

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

THIARE APARECIDA DO VALLE COELHO

MORTALIDADE DE MINIESTACAS DE *Eucalyptus benthamii* E POSSÍVEIS  
FONTES DE INÓCULO

CURITIBA

2018

THIARE APARECIDA DO VALLE COELHO

MORTALIDADE DE MINIESTACAS DE *Eucalyptus benthamii* E POSSÍVEIS  
FONTES DE INÓCULO

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Engenharia Florestal, no Curso de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, Setor de Ciências Agrárias, da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Celso Garcia Auer

Co-orientador: Prof. Dr. Álvaro Figueredo dos Santos

CURITIBA

2018

Ficha catalográfica elaborada pela  
Biblioteca de Ciências Florestais e da Madeira - UFPR

Coelho, Thiare Aparecida do Valle

Mortalidade de miniestacas de *Eucalyptus benthamii* e possíveis fontes de inóculo / Thiare Aparecida do Valle Coelho. – Curitiba, 2018.  
40 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Celso Garcia Auer

Coorientador: Prof. Dr. Álvaro Figueredo dos Santos

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal.  
Defesa: Curitiba, 08/03/2018.

Área de concentração: Silvicultura.

1. Viveiros florestais - Fungos. 2. Fungos fitopatogênicos. 3. Eucalipto – Doenças e pragas. 4. Teses. I. Auer, Celso Garcia. II. Santos, Álvaro Figueredo dos. III. Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Agrárias. IV. Título.

CDD – 634.9

CDU – 634.0.232.32

Bibliotecária: Berenice Rodrigues Ferreira – CRB 9/1160



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO ENGENHARIA  
FLORESTAL

## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ENGENHARIA FLORESTAL da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **THIARE APARECIDA DO VALLE COELHO** intitulada: **MORTALIDADE DE MINIESTACAS DE *Eucalyptus benthamii* E POSSÍVEIS FONTES DE INÓCULO**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 08 de Março de 2018.

CELSO GARCIA AUER

Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

SANDRA REGINA CABEL

Avaliador Externo (PUC/PR)

IDA CHÁPAVAL PIMENTEL

Avaliador Externo (UFPR)



Dedico este trabalho aos meus pais  
Bárbara e Lineu Coelho e ao meu irmão  
Thiago, por todo apoio e compreensão  
prestados durante este período e em  
todos os momentos importantes de minha  
vida e formação!

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom de minha vida, por ter me guiado no decorrer do mestrado me ajudando a trilhar o caminho mais correto possível.

Agradeço aos meus pais Bárbara e Lineu, e ao meu irmão Thiago, por todo o apoio, compreensão, amor, carinho, principalmente nos momentos mais difíceis, por serem a minha base e exemplo de vida!

Ao pesquisador Dr. Celso Garcia Auer, pela orientação, atenção, dedicação, paciência e amizade durante o decorrer do trabalho e à oportunidade concedida para a realização do mesmo.

Ao pesquisador Dr. Álvaro Figueredo dos Santos pela co-orientação e sugestões para o desenvolvimento e conclusão deste trabalho.

Aos funcionários do Laboratório de Patologia Florestal da Embrapa Florestas, Davi e Carol, pela ajuda na condução dos experimentos.

Aos amigos e companheiros de laboratório, Izabela, Cristiane, Maislian, Vivien, Nicolas, Eduardo e Izabele, pela ajuda nestes dois anos de trabalho e principalmente pela amizade e companheirismo de todos.

À Reflorestadora Golden Tree pelo fornecimento do material vegetal a ser trabalhado, a todos os funcionários do viveiro que ajudaram na coleta do material.

À Professora Dra. Ida Chapaval Pimentel, M.Sc. Carolina Gracia Poitevin (UFPR), Professora Dra. Maria Alves Ferreira e M.Sc. Thaissa de Paula Faria dos Santos (UFLA), pelo auxílio com a identificação dos fungos.

À Embrapa Florestas, pelo apoio para o desenvolvimento do projeto.

À CAPES, pelo apoio financeiro com a concessão da bolsa de mestrado.

Aos meus amigos, familiares e à todas aquelas pessoas que, mesmo não mencionadas, de uma forma ou outra contribuíram para a realização deste projeto.

**A VOCÊS, O MEU MAIS SINCERO OBRIGADA!**

“Comece fazendo o que é necessário, depois o que é possível, e de repente você estará fazendo o impossível.”

(SÃO FRANCISCO DE ASSIS)

## RESUMO

*Eucalyptus benthamii* Maiden et Cabbage é uma espécie originária da Austrália, cultivada na região sul do Brasil devido à sua adaptabilidade ao clima da região. Com a expansão da eucaliptocultura há uma grande procura por mudas da espécie e de acordo com as condições existentes nos viveiros vários fatores bióticos e abióticos têm surgido durante a produção de mudas. Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a podridão de miniestacas de *E. benthamii* em três clones comerciais, testar a patogenicidade dos principais fungos associados e buscar as principais fontes de inóculo desses fungos causadores da podridão em miniestacas. As coletas foram realizadas em viveiro clonal na colônia de Entre Rios, Guarapuava/PR, sendo a primeira coleta em setembro/2016 e a segunda coleta em abril/2017. Coletou-se miniestacas em fase de enraizamento com sintomas de podridão aparente; brotações saudáveis; amostras do substrato utilizado para o enraizamento das miniestacas; areia proveniente dos canaletões dos minijardins; tubetes (usados e lavados); e britas provenientes do piso da estufa. Para detecção e identificação dos fungos, utilizou-se os métodos de isolamentos: câmara úmida, isolamento indireto, diluição em série, teste com isca de folha de mamona (*Ricinus communis* L.) e plaqueamento de resíduos. Concluiu-se que *Botrytis cinerea*, Complexo *Calonectria scoparia*, *Fusarium* spp. e *Pestalotiopsis* sp. são os agentes causais da podridão de miniestacas de *E. benthamii*. Miniestacas assintomáticas, tubetes, brita, areia e substrato usado podem ser as principais fontes de inóculo.

**Palavras-chave:** *Botrytis cinerea*, doenças em viveiro, eucalipto.

## ABSTRACT

*Eucalyptus benthamii* Maiden et Cabbage is a species native to Australia, cultivated in the Southern region of Brazil due to its adaptability to the climate of the region. With the expansion of eucalypts cultivation, there is a great demand for seedlings of this species and due to the existing conditions in the nurseries, several biotic and abiotic factors have arisen during seedling production. The objective of this work was to evaluate rotting of *E. benthamii* minicuttings in three commercial clones, to test the pathogenicity of the main associated fungi and to search for the main inoculum sources of fungi that cause rot in minicuttings. The collections were carried out in a clonal nursery in the colony of Entre Rios, Guarapuava/PR, in September/2016 (1<sup>st</sup> collection) and April/2017 (2<sup>nd</sup> collection). Minicuttings were collected during rooting phase with symptoms of apparent rot; healthy shoots; samples of the substrate used for rooting of the minicuttings; sand from clonal minigarden; plastic tubes; and cracked stones from the greenhouse floor. For detection and identification of the fungi, the methods of direct isolation, indirect isolation, serial dilution, castor bean (*Ricinus communis* L.) test and residue plating were used. *Botrytis cinerea*, Complexo *Calonectria scoparia*, *Fusarium* spp. and *Pestalotiopsis* sp. are the causal agents of the minicuttings rotting of *E. benthamii*. Asymptomatic minicuttings, plastic tubes, cracked stones, sand and used substrate may be main sources of inoculum.

**Key-words:** *Botrytis cinerea*, nursery disease, eucalypts.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – ESTRUTURA DO VIVEIRO CLONAL.....	18
FIGURA 2 – DETALHE DA MORTALIDADE DE <i>Eucalyptus benthamii</i> EM CASA DE VEGETAÇÃO.....	19
FIGURA 3 – TESTE COM ISCA COM FOLHA DE MAMONA PARA AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE FUNGOS .....	24
FIGURA 4 – PATOGENICIDADE DE FUNGOS À MINIESTACAS DE <i>Eucalyptus benthamii</i> .....	29

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – INCIDÊNCIA (%) DE FUNGOS ASSOCIADOS COM A MORTALIDADE DE MINIESTACAS DE TRÊS CLONES (B1, B2 e B3) DE <i>Eucalyptus benthamii</i> EM DUAS ÉPOCAS DE COLETA (SETEMBRO/2016 E ABRIL/2017) OBTIDOS EM CÂMARA ÚMIDA E MEIO BATATA DEXTROSE ÁGAR (BDA).....	26
TABELA 2 – TAMANHO MÉDIO (MM) DA LESÃO EM MINIESTACAS DE <i>E. benthamii</i> INOCULADAS COM ISOLADOS DE <i>Botrytis cinerea</i> , Complexo <i>Calonectria scoparia</i> , <i>Fusarium</i> sp. e <i>Pestalotiopsis</i> sp., APÓS SETE E QUATORZE DIAS DE INCUBAÇÃO À 24 ± 2 °C .....	30
TABELA 3 – PERCENTUAL DE RECUPERAÇÃO DOS FUNGOS INOCULADOS, APÓS O TESTE DE PATOGENICIDADE .....	31
TABELA 4 – FUNGOS ENCONTRADOS EM DIFERENTES FONTES DE INÓCULO NO VIVEIRO CLONAL COM MORTALIDADE DE MINIESTACAS DE <i>Eucalyptus benthamii</i> .....	32

