

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA FLORESTAL**

***Ceratocystis fimbriata* Ellis & Halsted EM ESPÉCIES
FLORESTAIS NO RIO GRANDE DO SUL:
COMPORTAMENTO E CONTROLE BIOLÓGICO**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Ricardo Mezzomo

Santa Maria, RS, Brasil

2014

***Ceratocystis fimbriata* Ellis & Halsted EM ESPÉCIES
FLORESTAIS NO RIO GRANDE DO SUL:
COMPORTAMENTO E CONTROLE BIOLÓGICO**

Ricardo Mezzomo

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, Área de Concentração em Silvicultura, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Engenharia Florestal**

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Marlove Fátima Brião Muniz

Santa Maria, RS, Brasil

2014

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Mezzomo, Ricardo
Ceratocystis fimbriata Ellis & Halsted em espécies florestais no Rio Grande do Sul: comportamento e controle biológico / Ricardo Mezzomo.-2014.
78 f.; 30cm

Orientadora: Marlove Fátima Brião Muniz
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, RS, 2014

1. Murcha-de-ceratocystis 2. Patogenicidade 3. Espécies nativas I. Muniz, Marlove Fátima Brião II. Título.

© 2014

Todos os direitos autorais reservados a Ricardo Mezzomo. A reprodução de partes ou de todo deste trabalho só poderá ser feita mediante citação da fonte.

Endereço: Departamento de Defesa Fitossanitária, Centro de Ciências Rurais, Prédio 42 - Campus Universitário, Universidade Federal de Santa Maria, CEP: 97105-900 - Santa Maria/RS.

Fone: (55) 3220-8015; e-mail: mezzomoricardo@hotmail.com

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal**

A comissão examinadora, abaixo assinada, aprova a
Dissertação de Mestrado

***Ceratocystis fimbriata* Ellis & Halsted EM ESPÉCIES FLORESTAIS
NO RIO GRANDE DO SUL: COMPORTAMENTO E CONTROLE
BIOLÓGICO**

elaborada por
Ricardo Mezzomo

como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Engenharia Florestal

COMISSÃO EXAMINADORA:

Marlove Fátima Brião Muniz, Dr^a. (UFSM)
(Presidente/Orientador)

Stela Maris Kulczynski, Dr^a. (UFSM/CESNORS)

Igor Poletto, Dr. (UNIPAMPA)

Santa Maria, 25 de fevereiro de 2014.

*À minha mãe Iria Teresinha, pelo amor, apoio e carinho em todos os momentos da minha vida.
Dedico e ofereço.*

AGRADECIMENTOS

À Deus pela vida e pelas oportunidades disponíveis durante toda minha vida.

À toda minha família em especial a minha mãe Iria Teresinha, pelo amor, apoio e incentivo.

À Universidade Federal de Santa Maria que, através do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, oportunizou a realização desta dissertação.

Ao órgão financiador CAPES, pelo apoio financeiro com a concessão da bolsa de mestrado.

À Prof^a. Dra. Marlove Fátima Brião Muniz, pela orientação e oportunidade. As professoras Dra. Maristela Machado Araújo, Dra. Lia Rejane Silveira Reiniger, e o Dr. Álvaro Figueredo dos Santos pela Co-Orientação deste trabalho e ajuda nos momentos em que foram solicitados.

À banca examinadora, constituída pela Prof^a. Dra. Stela Maris Kulczynski e Prof. Dr. Igor Poletto.

À Pro-Reitoria de Infraestrutura através do Setor de Transportes pela disponibilidade do caminhão e do motorista Cláudio para o transporte das mudas.

Ao Coordenador do PPGEF Prof. Dr. Frederico Dimas Fleig pela disponibilidade.

Às secretárias do PPGEF Cerlene Machado e Rone Maria, pela paciência e atenção durante o desenvolvimento deste trabalho.

A toda equipe do Viveiro Florestal da UFSM em especial aos funcionários Elio e Gervásio pela ajuda na execução nos trabalhos à campo.

Às Dr^a.(s). Marília Lazarotto e Paola Mendes Milanesi pela amizade e ensinamentos enriquecendo o desenvolvimento deste trabalho.

À Dr^a. Graziela Piveta por disponibilizar os isolados testados neste trabalho, além da amizade, companheirismo sempre que solicitada.

Às colegas de mestrado Anna Paula Lora Zimmermann, Roselene Marostega Felker, Suelen Carpenedo Aimi e Thaíse da Silva Tonetto.

