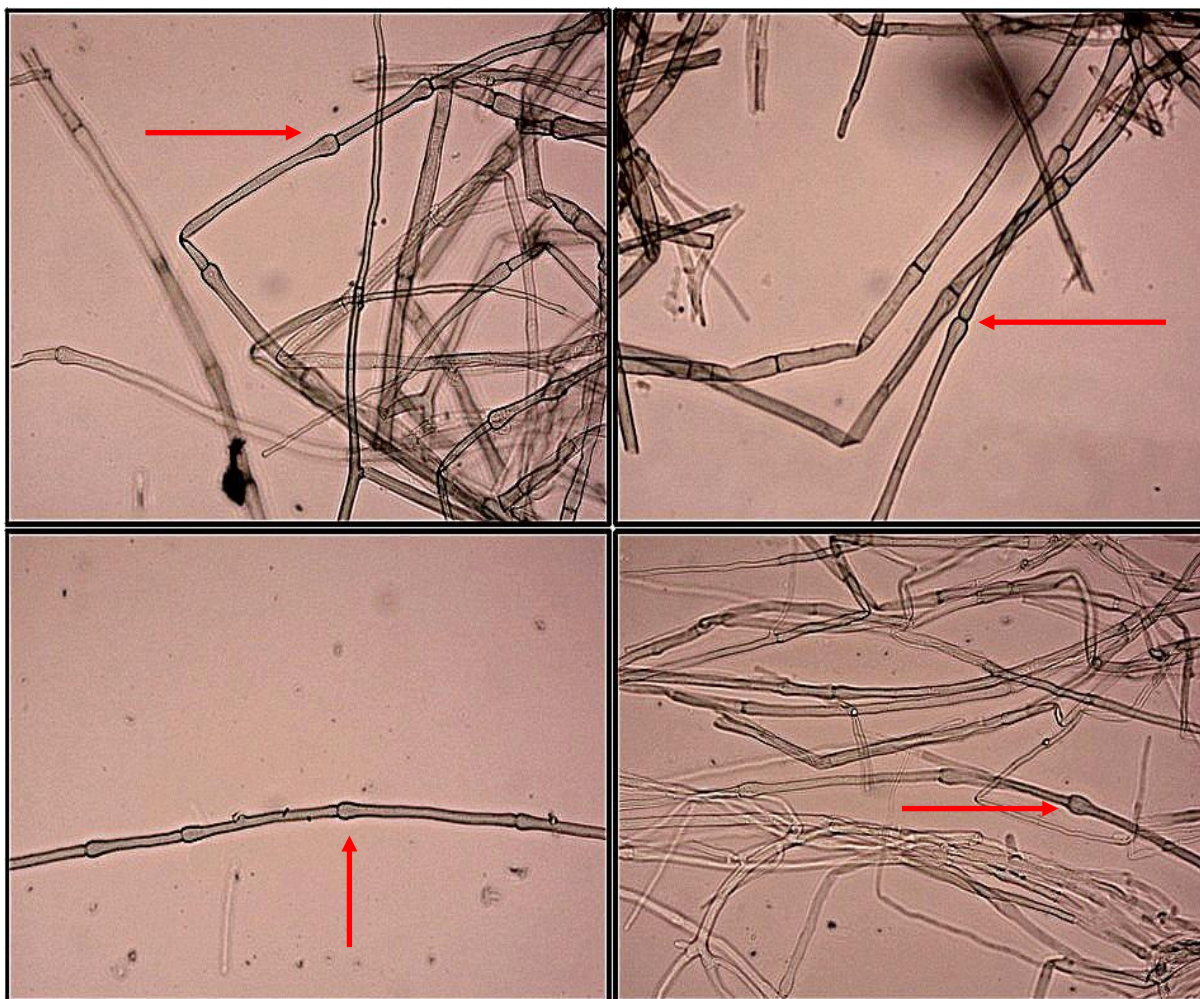
FONTE - O autor (2013)

FIGURA 4 - CRESCIMENTO MICELIAL DO ISOLADO R2 DE *Rosellinia bunodes* EM TEMPERATURAS DISTINTAS. A) 8 °C; B) 12 °C; C) 16 °C; D) 20 °C; E) 24 °C; F) 28 °C; G) 32 °C. COLOMBO (PR), 2013.

### 3.1.3 Caracterização morfológica de *Rosellinia bunodes*

Com a confecção de lâminas microscópicas foi possível a visualização de inchaços piriformes nos septos das hifas, constatando-se a fase vegetativa do fungo *R. bunodes* (Figura 5). Não foi verificada a presença de estruturas sexuais, como corpos de frutificação (peritécios). Da mesma forma, não se observou a formação do estado conidial (conidióforos agrupados em feixes ou sinêmios), referido na literatura como sendo *Dematophora* sp. (BOOTH; HOLLIDAY, 1972). De acordo com Bermúdez e Carranza-Morse (1992), os conídios de *Dematophora* sp. são caracterizados como pardo-escuros, elipsoides e de parede lisa.

Alguns autores relataram a ocorrência da forma imperfeita do gênero *Rosellinia*. Oliveira et al. (2008) confirmaram a presença da forma anamórfica do fungo *R. pepo* em plantas de seringueira com seis meses de idade no Estado da Bahia. No mesmo ano, estes autores também identificaram a fase conidial *Dematophora* em plantas de cacaueteiro, mas sem constatar o aparecimento da fase teleomórfica (peritécios) no campo.



FONTE: O autor (2014)

FIGURA 5 - HIFAS DE *Rosellinia bunodes* COM SEPTOS PIRIFORMES (SETAS VERMELHAS) EM AUMENTO DE 400X. COLOMBO (PR), 2014.

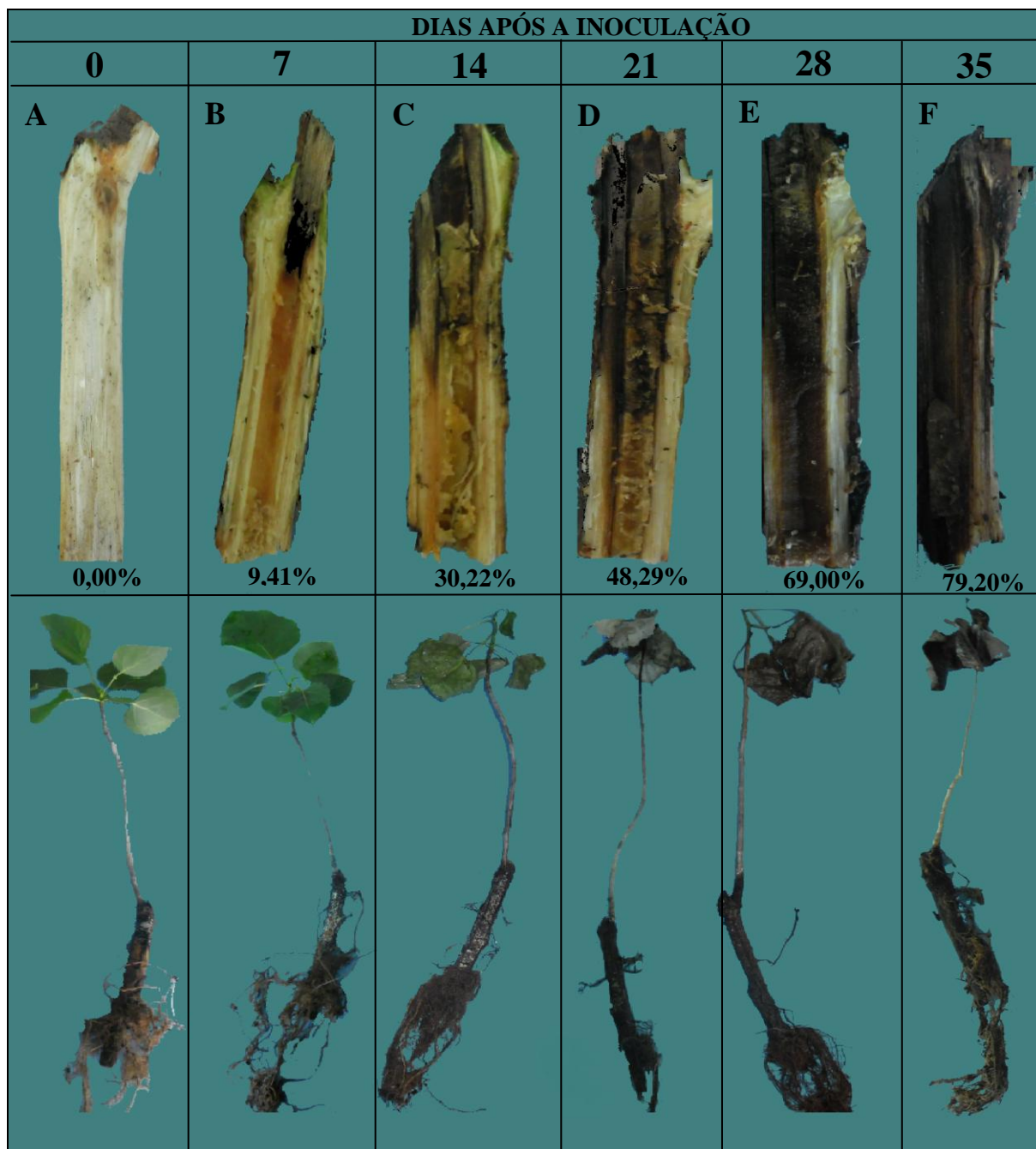
### 3.2 CARACTERIZAÇÃO SINTOMATOLÓGICA DA ROSELINIOSE EM ÁLAMO

Os sintomas externos de murchamento e clorose das folhas tornaram-se visíveis quatorze dias após a inoculação, quando o sistema radicular se encontrava totalmente danificado pelo estabelecimento do patógeno (Figura 6C). Após este estágio, os ramos apresentavam-se secos e ocorria a queda das folhas, culminando na morte precoce das mudas (Figura 6D). Ao realizar o corte longitudinal em áreas próximas do colo, tecidos do lenho externavam uma pigmentação que variava do marrom claro ao preto (Figura 6B e 6F), o que caracteriza os sintomas internos. O mesmo foi relatado em plantas de algodão que exibiam coloração salmão avermelhada em praticamente toda região interna afetada pela presença deste ascomiceto (RUANO et al., 2007).

Na região basal das mudas, os sinais apareceram na forma de um micélio esbranquiçado (Figura 7A) que alastrava-se na forma de rizomorfias até o sistema radicular, podendo-se observar o crescimento do fungo sobre o solo aderido às raízes já ao sétimo dia após a inoculação (Figura 7B, 7C e 7D). Com o passar do tempo, as lesões tornavam-se enegrecidas, característica principal desta podridão. A velocidade com que este patógeno instala-se no sistema radicular e a rápida colonização dos tecidos condutores, comprometem o fluxo xilemático e o transporte de seiva para a parte aérea dos vegetais, ocasionando a morte antecipada das plantas.

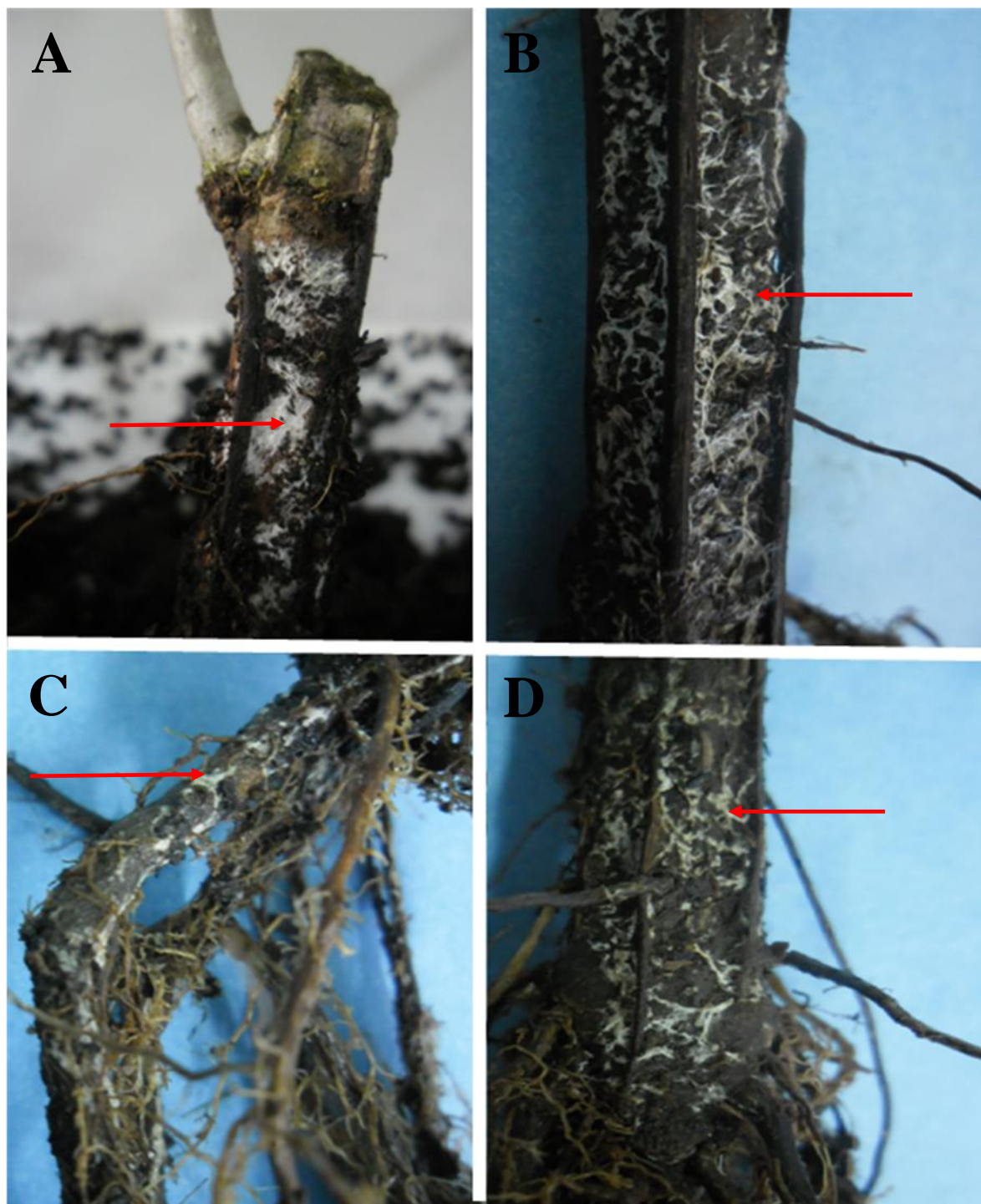
A roselinose pode manifestar-se em qualquer fase do desenvolvimento do hospedeiro, podendo atacar plântulas jovens até árvores adultas em plena produção. Em plantios de cacaueteiro (*Theobroma cacao* L.), Oliveira e Luz (2005) mencionam a ocorrência de *R. pepo* e *R. bunodes* em plantas com aproximadamente oito meses de idade, em áreas de replantio onde a retirada de material orgânico e restos culturais não era procedida durante a erradicação das plantas mortas.

Observou-se que o valor máximo de incidência externa e interna (100%) se diferenciou dos valores mais altos encontrados para a variável severidade interna, em torno de 79% (Figura 8). Esta diferença está ligada à metodologia de avaliação empregada. Análise de incidência externa contabiliza somente a presença de plantas sintomáticas (murcha e clorose) na parte aérea. Análise de incidência interna contabiliza a presença de estruturas do patógeno nos tecidos internos das plantas. Por outro lado, a severidade interna leva em consideração a percentagem ou proporção de tecido vegetal lesionado internamente pela infecção promovida pelo patógeno, podendo assim fornecer o valor real de tecido doente em relação ao tecido sadio.



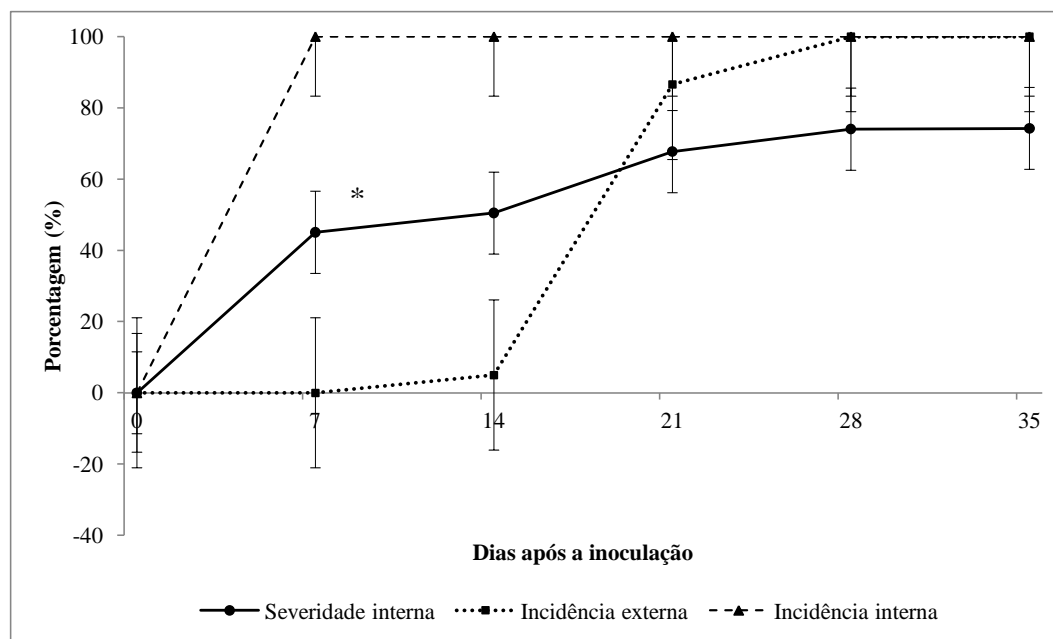
FONTE: O autor (2014)

FIGURA 6 - QUADRO SINTOMATOLÓGICO DE ROSELINIOSE EM MUDAS DE ÁLAMO. A) TESTEMUNHA: PLANTA SADIA COM 0% DE SEVERIDADE; B) PLANTA AOS 7 DIAS APÓS A INOCULAÇÃO COM 9,41% DE SEVERIDADE; C) PLANTA AOS 14 DIAS APÓS A INOCULAÇÃO COM 30,22% DE SEVERIDADE; D) PLANTA AOS 21 DIAS APÓS A INOCULAÇÃO COM 48,29% DE SEVERIDADE; E) PLANTA AOS 28 DIAS APÓS A INOCULAÇÃO COM 69% DE SEVERIDADE; F) PLANTA AOS 35 DIAS APÓS A INOCULAÇÃO COM 79,2% DE SEVERIDADE. COLOMBO (PR), 2014.