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	10
2	OBJETIVOS .....	12
2.1.1	Objetivo Geral.....	12
2.1.2	Objetivos Específicos .....	12
3	REVISÃO DE LITERATURA .....	13
3.1	<i>Eucalyptus benthamii</i> .....	13
3.2	PRINCIPAIS DOENÇAS DO EUCALIPTO .....	14
3.3	DOENÇAS EM VIVEIROS FLORESTAIS .....	15
4	MATERIAL E MÉTODOS .....	17
4.1	CARACTERIZAÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO .....	17
4.2	AMOSTRAGEM DA PODRIDÃO DE MINIESTACAS DE <i>Eucalyptus benthamii</i> .....	18
4.3	ANÁLISES LABORATORIAIS .....	20
4.4	IDENTIFICAÇÃO DOS FUNGOS ISOLADOS.....	21
4.5	TESTE DE PATOGENICIDADE .....	21
4.6	FONTES DE INÓCULO NO VIVEIRO .....	22
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
5.1	FUNGOS PRESENTES EM MINIESTACAS DE <i>Eucalyptus benthamii</i> .....	26
5.2	PATOGENICIDADE DE FUNGOS EM MINIESTACAS DE <i>E. benthamii</i> .....	29
5.3	FONTES DE INÓCULO NO VIVEIRO .....	32
6	CONCLUSÕES.....	35
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	37

## 1 INTRODUÇÃO

A partir de ensaios realizados por Navarro de Andrade, em 1909 na então Cia. Paulista de Estradas de Ferro, iniciou-se o plantio de eucaliptos no Brasil. Com a lei de incentivos fiscais, na década de 1960, o plantio de eucalipto se intensificou em diversas regiões do país. Desta forma, nas décadas seguintes foram desenvolvidos novos projetos que visavam e possibilitavam a expansão da cultura do eucalipto no país (MORA e GARCIA, 2000).

Nos últimos cinco anos a área com plantios de eucalipto no Brasil teve um crescimento de 2,4%. Em 2016, a área ocupada por plantios do gênero no país foi de 5,7 milhões de ha, o equivalente a 72% de toda área ocupada por plantios florestais (7,84 milhões de ha). De toda a área plantada, apenas 5% encontra-se no estado do Paraná, que vem apresentando aumento na sua área de plantio (IBÁ, 2017). Este baixo percentual deve-se às condições climáticas de frio intenso existentes, o que torna a eucaliptocultura limitada e restrita. Devido à ação de geadas, em algumas áreas, nem mesmo as espécies tolerantes conseguem se adaptar às condições climáticas severas (SCHULTZ, 2011).

Buscando atender a necessidade de plantios com espécies tolerantes ao frio, o *Eucalyptus benthamii* Maiden et Cabbage foi introduzido como uma opção, pois é uma espécie originária da Austrália e tornou-se promissora para plantios devido ao bom desenvolvimento em regiões frias e por ter boa resistente às geadas.

Por estes motivos, ocorre apresenta grande demanda mudas de *Eucalyptus benthamii*. Visando a atender essa grande demanda, sobretudo de mudas uniformes e com qualidade, vem sendo utilizada a miniestaquia como técnica de propagação vegetativa.

Vários fatores bióticos e abióticos têm surgido nas fases de produção de mudas. Os viveiros florestais são locais propícios para a ação de micro-organismos fitopatogênicos devido suas características, tais como: condição de alta umidade relativa do ar, temperaturas amenas, tecido vegetal tenro, proximidade entre mudas nas bandejas e cultivo contínuo da mesma espécie (HOPPE e BRUN, 2004).

Nos viveiros, as doenças podem ocorrer tanto nos jardins e minijardins clonais, como durante seu crescimento e rustificação. Um exemplo é a podridão de

estacas e miniestacas que podem ocorrer na produção de mudas clonais de eucalipto, podendo acarretar em prejuízos significativos (ALFENAS *et al.*, 2009).

Por esses motivos, a necessidade de se conhecer os agentes causais da podridão de miniestacas de *E. benthamii* e suas possíveis fontes de inóculo levaram ao desenvolvimento deste trabalho.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1.1 Objetivo Geral

Analisar as causas da mortalidade de miniestacas de *Eucalyptus benthamii* em viveiro clonal.

### 2.1.2 Objetivos Específicos

- Identificar os principais fungos associados a mortalidade em miniestacas;
- Identificar fontes de inóculo dos fungos associados a mortalidade em miniestacas;
- Avaliar a patogenicidade dos fungos associados com a mortalidade de miniestacas.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 *Eucalyptus benthamii*

O gênero *Eucalyptus* é originário da Austrália, Indonésia e Papua Nova Guiné (FAO, 2000), tendo sido introduzido no Brasil no início do século XIX. Há indícios de que as primeiras árvores teriam sido plantadas no Jardim Botânico do Rio de Janeiro, e que o eucalipto era utilizado para fins ornamentais e como quebra-vento devido seu excelente desenvolvimento. Entre 1904 a 1909, Edmundo Navarro de Andrade, desenvolveu estudos com espécies nativas e de eucalipto no Horto de Jundiaí-SP, nos quais o eucalipto destacou-se entre as demais e passou a ser utilizado pela Companhia Paulista de Estradas de Ferro para produzir lenha para suas locomotivas. Desta forma, Edmundo Navarro de Andrade foi o responsável pela utilização do eucalipto como espécie de potencial econômico (PEREIRA *et al.*, 2000).

O *Eucalyptus benthamii* é originário da Austrália, ao oeste da cidade de Sydney em planícies ao longo do rio Nepean. A espécie ocorria em solos férteis das planícies de deposição de rios, porém grande parte da população original foi cortada para a formação de pastagens ou inundada para a construção da represa de Warragamba. Ainda devido sua necessidade por solos férteis, a espécie tornou-se vulnerável com a expansão da fronteira agrícola, sendo a mesma considerada em extinção (HIGA e PEREIRA, 2003).

A espécie foi introduzida no Brasil em 1988, por meio da Embrapa Florestas, que realizou o plantio de um lote de sementes originárias da sua região de procedência. As sementes foram originárias da mistura entre sete e dez árvores matrizes. A população implantada na Embrapa Florestas é caracterizada como uma Área Alterada de Coleta de Sementes com Matrizes Marcadas (ACS-AM), e as sementes produzidas são utilizadas em plantios experimentais (PALUDZYSZYN FILHO, SANTOS e FERREIRA, 2006).

Na área de ocorrência original o *E. benthamii* é encontrado em áreas com altitudes inferiores a 100 m, temperatura média máxima de 26 °C e média mínima de 4 °C com ocorrência de geadas leves, e precipitação anual de 1100 mm (HIGA e PEREIRA, 2003). Em plantios experimentais da Embrapa Florestas no estado do Paraná, *E. benthamii* demonstrou suportar médias maiores de precipitação que a

requerida para a espécie, bem como alta tolerância às geadas suportando até 25 geadas anuais. Assim, *E. benthamii* é indicado para plantios em regiões com temperaturas mínimas absolutas de até -10 °C (PALUDZYSZYN FILHO, SANTOS, e FERREIRA, 2006).

### 3.2 Principais doenças do eucalipto

Segundo Alfenas e Zauza (2007), doença é qualquer alteração das funções fisiológicas normais da planta que possa ter sido causada por um agente biótico (patógeno – fungos, bactérias, nematóides, viróides, micoplasmas, protozoários, etc.), ou abiótico (condições adversas do ambiente), ou ainda, por anormalidades genéticas. Para que ocorra a doença é necessário que haja a presença do hospedeiro suscetível, fonte de inóculo do patógeno, e condições ambientais favoráveis tais como: temperatura, umidade e luminosidade.

Com a expansão da eucaliptocultura várias doenças têm surgido na fase de produção de mudas nos viveiros, e em campo após o seu plantio (ALFENAS *et al.*, 2009). Até o momento, os únicos agentes bióticos na eucaliptocultura são fungos e bactérias (ALFENAS e ZAUZA, 2007).

As principais doenças que ocorrem em viveiros são: tombamento de mudas ou “*damping-off*”, podridão de estacas e miniestacas, podridão de raízes, canela preta, mofo cinzento, oídio, manchas foliares, mancha bacteriana, murcha bacteriana, ferrugem (SANTOS, AUER e GRIGOLETTI JÚNIOR, 2001; ALFENAS e ZAUZA, 2007; ALFENAS *et al.*, 2009; AUER, SANTOS e FURTADO, 2016). Segundo esses autores, as principais doenças que ocorrem no campo são: ferrugem causada por *Puccinia psidii*, manchas foliares causadas por fungos dos gêneros *Cylindrocladium* (atualmente *Calonectria*), *Mycosphaerella/Teratosphaeria* e por bactérias do gênero *Xanthomonas*, murcha bacteriana de *Ralstonia*, murcha de *Ceratocystis*, cancro causado por *Chrysosporthe cubensis* e *Botryosphaeria*, enfermidade rosada ou rubelose causada por *Erythricium salmonicolor*.