FONTE: O autor (2014)

FIGURA 7 - SINAIS DE *Rosellinia bunodes* (RIZOMORFAS) (SETAS VERMELHAS). A, B E D) NO COLO DE PLANTAS DE ÁLAMO INFECTADO COM *Rosellinia bunodes*; C) RAÍZES DE PLANTAS DE ÁLAMO INFECTADAS COM *Rosellinia bunodes*. COLOMBO (PR), 2014.



\* Barras de erro padrão

FONTE: O autor (2014)

FIGURA 8 - INCIDÊNCIA (%) E SEVERIDADE (%) DA ROSELINIOSE EM MUDAS DE ÁLAMO APÓS A INOCULAÇÃO COM O ISOLADO R2 DE *Rosellinia bunodes*. COLOMBO (PR), 2014.

### 3.3 TESTE DE PATOGENICIDADE DE ISOLADOS DE *Rosellinia bunodes* EM ESPÉCIES FLORESTAIS

O método de inoculação utilizado foi considerado eficiente na reprodução de todos os sintomas da doença e sinais do patógeno observados em condições de campo. Ambos isolados (R1 e R2) de *R. bunodes* mostraram-se patogênicos às mudas de álamo, araucária e erva-mate (Tabela 4 e Figura 9).

Ao décimo terceiro dia após a instalação do ensaio, 100% das mudas de álamo encontravam-se mortas quando inoculadas com o isolado R2 de *R. bunodes* (Figura 10). Castro et. al., (2013) observaram o mesmo comportamento de *R. bunodes*, constatando a morte de 98% de mudas de café (*Coffea arabica* L.) entre o décimo e o décimo primeiro dia após a inoculação. Por outro lado, neste trabalho o isolado R1 expressou-se de modo menos agressivo, causando a morte de somente 10% de plantas de álamo para a mesma data de avaliação, obtendo a máxima incidência (90%) aos trinta e quatro dias após a inoculação.

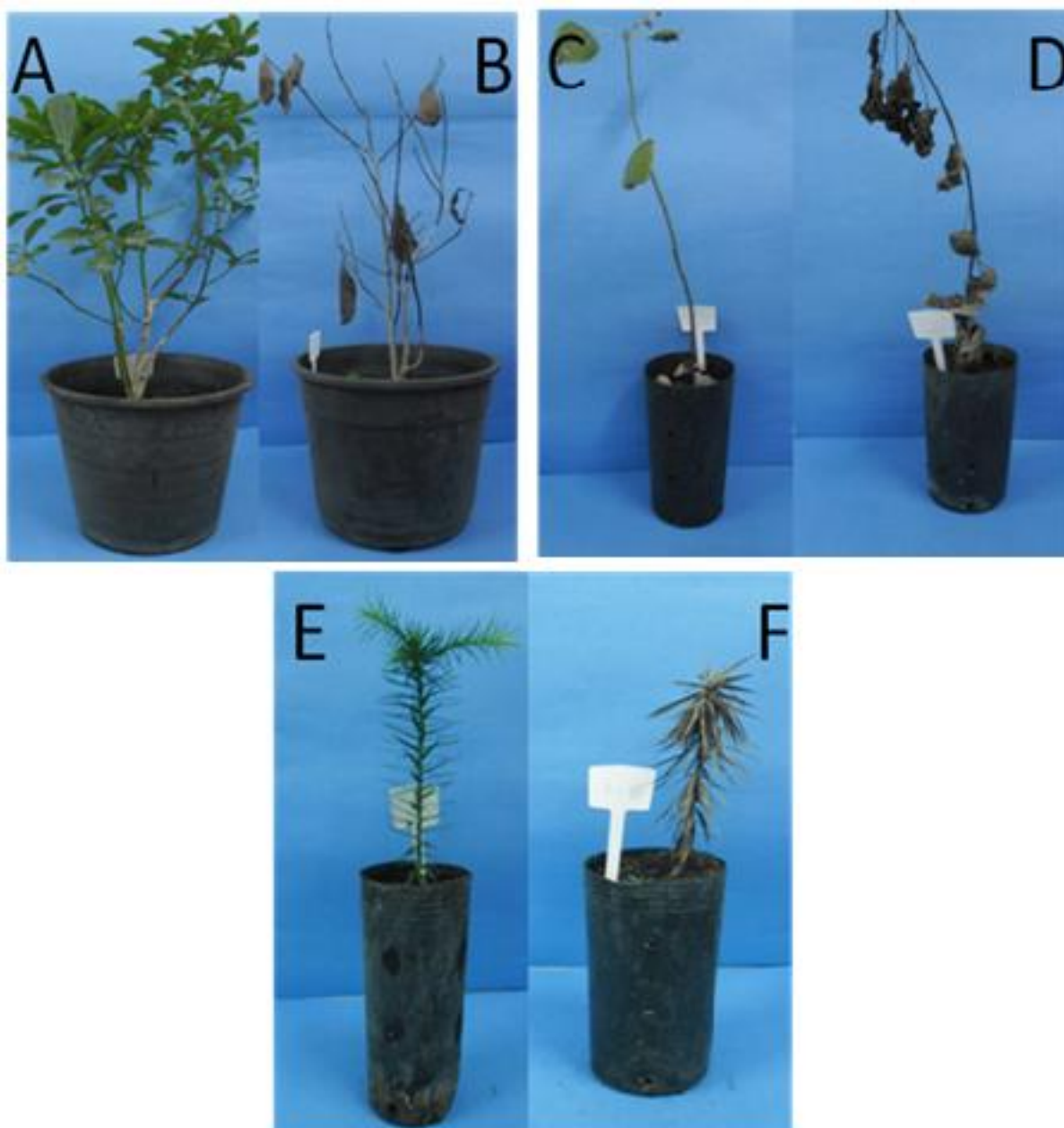
Para as mudas de araucária, a incidência máxima registrada foi de 100% aos trinta e quatro dias após a inoculação para os dois isolados de *R. bunodes* utilizados neste ensaio (Figura 11), atestando que tanto o isolado R1, quanto o isolado R2 manifestaram-se de maneira destrutiva para esta espécie. Para as mudas de erva-mate, a maior mortalidade foi constatada aos quarenta e um dias, variando de 70% a 80% de plantas mortas, para o isolado R1 e R2, respectivamente (Figura 12).

TABELA 3 - INCIDÊNCIA (%) DE ROSELINIOSE EM TRÊS HOSPEDEIROS FLORESTAIS: ÁLAMO (*Populus deltoides*); ARAUCÁRIA (*Araucaria angustifolia*), ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis*). COLOMBO (PR), 2013.

HOSPEDEIROS	ISOLADOS*	DIAS APÓS A INOCULAÇÃO										
		6	13	20	27	34	41	48	55	62	69	76
		INCIDÊNCIA (%)										
Álamo	R1	0	10	80	80	90	90	90	90	90	90	90
	R2	0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Erva-mate	R1	0	0	0	50	60	70	70	70	70	70	70
	R2	0	0	0	30	30	80	80	80	80	80	80
Araucária	R1	0	0	10	70	100	100	100	100	100	100	100
	R2	0	0	40	80	100	100	100	100	100	100	100

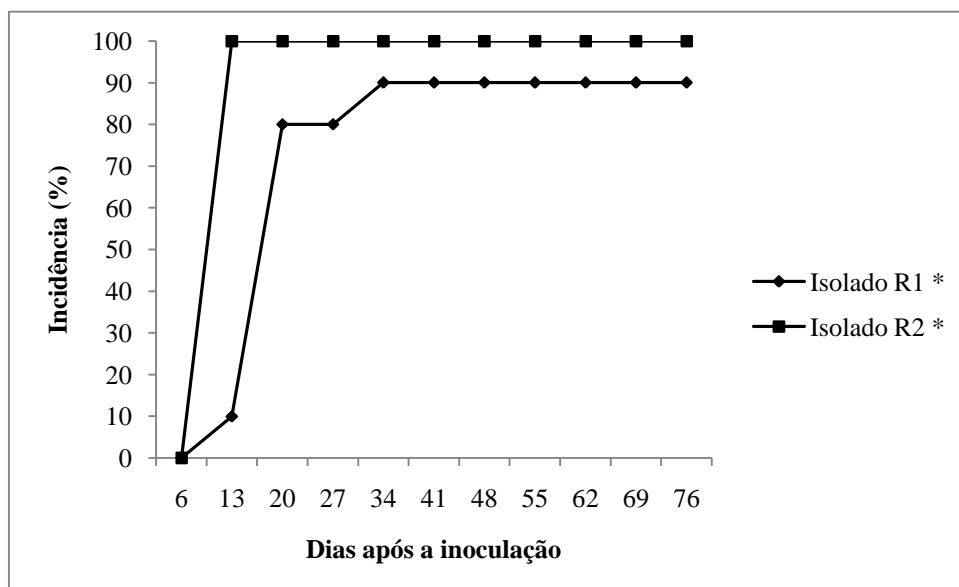
\*Isolados de *Rosellinia bunodes*: R1 e R2

FONTE: O autor (2013)



FONTE: O autor (2013)

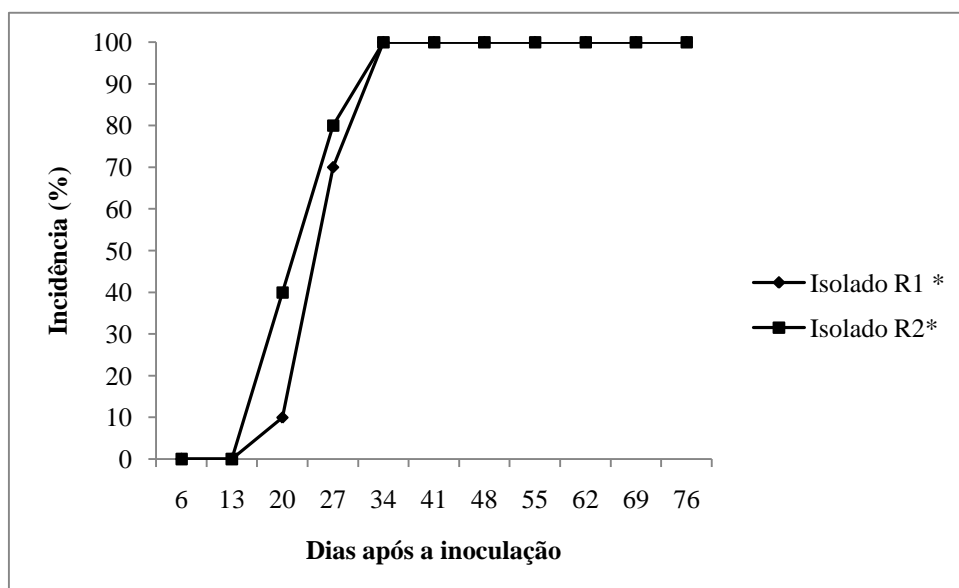
FIGURA 9 - ROSELINIOSE EM ESPÉCIES FLORESTAIS: ERVA-MATE: (SADIA – A) E (DOENTE – B);  
ÁLAMO: (SADIA – C) E (DOENTE – D); ARAUCÁRIA: E) (SADIA – E) E (DOENTE – F); COLOMBO  
(PR), 2013.



\*Isolados de *Rosellinia bunodes*: R1 e R2

FONTE: O autor (2013)

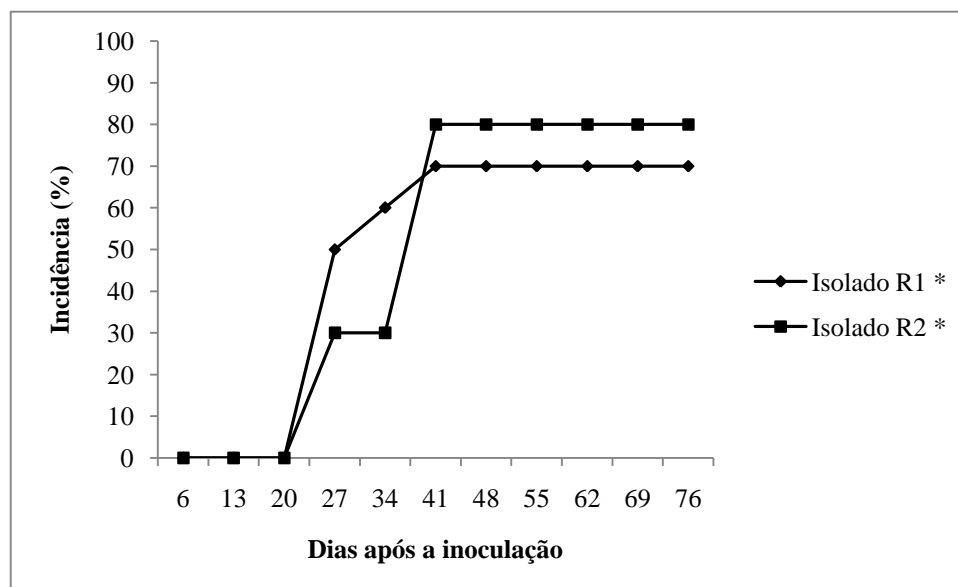
FIGURA 10 - INCIDÊNCIA (%) DE ROSELINIOSE EM MUDAS DE ÁLAMO (*Populus deltoides*) INOCULADAS COM DOIS ISOLADOS DE *Rosellinia bunodes*. COLOMBO (PR), 2013.



\*Isolados de *Rosellinia bunodes*: R1 e R2

FONTE: O autor (2013)

FIGURA 11 - INCIDÊNCIA (%) DE ROSELINIOSE EM MUDAS DE ARAUCÁRIA (*Araucaria angustifolia*) INOCULADAS COM DOIS ISOLADOS DE *Rosellinia bunodes*. COLOMBO (PR), 2013.



\*Isolados de *Rosellinia bunodes*: R1 e R2

FONTE: O autor (2013)

FIGURA 12 - INCIDÊNCIA (%) DE ROSELINIOSE EM MUDAS DE ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis*) INOCULADAS COM DOIS ISOLADOS DE *Rosellinia bunodes*. COLOMBO (PR), 2013.

Houve diferença significativa entre a AACPD causada pelos dois isolados de *R. bunodes*. Também houve diferença nos valores de AACPD das três espécies florestais (Tabela 4).

O isolado R2 foi mais agressivo que o isolado R1, tendo os maiores valores de AACPD para as três espécies arbóreas utilizadas neste trabalho (Tabela 5). Houve maior suscetibilidade das plantas de álamo, diferindo estatisticamente das mudas de araucária e erva-mate (Tabela 5). Credita-se a maior suscetibilidade das mudas de álamo à origem dos isolados de *R. bunodes*, provenientes de tecidos sintomáticos de plantas adultas de álamo.

Os maiores valores de AACPD foram verificados para o isolado R2 de *R. bunodes*, sendo considerado o mais agressivo para os três hospedeiros testados. Esta oscilação entre o desempenho dos isolados, pode estar associada à variabilidade genética encontrada dentro da mesma espécie de patógeno, embora Castro et al. (2013) tenha observado pouca variação genética entre isolados de *R. bunodes* e *R. pepo* em seu trabalho sobre patogenicidade.

TABELA 4 - ANÁLISE DA VARIÂNCIA (ANOVA) PARA A VARIÁVEL ÁREA ABAIXO DA CURVA DE PROGRESSO DA DOENÇA (AACPD) PARA TRÊS ESPÉCIES FLORESTAIS INOCULADAS COM OS ISOLADOS R1 E R2 DE *Rosellinia bunodes*. COLOMBO (PR), 2013.

FV	GL	SQ	QM	F
Isolados de <i>Rosellinia</i>	1	7526041,66	7526041,66	5,32*
Espécies Florestais	2	55793083,33	27896541,66	19,75**
Interação	2	2543083,33	1271541,66	0,900 <sup>ns</sup>
Tratamentos	5	65862208,33	13172441,66	9,32**
Resíduo	54	76260250,00	1412226,85	
<b>Total</b>	<b>59</b>	<b>142122458,33</b>		

\*\*significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < 0,01$ ); \*significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $0,01 \leq p < 0,05$ ); ns não significativo ( $p > 0,05$ ); FV: Fonte de variação. GL: Graus de liberdade. SQ: Soma dos quadrados. QM: Quadrado médio. F: Estatística F calculada.