Com relação às doenças causadas por agentes abióticos, estas são consideradas importantes devido à frequência com que ocorrem no eucalipto. Normalmente, essas doenças ocorrem por diversas causas, tais como: distúrbios radiculares (má formação no sistema radicial), déficit hídrico, excesso de umidade, estiolamento, afogamento de coleto, assamento de coleto, queima por geada, injúria

por granizo, queima por fogo, quebra de árvores por vento, desequilíbrio nutricional e fitotoxicidade (SANTOS, AUER e GRIGOLETTI JÚNIOR, 2001; ALFENAS e ZAUZA, 2007; ALFENAS *et al.*, 2009).

Há ainda a doença conhecida como “Seca de Ponteiros do Vale do Rio Doce – SPVRD”, considerada complexa por ser inicialmente causada por agentes abióticos (precipitação excessiva), seguida de agentes bióticos (insetos, psilídeos e patógenos secundários). Primeiramente foi constatada na região do Vale do Rio Doce, em Minas Gerais, dando origem ao seu nome. Posteriormente foi verificada nos estados de Amapá, Bahia, Goiás, Maranhão, Pará, Paraná e São Paulo (SANTOS, AUER e GRIGOLETTI JÚNIOR, 2001; ALFENAS *et al.*, 2009; AUER, SANTOS e FURTADO, 2016).

### 3.3 Doenças em viveiros florestais

Para que sejam estabelecidos povoamentos florestais de qualidade é necessário o plantio de mudas florestais de alto padrão. Desta forma, avanços técnicos vêm sendo realizados com o intuito de melhorar a qualidade das mudas assegurando seu bom desenvolvimento após o plantio. O uso de mudas com alto padrão de qualidade resulta no aumento da sobrevivência das mesmas após o plantio, diminui a frequência dos tratamentos culturais e manutenção do povoamento, garantindo um produto de qualidade com menor custo de produção (HOPPE *et al.*, 2004).

Para Alfenas *et al.* (2009) os viveiros são considerados os cartões de visitas das empresas, sendo seu gerenciamento uma tarefa árdua. O sucesso da produção de mudas depende do material genético, condições de manejo, bem como, da experiência, observação, persistência, organização e liderança do viveirista.

Conforme as suas características, os viveiros reúnem condições que favorecem o desenvolvimento e instalação de pragas e doenças. Os viveiros mais tecnificados estão sujeitos à ação desses micro-organismos devido aos seguintes fatores: água em abundância, umidade relativa do ar, temperatura, substrato esterilizado, tecido vegetal tenro, proximidade das mudas, cultivo contínuo da mesma espécie, pois favorecem o surgimento das doenças nesses locais (GRIGOLETTI JÚNIOR, AUER e SANTOS, 2001).

Conforme Ferreira (1989), somados aos fatores ambientais as injúrias causadas na preparação das estacas, atuam como mais um fator favorável ao aparecimento de fungos causadores de lesões ou podridão.

Para a obtenção de uma muda sadia, a qualidade do propágulo vegetativo que lhe deu origem é de suma importância. Quando as mudas são oriundas de material propagativo de baixa qualidade, as mesmas estarão sujeitas ao estresse, ficando mais suscetíveis a ação de fitopatógenos. Assim, sementes e estacas devem estar em sua melhor condição de vigor e sanidade (GRIGOLETTI JÚNIOR, AUER e SANTOS, 2001).

Segundo Grigoletti Júnior, Auer e Santos (2001) os viveiros permanentes estão mais sujeitos ao aparecimento de organismos fitopatogênicos que os viveiros temporários, pois o cultivo contínuo da mesma espécie em uma mesma área irá aumentar o inóculo.

As doenças podem ocorrer nos viveiros nas fases de multiplicação de brotos para estaquia e miniestaquia, enraizamento, aclimatação à sombra e também aclimatação a céu aberto (ALFENAS *et al.*, 2009).

As doenças mais comuns que ocorrem em viveiros de eucalipto são: tombamento de mudas ou "damping-off", podridão de estacas e miniestacas, podridão de raiz, manchas foliares de origem fúngicas e/ou bacteriana, mofo cinzento, oídio e ferrugem (FURTADO *et al.*, 2001; ALFENAS e ZAUZA, 2007; ALFENAS *et al.*, 2009; AUER, SANTOS e FURTADO, 2016). O controle dessas doenças é realizado através das técnicas de manejo que buscam restringir as fontes de inóculo e as condições favoráveis à infecção (ALFENAS e ZAUZA, 2007).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Caracterização da área de estudo

O estudo foi realizado em um viveiro clonal localizado, em Guarapuava/PR. O município de Guarapuava está a uma altitude de 1098 m, na região Centro-Sul do estado do Paraná (IPARDES, 2018). Segundo a classificação climática de Köppen, seu clima predominante é o Cfb (clima temperado), com temperatura média no mês mais frio abaixo de 18 °C, com verões frescos e sem estação seca definida (IAPAR, 2017).

Os experimentos foram realizados em um viveiro comercial de produção de mudas clonais de *E. benthamii*. O viveiro produz, em média, 46.500 mudas por mês, sendo as miniestacas coletadas de 9.300 matrizes. As mudas são produzidas pela técnica de miniestaquia a partir de minicepas do minijardim clonal. O minijardim clonal está implantado em canaletões de fibrocimento, com cobertura de estufim de plástico, em leito de areia (FIGURA 1A).

As mudas clonais são produzidas em tubetes de 50 cm<sup>3</sup> arranjados em bandejas de polipropileno com 216 células, dispostos lado a lado (sem alternância) ocupando 100% da densidade da bandeja. As miniestacas são coletadas no minijardim, processadas e estaqueadas em um galpão, sendo levadas à estufa para enraizamento, sem redução foliar (FIGURA 1B). No período de enraizamento é que se verifica a mortalidade das miniestacas de *E. benthamii*.

O sistema de irrigação *fogger* é utilizado na casa de vegetação, no minijardim clonal a irrigação é realizada através de gotejamento e aspersão, e na casa de aclimação e rustificação ocorre por aspersão. É realizada fertirrigação de crescimento, desenvolvimento e rustificação, sem frequência definida, pois a mesma varia com o desenvolvimento da muda. Para a lavagem dos tubetes e bandejas é utilizado equipamento de lavagem com pressão com água e hipoclorito. A água utilizada na irrigação e lavagem dos tubetes é proveniente de uma nascente e lagoa de captação.

A casa de vegetação é formada por uma estrutura galvanizada, com plástico e sombrite retrátil. As bandejas ficam dispostas sobre o solo, que possui uma camada de brita para drenagem.

FIGURA 1 – ESTRUTURA DO VIVEIRO CLONAL. A: MINIJARDIM CLONAL; B: CASA DE VEGETAÇÃO PARA ENRAIZAMENTO DAS MINIESTACAS.



FONTE: A Autora (2018).

#### 4.2 Amostragem da podridão de miniestacas de *Eucalyptus benthamii*

Foram coletadas plantas com sintomas caracterizadas por podridão basal ou podridão mediana das miniestacas (FIGURA 2A, 2B e 2C). As coletas foram

realizadas em duas épocas distintas do ano: inverno e verão, respectivamente setembro/2016 (1ª coleta) e abril/2017 (2ª coleta). Foram coletados materiais de três clones comerciais: clone B1, clone B2 e clone B3. Para avaliar a podridão de miniestacas, nas duas coletas, foram coletadas 150 miniestacas por clone.

FIGURA 2 – DETALHE DA MORTALIDADE DE MINIESTACAS DE *Eucalyptus benthamii* EM CASA DE VEGETAÇÃO. A: MORTALIDADE DE MINIESTACAS EM REBOLEIRA; B – C: MINIESTACAS APRESENTANDO PODRIDÃO.



FONTE: A Autora (2018).

A ocorrência da doença apresentava-se em toda a casa de vegetação, dessa forma, toda a casa de vegetação foi percorrida, sendo que as miniestacas foram coletadas aleatoriamente ao acaso. Às vezes, verificava-se a presença de reboleiras de miniestacas com podridão e mortas (FIGURA 2A). Posteriormente, as miniestacas foram embaladas em sacos plásticos limpos, identificadas e levadas para análise no laboratório conforme recomendado por Alfenas e Zauza (2007).