FONTE: O autor (2013)

TABELA 5 - ÁREA ABAIXO DA CURVA DE PROGRESSO DA DOENÇA (AACPD) PARA TRÊS ESPÉCIES FLORESTAIS INOCULADAS COM OS ISOLADOS OS ISOLADOS R1 E R2 DE *Rosellinia bunodes*. COLOMBO (PR), 2013.

ISOLADOS DE <i>Rosellinia bunodes</i>	AACPD**
R1	4945,0* b
R2	5653,3 a
DMS	615,46
ESPÉCIES FLORESTAIS	AACPD
Álamo	6657,5 a
Araucária	4725,0 b
Erva-mate	4515,0 b
DMS	905,83
CV (%)	22,43

\*As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. \*\*Área abaixo da curva de progresso da doença; DMS: Diferença mínima significativa; CV: Coeficiente de variação.

FONTE: O autor (2013)

#### 4 CONCLUSÕES

- O maior crescimento micelial de *R. bunodes* ocorre em meio BDA em temperatura ótima de 24 °C.
- Os isolados R1 e R2 de *R. bunodes* são patogênicos para as espécies florestais álamo, araucária e erva-mate.
- O álamo é mais suscetível ao ataque de *R. bunodes* quando comparado à araucária e à erva-mate.
- Os sintomas de Roseliniose (clorose e murcha) são visíveis aos 14 dias após a inoculação em mudas de álamo.
- Os sinais de *R. bunodes* (micélio) são aparentes ao sétimo dia após a inoculação em mudas de álamo.
- Verificou-se a presença de hifas com septos piriformes, característica desta espécie de fungo.
- Não se observou a presença de estruturas reprodutivas sexuadas e assexuadas de *R. bunodes*.

## REFERÊNCIAS

- ABRAF. Associação Brasileira de Produtores de Florestas Plantadas. **Anuário Estatístico ABRAF 2013, ano base 2012**. 148 p.: il. color; 21 cm. Brasília, 2013.
- BERMUDEZ, M.; CARRANZA-MORSE, J. Estado anamórfico de *Rosellinia bunodes* (Berk. e Br.) Sacc y *Rosellinia pepo* Pat. (Ascomycotina: Xylariaceae). **Revista Biol. Trop.**, 40 (1): 43-46 p., 1992.
- BOOTH C.; HOLLIDAY, P. *Rosellinia pepo*. **CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria**. 351:1, 1972.
- CASTAÑO, J. Algunas observaciones sobre la "llaga negra" radicular del café. Chinchina:, Colombia, Centro Nacional de Investigaciones del café. **Boletín Informativo** v.4(37):28-30p., 1953.
- CASTRO, B. L.; CARREÑO, A. J.; GALEANO, N. F.; ROUX, J.; WINGFIELD, M. J.; GAITÁN, A. L. Identification and genetic diversity of *Rosellinia* spp. associated with root rot of coffee in Colombia. **Australasian Plant Pathology**. Colombia, 42(5):515-523p., 2013.
- DHINGRA, O. D., SINCLAIR, J. B. **Basic Plant Pathology Methods**. Second edition. CRC Lewis Publishers: Boca Raton, 434p, 1995.
- DUQUE, J. **La podredumbre negra de la raíz del café**. El Café de El Salvador 2:31-37, 1951.
- GRUTEUND, C.; SANTOS, A. F.; MACHADO, E. B. Influência de diferentes temperaturas no crescimento micelial de *Rosellinia* sp. **Anais do XI Evento de Iniciação Científica da Embrapa Florestas**, Colombo, 2012.
- HOLLIDAY, P. 1980. Fungus diseases of tropical crops. Cambridge, Cambridge University Press. 607p.
- LÓPEZ-DUQUE, S.; FERNÁNDEZ, O. Llagas radicales negras (*Rosellinia bunodes*) y estrellada (*Rosellinia pepo*) del café. Efecto de la humedad y pH del suelo en el desarrollo micelial e infección. **Cenicafé**, Colombia, 17:61.f.II. 1966.
- MAY DE MIO, L. L.; AMORIM, L.. Doenças do álamo. **Floresta** 30 (1/2): 139-153. Universidade Federal do Paraná. Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação. Curitiba, 2000. Disponível em: <<http://ojs.c3sl.ufpr.br/ojs2/index.php/floresta/article/download/2323/1941>>. Acesso em: 22 Jul. 2013.
- MAY DE MIO, L. L.; RUARO, L. Métodos de avaliação da ferrugem do álamo e eficiência de fungicidas no seu controle. **Rev. Árvore**, Viçosa, v. 32, n. 5, Oct. 2008. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S010067622008000500008&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010067622008000500008&lng=en&nrm=iso)>. Acesso em: 03 Feb. 2014.
- MENEZES, M.; SILVA-HANLIN, D. M. W. **Guia prático para fungos fitopatogênicos**. Recife: UFRPE, 106p., 1997.
- MOORE-LANDECKER, E. **Fundamentals of the Fungi**. Prentice-hall. London. p.482, 1972.
- OLIVEIRA, I. M. Pudricão negra da raiz do cacaueiro causada por *Rosellinia* sp. no Brasil. **Agrotropica**, Brasil,

4 (2): 21-26p., 1992.

OLIVEIRA, M. L.; MELO, G. L.; NIELLA, A. R. R.; SILVA, V. R. Black root rot caused by *Rosellinia pepo*, a new disease of the clove tree in Brazil. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, . 33, n. 2 Mar – Abr, 2008.

OLIVEIRA, M. L.; LUZ, E. D. M. N. **Identificação e manejo das principais doenças do cacaueteiro no Brasil**. Ilhéus, CEPLAC/CEPEC/SEFIT. 132p., 2005.

ORTIZ, C. E.; VILLEGAS, C.; HERRERA, N. M.. Aislamiento y caracterización morfológica de *Rosellinia pepo* pat. en plantas de macadamia. **Rev.Fac.Nal.Agr.Medellín**, Medellín, v. 59, n. 2, 2006 . Disponível em: <[http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S030428472006000200008&lng=es&nrm=iso](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S030428472006000200008&lng=es&nrm=iso)>. Acesso em: 23 jul. 2013.

PONTE, J. J. **Clínica de doenças de plantas**. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza: 872 p. (pág: 605). 1996.

RIVERA, V. On root rots caused by *Rosellinia necatrix* and *Agaricus melleus*: susceptibility due to the temperature of the root environment, influence of the soil and of the nature of the wood of the plant host; methods of control. **Nuovo G. bot. ital**, v. 47: n. 2, 477-487p., 1940.

RUANO, O; MURAMOTO, S. P.; ALMEIDA, W. P.; CIA, E.; LUDERS, R. R.; OLIVEIRA, A. B. *Rosellinia* spp.: Novo fungo associado a mortalidade de plantas de algodoeiro (*Gossypium hirsutum*), em Goiás. **Anais do VI Congresso Brasileiro do Algodão**. Uberlândia-MG, 2007.

RUANO-ROSA D.; DEL MORAL-NAVARRETE L.; LÓPEZ-HERRERA C. J. **Actas del V Congreso Mundial del Aguacate**, Malaga, Spain, 440p., 2003.

SANTOS, A. F. dos; MACHADO, E. B. **Controle químico da ferrugem do álamo**. Comunicado Técnico 253. Embrapa Florestas, ISSN 1517-5030. Colombo (PR), 2010.

SANTOS, A. F. dos; MACHADO, E. B.; TESSMANN, D. J.; THOMAZI, H. Patogenicidade de *Rosellinia bunodes* ao álamo. **Anais do XXXVIII Congresso Paulista de Fitopatologia (CD-ROM)**. Araras- SP, 2015.

SANTOS, A. F. dos; MACHADO, E. B.; STANOSZ, G. R. **Primeiro relato da ocorrência de Septoria musiva em álamo no Brasil**. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, (supl.), p. 122, ago. 2006. Edição dos Resumos do 39º Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 2006, Salvador. Resumo 0001.

SHANER, G.; FINNEY, R. E. The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in knox wheat. **Phytopathology** 67:1051-1056, 1977.

SILVA, F. DE A. S.; AZEVEDO, C. A. V. de. Versão do programa computacional Assistat para o sistema operacional Windows. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v.4, n.1, 71-78 p., 2006.

SIVANESAN, A.; HOLLIDAY, P. *Rosellinia necatrix*. Description of Pathogenic Fungi and Bacteria, vol. 352 **Commonwealth Mycological Institute**, Kew, Surrey, England, 1972.

SZTEJNBERG, A.; MADAR, Z; CHET, I. Induction and quantification of microsclerotia in *Rosellinia necatrix*. **Phytopathology**, v. 70 525–527p., 1980.

THOMAZI, H.; SANTOS, A. F. Dos; BUHRER, C.; MACHADO, E. B.; TESSMANN, D. J. Patogenicidade de *Rosellinia* sp. a algumas espécies florestais. **Anais do 47º Congresso Brasileiro de Fitopatologia**. Londrina-PR, 2014.

VALE, F. X. R.; FERNANDES FILHO, E. I.; LIBERATO, J. R. QUANT. A software plant disease severity assessment. **8<sup>th</sup> International Congress of Plant Pathology**, Christchurch New Zealand, 105 p., 2003.

VALE, F. X. R. do; ZAMBOLIM, L. **Controle de doenças de plantas: grandes culturas**. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG: 979 p., 1997.

VENTURA, J. A.; COSTA, H.; SANTANA, E. N.; MARTINS, M. V. V.; **Diagnóstico e Manejo das Doenças do Cafeeiro Conilon (*Coffea canephora*)**. In: FERRÃO, R. G.; FONSECA, A. F. A.; BRAGANÇA, S. M.; FERRÃO, M. A. G.; MUNER, L. H.; *Café Conilon*. 1ª Ed., 453-497p., Vitória-ES: Incaper, 2007.

## CAPÍTULO II – BIOCONTROLE DE *Rosellinia bunodes* EM ÁLAMO

**RESUMO** – Responsável por danos consideráveis em muitas espécies cultivadas, sobretudo em espécies perenes arbóreas, o fungo *R. bunodes* vem ganhando destaque devido a incidência em plantios comerciais de espécies florestais, como o álamo. O álamo é plantado nos Estados do Paraná e de Santa Catarina para a produção madeireira, destinada à fabricação de palitos de fósforo. Em razão da não existência de produtos registrados para esta cultura no Brasil, o controle cultural, muitas vezes ineficiente, torna-se a única opção de supressão desta doença. Na busca de soluções para este problema, o emprego de técnicas alternativas, como o controle biológico vem de encontro com as necessidades de implantação de um sistema mais sustentável. O fungo *Trichoderma* é considerado um ativo habitante do solo e possui aptidão inibitória no crescimento de fungos fitopatogênicos. Face ao exposto, objetivou-se com este capítulo, avaliar isolados de *Trichoderma* spp. com capacidade antagônica de inibição *in vitro* e *in vivo* de *R. bunodes*. O experimento foi conduzido no Laboratório de Patologia Florestal da Embrapa Florestas, localizada no município de Colombo (PR). Os testes de antagonismo em confrontação direta, produção de compostos voláteis e não voláteis foram realizados entre 30 isolados de *Trichoderma* spp. e o isolado R2 de *R. bunodes*. Para estes testes, foram efetuadas medições das colônias do fitopatógeno com auxílio de paquímetro digital. Nos testes realizados em casa-de-vegetação, avaliou-se a incidência de plantas doentes em cada tratamento. Os isolados TRICH 103, TRICH 104, TRICH 112, TRICH 115, AR, LPF8, SP4 e TRE de *Trichoderma* spp. demonstraram maior ação antagônica ao crescimento micelial de *R. bunodes* pelos testes de culturas pareadas, produção de compostos voláteis e não voláteis. O isolado AR de *Trichoderma* sp. necessita de quatorze dias para se estabelecer em substrato contendo *R. bunodes*. Não foi observada a mortalidade de mudas de álamo nos tratamentos testados para o ensaio de biocontrole, devido à redução do crescimento micelial de *R. bunodes* pela elevação das temperaturas dentro da casa de vegetação, não sendo possível constatar o efeito *in vivo* do fungo antagonista *Trichoderma* sobre *R. bunodes*.

Palavras-chave: podridão radicular, controle biológico, *Trichoderma*.

## CHAPTER II – BIOCONTROL OF *Rosellinia bunodes* IN POPLAR

**ABSTRACT** – Responsible for considerable damage in many cultivated species, especially in woody perennial species, the fungus *R. bunodes* has been highlighted because of its incidence in commercial plantations of forest species, like poplar. The poplar is planted in Parana and Santa Catarina states for timber production, for the matches manufacture. With the absence of products registered for these crop in Brazil, cultural control, often inefficient, it is the only option of suppressing this disease. In the search for solutions to this problem, the use of alternative techniques, such as biological control stand out needs for implementing a more sustainable system. *Trichoderma* is considered active inhabitant of soil due to this inhibitory ability on the growth of pathogenic fungi. Given the above, the objective with this chapter is evaluate *Trichoderma* spp. isolates with antagonistic ability *in vitro* and *in vivo* control of *R. bunodes*. The experiment was conducted in Forest Pathology Laboratory of Embrapa Forests, located in the city of Colombo (PR). Antagonism tests in direct confrontation and production of volatile and non-volatile compounds were conducted between 30 isolates of *Trichoderma* spp. and isolate R2 of *R. bunodes*. For these tests, measurements were made of the pathogen colonies using a digital caliper. In tests conducted in greenhouse, evaluated the incidence of diseased plants in each treatment. TRICH 103, TRICH 104, TRICH 112, TRICH 115, AR, LPF8, SP4 and TRE *Trichoderma* spp. isolates demonstrated greater antagonistic action to mycelial growth of *R. bunodes* by testing paired cultures and production of volatile and non-volatile compounds. AR *Trichoderma* sp. isolated needs fourteen days to settle in substrate containing *R. bunodes*. There was no mortality of poplar seedlings in treatments tested for biocontrol test, due to reduced mycelial growth of *R. bunodes* by rising temperatures inside the greenhouse, it is not possible to verify the *in vivo* effect of *Trichoderma* antagonistic fungus on *R. bunodes*.

Key words: root rot, biological control, *Trichoderma*.

## 1 INTRODUÇÃO

O álamo (*Populus deltoides* Batl. ex Marsh.) é uma espécie florestal cultivada mundialmente, tendo em vista à alta qualidade da sua madeira. Na região Sul do Brasil, os plantios desta cultura estão localizados no Vale do Rio Iguaçu (Porto União (SC), Paula Freitas e União da Vitória (PR)) (SANTOS et al., 2010), sendo a totalidade de produção destinada ao abastecimento da indústria fosforeira.

Os clones de álamo são extremamente exigentes em tratos culturais e fitossanitários (MAY DE MIO; AMORIM, 2000), o que encarece os custos de manutenção das florestas plantadas. As principais doenças desta cultura são a ferrugem (*Melampsora medusae* Thuem.) (MAY DE MIO; RUARO, 2008; SANTOS; MACHADO, 2010) e a septoriose (*Septoria musiva* Peck.) (SANTOS et al., 2006). Contudo, desde 2012 tem-se constatado o surgimento de plantas mortas em plantios comerciais no estado do Paraná, causadas pelo fitopatógeno *Rosellinia bunodes* (SANTOS et al., 2015).

Os fungos fitopatogênicos do gênero *Rosellinia* sp. são responsáveis por prejuízos consideráveis em muitas espécies cultivadas (ARANZAZU, 1992). Sobretudo, em espécies perenes arbóreas (GOVINDARAJAN, 1988), como é o caso do cacauzeiro, do cafeeiro e da seringueira (SIVANESAN; HOLLIDAY, 1972). Os principais sintomas da roseliniose (*R. bunodes*) em álamo são o amarelecimento e a murcha das folhas, o secamento de ramos e a morte prematura das plantas (SANTOS et al., 2015). Isto decorrerá em consequência do comprometimento de todo o sistema radicular, pela colonização do fungo nessas áreas, o que reduz e/ou impede o transporte de seiva para a parte aérea.

A fácil disseminação, a ampla gama de hospedeiros e o pouco conhecimento sobre as características intrínsecas ao patógeno, fazem desta doença uma ameaça aos cultivos de álamo, em virtude da ausência de produtos registrados para esta cultura no Brasil. A utilização de técnicas de controle cultural, como a erradicação de plantas doentes e a remoção de resíduos lenhosos em decomposição, torna-se a única opção de controle à esta doença, porém, este método não oferece eficiência na redução total do potencial de inóculo de *R. bunodes* no solo.

Na busca de um método eficaz de controle, o emprego de técnicas alternativas como o controle biológico, atende às necessidades do sistema. Diante disso, atenção especial vem sendo dada a essa linha de pesquisa, em que microrganismos são testados como potenciais agentes de biocontrole para as doenças de plantas (PUNJA; UTKHEDE, 2003). O fungo

*Trichoderma* spp., um dos agentes de biocontrole mais pesquisados no Brasil, apresenta aptidão para ser utilizado em larga escala (SAITO et al., 2009). Possui qualidades desejáveis, como sua versatilidade de comportamento, além de estimular processos de parasitismo, antibiose e competição (KUBICEK, 1992).

Face ao exposto, objetivou-se com este capítulo avaliar isolados de *Trichoderma* spp. com capacidade antagonica de controle *in vitro* e *in vivo* de *R.bunodes* em mudas de álamo.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 TESTES *IN VITRO*

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Patologia Florestal da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Florestas), localizada no município de Colombo (PR), no período de abril a setembro de 2014.

Os isolados de *R. bunodes* e *Trichoderma* spp. foram obtidos na micoteca do Laboratório de Patologia Florestal da Embrapa Florestas. A procedência dos 30 isolados do fungo antagonista *Trichoderma* spp. utilizados neste trabalho estão expressos na Tabela 1. Os testes de antagonismo em confrontação direta, liberação de compostos voláteis e não voláteis foram realizados entre 30 isolados de *Trichoderma* spp. e o isolado R2 de *R. bunodes*. A escolha do isolado R2 de *R. bunodes* deve-se ao fato de ter sido o isolado mais agressivo em ensaios executados previamente (Cap. 1).

TABELA 1 - PROCEDÊNCIA DOS ISOLADOS DE *Trichoderma* spp. COLOMBO (PR), 2014.

ISOLADOS	HOSPEDEIRO	PARTE DA PLANTA
TRIC 100	ÁLAMO	RAIZ
TRIC 103	PUPUNHA	RAIZ
TRIC 104	PUPUNHA	RAIZ
TRIC 105	PUPUNHA	RAIZ
TRIC 106	PUPUNHA	COLO
TRIC 108	PUPUNHA	RAIZ
TRIC 109	PUPUNHA	RAIZ
TRIC 111	PUPUNHA	RAIZ
TRIC 112	PUPUNHA	SEMENTE
TRIC 113	PUPUNHA	RAIZ
TRIC 114	PUPUNHA	RAIZ
TRIC 115	PUPUNHA	RAIZ
TRIC 116	PUPUNHA	RAIZ
TRIC 118	PUPUNHA	RAIZ
TRIC 119	PUPUNHA	RAIZ
AR	ARAUCÁRIA	RAIZ
B1R1	PINUS	RAIZ
B2R1	PINUS	RAIZ
B2R2	PINUS	RAIZ
BR1	PINUS	RAIZ
BR2	PINUS	RAIZ
LPF8	PINUS	RAIZ
LPFE 3	PINUS	RAIZ
PR3	PINUS	RAIZ
SP4	ARAUCÁRIA	RAIZ
TR0506	PINUS	RAIZ
TRB1	PINUS	RAIZ
TRB2	PINUS	RAIZ
TRCO	COCO	FRUTO
TRE	PINUS	SEMENTE

FONTE: O autor (2013)

#### 1.1.1 Teste de antagonismo em confrontação direta: *Trichoderma* spp. x *Rosellinia bunodes*

Os isolados de ambos os fungos foram repicados para placas de Petri com meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA) e incubados em câmara de crescimento do tipo BOD à temperatura de 24 °C. O isolado R2 de *R. bunodes* permaneceu no escuro por 10 dias. Os isolados de *Trichoderma* spp. foram crescidos em fotoperíodo de 12 horas por 5 dias.

Discos de 5 mm com crescimento micelial ativo do isolado R2 de *R. bunodes* foram transferidos para as placas de Petri, quatro dias antes que os isolados de *Trichoderma* spp., devido a diferença na velocidade de crescimento micelial do patógeno em relação ao antagonista. Os fungos foram dispostos de maneira oposta nas placas, ambos mantendo aproximadamente 2,0 cm de distância das extremidades da placa. A testemunha consistiu unicamente na deposição de discos do isolados R2 de *R. bunodes* arranjadas de forma oposta.

Após o pareamento, as placas foram mantidas em incubadora tipo BOD em temperatura de 24 °C com fotoperíodo de 12 horas por 9 dias. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, distribuídos em 31 tratamentos (30 isolados de *Trichoderma* spp. mais a testemunha) com três repetições, cada repetição foi composta por uma placa de Petri.

#### 1.1.2 Inibição do crescimento micelial de *Rosellinia bunodes* pelo método de liberação de compostos voláteis por *Trichoderma* spp.

Baseado no método descrito por Mariano (1993), placas de Petri contendo o meio BDA receberam discos de 5 mm de diâmetro do fitopatógeno e do antagonista, em placas separadas. Após vinte e quatro horas, ambas as placas foram sobrepostas e unidas por filme PVC para impedir o escape de compostos voláteis. A testemunha consistiu somente na deposição de discos de micélio do patógeno.

A incubação ocorreu em câmara de crescimento tipo BOD a 24 °C, por sete dias. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, distribuídos em 31 tratamentos (30 isolados de *Trichoderma* spp. mais a testemunha) com três repetições, onde cada repetição foi composta por uma placa de Petri.

#### 1.1.3 Inibição do crescimento micelial de *Rosellinia bunodes* pelo método de liberação de compostos não voláteis por *Trichoderma* spp.

Para a constatação de resposta da produção de metabólitos não voláteis pelo fungo antagonista *Trichoderma* spp. foi utilizado o método descrito por MICHEREFF et al. (1993)

que consiste na cobertura do meio de cultura com papel celofane esterilizado. Por ser semipermeável, o papel celofane permite a nutrição e o crescimento do agente de biocontrole, além de promover a difusão de metabólitos (ETHUR, 2002).

No centro de cada placa de Petri coberto com papel celofane, foi inserido um disco de 5 mm de diâmetro contendo o crescimento dos 30 isolados do fungo antagonista. As placas foram incubadas em câmara de crescimento por 72 horas, a 24 °C com 12 horas de fotoperíodo. Em seguida, o papel celofane com as culturas aderentes de *Trichoderma* spp. foram retirados das placas. Depositou-se em seguida, um disco de micélio do fitopatógeno com crescimento ativo diretamente no meio de cultura. Novamente, procedeu-se a incubação das placas por sete dias em câmara de crescimento por 72 horas, a 24 °C com 12 horas de fotoperíodo. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, distribuídos em 31 tratamentos (30 isolados de *Trichoderma* spp. mais a testemunha) com três repetições, onde cada repetição foi representada por uma placa de Petri. O tratamento testemunha não recebeu discos do fungo antagonista.

#### 1.1.4 Avaliações

A capacidade antagônica dos isolados de *Trichoderma* spp. foi avaliada ao sétimo (teste de compostos voláteis), nono (teste de confrontação direta) e décimo (teste de compostos não voláteis) dias após a instalação dos experimentos. As avaliações consistiram na mensuração de duas medidas diametralmente opostas da colônia do fitopatógeno, com o auxílio de paquímetro digital. A partir da média das duas medidas, calculou-se a percentagem de inibição do crescimento do patógeno através da fórmula proposta por Edginton et al. (1971):

$$(PI\%) = (Dc - Dt / Dc) \times 100$$

Onde:

- PI é a porcentagem de inibição promovida pelo antagonista em relação ao patógeno;
- Dc é o diâmetro médio da colônia do patógeno na testemunha;
- Dt é o diâmetro médio da colônia do patógeno nos tratamentos testados.

A homogeneidade da variância dos dados foi verificada pelo teste de Bartlett e a normalidade do erro pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de

probabilidade, utilizando o software ASSISTAT 7.7 beta (SILVA; AZEVEDO, 2006).

## 2.2 TESTES *IN VIVO*

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Patologia Florestal e na casa de vegetação da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Florestas), localizada no município de Colombo (PR), no período de setembro de 2014 a janeiro de 2015.

### 2.2.1 Efeito de diferentes épocas de plantio de mudas de álamo em substrato infestado por *Rosellinia bunodes* e *Trichoderma* spp.

Para este teste foram utilizados o isolado AR de *Trichoderma* sp. proveniente de raízes de araucária, pré-selecionado em testes *in vitro* e o isolado R2 de *R. bunodes*.

Em frascos de vidro transparente (500 mL, 14,5 cm de altura e 5 mm de diâmetro) foram acondicionadas 80 g de grãos de sorgo com adição de 40 mL de água destilada. Esse material foi autoclavado a 120 °C por 30 minutos. Em seguida, em cada frasco foram adicionados 7 discos com 8 mm de diâmetro de meio de cultura BDA com crescimento micelial ativo do isolado R2 de *R. bunodes*. Este material foi incubado a 24 °C no escuro por 17 dias. Para o isolado AR de *Trichoderma* sp. foi executado o mesmo procedimento anterior, modificando-se somente o tempo de incubação para 7 dias. Diariamente procedeu-se a agitação manual dos frascos para melhor distribuição e uniformização do crescimento fúngico nos grãos de sorgo.

Transcorrido o tempo de incubação, realizou-se a mistura com o substrato comercial na proporção de 1 kg de substrato para 32 g de grãos de sorgo colonizadas com o isolado R2 de *R. bunodes* (SANTOS, 2014, informação verbal<sup>3</sup>). O isolado AR de *Trichoderma* spp. foi adicionado ao substrato na mesma proporção. Em cada um dos 30 vasos plásticos (capacidade de 700 g) foi transplantada 1 muda de álamo com seis meses de idade.

---

<sup>3</sup> Entrevista concedida pelo engenheiro agrônomo Álvaro Figueredo dos Santos, da Embrapa-Florestas, Colombo (PR), à engenheira agrônoma Heloisa Thomazi, estudante de mestrado, bolsista CAPES, em 20.11.2013.

A determinação da concentração de conídios (média de cinco repetições) foi efetuada mediante a pesagem de 1 g de grãos de sorgo colonizadas com o isolado AR de *Trichoderma*, diluídos em 10 mL de água deionizada esterilizada. Uma alíquota de 1 mL da suspensão foi adicionada à Câmara de Neubauer, obtendo-se a concentração de  $7 \times 10^6$  conídios de *Trichoderma* sp/g. A concentração final obtida foi de  $2,24 \times 10^8$  conídios de *Trichoderma*/32g de grãos de sorgo colonizadas com o antagonista.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com 10 repetições, cada repetição foi composta por uma muda. Os tratamentos consistiram de diferentes datas de plantio, sendo dispostos da seguinte maneira: Testemunha: mudas plantadas em substrato contendo somente o isolado R2 de *R. bunodes*; Tratamento 1: mudas plantadas no mesmo dia da adição do isolado R2 de *R. bunodes* e do isolado AR de *Trichoderma* sp. ao substrato; Tratamento 2: mudas plantadas 7 dias após a adição do isolado R2 de *R. bunodes* e do isolado AR de *Trichoderma* sp. ao substrato; Tratamento 3: mudas plantadas 14 dias após a adição do isolado R2 de *R. bunodes* e do isolado AR de *Trichoderma* sp. ao substrato, totalizando 4 tratamentos. Durante quatro semanas após a data de cada plantio, foi realizada a avaliação semanal da incidência de plantas sintomáticas em cada tratamento. A partir dos dados de incidência, calculou-se a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) (SHANER; FINNEY, 1977) baseado na fórmula:  $AACPD = \sum (y_i + y_{i+1}) / 2 * (t_{i+1} - t_i)$ , onde  $i$  = número de avaliações;  $y$  = incidência de Roseliniose;  $t$  = tempo (dias).

A homogeneidade da variância dos dados foi verificada pelo teste de Bartlett e a normalidade do erro pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Os valores de AACPD de cada tratamento aos 35 dias foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, com a utilização do programa ASSISTAT, versão 7.7 beta (SILVA; AZEVEDO, 2006).

### 2.2.2 Biocontrole *in vivo* de *Rosellinia bunodes* em mudas de álamo

Para este teste foram utilizados o isolado R2 de *R. bunodes* e os isolados AR, TRICH 104 e TRE de *Trichoderma* spp., selecionados a partir do melhor desempenho em testes *in vitro*.

Em frascos de vidro transparente de 500 mL (14,5 cm de altura e 5 mm de diâmetro) foram acondicionadas 80 g de grãos de sorgo com adição de 40 mL de água destilada. Esse material foi autoclavado a 120 °C por 30 minutos. Em seguida, em cada frasco foram adicionados 7 discos com 8 mm de diâmetro de meio de cultura BDA com crescimento micelial ativo do isolado R2 de *R. bunodes*. Este material foi incubado a 24 °C no escuro por 17 dias. Para os isolados AR, TRICH 104 e TRE de *Trichoderma* spp. foi executado o mesmo procedimento anterior, modificando-se somente o tempo de incubação para 7 dias. Diariamente procedeu-se a agitação manual dos frascos para melhor distribuição e uniformização do crescimento fúngico nos grãos de sorgo.

Transcorrido o tempo de incubação, foi realizada a mistura com o substrato comercial na proporção de 1 kg de substrato para 32 g de grãos de sorgo colonizadas com *R. bunodes* (SANTOS, 2014, informação verbal<sup>4</sup>). Os isolados de *Trichoderma* spp. foram adicionados ao substrato na mesma proporção. A mistura final foi acondicionada em 30 vasos plásticos (capacidade de 700 g) pelo período de 14 dias, obedecendo o tempo ideal estabelecido em experimento prévio. Posteriormente, uma muda de álamo foi transplantada em cada vaso plástico.

A determinação da concentração de conídios (média de cinco repetições) foi efetuada mediante a pesagem de 1 g de grãos de sorgo colonizadas com o isolado AR de *Trichoderma*, diluídos em 10 mL de água deionizada esterilizada. Uma alíquota de 1 mL da solução foi adicionada à Câmara de Neubauer, obtendo-se a concentração de  $7 \times 10^6$  conídios de *Trichoderma*/g. A concentração final obtida foi de  $2,24 \times 10^8$  conídios de *Trichoderma*/32g de grãos de sorgo colonizadas com o antagonista.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com 10 repetições, cada repetição foi composta por uma muda. Os tratamentos foram dispostos da seguinte maneira: Testemunha: plantio das mudas em substrato contendo apenas o isolado R2 de *R. bunodes*; Tratamento 1: plantio das mudas em substrato contendo o isolado R2 de *R. bunodes* e o isolado AR de *Trichoderma*; Tratamento 2: plantio das mudas em substrato contendo o isolado R2 de *R. bunodes* e o isolado TRICH 104 de *Trichoderma*; Tratamento 3: plantio das mudas em substrato contendo o isolado R2 de *R. bunodes* e o isolado TRE de *Trichoderma*, totalizando quatro tratamentos.

---

<sup>4</sup> Entrevista concedida pelo engenheiro agrônomo Álvaro Figueredo dos Santos, da Embrapa-Florestas, Colombo (PR), à engenheira agrônoma Heloisa Thomazi, estudante de mestrado, bolsista CAPES, em 20.11.2013.

As avaliações de incidência foram realizadas aos 6, 13, 20, 27, 35 dias após a data de plantio. A partir dos dados de incidência, calculou-se a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) (SHANER; FINNEY, 1977) baseado na fórmula:  $AACPD = \sum (y_i + y_{i+1}) / 2 * (t_{i+1} - t_i)$ , onde  $i$  = número de avaliações;  $y$  = incidência de Roseliniose;  $t$  = tempo (dias).

As avaliações de altura de plantas e diâmetro de caule foram realizadas na data de implantação e 35 dias após a data de plantio, com auxílio de régua milimetrada e de paquímetro digital, respectivamente. Ao final do experimento, realizou-se a análise destrutiva de duas mudas por tratamento. Esta avaliação consistiu no arranquio e corte longitudinal do colo das mudas para a verificação de sinais e sintomas no interior do caule. Através de fotografias, a severidade real foi mensurada a partir do software Quant (VALE et al., 2003).

A homogeneidade da variância dos dados foi verificada pelo teste de Bartlett e a normalidade do erro pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Os valores de AACPD de cada tratamento aos 35 dias foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, com a utilização do programa ASSISTAT, versão 7.7 beta (SILVA e AZEVEDO, 2006).

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 TESTES *IN VITRO*

##### 3.1.1 Teste de antagonismo em confrontação direta: *Rosellinia bunodes* x *Trichoderma* spp.

O maior crescimento micelial de *R. bunodes* (83,50 mm) e a menor porcentagem de inibição (0%) ocorreram na testemunha, diferindo estatisticamente dos demais pelo teste de Tukey (5% de probabilidade), exceto para os isolados TRICH 118 e TR0506 que apresentaram a menor eficiência de controle, demonstrando uma baixa capacidade antagônica, com valores de crescimento micelial de 67,78 mm e 74,96 mm e porcentagem de inibição de 18,82 % e 10,22 %, respectivamente (Tabela 2).

De acordo com a ANOVA, verificou-se que todos os tratamentos testados foram estatisticamente significativos ao nível de 1 % de probabilidade ( $p < 0,01$ ) (Tabela 3).

TABELA 2 - CRESCIMENTO MICELIAL (mm) E PERCENTAGEM DE INIBIÇÃO (%) DE *Rosellinia bunodes* PELO MÉTODO DE CULTURAS PAREADAS com *Trichoderma*. COLOMBO (PR), 2014.

<b>PAREAMENTO</b> <i>Rosellinia bunodes</i> <i>x Trichoderma</i>	<b>DIÂMETRO MÉDIO</b> <b>DAS COLÔNIAS DE</b> <i>Rosellinia bunodes</i> <b>(mm)</b>	<b>INIBIÇÃO PELO</b> <b>ANTAGONISTA</b> <b>(%)</b>
R2 x 100	55,87*c	33,09 a
R2 x 103	55,69 c	33,30 a
R2 x 104	56,69 c	32,10 a
R2 x 105	64,07 bc	23,26 ab
R2 x 106	61,15 bc	26,77 ab
R2 x 108	55,36 c	33,69 a
R2 x 109	58,62 c	29,79 a
R2 x 111	64,34 bc	22,94 ab
R2 x 112	62,80 bc	24,79 ab
R2 x 113	63,34 bc	24,13 ab
R2 x 114	63,29 bc	24,20 ab
R2 x 115	62,14 bc	25,58 ab
R2 x 116	61,15 bc	26,76 ab
R2 x 118	67,78 abc	18,82 abc
R2 x 119	62,99 bc	24,56 ab
R2 x AR	63,09 bc	24,44 ab
R2 x B1R1	55,39 c	33,66 a
R2 x B2R1	60,81 bc	27,16 ab
R2 x B2R2	59,06 bc	29,26 ab
R2 x BR1	58,47 c	29,98 a
R2 x BR2	64,43 bc	22,83 ab
R2 x LPF8	59,42 bc	28,83 ab
R2 x LPFE3	64,15 bc	23,17 ab
R2 x PR3	59,21 bc	29,08 ab
R2 x SP4	59,71 bc	28,49 ab
R2 x TR0506	74,96 ab	10,22 bc
R2 x TRB1	62,23 bc	25,47 ab
R2 x TRB2	57,00 c	31,73 a
R2 x TRCO	54,66 c	34,54 a
R2 x TRE	59,51 bc	28,73 ab
R2 x R2	83,50 a	0,00 c
<b>CV (%)</b>	<b>8,10</b>	<b>22,72</b>

\*As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. CV: Coeficiente de variação

FONTE: O autor (2014)

TABELA 3 - ANÁLISE DA VARIÂNCIA (ANOVA) PARA AS VARIÁVEIS CRESCIMENTO MICELIAL (mm) E PERCENTAGEM DE INIBIÇÃO (%) DE *R. bunodes* PELO MÉTODO DE CULTURAS PAREADAS com *Trichoderma*. COLOMBO (PR), 2014.