### 4.3 Análises laboratoriais

As análises laboratoriais foram realizadas no Laboratório de Patologia Florestal da Embrapa Florestas, em Colombo/PR. Foram realizados três procedimentos para o isolamento dos fungos: câmara úmida e isolamento indireto, seguindo as metodologias propostas por Alfenas *et al.* (2016) e Ferreira (1989):

a) Câmara úmida: as miniestacas foram mantidas em câmara úmida para a indução da formação de estruturas reprodutivas. Para a confecção da câmara úmida, foram utilizadas caixas gerbox desinfestadas com hipoclorito de sódio a 1%, com folhas de papel mata-borrão esterilizadas em autoclave (120 °C, 1,5 atm por 20 min), umedecidas com água ultrapurificada estéril (Milli-Q). Foram dispostas cinco miniestacas lavadas por caixa gerbox, sobre o papel umedecido, sem contato entre as mesmas. A caixa gerbox foi vedada com filme P.V.C e permaneceram incubadas sob luz fluorescente contínua e temperatura ambiente até formarem estruturas de reprodução que possibilitassem a identificação (entre 7 e 14 dias).

b) Isolamento indireto: consistiu na retirada de fragmentos de tecido da região limítrofe entre o tecido sadio e o doente, que foram superficialmente desinfestados. Os fragmentos passaram pelo processo de assepsia que consistiu em: imersão em álcool 70% por 30 s e em hipoclorito de sódio 1% por 1 min, seguido de lavagem com água ultrapurificada estéril, e deixados sobre papel mata-borrão esterilizado para retirar o excesso de água. Após a desinfestação dos fragmentos, os mesmos foram transferidos para placas de Petri contendo meio de cultura, sendo quatro fragmentos por placa. Utilizou-se o meio batata-dextrose-ágar - BDA (39 g de extrato comercial; água ultrapurificada 1000 mL), o meio foi esterilizado em autoclave por 20 min, e depois vertido nas placas de Petri. As placas foram mantidas em câmara de crescimento do tipo B.O.D. (Biochemical Oxygen Demand), com temperatura de  $24 \pm 2$  °C, no escuro, por sete dias. Após o aparecimento de colônias fúngicas, discos de micélio foram transferidos para novas placas de meio BDA, para a obtenção de colônias puras, incubadas nas mesmas condições acima.

#### 4.4 Identificação dos fungos isolados

Para a identificação dos fungos isolados, foi realizada a purificação das culturas, realizada por meio da repicagem de fragmentos de micélio-ágar para placas com meio BDA.

Foram preparadas lâminas semipermanentes. Para tal procedimento foi utilizada a técnica descrita por Mafia e Alfenas (2016). A técnica consiste na utilização de lâmina e lamínula, coradas com solução de Amann modificado (lactoglicerol com azul de metileno). Através da observação microscópica das lâminas foi realizada a identificação, em nível de gênero, dos fungos, utilizando as descrições de fungos de Barnett e Hunter (1972).

Isolados inicialmente identificados como *Cylindrocladium* sp. foram considerados como *Calonectria*. Posteriormente, esses isolados foram enviados para o Laboratório de Patologia Florestal, Universidade Federal de Lavras, para identificação final da espécie por análise molecular.

As culturas purificadas foram mantidas em tubos de ensaio inclinados com meio BDA recobertas com óleo mineral, e por meio do método de Castellani, que consiste na utilização de vidros de antibiótico com água ultrapurificada estéril e lacrados com selos de alumínio. Os tubos de ensaio e os vidros de antibiótico (método de Castellani) foram identificados e armazenados em sala com temperatura controlada a 18 °C (GONÇALVES, ALFENAS e MAFIA, 2016). Os isolados foram armazenados na sala da coleção de Fitopatógenos de Espécies Florestais da Embrapa Florestas, Colombo/PR.

#### 4.5 Teste de patogenicidade

A obtenção de um organismo a partir de uma planta doente, não significa que ele seja o agente causal. Assim, é necessário que sua patogenicidade seja comprovada através dos Postulados de Koch (ALFENAS *et al.*, 2016).

Para testar a patogenicidade foram utilizados os isolados dos fungos que apresentaram maior incidência em associação com a podridão de miniestacas de *E. benthamii*, e os considerados fitopatógenos pela literatura. Foram testados os isolados de: *Botrytis cinerea* Pers., isolados 1, 2 e 3 de *Cylindrocladium* sp., isolados 1 e 2 de *Fusarium* sp. e *Pestalotiopsis* sp. Foram utilizados discos de micélio-ágar de

sete mm de diâmetro, retirados de culturas em meio BDA mantidas em câmara B.O.D., com temperatura de  $24 \pm 2$  °C, no escuro, por sete dias, e inoculados nas bases das miniestacas sadias de *E. benthamii*, e mantidas em câmara úmida.

Utilizou-se dez miniestacas de cada clone (B1, B2 e B3), para cada fungo. As miniestacas foram coletadas em agosto/2017 no minijardim clonal do viveiro. As miniestacas apresentavam cerca de 10 cm de comprimento, e para melhor alocação das miniestacas suas folhas foram cortadas ao meio. As miniestacas foram desinfestadas superficialmente com álcool 70% por 30 s e hipoclorito de sódio 1% por 1 min, seguido de lavagem com água ultrapurificada estéril, e deixadas sobre papel mata-borrão esterilizado para retirar o excesso de água. Como testemunha, as miniestacas foram inoculadas com discos que continham apenas meio BDA.

Para a realização do teste de patogenicidade, foi utilizada a metodologia sugerida por Duin et al. (2017), onde as miniestacas inoculadas foram incubadas em caixas gerbox com papel mata-borrão estéril umedecido, mantidos sob luz fluorescente contínua, em temperatura controlada ( $24 \pm 2$  °C), por 14 dias, quando realizou-se o reisolamento.

As avaliações ocorreram aos sete e 14 dias após a inoculação, verificando se havia a presença de sintomas, e medindo o comprimento das lesões com auxílio de paquímetro digital. O reisolamento consistiu no isolamento indireto dos fragmentos de cada miniestaca em meio BDA, incubados em câmara B.O.D a  $24 \pm 2$  °C, e fotoperíodo de 12 h. Para o reisolamento dos fragmentos, também foi realizada a desinfestação superficial dos mesmos, seguindo as mesmas etapas já citadas anteriormente.

Os dados de patogenicidade foram submetidos ao teste de homogeneidade de variâncias de Bartlett, análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5 %, por meio do programa ASSISTAT®.

#### 4.6 Fontes de inóculo no viveiro

Buscando encontrar as fontes de inóculo dos patógenos, foram coletadas: miniestacas assintomáticas dos minijardins clonais; amostras de substrato novo e usado; areia proveniente dos canaletões dos minijardins clonais; tubetes; e britas que recobrem o solo da casa de vegetação. As amostras foram embaladas em sacos plásticos limpos, lacrados, identificados, levados ao laboratório e mantidos em

refrigeração a 6 °C, antes do processamento. Assim, foram feitos isolamentos a partir de:

a) Miniestacas assintomáticas: foram coletadas, ao acaso, 50 brotações assintomáticas de cada clone no mijardim clonal do viveiro comercial, em setembro/2016 (1ª coleta) e abril/2017 (2ª coleta). As mesmas foram mantidas em câmara úmida. Foram dispostas cinco miniestacas lavadas por caixa gerbox, sobre o papel umedecido, sem contato entre as mesmas. A caixa gerbox foi vedada com filme P.V.C e permaneceram incubadas sob luz fluorescente contínua e temperatura ambiente até formarem estruturas de reprodução que possibilitassem a identificação (entre 7 e 14 dias).

b) Substrato: o substrato novo foi coletado diretamente de embalagens ainda fechadas, onde se coletou três amostras. O substrato usado foi coletado diretamente dos tubetes na casa de vegetação, e foram coletadas três amostras de cada clone. Para o isolamento de fungos foi utilizada a técnica de diluição em série descrita por Mello *et al.* (2011). Diluiu-se 10 g de substrato em 90 mL de água estéril, sendo esta a primeira diluição, a qual foi agitada manualmente, sendo espalhadas 10 µL, 50 µL, e 100 µL da diluição em placas de Petri contendo meio de Martin (5 g de peptona; 0,5 g de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 1 g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 10 mL de solução de rosa bengala na concentração de 1:300; 30 mg de sulfato de estreptomicina; 10 g de dextrose; 20 g de ágar-ágar; 1000 mL de água ultrapurificada). Da primeira diluição, foram retirados 1 mL e diluídos em 9 mL de água, sendo esta a segunda diluição. Este procedimento foi realizado sucessivamente até completar as diluições: 1:10, 1:100, 1:1000 e 1:10000. De cada diluição foram realizados três plaqueamentos. As placas foram incubadas em câmara B.O.D a 24 ± 2 °C, fotoperíodo de 12 horas, até a formação de colônias. Após a formação das colônias, fez-se a identificação dos fungos ao nível de gênero.

c) Areia: foram coletadas três amostras de areia em diferentes canaletões de cada clone. O isolamento da areia se deu através da diluição em série, utilizando os mesmos procedimentos descritos para a diluição do substrato, sendo novamente espalhados 10 µL, 50 µL, e 100 µL da diluição em placas de Petri contendo meio de Martin. As placas foram incubadas conforme descrito para o isolamento de fungos do substrato.

d) Tubetes: foram coletados três tubetes usados de cada clone (coletados no interior da estufa, com miniestacas que apresentavam podridão) e tubetes lavados.