<b>CRESCIMENTO MICELIAL (mm) DE <i>Rosellinia bunodes</i></b>				
<b>FV</b>	<b>GL</b>	<b>SQ</b>	<b>QM</b>	<b>F</b>
Tratamentos	30	3059,58	101,98	4,094**
Resíduo	62	1544,27	24,90	
Total	92	4603,85		
<b>PERCENTAGEM DE INIBIÇÃO (%) DE <i>Rosellinia bunodes</i></b>				
<b>FV</b>	<b>GL</b>	<b>SQ</b>	<b>QM</b>	<b>F</b>
Tratamentos	30	4887,78	146,25	4,134**
Resíduo	62	2193,5	35,37	
Total	92	6581,2		

\*\*significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < 0,01$ ); \*significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $0,01 \leq p < 0,05$ ); ns não significativo ( $p > 0,05$ ); FV: Fonte de variação. GL: Graus de liberdade. SQ: Soma dos quadrados. QM: Quadrado médio. F: Estatística F calculada.

FONTE: O autor (2014)

Todos os demais isolados utilizados neste ensaio mostraram-se promissores no biocontrole de *R. bunodes*, expressando uma redução no desenvolvimento do fitopatógeno. Os isolados TRICH 100, TRICH 103, TRICH 104, TRICH 108, TRICH 109, B1R1, BR1, TRB2, TRCO de *Trichoderma* sp. receberam destaque devido à evidência da capacidade competitiva apresentada na presença de *R. bunodes* (Figura 1). A porcentagem média de inibição destes isolados ficou em torno de 33%, sendo considerado um grau de supressão satisfatório quando comparado a outros trabalhos (RUANO-ROSA et al., 2010). Porém, estes isolados não diferiram estatisticamente dos isolados TRICH 105, TRICH 106, TRICH 111, TRICH 112, TRICH 113, TRICH 114, TRICH 115, TRICH 116, TRICH 119, AR, B2R1, B2R2, BR2, LPF8, LPFE3, PR3, SP4, TRB1 e TRE.

### 3.1.2 Inibição do crescimento micelial de *R. bunodes* pelo método de liberação de compostos voláteis por *Trichoderma* spp.

O efeito da produção de compostos voláteis do fungo *Trichoderma* foi significativo na redução do crescimento micelial e na percentagem de inibição do isolado R2 de *R. bunodes*, ao nível de 1% de probabilidade (Tabela 4).

A testemunha apresentou o maior crescimento micelial (Figura 2) do fitopatógeno em placa de Petri, não diferindo estatisticamente dos isolados TRICH 109, TRICH 116, TRICH 119, TR0506 e TRB2 de *Trichoderma* (Tabela 5), estes últimos, considerados os menos indicados para a supressão de *R. bunodes*, levando-se em consideração a capacidade individual de liberação de compostos antifúngicos.

A maioria dos isolados de *Trichoderma* spp. utilizados neste trabalho inibiram o crescimento do patógeno. Os isolados TRICH 105, TRICH 106, TRICH 111, TRICH 112, TRICH 113, TRICH 114, TRICH 115, AR, B1R1, B2R1, B2R2, TRCO e TRE, quando confrontados com o isolado de R2 de *R. bunodes*, mostraram-se eficientes no controle deste fungo, atingindo valores médios de inibição próximos à 72%. Os resultados deste ensaio confirmam que a produção de compostos voláteis pelo fungo *Trichoderma* foi eficiente no controle *in vitro* de *R. bunodes*.

TABELA 4. ANÁLISE DA VARIÂNCIA (ANOVA) PARA AS VARIÁVEIS CRESCIMENTO MICELIAL (MM) E PERCENTAGEM DE INIBIÇÃO (%) DE *Rosellinia bunodes* PELA LIBERAÇÃO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS DE *Trichoderma*. COLOMBO (PR), 2014.

<b>CRESCIMENTO MICELIAL (mm) de <i>Rosellinia bunodes</i></b>				
<b>FV</b>	<b>GL</b>	<b>SQ</b>	<b>QM</b>	<b>F</b>
Tratamentos	30	28827,58	960,91	7,889**
Resíduo	62	7551,71	121,80	
Total	92	36379,30		
<b>PERCENTAGEM DE INIBIÇÃO (%) DE <i>Rosellinia bunodes</i></b>				
<b>FV</b>	<b>GL</b>	<b>SQ</b>	<b>QM</b>	<b>F</b>
Tratamentos	30	35589,6	1186,32	7,889**
Resíduo	62	9323,10	150,37	
Total	92	44912,71		

\*\*significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < 0,01$ );\*significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $0,01 \leq p < 0,05$ ); ns não significativo ( $p > 0,05$ ); FV: Fonte de variação. GL: Graus de liberdade. SQ: Soma dos quadrados. QM: Quadrado médio. F: Estatística F calculada.

FONTE: O autor (2014)

TABELA 5 - CRESCIMENTO MICELIAL (MM) E PERCENTAGEM DE INIBIÇÃO (%) DE *Rosellinia bunodes* PELA LIBERAÇÃO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS DE *Trichoderma*. COLOMBO (PR), 2014.

<i>Rosellinia bunodes</i> x <i>Trichoderma</i>	DIÂMETRO MÉDIO DAS COLÔNIAS DE <i>Rosellinia bunodes</i> (mm)	INIBIÇÃO POR COMPOSTOS VOLÁTEIS (%)
R2 x 100	40,96* bcdefg	54,48 abcdef
R2 x 103	35,21 cdefg	60,87 abcde
R2 x 104	36,54 cdefg	59,40 abcde
R2 x 105	23,93 fg	73,40 ab
R2 x 106	30,21 efg	66,42 abc
R2 x 108	43,03 bcdefg	52,18 abcdef
R2 x 109	64,68 abcde	28,12 cdefg
R2 x 111	27,10 fg	69,88 ab
R2 x 112	24,30 fg	73,00 ab
R2 x 113	29,96 efg	66,70 abc
R2 x 114	29,06 fg	67,70 ab
R2 x 115	20,99 fg	76,66 ab
R2 x 116	76,02 ab	15,52 fg
R2 x 118	48,11 bcdefg	46,53 abcdef
R2 x 119	55,75 abcdef	38,05 bcdefg
R2 x AR	28,18 fg	68,68 ab
R2 x B1R1	27,72 fg	69,19 ab
R2 x B2R1	22,83 fg	74,62 ab
R2 x B2R2	24,50 fg	72,77 ab
R2 x BR1	31,96 defg	64,48 abcd
R2 x BR2	31,68 defg	64,79 abcd
R2 x LPF8	29,24 efg	67,50 abc
R2 x LPFE3	35,66 cdefg	60,37 abcde
R2 x PR3	32,67 defg	63,69 abcd
R2 x SP4	33,03 defg	63,30 abcd
R2 x TR0506	66,31 abcd	26,32 defg
R2 x TRB1	33,06 defg	63,26 abcd
R2 x TRB2	69,39 abc	22,89 efg
R2 x TRCO	18,89 g	79,00 a
R2 x TRE	21,07 fg	76,57 ab
R2 x R2	90,00 a	0,00 g
<b>CV (%)</b>	28,94	21,28

\*As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. CV: Coeficiente de variação

FONTE: O autor (2014)

### 3.1.3 Inibição do crescimento micelial de *Rosellinia bunodes* pelo método de liberação de compostos não voláteis por *Trichoderma* spp.

De acordo com a Tabela 6, verifica-se que efeito da produção de compostos não voláteis pelo fungo *Trichoderma* foi significativo ao nível de 1% de probabilidade, o que pode ser comprovado observando-se os valores de crescimento micelial e porcentagem de inibição de *R. bunodes* (Tabela 7 e Figura 3).

Conforme o exposto, os isolados AR, SP4 e TRE obtiveram resultados superiores na porcentagem de inibição do crescimento micelial de *R. bunodes*, com valores de 60,94%, 60,41% e 60,81% respectivamente, não diferindo estatisticamente dos isolados TRICH 103, TRICH 104, TRICH 105, TRICH 108, TRICH 109, TRICH 112, TRICH 113, TRICH 115, TRICH 119, LPF8, PR3 e TRB1. Em contrapartida, os isolados TRICH 111, TRICH 106, TRICH 114, B1R1, BR2, LPFE3, TRB2, TRCO e o tratamento testemunha não diferiram estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey (5% de probabilidade), apresentando porcentagem de inibição nula (0%).

TABELA 6 - ANÁLISE DA VARIÂNCIA (ANOVA) PARA AS VARIÁVEIS CRESCIMENTO MICELIAL (MM) E PORCENTAGEM DE INIBIÇÃO (%) DE *Rosellinia bunodes* PELA LIBERAÇÃO DE COMPOSTOS NÃO VOLÁTEIS DE *Trichoderma*. COLOMBO (PR), 2014.

<b>CRESCIMENTO MICELIAL (mm) DE <i>Rosellinia bunodes</i></b>				
<b>FV</b>	<b>GL</b>	<b>SQ</b>	<b>QM</b>	<b>F</b>
Tratamentos	30	15719,78	523,99	9,874**
Resíduo	62	3290,15	53,06	
Total	92	19009,93		
<b>PERCENTAGEM DE INIBIÇÃO (%) DE <i>Rosellinia bunodes</i></b>				
<b>FV</b>	<b>GL</b>	<b>SQ</b>	<b>QM</b>	<b>F</b>
Tratamentos	30	46391,34	1546,3	10,9**
Resíduo	62	9139,56	147,41	
Total	92	55530,90		

\*\*significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < 0,01$ ); \*significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $0,01 \leq p < 0,05$ ); ns não significativo ( $p > 0,05$ ); FV: Fonte de variação. GL: Graus de liberdade. SQ: Soma dos quadrados. QM: Quadrado médio. F: Estatística F calculada

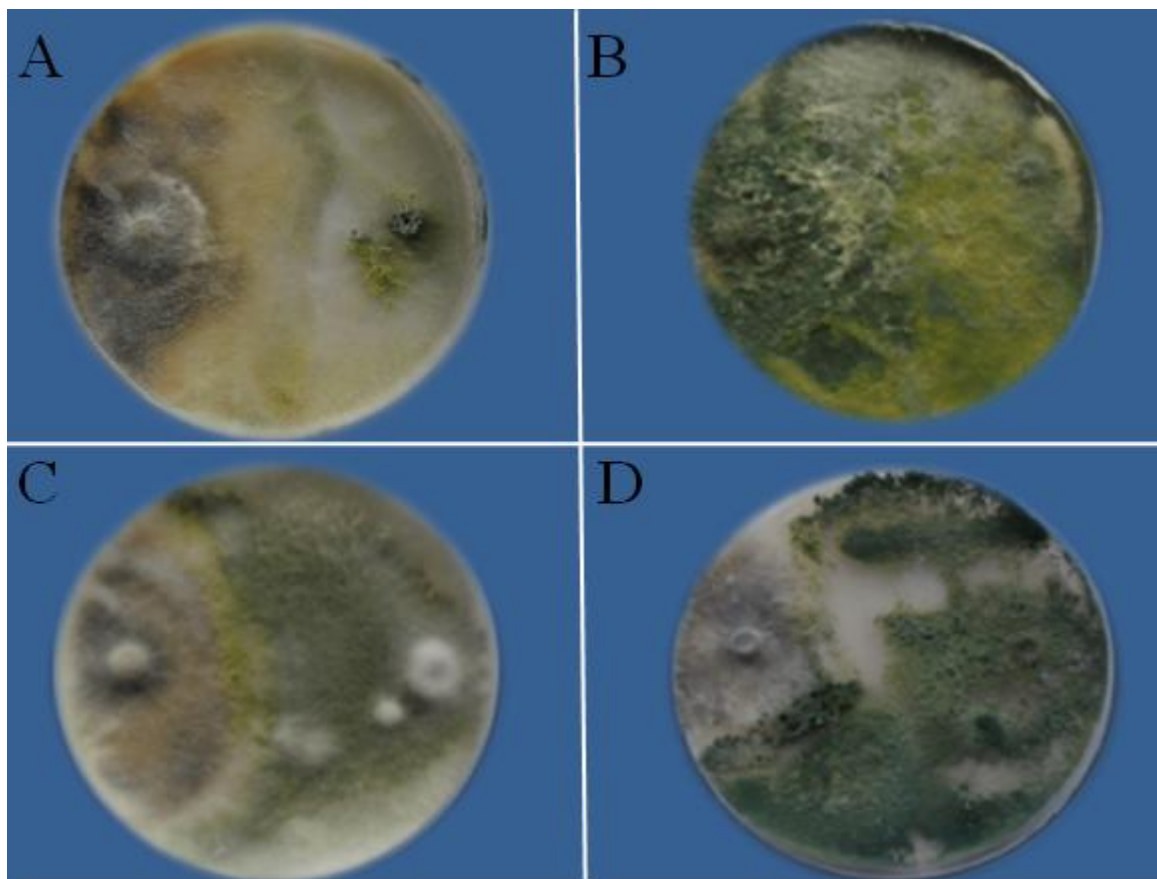
FONTE: O autor (2014)

TABELA 7 - CRESCIMENTO MICELIAL (MM) E PERCENTAGEM DE INIBIÇÃO (%) DE *Rosellinia bunodes* PELA LIBERAÇÃO DE COMPOSTOS NÃO VOLÁTEIS DE *Trichoderma*. COLOMBO (PR), 2014.

<i>Rosellinia bunodes</i> x <i>Trichoderma</i>	DIÂMETRO MÉDIO DAS COLÔNIAS DE <i>Rosellinia . bunodes</i> (mm)	INIBIÇÃO POR COMPOSTOS NÃO VOLÁTEIS (%)
R2 x 100	43,19* abcdefg	15,89 bcde
R2 x 103	23,01 ghi	52,81 ab
R2 x 104	25,25 ghi	48,21 abc
R2 x 105	30,02 defghi	38,44 abcde
R2 x 106	52,10 abcde	0,00 e
R2 x 108	28,77 efghi	41,00 abcd
R2 x 109	25,90 fghi	46,88 abc
R2 x 111	54,44 abc	0,00 e
R2 x 112	25,26 ghi	48,20 abc
R2 x 113	32,48 bcdefghi	33,40 abcde
R2 x 114	57,25 a	0,00 e
R2 x 115	23,70 ghi	51,40 ab
R2 x 116	53,33 abcd	6,04 de
R2 x 118	44,02 abcdefg	9,74 cde
R2 x 119	30,98 cdefghi	36,47 abcde
R2 x AR	19,04 i	60,94 a
R2 x B1R1	51,11 abcde	1,36 e
R2 x B2R1	42,70 abcdefgh	14,26 bcde
R2 x B2R2	46,11 abcdefg	7,08 de
R2 x BR1	57,16 a	6,28 de
R2 x BR2	23,31 fghi	0,00 e
R2 x LPF8	25,31 fghi	48,10 abc
R2 x LPFE3	52,21 abcde	0,00 e
R2 x PR3	37,85 abcdefghi	23,93 abcde
R2 x SP4	19,31 hi	60,41 a
R2 x TR0506	50,60 abcde	9,23 cde
R2 x TRB1	29,91 defghi	38,68 abcde
R2 x TRB2	54,67 ab	0,00 e
R2 x TRCO	54,17 abc	0,00 e
R2 x TRE	19,11 i	60,81 a
R2 x R2	48,77 abcdef	0,00 e
<b>CV (%)</b>	18,76	49,52