Os tubetes usados foram os mesmos esvaziados para a coleta do substrato usado. Foi utilizada a metodologia proposta por Duin et al. (2017), que consistiu em: lavagem dos tubetes em copo de Béquier esterilizado por autoclavagem com 20 mL de água estéril, na qual os tubetes foram lavados com auxílio de uma escova previamente esterilizada por 1 min em hipoclorito de sódio 1% e enxaguada em água esterilizada. A partir da solução da lavagem, foram coletadas, com micropipeta, alíquotas de 10  $\mu$ L, 50  $\mu$ L, e 100  $\mu$ L da solução e espalhadas em placas de Petri contendo meio de Martin. Cada diluição teve três repetições, sendo as placas incubadas conforme descrito para o isolamento de fungos provenientes do substrato.

e) Britas: foram coletadas três amostras de britas da casa de vegetação, ao redor de bandejas que apresentavam miniestacas sintomáticas. Foi utilizada a metodologia proposta por Duin et al. (2017), na qual foram pesadas 10 g de cada amostra, as quais foram lavadas em 90 mL de água esterilizada. A partir da solução da lavagem, foram coletadas, com micropipeta, alíquotas de 10  $\mu$ L, 50  $\mu$ L, e 100  $\mu$ L da solução e espalhadas em placas de Petri contendo meio de Martin. Cada diluição teve três repetições, sendo as placas incubadas conforme descrito para o isolamento de fungos provenientes do substrato.

Além da diluição em série para substrato e areia, e solução de brita, realizou-se também teste de isca com folha de mamona (*Ricinus communis* L.). O teste foi implantado em caixas gerbox, com duas folhas de papel mata-borrão esterilizadas em autoclave e umedecidas com água ultrapurificada estéril e uma folha nova de mamona. O substrato (FIGURA 3A), a areia (FIGURA 3B) e a brita (FIGURA 3C), foram umedecidos com água ultrapurificada estéril e colocados sobre as folhas, sendo estas perfuradas para a liberação de enzimas estimulantes aos fungos (ALFENAS *et al.*, 2016). O material permaneceu em câmara úmida sob luz constante e temperatura ambiente por sete dias.

FIGURA 3 – TESTE COM ISCA COM FOLHA DE MAMONA PARA AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE FUNGOS. A: SUBSTRATO USADO; B: AREIA DO CANALETÃO; C: BRITA DA CASA DE VEGETAÇÃO.



FONTE: A Autora (2018).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Fungos presentes em miniestacas de *Eucalyptus benthamii*

Na primeira coleta (setembro/2016), foram encontrados oito gêneros de fungos por meio do isolamento indireto: *Botrytis*, *Colletotrichum*, *Dendryphiopsis*, *Fusarium*, *Gliocladium*, *Pestalotiopsis*, *Trichoderma* e *Verticillium* (TABELA 1). *Pestalotiopsis* sp. foi o fungo de maior incidência média (61%), para todos os clones, seguido por *Trichoderma* sp. (10,6%), *Fusarium* sp. (9%), *Gliocladium* sp. (8%) e *Colletotrichum* sp. (5,3%). *B. cinerea* foi encontrado apenas no clone B1. Na técnica da câmara úmida, foram identificados sete gêneros de fungos: *Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Calonectria*, *Fusarium*, *Gliocladium*, *Pestalotiopsis* e *Verticillium*

Na segunda coleta (abril/2017), foram isolados oito gêneros de fungos por meio do isolamento indireto: *Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Cylindrocladium*, *Fusarium*, *Gliocladium*, *Pestalotiopsis*, *Trichoderma* e *Verticillium* (TABELA 1). O isolado *Cylindrocladium* sp. foi o fungo que apresentou maior incidência média (51,7%) para todos os clones estudados, seguido por *Pestalotiopsis* sp. (19,3%), *Fusarium* sp. (11,3%), *Trichoderma* sp. (8,7%) e *Gliocladium* sp. (4,3%). Na técnica da câmara úmida, foram identificados sete gêneros de fungos: *Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Calonectria*, *Gliocladium*, *Pestalotiopsis*, *Phomopsis* e *Verticillium* (TABELA 1).

Dos fungos encontrados são considerados patógenos e possíveis causadores da mortalidade de miniestacas: *B. cinerea*, *Colletotrichum* sp., *Cylindrocladium* sp., *Fusarium* sp. e *Pestalotiopsis* sp. (SANTOS, AUER e GRIGOLETTI JÚNIOR, 2001; ALFENAS e ZAUZA, 2007; ALFENAS, et. al. 2009; AUER e SANTOS, 2010; AUER, SANTOS e FURTADO, 2016). Os autores citam ainda *Rhizoctonia solani* Kuhn, como causador da mortalidade de miniestacas de *Eucalyptus* sp., porém o mesmo não foi encontrado nos isolamentos.

TABELA 1 – INCIDÊNCIA (%) DE FUNGOS ASSOCIADOS COM A MORTALIDADE DE MINIESTACAS DE TRÊS CLONES (B1, B2 e B3) DE *Eucalyptus benthamii* EM DUAS ÉPOCAS DE COLETA (SETEMBRO/2016 E ABRIL/2017) OBTIDOS EM CÂMARA ÚMIDA E MEIO BATATA DEXTROSE ÁGAR (BDA).

FUNGOS	SETEMBRO/2016							ABRIL/2017						
	CÂMARA ÚMIDA			MEIO BDA			MÉDIA	CÂMARA ÚMIDA			MEIO BDA			MÉDIA
	B1	B2	B3	B1	B2	B3		B1	B2	B3	B1	B2	B3	
<i>Botrytis cinerea</i>	-	-	-	7	-	-	2,3	-	-	-	-	-	-	-
<i>Cladosporium</i> sp.	X	X	X	-	-	-	-	X	X	X	-	3	-	1,0
<i>Colletotrichum</i> sp.	X	-	X	3	5	8	5,3	-	X	X	1	-	-	0,3
<i>Cylindrocladium</i> sp.	X	X	X	-	-	-	-	X	X	X	45	33	77	51,7
<i>Calonectria</i> sp.	-	-	-	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-
<i>Dendryphiopsis</i> sp.	-	-	-	-	2	2	1,3	-	-	-	-	-	-	-
<i>Fusarium</i> sp.	X	X	X	11	6	10	9,0	-	-	-	9	17	8	11,3
<i>Gliocladium</i> sp.	X	X	X	17	3	4	8,0	X	X	X	6	7	-	4,3
<i>Pestalotiopsis</i> sp.	X	X	X	44	78	61	61,0	X	X	X	20	27	11	19,3
<i>Phomopsis</i> sp.	-	-	-	-	-	-	-	X	X	X	-	-	-	-
<i>Trichoderma</i> sp.	-	-	-	13	5	14	10,6	-	-	-	12	10	4	8,7
<i>Verticillium</i> sp.	X	X	X	5	1	1	2,3	X	X	X	7	3	-	3,3

(X) presente; (-) ausente

A identificação dos isolados de *Cylindrocladium* por meio de análise molecular revelou que os isolados inicialmente denominados como *Cylindrocladium* sp. foram provisoriamente classificados como pertencentes ao Complexo *Calonectria scoparia* (FERREIRA, 2018; comunicação pessoal).

Schultz (2011) encontrou em viveiros de *E. benthamii*, o fungo *B. cinerea* causando podridão de miniestacas. Esse fungo, um dos causadores da podridão de estacas, foi encontrado apenas no clone B1 e em baixa frequência (7%). Isso indica que o clone B1 pode ser mais suscetível à ação de *B. cinerea* em relação aos demais clones.

*Pestalotiopsis* sp. encontrado em alta frequência nos isolamentos também foi relatado por Schultz (2011) em associação com o anelamento da haste de mudas e manchas foliares em *E. benthamii*. Alfenas e Zauza (2007) e Alfenas *et al.* (2009) citaram *Pestalotiopsis* sp. causando o anelamento da haste de estacas e miniestacas em outras espécies de eucalipto, relacionando-o como patógeno secundário ou fraco, pois sempre se encontra associado a hospedeiros debilitados ou que contenham injúrias causadas no preparo das estacas e miniestacas. Ainda como patógeno secundário para a podridão de miniestacas de *Eucalyptus* spp., há relatos da presença de *Botryosphaeria ribis* (AUER e SANTOS, 2010; AUER, SANTOS e FURTADO, 2016).

Não se verificou relatos de *Fusarium* sp. associado a morte de miniestacas em eucalipto. Santos, Auer e Grigoletti Júnior (2001), relataram a presença de *Fusarium* sp. relacionado a podridão de raízes, bem como *Phytophthora* sp. e *Pythium* sp. Auer, Grigoletti Júnior e Maschio (1995), relataram a ocorrência de *Fusarium* spp. associado à morte de macroestacas de erva-mate, bem como *Colletotrichum* sp. e *Ceratocystis minuta* (Siem.) Hunt.

Com relação às épocas de coleta, final de inverno (setembro/2016) e final de verão (abril/2017), houve diferenciação em relação à frequência e ocorrências dos fungos. *B. cinerea* foi encontrado apenas na coleta do final de inverno, setembro/2016 e em apenas um clone. *Pestalotiopsis* sp., foi encontrado nas duas épocas em todos os clones, porém com maior frequência na coleta do final de inverno, setembro/2016. *Fusarium* sp., também foi encontrado nas duas épocas e em todos os clones, com frequências similares em ambas as épocas. Porém, na câmara úmida *Fusarium* sp. não foi encontrado na coleta do final do verão (abril/2017). Com relação ao isolado do Complexo *Calonectria scoparia* (Complexo

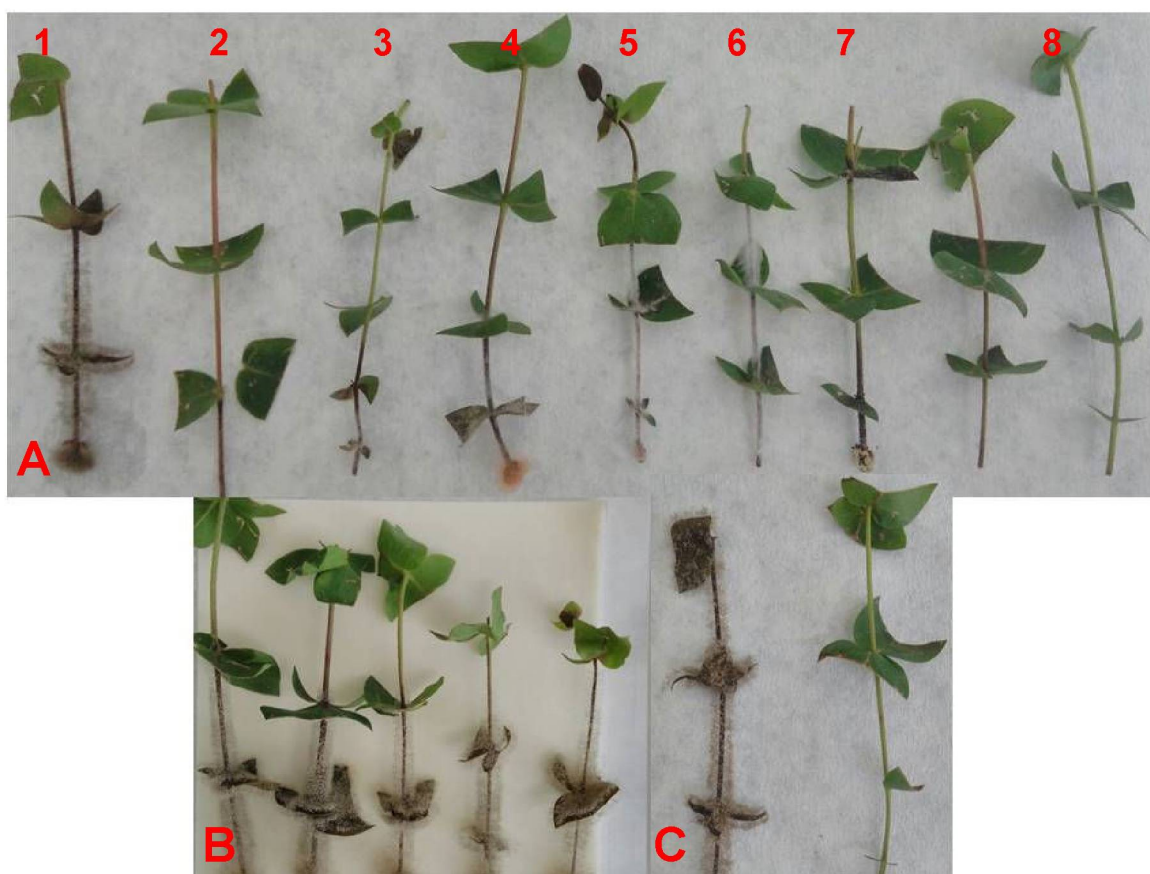
Cs), foi verificado no isolamento indireto apenas na coleta do final do verão (abril/2017), em alta frequência. Na câmara úmida, peritécios do Complexo Cs foram verificados em ambas as coletas, apresentando no clone B2 sua fase teleomórfica. Os resultados, tanto para *B. cinerea* e Complexo Cs, foram diferentes dos encontrados por Cabel (2014), no qual a autora não relatou correlação entre a incidência de doenças bióticas, causadas pelos referidos fungos, com as condições ambientais presentes em casas de vegetação.

## 5.2 Patogenicidade de fungos em miniestacas de *E. benthamii*

Após sete dias de inoculação todas as miniestacas apresentavam lesões que haviam progredido para podridão, sendo assim todos os isolados testados foram considerados patogênicos. Após 14 dias de incubação todas as miniestacas em que havia sido inoculado o isolado de *B. cinerea* apresentaram lesão em todo o seu comprimento. As miniestacas que foram inoculadas o isolado 2 do Complexo Cs, os isolados 1 e 2 de *Fusarium* sp. e *Pestalotiopsis* sp. apresentaram lesão em mais de 50% de seu comprimento, confirmando as informações de Alfenas *et al.* (2009), Auer, Santos e Furtado (2016), que citaram espécies do gênero *Cylindrocladium* (= *Calonectria*) e *B. cinerea* como causadores da podridão de miniestacas de eucalipto. Carvalho, Alfenas e Demuner (1989), também comprovaram a patogenicidade de espécies do gênero *Cylindrocladium* (= *Calonectria*), em macroestacas de eucalipto, bem como a patogenicidade de *Fusarium* spp (FIGURA 4). Na testemunha também ocorreram lesões, porém as mesmas podem ser provenientes da injúria causada pela coleta das miniestacas.

Com relação ao tamanho das lesões, houve diferença significativa entre clones e entre os isolados (TABELA 2). O clone B2 foi mais suscetível do que os outros dois clones. Em média, tanto após sete dias ou 14 dias, os clones foram mais suscetíveis ao ataque de *Botrytis cinerea* do que os demais isolados. *Pestalotiopsis* sp. é considerado patógeno secundário ou fraco, sendo encontrado associado às manchas foliares e anelamento da haste (ALFENAS, *et al.*, 2009; SCHULTZ, 2011), porém deve-se atenção especial a este fungo, pois o mesmo apresentou lesões médias maiores ou próximas as causadas pelo isolado do Complexo Cs (TABELA 2). No reisolamento dos patógenos inoculados, houve recuperação de todos os isolados, cujas frequências variaram de 73,3 a 96,7% (TABELA 3).

FIGURA 4 – PATOGENICIDADE DOS FUNGOS À MINIESTACAS DE *Eucalyptus benthamii*. A: MINIESTACAS APÓS SETE DIAS DE INOCULAÇÃO – 1. *Botrytis cinerea*, 2. ISOLADO 1 - Complexo Cs, 3. ISOLADO 2 - Complexo Cs., 4. ISOLADO 3 - Complexo Cs., 5. ISOLADO 1 - *Fusarium* sp., 6. ISOLADO 2 - *Fusarium* sp., 7. *Pestalotiopsis* sp., 8. TESTEMUNHA; B: MINIESTACAS INOCULADAS COM *Botrytis cinerea* APÓS SETE DIAS; C: COMPARAÇÃO DE MINIESTACA INOCULADA COM *Botrytis cinerea* E TESTEMUNHA APÓS 14 DIAS DE INOCULAÇÃO.



FONTE: A autora (2018).

TABELA 2 – TAMANHO MÉDIO (MM) DA LESÃO EM MINIESTACAS DE *Eucalyptus benthamii* INOCULADAS COM ISOLADOS DE *Botrytis cinerea*, Complexo Cs, *Fusarium* sp. e *Pestalotiopsis* sp., APÓS SETE E QUATORZE DIAS DE INCUBAÇÃO À 24 ± 2 °C.