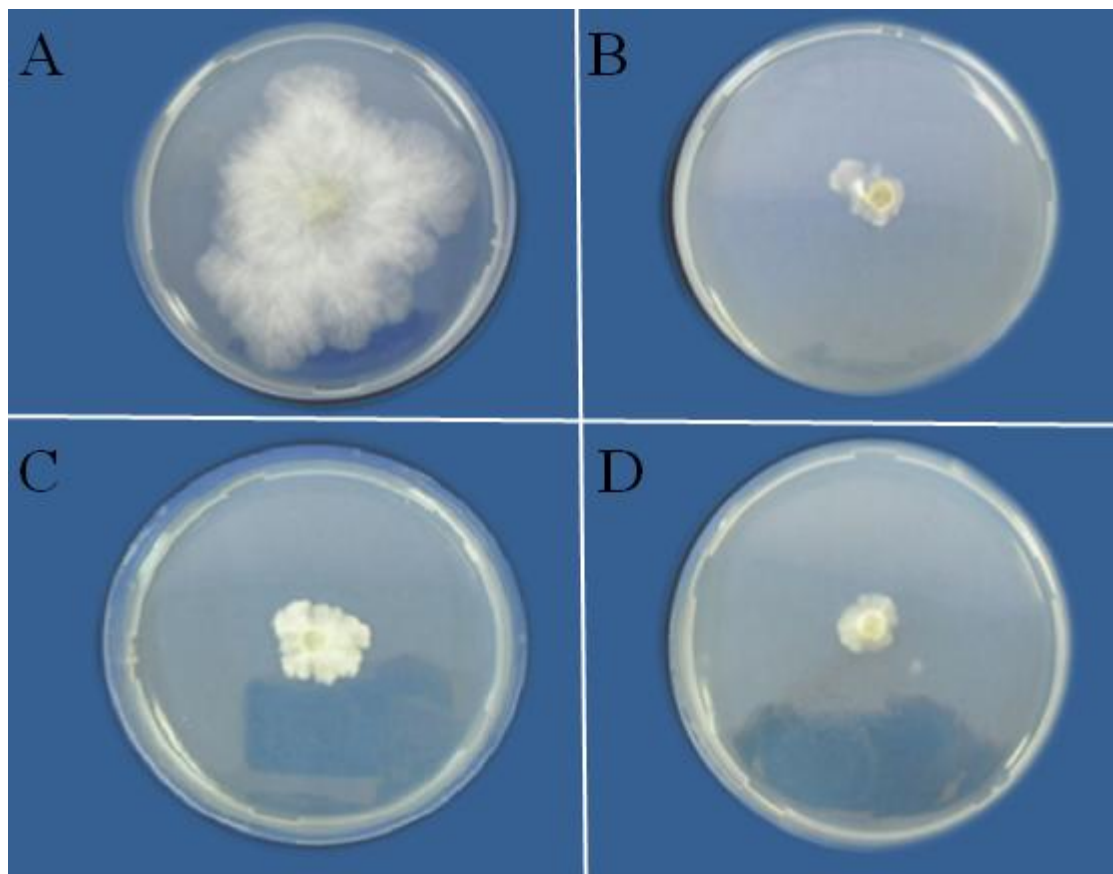
\*As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. CV: Coeficiente de variação

FONTE: O autor (2014)



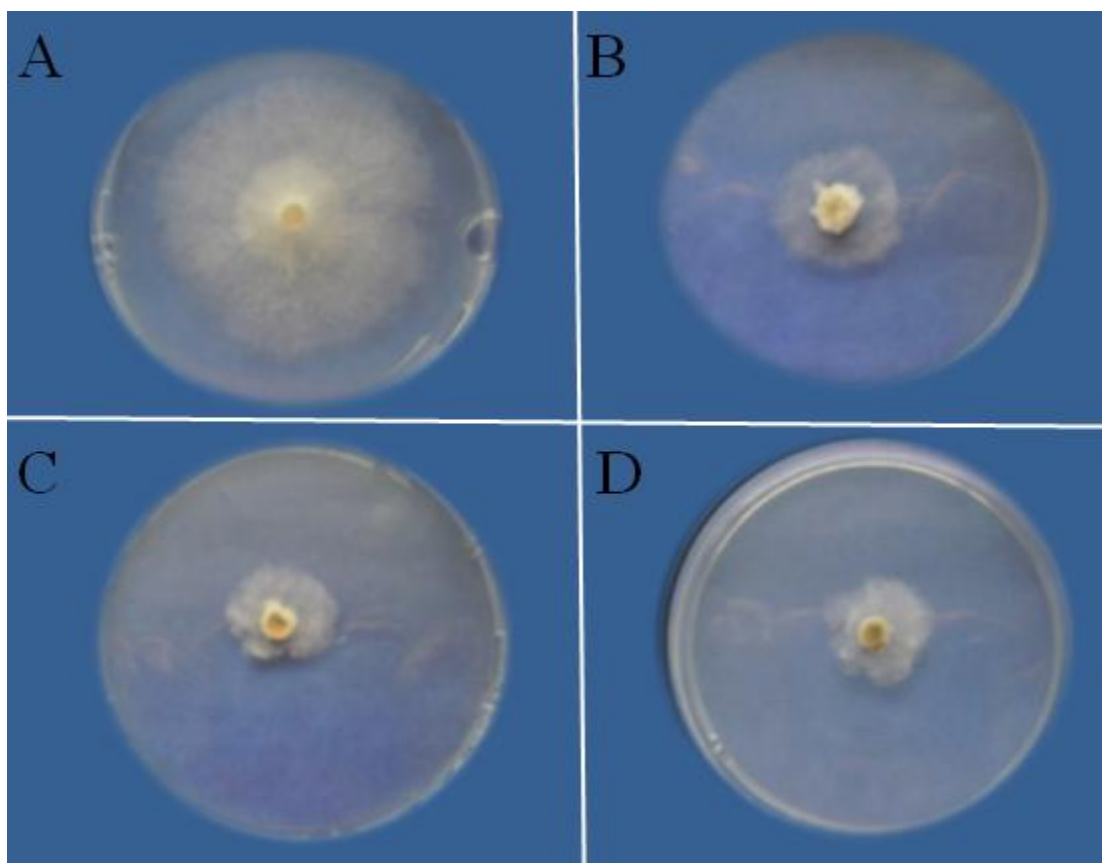
FONTE: O autor (2014)

FIGURA 1 - INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO MICELIAL *IN VITRO* DE *R. bunodes* PELO MÉTODO DE CULTURAS PAREADAS COM *Trichoderma*. A) TRICH 100; B)TRICH 104; C) AR; D)TRE. COLOMBO (PR), 2014.



FONTE: O autor (2014)

FIGURA 2 - INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO MICELIAL *IN VITRO* DE *R. bunodes* PELA LIBERAÇÃO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS DE *Trichoderma*. A) TESTEMUNHA; B) TRICH 104; C) AR; D) TRE. COLOMBO (PR), 2014.



FONTE: O autor (2014)

FIGURA 3 - INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO MICELIAL *IN VITRO* DE *R. bunodes* PELA LIBERAÇÃO DE COMPOSTOS NÃO VOLÁTEIS DE *Trichoderma*. A) TESTEMUNHA; B) TRICH 104; C) AR; D) TRE. COLOMBO (PR), 2014.

## 3.2 TESTES *IN VIVO*

### 3.2.1 Efeito de diferentes épocas de plantio de mudas de álamo em substrato infestado por *Rosellinia bunodes* e *Trichoderma* spp.

Houve efeito significativo na AACPD relativa entre os tratamentos testados (Tabela 8). A testemunha e o tratamento 1 (plantio das mudas no mesmo dia da aplicação dos fungos no substrato) foram estatisticamente iguais, apresentando os maiores valores para AACPD relativa. 88,0 e 74,0, respectivamente (Tabela 9). O tratamento 2 não diferiu estatisticamente dos tratamentos 1 e 3 pelo teste de Tukey (5% de probabilidade), obtendo valor de 42,54. O tratamento 3 foi considerado mais eficiente, pois apresentou menor valor de AACPD relativa (20,0), diferindo estatisticamente dos demais (Tabela 9).

A maior discrepância entre os tratamentos pode ser observada entre os quatorze primeiros dias após a inoculação. Plantas que receberam os tratamentos testemunha e tratamento 1 apresentaram valores elevados de incidência (90% e 60%, respectivamente) (Figura 5) por outro lado, as mudas conduzidas nos tratamentos 2 e 3 não demonstraram sintomas da doença (0% de plantas mortas) para o mesmo dia de avaliação.

TABELA 8 - ANÁLISE DA VARIÂNCIA (ANOVA) PARA A VARIÁVEL ÁREA ABAIXO DA CURVA DE PROGRESSO DA DOENÇA PARA OS SEGUINTE TRATAMENTOS: TESTEMUNHA: MUDAS PLANTADAS EM SUBSTRATO CONTENDO SOMENTE O ISOLADO R2 DE *R. bunodes*; TRATAMENTO 1: MUDAS PLANTADAS NO MESMO DIA DA ADIÇÃO DO ISOLADO R2 DE *R. bunodes* E DO ISOLADO AR DE *Trichoderma* sp. AO SUBSTRATO; TRATAMENTO 2: MUDAS PLANTADAS 7 DIAS APÓS A ADIÇÃO DO ISOLADO R2 DE *R. bunodes* E DO ISOLADO AR DE *Trichoderma* sp. AO SUBSTRATO; TRATAMENTO 3: MUDAS PLANTADAS 14 DIAS APÓS A ADIÇÃO DO ISOLADO R2 DE *R. bunodes* E DO ISOLADO AR DE *Trichoderma* sp. AO SUBSTRATO. COLOMBO (PR), 2014.

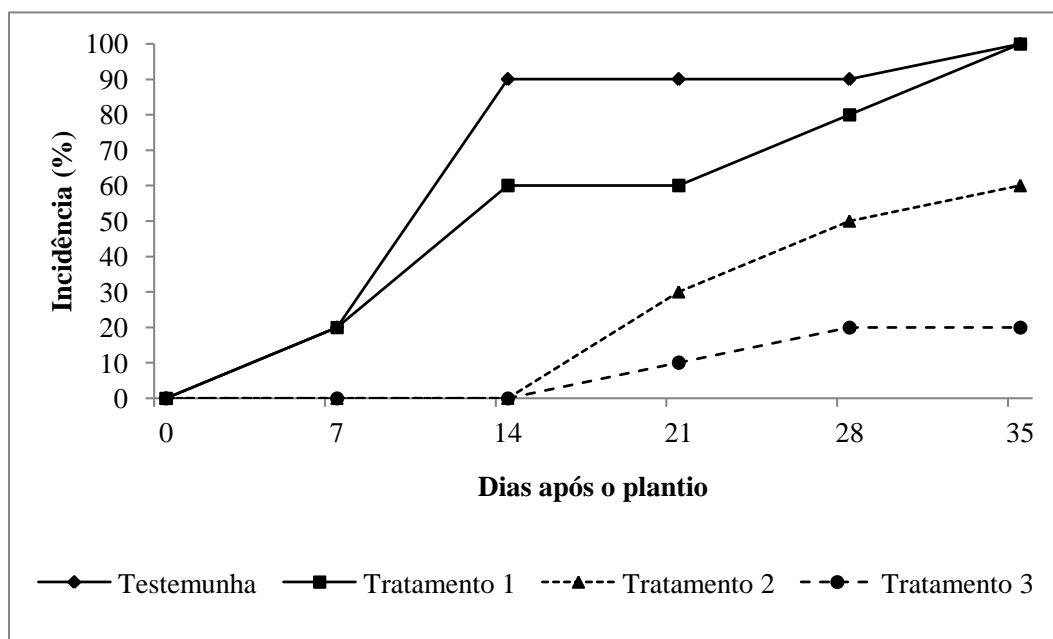
FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	3	28193,21611	9397,73870	7,7570**
Resíduo	36	43614,60284	1211,51675	
Total	39	71807,81895		

\*\*significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < 0,01$ ); \*significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $0,01 \leq p < 0,05$ ); ns não significativo ( $p > 0,05$ ); FV: Fonte de variação. GL: Graus de liberdade. SQ: Soma dos quadrados. QM: Quadrado médio. F: Estatística F calculada  
FONTE: O autor (2014)

TABELA 9 - ÁREA ABAIXO DA CURVA DE PROGRESSO DA DOENÇA RELATIVA (AACPD RELATIVA) PARA OS SEGUINTE TRATAMENTOS: TESTEMUNHA: MUDAS PLANTADAS EM SUBSTRATO CONTENDO SOMENTE O ISOLADO R2 DE *R. bunodes*; TRATAMENTO 1: MUDAS PLANTADAS NO MESMO DIA DA ADIÇÃO DO ISOLADO R2 DE *R. bunodes* E DO ISOLADO AR DE *Trichoderma* sp. AO SUBSTRATO; TRATAMENTO 2: MUDAS PLANTADAS 7 DIAS APÓS A ADIÇÃO DO ISOLADO R2 DE *R. bunodes* E DO ISOLADO AR DE *Trichoderma* sp. AO SUBSTRATO; TRATAMENTO 3: MUDAS PLANTADAS 14 DIAS APÓS A ADIÇÃO DO ISOLADO R2 DE *R. bunodes* E DO ISOLADO AR DE *Trichoderma* sp. AO SUBSTRATO. COLOMBO (PR), 2014.

Tratamentos	AACPD**
Testemunha	88,00* a
T1	74,00 ab
T2	42,54 bc
T3	20,00 c
<b>DMS</b>	56,15
<b>CV(%)</b>	61,98

\*As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. \*\*Área abaixo da curva de progresso da doença. DMS: Diferença mínima significativa; CV: Coeficiente de variação.  
FONTE: O autor (2014)



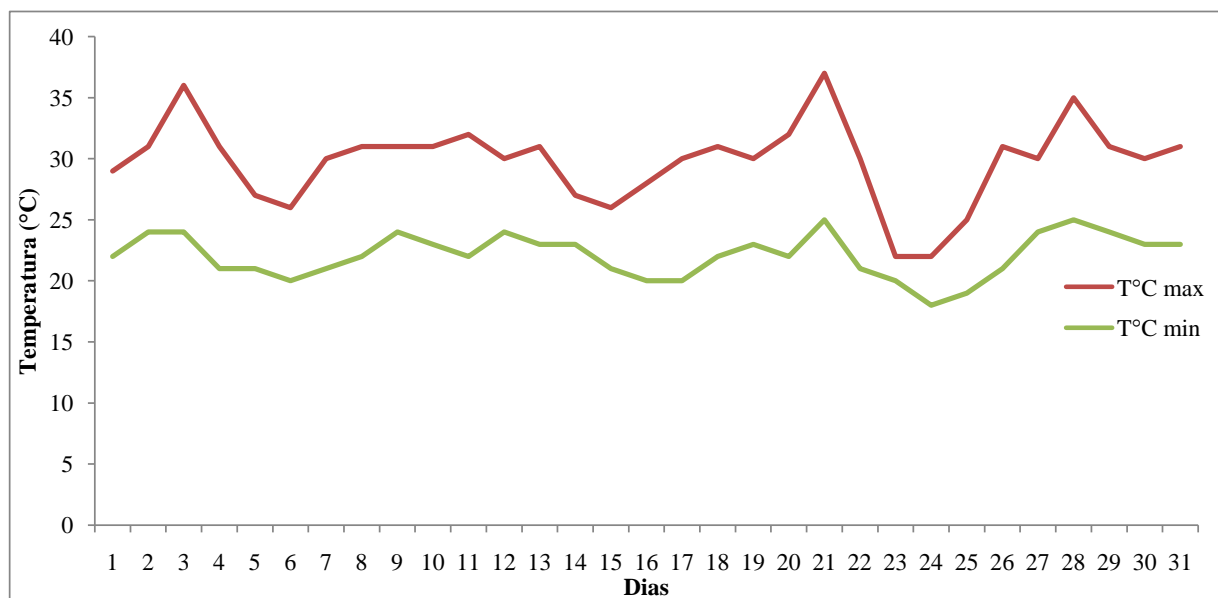
FONTE: O autor (2014)

FIGURA 4 – CURVA DE PROGRESSO DE ROSELINIOSE EM MUDAS DE ÁLAMO MANTIDAS SOB DIFERENTES TRATAMENTOS. COLOMBO (PR), 2014.

### 3.2.2 Biocontrole *in vivo* de *Rosellinia bunodes* em mudas de álamo

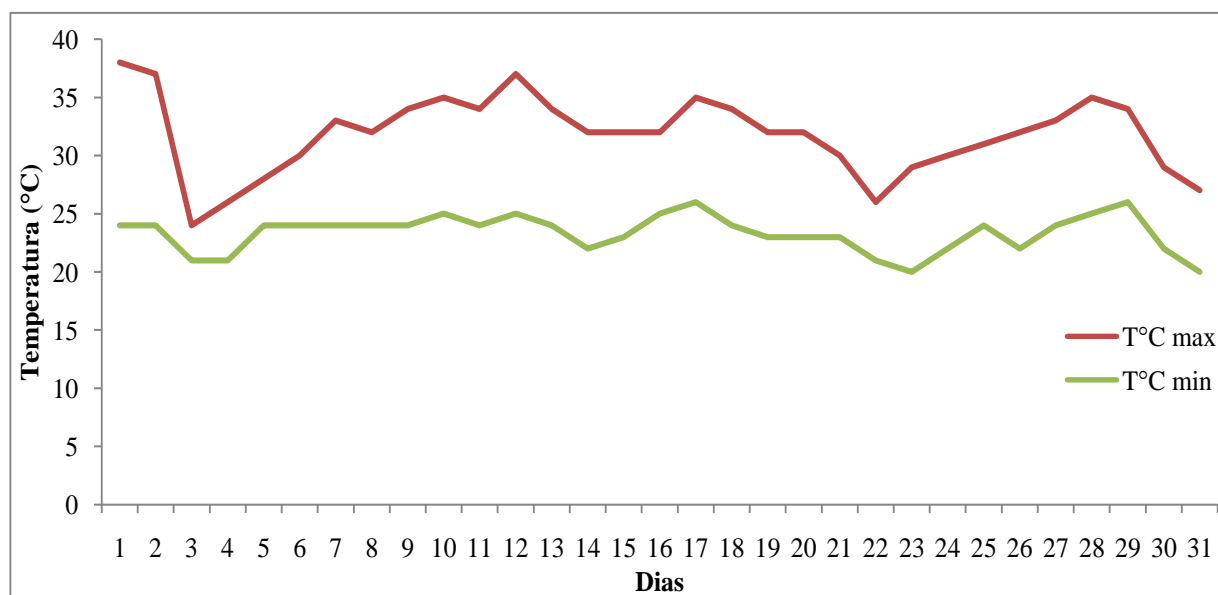
Neste experimento não foi observada a mortalidade de mudas de álamo nos tratamentos testados, incluindo a testemunha. Tal fato pode estar relacionado as máximas temperaturas incidentes nos meses de dezembro de 2014 e janeiro de 2015 (Figuras 5 e 6), período em que o experimento estava sendo conduzido. Temperatura elevadas podem ter afetado negativamente a infecção das plantas.