AVALIAÇÃO (SETE DIAS)							
CLONE	<i>Botrytis cinerea</i>	Isolado 1	Complexo Cs Isolado 2	Isolado 3	Fusarium sp. Isolado 1	Isolado 2	<i>Pestalotiopsis</i> sp.
	LESÃO (mm)	LESÃO (mm)	LESÃO (mm)	LESÃO (mm)	LESÃO (mm)	LESÃO (mm)	LESÃO (mm)
B1	49,8 a*	15,4 ab	22,6 a	24,4 a	21,2 a	23,1 a	18,2 a
B2	52,5 a	16,9 a	24,7 a	15,2 b	18,8 a	24,3 a	28,9 a
B3	29,4 b	12,2 b	16,6 b	13,9 b	9,2 b	15,5 a	25,3 a
Média	43,9 A	14,8 C	21,3 BC	17,8 C	16,4 C	20,9 BC	24,1 B
CV (%)				42,4			
AVALIAÇÃO (QUATORZE DIAS)							
CLONE	LESÃO (mm)	LESÃO (mm)	LESÃO (mm)	LESÃO (mm)	LESÃO (mm)	LESÃO (mm)	LESÃO (mm)
	LESÃO (mm)	LESÃO (mm)	LESÃO (mm)	LESÃO (mm)	LESÃO (mm)	LESÃO (mm)	LESÃO (mm)
B1	77,9 a	31,9 a	40,9 a	44,2 a	42,3 a	40,6 a	47,2 a
B2	78,5 a	32,7 a	51,1 a	43,9 a	44,2 a	47,6 a	40,5 ab
B3	67,3 b	30,8 a	35,9 b	28,5 b	32,7 a	31,7 a	35,0 b
Média	74,6 A	31,8 C	42,6 B	38,9 BC	39,7 BC	39,9 BC	39,4 BC
CV (%)				32,3			

\*Médias seguidas por letras minúsculas distintas na coluna e maiúsculas na linha diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%

TABELA 3 – PERCENTUAL DE RECUPERAÇÃO DOS FUNGOS INOCULADOS, APÓS O TESTE DE PATOGENICIDADE

ISOLADO		RECUPERAÇÃO (%)
<i>Botrytis cinerea</i>		73,3
Complexo Cs	Isolado 1	80,0
	Isolado 2	86,7
	Isolado 3	80,0
<i>Fusarium</i> sp.	Isolado 1	90,0
	Isolado 2	96,7
<i>Pestalotiopsis</i> sp.		86,7

Com o teste de patogenicidade foi possível verificar a diferença entre a agressividade dos fungos para a espécie, isto já havia sido demonstrado por Paradela, Bedendo e Krügner (1999), onde havia sido inoculado *Botryosphaeria* sp., *Colletotrichum* sp. e *Cylindrocladium* sp. em um híbrido de *E. grandis* x *E. urophylla* e apresentaram diferenças significativas quanto ao tamanho da lesão causada pelos respectivos fungos mostrando a agressividade dos mesmos para o híbrido.

### 5.3 Fontes de inóculo no viveiro

Nas miniestacas assintomáticas foram isolados oito gêneros fúngicos (TABELA 4), sendo quatro considerados causadores da podridão de miniestacas: *Colletotrichum*, Complexo Cs, *Fusarium* e *Pestalotiopsis*. Após sete dias em câmara úmida, todas as estacas apresentavam algum fungo. Em todas as estacas com lesões escuras foi verificada a presença de *Pestalotiopsis* sp. Paradela, Bedendo e Krügner (1999) ao analisarem estacas assintomáticas de um híbrido de *E. grandis* x *E. urophylla*, também obtiveram isolados de *Colletotrichum* sp., *Cylindrocladium* sp. e *Fusarium* sp. Duin et al. (2017), relatou a presença de *Colletotrichum* sp., *Calonectria polizzi* Lombard, Crous & Wingf., *Fusarium* sp. e *Pestalotiopsis* sp. ao isolar fungos de miniestacas assintomáticas de acácia-negra

Com relação aos tubetes lavados, foram encontrados praticamente os mesmos fungos das miniestacas assintomáticas (TABELA 4), indicando falhas no processo de higienização do material. *Pestalotiopsis* sp. isolado de miniestacas com apodrecimento também foi isolado dos tubetes. *Pestalotiopsis* sp. foi relatado por Duin et al. (2017) em tubetes lavados de miniestacas de acácia-negra, a qual encontrou ainda *Fusarium* sp. Desta forma, tubetes lavados podem ser considerados fonte de inóculo para os referidos fungos.

TABELA 4 – FUNGOS ENCONTRADOS EM DIFERENTES FONTES DE INÓCULO NO VIVEIRO CLONAL COM MORTALIDADE DE MINIESTACAS DE *Eucalyptus benthamii*.

FUNGO	FUNTE DE INÓCULO					
	MINIESTACA SEM SINTOMA	TUBETE LAVADO	BRITA	AREIA	SUBSTRATO USADO	SUBSTRATO NOVO
<i>Aspergillus</i> sp.	-	+	-	-	+	+
<i>Chaetomium</i> sp.	-	+	-	-	-	-
<i>Cladosporium</i> sp.	+	+	-	+	-	-
<i>Colletotrichum</i> sp.	+	-	-	-	-	-
Complexo Cs	+	-	+	-	+	-
<i>Fusarium</i> sp.	+	-	+	+	+	-
<i>Gliocladium</i> sp.	+	+	-	-	+	+
<i>Penicillium</i> sp.	-	+	-	+	+	+
<i>Pestalotiopsis</i> sp.	+	+	+	+	+	-
<i>Phomopsis</i> sp.	+	-	-	-	-	-
<i>Trichoderma</i> sp.	-	+	+	+	+	+
<i>Verticillium</i> sp.	+	+	-	-	+	+
<i>Xylaria</i> sp.	-	+	-	-	-	-

(+) presente; (-) ausente

No caso da brita da casa de vegetação, foram encontrados: Complexo Cs, *Fusarium* sp. e *Pestalotiopsis* sp. que são considerados patogênicos. Ao avaliar o piso da casa de vegetação de um viveiro de acácia-negra, Duin et al. (2017), encontrou fungos pertencentes aos mesmos gêneros (*Calonectria*, *Fusarium* e *Pestalotiopsis*), demonstrando o risco da disseminação do piso da casa de vegetação para miniestacas na mesa suspensa. No caso deste viveiro de *E. benthamii*, as bandejas não se encontram suspensas, mas diretamente sobre o piso da casa de vegetação, facilitando a disseminação dos patógenos para as miniestacas. Assim, recomenda-se o tratamento das britas que compõem o piso da casa de vegetação, bem como sua troca regularmente.

Na areia dos canaletões, foram isolados *Fusarium* sp. e *Pestalotiopsis* sp. contrariando o que foi relatado por Duin et al. (2017), onde em minijardins clonais de acácia-negra, no qual não foram encontrados organismos fitopatogênicos. A presença desses fitopatógenos pode se dar devido à ausência de quebra-vento ao redor do viveiro e a proximidade do mesmo com áreas de cultivos agrícolas. Reis e Santos (1985), ao testarem a armadilha tipo cata-vento para verificar a população de *Helminthosporium sativum* no ar concluíram que havia o transporte de propágulos do fungo pelo vento, desta forma a proximidade do viveiro com áreas de cultivos agrícolas e a falta de quebra-vento podem estar associados à presença de *Fusarium* sp. e *Pestalotiopsis* sp. na areia do canaletão.

Com relação ao substrato, não foram encontrados fungos considerados fitopatogênicos no substrato novo, mostrando sua qualidade sanitária e reduzindo a possibilidade de servir como fonte de inóculo. No substrato usado, foram encontrados *Calonectria*, *Fusarium* sp. e *Pestalotiopsis* sp. indicando que seu reuso pode aumentar o risco de infestação dos tubetes, casa de vegetação e miniestacas sadias.

Utilizando a isca de folha de mamona, foram encontrados Complexo Cs, *Cladosporium* sp., *Fusarium* sp. e *Pestalotiopsis* sp. na areia, brita e substrato usado. Alfenas *et al.* (2016), indicaram a utilização da isca de folha de mamona para verificar a presença de *Cylindrocladium* sp. em substrato, porém a mesma pode ser utilizada para indicar a presença de outros fitopatógenos e em diferentes materiais, como brita e areia.

Tubetes e bandejas devem ser previamente lavados com jatos de água sob pressão ou em tambores rotativos, para que seja removido o máximo de resíduos de substrato e solo aderidos nos mesmos, e após o processo de lavagem devem ser desinfestados por imersão em água quente (80 °C). Além de erradicar os inóculos fitopatogênicos, a desinfestação térmica pode favorecer o aumento de enraizamento e da massa do sistema radicular (ALFENAS, *et al.*, 2009).

Desta forma, miniestacas assintomáticas, tubetes, brita da casa de vegetação, areia dos canaletões e substrato usado, podem ser considerados fontes de inóculo dos patógenos encontrados causando podridão em miniestacas de *E. benthamii*.

## 6 CONCLUSÕES

- Os fungos *Botrytis cinerea*, Complexo *Calonectria scoparia*, *Fusarium* spp. e *Pestalotiopsis* sp. foram considerados os agentes causais da mortalidade de miniestacas de *Eucalyptus benthamii*.
- Miniestacas assintomáticas, tubetes, brita, areia e substrato usado são considerados fontes de inóculo para os patógenos causadores da podridão de miniestacas.
- Os isolados de *Botrytis cinerea* e *Pestalotiopsis* sp., foram os mais agressivos às miniestacas.

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

De acordo com os resultados encontrados neste trabalho, algumas recomendações silviculturais podem ser feitas em relação ao controle da mortalidade de miniestacas clonais de *E. benthamii*:

- Utilizar matrizes sadias e com alta capacidade de enraizamento;
- Realizar a desinfestação, com álcool e hipoclorito de sódio, das ferramentas de poda;
- Reduzir a área foliar das miniestacas durante sua produção para evitar o acúmulo de água nas mesmas;
- Desinfestar a betoneira utilizada para umedecer o substrato;
- Não reutilizar substrato;
- Lavar tubetes e bandejas com jatos de água sob pressão ou em tambores rotativos, e posteriormente desinfestá-los por imersão em água quente (80 °C) por 1 min;
- Manter as mudas em canteiros suspensos e bem espaçadas, para facilitar a aeração, entrada de luz e evitar a contaminação das mesmas pelos patógenos existentes no solo/piso;
- Substituir as britas por cimento ou trocar as britas com frequência para eliminar os inóculos de fungos fitopatogênicos, bem como desinfestar as mesmas com a pulverização de hipoclorito de sódio;
- Estabelecer boas práticas de manejo no viveiro para eliminar os fitopatógenos.

## REFERÊNCIAS

- ALFENAS, A.C.; FERREIRA, F.A.; ALFENAS, R.F. Inoculação de fungos fitopatogênicos. In: ALFENAS, A.C.; MAFIA, R.G. **Métodos em Fitopatologia**. 2ª Edição. Viçosa (MG): Editora UFV, 2016, p. 123 – 144.
- ALFENAS, A.C.; FERREIRA, F.A.; MAFIA, R.G.; GONÇALVES, R.C. Isolamento de fungos fitopatogênicos. In: ALFENAS, A.C.; MAFIA, R.G. **Métodos em Fitopatologia**. 2ª Edição. Viçosa (MG): Editora UFV, 2016, p. 55 – 93.
- ALFENAS, A.C.; ZAUZA, E.A.V. **Doenças na cultura do eucalipto**. Sociedade de Investigações Florestais, Viçosa, 2007. 164 p.
- ALFENAS, A.C.; ZAUZA, E.A.V.; MAFIA, R.G.; ASSIS, T.F. **Clonagem e doenças do eucalipto**. 2ª Edição. Viçosa, MG. Editora UFV, 2009. 500 p.
- AUER, C.G.; GRIGOLETTI JÚNIOR, A.; MASCHIO, L.M. de A. **Doenças fúngicas em erva-mate (*Ilex paraguariensis*)**. Colombo: Embrapa – CNPF, 1995. 2 p. (Embrapa – CNPF, Pesquisa em Andamento, 1).
- AUER, C.G.; SANTOS, A.F. dos. Principais doenças em viveiros de eucalipto. In: DUTRA, L.F.; WENDLING, I. **Produção de mudas de eucalipto**. Colombo: Embrapa Florestas, 2010. 184 p.
- AUER, C.G.; SANTOS, A.F. dos; FURTADO, E.L. Doenças do eucalipto. In: AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. (Org.). **Manual de Fitopatologia**. 5ª Edição. Ouro Fino: Editora Agronômica Ceres Ltda., 2016, v. 2, p. 359 – 372.
- BARNETT, H.L.; HUNTER, B.B. **Illustrated genera of imperfect fungi**. 3. Ed. New York: MacMillan, 1972. 241 p.
- CABEL, S.R. **Relações entre condições meteorológicas com a ministaquia e incidência de doenças bióticas em viveiro clonal de eucalipto no sul do Brasil**. Curitiba, 2014. 73 p. Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

CARVALHO, A.O.; ALFENAS, A.C.; DEMUNER, N.L. Patogenicidade de fungos isolados de estacas de eucalipto para enraizamento, em casa de vegetação. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 14, n. 2, p. 122. 1989 (Resumo 055).

DUIN, I.M.; HIGA, A.R.; SANTOS, A.F. dos; COELHO, T.A.V.; REZENDE, E.H.; AUER, C.G. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 43, n. 4, p. 297-302. 2017.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO. **Global Forest Resources Assessment 2000** – Main report. FAO Forestry Paper. ISSN 0258-6150, 2000. 479 p. Disponível em: <[www.fao.org/forestry/fo/fra/main/index.jsp](http://www.fao.org/forestry/fo/fra/main/index.jsp)>. Acesso em 15 nov 2017.

FERREIRA, F.A. **Patologia florestal**: principais doenças florestais no Brasil. Sociedade de Investigações Florestais, 1989. 570 p.

FURTADO, E.L.; SANTOS, C.A.G.; TAKAHASHI, S.S.; CAMARGO, F.R.A. **Doenças em viveiro de *Eucalyptus* sp.**: diagnóstico e manejo. Botucatu: Votorantim Celulose e Papel, Unidade Florestal, 2001. 23 p. (Boletim Técnico n.1).

GRIGOLETTI JÚNIOR, A.; AUER, C.G.; SANTOS, A.F. dos. **Estratégia de Manejo de Doenças em Viveiros Florestais**. Colombo, PR. Embrapa Florestas. Ministério da Agricultura. Circular Técnica 47, 2001.

GOLDEN TREE REFLORESTADORA – Disponível em: <<http://www.goldentreereflorestadora.com.br/mainpage.php>>. Acesso em 12 dez 2017.

GONÇALVES, R.C.; ALFENAS, A.C.; MAFIA, R.G. Armazenamento de microrganismos em cultura com ênfase em fungos fitopatogênicos. In: ALFENAS, A.C.; MAFIA, R.G. **Métodos em Fitopatologia**. 2ª Edição. Viçosa (MG): Editora UFV, 2016, p. 94 – 106.

HIGA, R.C.V.; PEREIRA, J.C.D. **Usos potenciais do *Eucalyptus benthamii* Maiden et Cabbage**. Colombo, PR. Embrapa Florestas. Comunicado Técnico 100, 2003.

HOPPE, J.M.; BRUN, E.J. **Produção de sementes e mudas florestais**. Santa Maria: Editora, 2004. 125 p. (Caderno Didático).

HOPPE, J.M.; SCHUMACHER, M.V.; QUEVEDO, F.F.; GENRO, C.J. M.; THOMAS, R.; VIVIAN, J.C.; FONTTANA, T. **Uso do bacsol na decomposição de resíduos orgânico urbano**. Santa Maria: UFSM-FATEC, 2004. 119p.

Instituto Agrônomo do Paraná – IAPAR. **Cartas Climáticas do Paraná – Classificação Climática**. Londrina, PR. Disponível em: <<http://www.iapar.br/pagina-863.html>>. Acesso em 12 dez 2017.

Indústria Brasileira de Árvores – IBÁ. **Relatório Anual 2017 – ano base 2016**. Brasília: IBÁ, 2017. 80 p.

Instituto Paranaense de Desenvolvimento Econômico e Social – IPARDES. **Caderno Estatístico – Município de Guarapuava**. Curitiba, PR. Janeiro 2018. 44 p.

MAFIA, R.G.; ALFENAS, A.C. Preparações e observações microscópicas de espécimes fúngicos. In: ALFENAS, A.C.; MAFIA, R.G. **Métodos em Fitopatologia**. 2ª Edição. Viçosa (MG): Editora UFV, 2016, p. 207 – 224.

MELLO, S.C.M. de; REIS, A.; SILVA, J.B.T. da. **Manual de curadores de germoplasma – micro-organismos: fungos filamentosos**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2011. 25 p.

MORA, A.L.; GARCIA, C.H. **A cultura do eucalipto no Brasil**. São Paulo, SP. São Paulo: Sociedade Brasileira de Silvicultura, 2000. 112 p.

PALUDZYSZYN FILHO, E.; SANTOS, P.E.T.; FERREIRA, C.A. **Eucaliptos indicados para plantio no estado do Paraná**. Colombo: Embrapa Florestas, 2006. 45 p. (Embrapa Florestas. Documentos, 129).

PARADELA, A.L.; BEDENDO, I.P.; KRÜGNER, T.L. Comunidade fúngica associada a brotações de *Eucalyptus* em jardim clonal e seu envolvimento na etiologia da podridão de estacas utilizadas para produção de mudas. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 25, n. 2, p. 144-151, 1999.

PEREIRA, J.C.D.; STURION, J.A.; HIGA, A.R.; HIGA, R.C.V.; SHIMIZU, J.Y. **Características da madeira de algumas espécies de eucalipto plantadas no Brasil**. Colombo: Embrapa Florestas, 2000. 113 p. (Embrapa Florestas. Documentos, 38).

REIS, E.M.; SANTOS, H.P. dos. População de *Helminthosporium sativum* no ar quantificado através de uma armadilha tipo cata-vento. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 10, p. 515-519, 1985.

SANTOS, A.F. dos.; AUER, C.G.; GRIGOLETTI JÚNIOR, A. **Doenças do eucalipto no sul do Brasil**: identificação e controle. 2001. 20 p. (Circular Técnica 45 – Embrapa).

SCHULTZ, B. **Levantamento de doenças bióticas e abióticas em *Eucalyptus benthamii* Maiden nos estados do Paraná e Santa Catarina**. Curitiba, 2011. 101 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

SILVA, F.de A.S.e.; AZEVEDO, C.A.V. de. **The Assistat Software Version 7.7** and its use in the analysis of experimental data. *Afr. J. Agric. Res*, v. 11, n.39, p.3733-3740, 2016.