Como já verificado neste trabalho, ensaios *in vitro* demonstraram crescimento micelial nulo de *R. bunodes* em temperatura de 32 °C e crescimento reduzido em temperatura de 28 °C. De acordo com dados de acompanhamento, a temperatura máxima registrada no interior da casa de vegetação atingiu 42 °C, o que pode ter contribuído para a redução do potencial patogênico de *R. bunodes*.



FONTE: ACCWEATHER (2015)

FIGURA 5 – DADOS METEOROLÓGICOS DE TEMPERATURA (MÁXIMA E MÍNIMA) DIÁRIOS PARA O MUNICÍPIO DE CURITIBA. MÊS DE DEZEMBRO DE 2014. CURITIBA, 2014.



FONTE: ACCWEATHER (2015)

FIGURA 6 – DADOS METEOROLÓGICOS DE TEMPERATURA (MÁXIMA E MÍNIMA) DIÁRIOS PARA O MUNICÍPIO DE CURITIBA. MÊS DE JANEIRO DE 2015. CURITIBA, 2015.

## 4 DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo são importantes, pois evidenciam a supressão do crescimento micelial *in vitro* de *R. bunodes* na presença de isolados de *Trichoderma*. Esta redução do crescimento micelial de *R. bunodes* está ligada a processos promovidos pelo fungo *Trichoderma*, como competição, antibiose e antagonismo direto (BETTIOL, 1991, PERELLO et al., 2003).

Comparando-se os resultados obtidos nas metodologias de controle *in vitro* utilizadas, pode-se atentar que a liberação de compostos voláteis ocasionou a maior percentagem de inibição (próximo à 80%) e o menor crescimento micelial de *R. bunodes*, sendo este o mecanismo mais eficiente encontrado pelo fungo *Trichoderma* sp. para a supressão deste patógeno *in vitro*. Certamente este fato está relacionado à exsudação de metabólitos danosos à sobrevivência deste fitopatógeno (WEIDLING, 1934). Uma alta percentagem inibitória também foi verificada por pesquisadores indianos no controle de *Colletotrichum capsici*, em que se comprovou que metabólitos voláteis oriundos de *Trichoderma harzianum* promoveram uma inibição de 67% no crescimento micelial deste patógeno (AJITH; LAKSHMIDEVI, 2010).

Do mesmo modo, estudos recentes revelam que substâncias antimicrobianas voláteis são efetivas contra numerosos fungos causadores de doenças, como *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*, *Curvularia lunata*, *Bipolaris sorokiniana*, entre outros (XIAO-YAN et al, 2006; SVETLANA et al, 2010). Vey et al. (2001) citam o etileno, o cianeto de hidrogênio, os aldeídos e as cetonas como compostos que desempenham um papel importante no biocontrole de doenças de plantas. Segundo Mangenot e Diem (1979), o gás carbônico também é um dos gases produzidos por espécies de fungos antagonistas, que possui ação tanto bioestimulante, quanto de inibição.

Para o teste de confrontação direta, 28 dos 30 isolados de *Trichoderma* spp. inibiram o crescimento micelial do patógeno, comprovando que o crescimento de *R. bunodes* foi prejudicado devido mecanismos de controle desencadeados pelo fungo antagonista.

Diversos autores constataram respostas inibitórias pela ação de *Trichoderma* spp. no crescimento micelial de diferentes espécies de *Rosellinia* (CASTRO, 1995; ESQUIVEL et al., 1992; FREEMAN et al., 1986; RUIZ; LEGUIZAMON, 1996; SZTEJNBERG et al., 1987). Em pesquisa desenvolvida por Ruano-Rosa et al. (2010), foram identificados 30 isolados de *Trichoderma* spp. que apresentaram níveis elevados de inibição ao crescimento micelial de *R.*

*necatrix* (Rn 400) pelo método de culturas pareadas. O mesmo foi verificado por Ruano-Rosa, Moral-Navarrete e López-Herrera (2003) sendo que sete dos oito isolados de *Trichoderma* spp. testados exerceram ação inibitória a vários isolados de *R. necatrix*, em alguns casos, a percentagem de inibição *in vitro* chegou a atingir 35%. O gênero *Trichoderma* também já foi relatados inibindo outros patógenos de solo utilizando a metodologia de confrontação direta. Isolados de *Trichoderma virens* mostraram-se eficazes no controle de *Phytophthora palmivora* provenientes de plantas de cacau (MPIKA et al., 2009). Esta mesma espécie de antagonista foi citada por Howell (2003) suprimindo o crescimento *in vitro* de *Macrophomina phaseolina*, causador de podridão de raízes, caules, ramos e frutos de diferentes culturas de importância econômica.

A liberação de compostos não voláteis pelo fungo *Trichoderma* foi menos eficiente na supressão *in vitro* de *R. bunodes*, quando comparada aos outros procedimentos empregados neste trabalho. Para este teste, 9 dos 30 isolados do agente antagonista demonstraram ausência de inibição (%), ou seja, não restringiram o crescimento micelial de *R. bunodes*. O desempenho não satisfatório de alguns isolados de *Trichoderma* pode estar relacionado à variabilidade genotípica das espécies e à atividade de diferentes genótipos que coordenam ações essenciais, como o crescimento e a esporulação, além de fatores intraespecíficos, como o controle biológico (HARMAN et al., 1998) que determinam o grau de especialização do agente antagonista. Respostas de controle foram relatadas por Ruano-Rosa et al. (2010) utilizando a técnica de cobertura do meio de cultura com papel celofane. Estes autores constataram que dos 30 isolados de *Trichoderma* spp. testados, 16 produziram metabólitos não voláteis prejudiciais ao estabelecimento de *R. necatrix*. Ruano-Rosa e López-Herrera (2009) também comprovaram que isolados de *Trichoderma virens* provocaram inibição total do crescimento de *R. necatrix* pela emissão de compostos não voláteis.

De acordo com os resultados obtidos neste estudo, os ensaios *in vitro* possibilitaram realizar uma pré-seleção dos isolados de *Trichoderma* spp. a serem testados em experimentos *in vivo*. Para tanto, os isolados TRICH 104, AR e TRE foram selecionados conforme o melhor desempenho nas três metodologias laboratoriais empregadas.

No teste realizado em casa de vegetação, as mudas de álamo plantadas 14 dias após a mistura de *R. bunodes* e *Trichoderma* spp em substrato, mantiveram-se saudáveis até o décimo quarto dia após a inoculação, enquanto que plantas submetidas ao plantio no mesmo dia da mistura apresentaram valores elevados de incidência (60%) para a mesma data de avaliação. Esta resposta pode estar relacionada ao maior tempo de exposição entre o agente antagonista e o patógeno no substrato, sem a presença do hospedeiro, o que gera uma interação competitiva

por recursos específicos, como água, nutrientes, espaço e luz, além de estimular relações de hiperparasitismo entre os microrganismos, ocasionando uma redução da densidade de inóculo de *R. bunodes*, devido alterações nas atividades determinantes da doença, como o crescimento, a infectividade e a agressividade.

Chet et al. (1998), sugerem que o processo de inibição inicia-se com o crescimento quimiotrópico de *Trichoderma* spp. em resposta à algum estímulo liberado pelo fungo hospedeiro, ocasionando o enovelamento das hifas. Esta relação íntima entre patógeno e antagonista é considerado fator primordial para a liberação de enzimas hidrolíticas pelo hiperparasita, fazendo com que a parede celular do fungo hospedeiro seja degradada, o que facilita a penetração. Outra causa deste comportamento, pode estar ligada à exsudação de metabólitos secundários pelo *Trichoderma* spp., deletérios ao crescimento do patógeno no substrato, confirmando as respostas obtidas nos testes *in vitro* neste trabalho. Além disso, a possibilidade das plantas de álamo terem desenvolvido algum tipo de mecanismo de resistência a partir da presença do fungo *Trichoderma* spp, não pode ser descartada. Conforme relatado na literatura, a indução da resistência é conceituada como sendo um mecanismo de controle indireto, onde a planta responde a agressão do patógeno através da ativação de mecanismos latentes de resistência (ROMEIRO, 1999).

Portanto, os dados obtidos sugerem a possibilidade de utilização do controle biológico em áreas de plantio de álamo infestadas pelo fungo *R. bunodes*, como alternativa aos métodos de controle convencionais, como a aplicação de substâncias sintéticas, deletérias ao meio ambiente e à saúde do aplicador. Maiores estudos devem ser realizados para promover a maximização do uso do biocontrole no setor florestal.

## 5 CONCLUSÕES

- Os isolados TRICH 103, TRICH 104, TRICH 112, TRICH 115, AR, LPF8, SP4 e TRE de *Trichoderma* spp. demonstraram maior ação antagônica ao crescimento micelial de *R. bunodes* pelos testes de culturas pareadas, liberação de compostos voláteis e não voláteis.
- O isolado AR de *Trichoderma* spp. necessita de 14 dias para se estabelecer em substrato contendo *R. bunodes*, o que aumenta a eficiência de controle deste fitopatógeno.

## REFERÊNCIAS

- AJITH, P. S.; LAKSHMIDEVI, N. Effect of volatile and non-volatile compounds from *Trichoderma* spp. against *Colletotrichum capsici* incitant of anthracnose on bell peppers. **Nature and Science** v.8, 265-269p., 2010.
- ARANZAZU, L. F. Seguimiento epidemiológico de la Llaga estrellada del cacao producida por *Rosellinia pepo*. 1987-1992. In **Congreso Ascolfi** 13, Villavicencio, Colombia. Memorias. Bogotá. ASCOLFI. P. 25., 1992.
- BETTIOL, W. Componentes do controle biológico de doenças de plantas. In: BETTIOL, W. (Org.) Controle biológico de doenças de plantas. **Boletim Técnico**, Brasília: Embrapa, n. 5, 1-51 p., 1991.
- CASTRO, B. L. Antagonismo de algunos aislamientos de *Trichoderma koningii* originados en suelo colombiano contra *Rosellinia bunodes*, *Sclerotia sclerotiorum* y *Pythium ultimum*. **Phytopatol.** Colomb. v.19. 7-18p., 1995.
- CHET, I.; BENHAMOU, N.; HARAN, S. **Mycoparasitism and lytic enzymes**. In: HARMAN, G. E.; KUBICEK, C. P. (Eds.) *Trichoderma* and *Gliocladium*. Vol 2. Enzymes, biological control, and commercial applications. Taylor & Francis, London. 153–172, 1998.
- EDGINTON, L. V.; KNEW, K. L.; BARRON, G. L. Fungitoxic spectrum of benzimidazole compounds. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 62, n. 7, p. 42 - 44, 1971.
- ESQUIVEL, V. H.; LEGUIZAMON, J. E.; ARBELAEZ, T. Busqueda y evaluacion de antagonistas a *Rosellinia bunodes* agente causante de la llaga negra del cafeto. **Cenicafe** v.43, 33-42p., 1992
- ETHUR, L. Z.; ROCHA, E. K.; MILANESI, P.; MUNIZ, M. F. B.; BLUME, E. Sanidade de sementes e emergência de plântulas de nabo forrageiro, aveia preta e centeio submetidas a tratamentos com bioprotetor e fungicida. **Ciência e Natura**, UFSM, v. 28, n.2, 17 – 27p, 2006.
- FREEMAN, S.; SZTEJNBERG, A.; CHET, I. Evaluation of *Trichoderma* as a biocontrol agent for *Rosellinia necatrix*. **Plant Soil** v. 94, 163-170p., 1986.
- GOVINDARAJAN, T. S. A review of the incidence of root disease on coffee and their management. **J. Coffee Res.**, v. 18 (Suppl). 16-28p., 1988.
- HARMAN G.E., HAYES C.K., ONDIK K.L., 1998. **Asexual genetic in *Trichoderma* and *Gliocladium*: mechanisms and implications**. In: *Trichoderma* and *Gliocladium*. Vol. 1. Basic biology, taxonomy and genetics (Kubicek C.P., Harman G.E., eds). Taylor and Francis Ltd. pp. 243-270.
- HOWELL, C. R. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: The history and evolution of current concepts. **Plant Dis.** v.87, 4-10p., 2003.
- KUBICEK, C. P. The cellulase proteins of *Trichoderma reesei*, structure, multiplicity, mode of action and regulation of formation. **Adv Biochem Engineer Biotechnol**, v. 45, 1-27 p., 1992.
- MANGENOT, F.; DIEM, H.G. Fundamentals of biological control. In: KRUPA, S.V.; DOMMERGUES,

- Y. R. (eds.). Ecology of root pathogens, Amstenolam: **Elsevier**,. 207-265 p., 1979.
- MARIANO, R.L.R. Métodos de seleção *in vitro* para o controle microbiológico de patógenos de plantas. In: LUZ, W. C. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**. Passo Fundo, RAPP369-409p., 1993
- MAY DE MIO, L. L.; AMORIM, L.. Doenças do álamo. **Floresta** 30 (1/2): 139-153. Universidade Federal do Paraná. Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação. Curitiba, 2000. Disponível em: <<http://ojs.c3sl.ufpr.br/ojs2/index.php/floresta/article/download/2323/1941>>. Acesso em: 22 Jul. 2013.
- MAY DE MIO, L. L.; RUARO, L. Métodos de avaliação da ferrugem do álamo e eficiência de fungicidas no seu controle. **Rev. Árvore**, Viçosa, v. 32, n. 5, Oct. 2008. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S010067622008000500008&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010067622008000500008&lng=en&nrm=iso)>. Acesso em: 03 Feb. 2014.
- MICHEREFF, S. J.; MENEZES, M.; MARIANO, R. L. R. Antagonismo de espécies de *Trichoderma* sobre *Colletotrichum graminicola*, agente da antracnose do sorgo em condições de laboratório. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v.19, 14-17 p., 1993.
- MPIKA, J.,; KÉBÉ, I. B.; ISSALI, A. E.; N'GUESSA, F. K.; PRUZHININA, S.; ZELAZOWSKA, M. K.; KUBICEK, C. P.; AKE, S. Antagonist potential of *Trichoderma indignus* isolats for biological control of *Phytophthora palmivora* the causative agent of black pod disease on cocoa (*Theobroma cacao* L.) in Côte d'Ivoire. **African Journal of Biotechnology**, v. 8 5280-5293p., 2009.
- ORTIZ, C. E.; VILLEGAS, C.; HERRERA, N. M. Aislamiento y caracterización morfológica de *Rosellinia pepo* pat. en plantas de macadamia. **Rev.Fac.Nal.Agr.Medellín**, Medellín, v. 59, n. 2, 2006. Disponível em: <[http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S030428472006000200008&lng=es&nrm=iso](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S030428472006000200008&lng=es&nrm=iso)>. Acesso em: 23 jul. 2013.
- PERELLÓ, A.; MÔNACO, C.; SISTERNA, M.; DAL BELLO, G. Biocontrol efficacy of *Trichoderma* isolates for Tan Spot of wheat in Argentina. **Crop Protection** v. 22,1099-1106p., 2003.
- PUNJA, Z. K.; UTKHEDE, R. S. Using fungi and yeasts to manage vegetable crop diseases. **Trends in Biotechnology**, v. 21, 400-407 p., 2003.
- ROMEIRO, R.S. **Indução de Resistência em plantas a patógenos**. Viçosa, UFV. Cadernos didáticos, 56. 1999.
- RUANO-ROSA D.; DEL MORAL-NAVARRETE L.; LÓPEZ-HERRERA C. J. **Actas del V Congreso Mundial del Aguacate, 2003**. Malaga, Spain: CAP, 440p., 2003.
- RUANO-ROSA, D.; LÓPEZ-HERRERA, C. J. Evaluation of *Trichoderma* spp. as biocontrol agents against avocado white root rot. **Biol Control**, v.51, 66-71p., 2009.
- RUANO ROSA, D.; DEL MORAL NAVARRETE, L.; LOPEZ HERRERA, C. J.. Selection of *Trichoderma* spp. isolates antagonistic to *Rosellinia necatrix*. **Spanish Journal of Agriculture Research**, v. 8, 1084–1097p., 2010.

RUIZ, L.; LEGUIZAMÓN, J. Efecto del contenido de materia orgánica del suelo sobre el control de *Rosellinia bunodes* con *Trichoderma* spp. **Cenicafé**, v. 47, 179–186p., 1996.

SAITO, L. R.; SALES, L. L. S. R.; MARTINCKOSKI, L.; ROYER, R.; RAMOS M. S.; REFFATTI, T. Aspectos dos efeitos do fungo *Trichoderma* spp. no biocontrole de patógenos de culturas agrícolas. **Pesquisa Aplicada & Agrotecnologia**, v.2, n.3, set.- dez, 2009.

SANTOS, A. F. dos; MACHADO, E. B. **Controle químico da ferrugem do álamo**. Comunicado Técnico 253. Embrapa Florestas, ISSN 1517-5030. Colombo (PR), 2010.

SANTOS, A. F. dos; et al. Primeiro relato da ocorrência de *Septoria musiva* em álamo no Brasil. **Trop. plant pathol.**, Brasília, v. 35, n. 1, Feb. 2010. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S198256762010000100009&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S198256762010000100009&lng=en&nrm=iso)>. Acesso em: 03 Fev. 2014.

SANTOS, A. F. dos; MACHADO, E. B.; TESSMANN, D. J.; THOMAZI, H. Patogenicidade de *Rosellinia bunodes* ao álamo. Anais do XXXVIII Congresso Paulista de Fitopatologia. Araras– SP, 2015.

SHANER, G.; FINNEY, R. E. The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in knox wheat. **Phytopathology** 67:1051-1056, 1977.

SIVANESAN, A.; HOLLIDAY, P. *Rosellinia necatrix*. **Description of Pathogenic Fungi and Bacteria**, vol. 352 Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England, 1972.

SILVA, F. DE A. S.; AZEVEDO, C. A. V. de. Versão do programa computacional Assistat para o sistema operacional Windows. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v.4, n.1, 71-78p., 2006.

SZTEJNBERG A., FREEMAN S., CHET I., KATAN J. Control of *Rosellinia necatrix* in soil and in apple orchard by solarization and *Trichoderma harzianum*. **Plant Dis** 71, 365-369, 1987.

SVETLANA Z.; STOJANOVIC S.; IVANOVIC Z.; GAVRILOVIC V.; POPOVIC, T.; BALAZ, J. Screening of antagonistic activity of microorganisms against *Colletotrichum acutatum* and *Colletotrichum gloeosporioides*, **Archives of Biological Science**, Belgrade, v. 62, n.3, 611-623p., 2010.

THOMAZI, H.; SANTOS, A. F. Dos.; BUHRER, C.; MACHADO, E. B.; TESSMANN, D. J. Patogenicidade de *Rosellinia* sp. a algumas espécies florestais. **Anais do 47º Congresso Brasileiro de Fitopatologia**. Londrina-PR, 2014.

VALE, F. X. R.; FERNANDES FILHO, E. I.; LIBERATO, J. R. QUANT. A software plant disease severity assessment. **8<sup>th</sup> International Congress of Plant Pathology**, Christchurch New Zealand, 105 p., 2003.

VEY, A.; HOAGLAND, R. E.; BUTT, T. M. Toxic metabolites of fungal biocontrol agents. Fungi as Biocontrol Agents: Progress, Problems and Potential. BUTT T. M.; JACKSON, C.; 311-346 p. **CAB International**, Bristol, 2001.

XIAO-YAN, S.; QING-TAO, S.; SHU-TAO, X.; XIU-LAN, C.; CAI-YUN, S.; YU-ZHONG, Z. Broad-

spectrum antimicrobial activity and high stability of Trichokonins from *Trichoderma koningii* SMF2 against plant pathogens. FEMS Microbiol. Lett. v.260, 119-125p., 2006.

WEIDLING, R. Studies on a lethal principle effective in the parasitic action of *Trichoderma lignorum* on *Rhizoctonia solani* and other soil fungi. **Phytopathology**, St Paul v. 24, 1153-1179 p., 1934.

## REFERÊNCIAS GERAIS

- ABRAF. Associação Brasileira de Produtores de Florestas Plantadas. **Anuário Estatístico ABRAF 2013, ano base 2012**. 148 p. : il. color; 21 cm. Brasília, 2013.
- ARANZAZU, F.; CÁRDENAS, J.; MUJICA, J.; GÓMEZ, R. Manejo de las llagas radicales (*Rosellinia* sp.). **Boletín de Sanidad Vegetal** 23. Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) and Corpoica, Santafé de Bogotá, Colombia, 1999.
- AUER, C. G.; GRIGOLETTI A. J. Doenças registradas em *Araucaria angustifolia* e *Pinus* spp. nos estados do Paraná e de Santa Catarina. Colombo: EMBRAPA, CNPF, 3p., 1997.
- AULER, S. C. V.; CARVALHO, D. D. C.; MELLO, S. C. M. Antagonismo de *Trichoderma harzianum* a *Sclerotium rolfsii* nas culturas do feijoeiro e soja. **Revista Agro@mbiente On-line**, Universidade Federal de Roraima, Boa Vista-RR, v. 7, n. 3, 359-365 p., set-dez, 2013.
- BAKER, . F.; COOK, R. J. **Biological control of plant pathogens**. San Francisco: W. F. Freeman, 433 p., 1974.
- BEHDAD, E. **Verbreitung von *Rosellinia necatrix* (Hartig) Berlese als Wurzelfauleerreger im Iran und Möglichkeiten der Schadensverhütung**. Ph. D Thesis. University of Hohenheim, Germany, pp. 119, 1975.
- BERMUDEZ, M.; CARRANZA-MORSE, J. Estado anamórfico de *Rosellinia bunodes* (Berk & Br.) Sacc y *Rosellinia pepo* Pat. (Ascomycotina: Xylariaceae). **Rev. Biol. Trop.**, 40 (1):43-46, 1992Costa Rica, 1991.
- BETTIOL, W.; MORANDI, M.A.B. Controle Biológico de Doenças 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,. p.7- 14, 2009.
- BRAÚNA, L. M. **Controle biológico do mofo branco por isolados de *Trichoderma* nas culturas de soja e feijão comum**. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia). Universidade de Brasília, Brasília, 2011.
- CASTAÑO, J. Algunas observaciones sobre la "llaga negra" radicular del cafeto. Chinchina:, Colombia, Centro Nacional de Investigaciones del cafe. **Boletín Informativo** v.4(37):28-30p., 1953.
- CASTRO, B. L. Antagonismo de algunos aislamientos de *Trichoderma koningii* originados en suelo colombiano contra *Rosellinia bunodes*, *Sclerotia sclerotiorum* y *Pythium ultimum*. **Phytopatol.** Colomb. 19. 7-18p., 1995.
- CASTRO, B. L.; SERNA C. A. Incidencia de llagas radicales (*Rosellinia* spp.) en el sistema café-yuca en el Departamento del Quindío. **Fitopatología Colomb** v. 33: 43-48p., 2009.
- CORRÊA, R. M. de. **Classificação, determinação da eficiência, da compatibilidade e do comportamento em aplicação aérea do vírus *Condylorrhiza vestigalis multiplenucleopolyhedrovirus***. Tese de doutorado. Universidade Federal do Paraná. 109 p.Curitiba, 2008.
- DENNIS, R. W. **British Ascomycetes**, J. Cramer. 321 p., 1978.

DICKMANN, D. I. ISEBRANDS, J. G., BLAKE, T. J., KOSOLA, K, and KORT, J. 2001. **Physiological ecology of poplars. In Poplar Culture In North America.** Part A, Chapter 1. Edited by D. I. Dickmann, J. G. Isebrands, J. E. Eckenwalder and J. Richardson. NRC Research Press. National Research Council of Canada, ON K 1 A 0R6. Canada. pp 1-42. 2001.

DOMSCH, K. H.; GAMS, W.; ANDERSON, T. H. Compendium of soil fungi. CRC Press, London, 630p., 1980.

EMBRAPA – CENARGEN. Banco de dados – Fungos relatados em plantas no Brasil. Disponível em: < <http://pragawall.cenargen.embrapa.br/aiqweb/michtml/fgbd01.asp#R>>. Acesso em: 28 mar. 2014.

ESQUIVEL, V. H.; LEGUIZAMÓN, J. E; ARBELAEZ, T. Búsqueda y evaluación de antagonistas a *Rosellinia bunodes* agente causante de la llaga negra del cafeto. **Cenicafé**, v. 43, 33–42 p., 1992.

FAO. Poplars and willows in wood production and land use. Roma, Itália, 1979.328p.

FAO. Poplars and willows for rural livelihoods and sustainable development. Roma, Itália, 2011.

FERREIRA, F. A. **Patologia Florestal; principais doenças florestais no Brasil.** Viçosa. Sociedade de Investigações Florestais, 570 p. ilustr., 1989.

GAMS, W.; BISSET, J. Morphology and identification of *Trichoderma*. In: MONTALVÃO, S. C. L. **Potencial de *Trichoderma* spp. no biocontrole de doenças do tomateiro.** Dissertação (Mestrado em Fitopatologia). Universidade de Brasília, Brasília, 2012.

GIBSON, I. A. S. 1978. *Rosellinia bunodes* (Berk. & Br.) Sacc. In Kranz, J.; Schmutterer, H.; Koch, W. eds. Diseases, pests and weeds in tropical crops. New York, John Wiley & Sons. pp. 135-136.

GRIGOLETTI, A. J.; AUER, C. G. Doenças da erva-mate: Identificação e Controle. **Circular técnica** v. 25, Colombo-PR, 1996. Disponível em:< <http://www.cnpf.embrapa.br/publica/circtec/edicoes/circ-tec25.pdf>> Acesso em: 25 set. 2014.

HOLLIDAY, P. 1980. Fungus diseases of tropical crops. Cambridge, Cambridge University Press. 607p.

JAVARINI, E. Caracterização das propriedades físicas e mecânicas de *Populus deltoides*, plantado nas várzeas do Vale Médio do Rio Iguaçú. Trabalho de Conclusão de Curso. Centro Universitário de União da Vitória – UNIUV. União da Vitória (PR), 2011.

KUBICEK, C. P. The cellulase proteins of *Trichoderma reesei*, structure, multiplicity, mode of action and regulation of formation. **Adv Biochem Engineer Biotechnol**, v. 45, 1-27 p., 1992.

LUCON, C. M. M.; KOIKE, C. M.; ISHIKAWA, A. I.; PATRÍCIO, F. R. A.; HARAKAVA, R. Bioprospecção de isolados de *Trichoderma* spp. para o controle de *Rhizoctonia solani* na produção de mudas de pepino. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v.44, n.3, 225-232 p., mar. 2009.

MACHADO, D. F. M.; PARZIANELLO, F. R.; SILVA, A. C. F. e ANTONIOLLI, Z. I. *Trichoderma* no Brasil:

o fungo e o bioagente. **Revista de Ciências Agrárias**, v.35, n.1, 274-288 p., 2012.

MAY DE MIO, L. L.; AMORIM, L.. Doenças do álamo. **Floresta** 30 (1/2): 139-153. Universidade Federal do Paraná. Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação. Curitiba, 2000. Disponível em: <<http://ojs.c3sl.ufpr.br/ojs2/index.php/floresta/article/download/2323/1941>>. Acesso em: 22 Jul. 2013.

MAY DE MIO, L. L.; RUARO, L. Métodos de avaliação da ferrugem do álamo e eficiência de fungicidas no seu controle. **Rev. Árvore**, Viçosa, v. 32, n. 5, Oct. 2008. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S010067622008000500008&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010067622008000500008&lng=en&nrm=iso)>. Acesso em: 03 Feb. 2014.

MENDOZA, R. A; TEN HOOPEN, G. M.; KASS, D. C. J.; SÁNCHEZ, V. A; KRAUSS, U. Evaluation of mycoparasites as biocontrol agents of *Rosellinia* root rot in cocoa. **Biol. Cont.**, v. 27, 210–227p., 2003.

MONTALVÃO, S. C. L. **Potencial de *Trichoderma* spp. no biocontrole de doenças do tomateiro**. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia). Universidade de Brasília, Brasília, 2012.

OLIVER, J. M. M. **Chopos Y choperas**. Madrid, Ediciones Mundi – Prensa, 1988, 124p.

OLIVEIRA, I. M. Pudricão negra da raiz do cacauzeiro causada por *Rosellinia* sp. no Brasil. **Agrotropica**, Brasil, v. 4, n.2, 21-26p., 1992.

OLIVEIRA, O. S. Fungos causadores de danos em *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. **Floresta**, Curitiba, v.12, n.2, p.23-27, 1981.

ORTIZ, C. E.; VILLEGAS, C.; HERRERA, N. M.. Aislamiento y caracterización morfológica de *Rosellinia pepo* pat. en plantas de macadamia. **Rev.Fac.Nal.Agr.Medellín**, Medellín, v. 59, n. 2, 2006. Disponível em: <[http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S030428472006000200008&lng=es&nrm=iso](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S030428472006000200008&lng=es&nrm=iso)>. Acesso em: 23 jul. 2013.

OTTO, G. M.; MOTTA, A. C. V.; REISSMAN, C. B. Resposta do álamo (*Populus deltoides* Marsh) à adubação nitrogenada em dois sítios do município de São Mateus do Sul, Paraná. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 17, n. 1/2, p. 81-90, jan./mar. 2007.

PÉREZ-JIMÉNEZ, R. M. A review of the biology and pathogenicity of *Rosellinia necatrix*-cause of white root rot disease of fruit trees and other plants. **Journal of Phytopathology**, v. 154, 257-266p., 2006.

PETRINI, L. E. *Rosellinia* species of the temperate zones. **Sydowia**, v. 44, 169-281p., 1993.

PLIEGO, C.; LÓPEZ-HERRERA, C.; RAMOS, C.; CAZORLA, F. Developing tools to unravel the biological secrets of *Rosellinia necatrix*, an emergent threat to woody crops. **Mol Plant Pathol**, v. 13, 226–239p., 2012.

PLANTWISE, **Knowledge Bank**. Disponível em: <<http://www.plantwise.org/knowledgebank/pwmap.aspx?speciesid=37958&loc=global>> Acesso em: 14 Ago. 2014.

RUIZ, L.; LEGUIZAMÓN, J. Efecto del contenido de materia orgánica del suelo sobre el control de *Rosellinia bunodes* con *Trichoderma* spp. **Cenicafé**, v. 47, 179–186p., 1996.

SACCAS, A. M., Les *Rosellinia* des caféiers en Oubangui-Chari L’Agronomie Tropicale. V. 11, 551–595p., and **L’Agron. Trop.** 11, 687–706p., 1956.

SAITO, L. R.; SALES, L. L. S. R.; MARTINCKOSKI, L.; ROYER, R.; RAMOS M. S.; REFFATTI, T. Aspectos dos efeitos do fungo *Trichoderma* spp. no biocontrole de patógenos de culturas agrícolas. **Pesquisa Aplicada & Agrotecnologia**, v.2, n.3, set.- dez, 2009.

SAMUEL, N.; HADAVI, N. *Trichoderma*: review of biology and sistematics of de genus. **Journal of General Microbiology**, v. 100, 923-935 p., 1996.

SANTOS, A. F. dos; MACHADO, E. B. **Controle químico da ferrugem do álamo**. Comunicado Técnico 253. Embrapa Florestas, ISSN 1517-5030. Colombo (PR), 2010.

SANTOS, A. F. dos; MACHADO, E. B.; TESSMANN, D. J.; THOMAZI, H. Patogenicidade de *Rosellinia bunodes* ao álamo. Anais do XXXVIII Congresso Paulista de Fitopatologia. Araras– SP, 2015.

SANTOS, A. F. dos; MACHADO, E. B.; STANOSZ, G. R. **Primeiro relato da ocorrência de Septoria musiva em álamo no Brasil**. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, (supl.), p. 122, ago. 2006. Edição dos Resumos do 39º Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 2006, Salvador. Resumo 0001.

SANTOS, R. P.; MACEDO, M. A.; DELGADO, G. V.; MARTINS, I.; MELLO, S. C. M. Enriquecimento da coleção de agentes de controle biológico de fitopatógenos: Novos isolados de *Trichoderma* procedentes de Petrolina (PE). Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 750 p. (Embrapa Recursos Genéticos. **Documentos 250**). 2007.

SILVA, T. W. R. **Associação de Fusarium spp. com sementes de Pinus Taeda: Detecção, transmissão, patogenicidade e biocontrole**. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2013.

SIVANESAN, A.; HOLLIDAY, P. *Rosellinia necatrix*. Description of Pathogenic Fungi and Bacteria, vol. 352 **Commonwealth Mycological Institute**, Kew, Surrey, England, 1972.

SIVASITHAMPARAM, K.; GHISALBERTI, E.L. Secondary metabolism in *Trichoderma* and *Gliocladium*. In *Trichoderma* and *Gliocladium*; HARMAN, G. E.; KUBICEK, C.P. Eds.; Taylor and Francis Ltd.:London, UK; Volume 1, 139–191p., 1998.

SOCIETY OF INVERTEBRATE PATHOLOGY. 2003. Disponível em: <<http://www.sipweb.org/directorymcp/fungi.html>> Acesso em: 12 out. 2014.

SZTEJNBERG, A.; MADAR, Z; CHET, I. Induction and quantification of microsclerotia in *Rosellinia necatrix*. **Phytopathology**, v. 70 525–527p., 1980.

TEN HOPPEN, G. M.; KRAUSS, U. Biology and control of *Rosellinia bunodes*, *Rosellinia necatrix* and *Rosellinia pepo*: A review. **Crop Protection**, Turrialba, Costa Rica, .v. 25, n.2, 89–107p. fev. 2006.

THOMAZI, H.; SANTOS, A. F.; BUHRER, C.; MACHADO, E. B.; TESSMANN, D. J. Patogenicidade de *Rosellinia* sp. a algumas espécies florestais. Anais do 47º Congresso Brasileiro de Fitopatologia. Londrina, 2014.

VALENCIA, A. J. C.; CASTRO, C. B. L. Aspectos biológicos de aislamientos de *Trichoderma* sp. antagónicos a *Rosellinia bunodes*. **Cenicafé**, Chinchiná, Caldas, Colombia, v. 55, n.1, 16-28p., 2004.

WATERSON, J. M. Observations on the parasitism of *Rosellinia pepo* Pat. **Trop. Agricult.** v.18, 174-184p., 1941.