Às colegas da Fitopatologia que integraram a “equipe de inoculações”: Clair Walker, Caciara Gonzatto Maciel, Geisa Finger, especialmente as acadêmicas Camila Shultz Pollet, Daniele Lemos Brum e Marciéli Pitorini Bovolini pela ajuda,

disponibilidade, e principalmente pela excelência e apoio durante a execução dos trabalhos.

Aos demais colegas do laboratório de Fitopatologia: Laura Pereira Vargas, Gisele Noal, Ricardo Feliciano dos Santos, Daniele Cardoso, Emanuele Junges, Bruna de Oliveira Bastos, Leíse Hekcler, Cláudia Braga Dutra, Evandro Missio, Tales Poletto, Janaíne Pedroso, Gerarda Beatriz, Fábio Hamann, Jucéli Müller, Patrícia Migliorini.

Aos funcionários do Departamento de Defesa Fitossanitária, Angelita Sangoi Martins, Marizete Possobom, Fernando Gnocatto e, especialmente, Maria Nevis Deconto Weber pelos ensinamentos, amizade e carinho.

A todos um sincero muito obrigado.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal
Universidade Federal de Santa Maria

***Ceratocystis fimbriata* Ellis & Halsted EM ESPÉCIES FLORESTAIS NO RIO GRANDE DO SUL: COMPORTAMENTO E CONTROLE BIOLÓGICO**

AUTOR: RICARDO MEZZOMO
ORIENTADOR: MARLOVE FÁTIMA BRIÃO MUNIZ
Santa Maria, 25 de fevereiro de 2014.

Patógenos do gênero *Ceratocystis* são polípagos, atacando diversas espécies com importância econômica, como a acácia-negra, eucalipto, mangueira e cacau, estes possuem ampla variabilidade, mesmo dentro de um único gênero ou espécie, resultado de adaptações ao meio em que vivem e aos hospedeiros disponíveis. Estudar o comportamento destes patógenos, como *Ceratocystis fimbriata*, em espécies florestais é importante para compreender as formas de sobrevivência, variabilidade e resistência do fungo principalmente em espécies nativas. O uso de biocontroladores como, dos gêneros *Trichoderma* e *Bacillus*, tem sido largamente estudado como alternativa para o controle biológico de patógenos de solo. Diante disto, o presente trabalho tem como objetivo estudar o comportamento de diferentes isolados de *C. fimbriata* obtidos de kiwi (*Actinidia deliciosa*) em espécies florestais como, acácia-negra (*Acacia mearnsii*), araçá (*Psidium cattleianum*), araucária (*Araucaria angustifolia*), cerejeira (*Eugenia involucrata*) e ingá (*Inga marginata*); o potencial de biocontrole *in vitro* de *Trichoderma* spp. e *Bacillus subtilis* sobre *C. fimbriata* e o comportamento *in vivo* de *B. subtilis* em mudas de acácia-negra, frente a *C. fimbriata*, como alternativa de controle. Para tanto, foram utilizados isolados de *C. fimbriata* obtidos e identificados em plantios de kiwi. No teste de patogenicidade cruzada os isolados foram avaliados quanto à sua variabilidade patogênica e o comportamento sobre mudas de acácia-negra, araçá, araucária, cerejeira e ingá. Através de testes de confrontação direta foi analisado o potencial antagônico *in vitro* de *Trichoderma* spp. e *B. subtilis* sobre o patógeno. Para a avaliação do comportamento *in vivo* de *B. subtilis* as mudas de acácia-negra foram inoculadas com o produto Rizolyptus[®], sete dias antes e após a inoculação do patógeno. As mudas de espécies nativas inoculadas com *C. fimbriata* não exibiram sintoma de murcha ou descoloração dos tecidos. Entretanto, em mudas de acácia-negra os isolados de *C. fimbriata* exibiram percentuais de severidade que variam entre 44,15 a 100%. Nos testes de confrontação direta os isolados de *Trichoderma* spp. e *B. subtilis* demonstraram-se eficientes no biocontrole *in vitro* sobre os isolados de *C. fimbriata* com percentuais de inibição variando de 46,48 a 57,76 e 14,12 a 32,20% respectivamente. No teste de biocontrole *in vivo*, o produto Rizolyptus[®] não foi eficiente no controle de *C. fimbriata* e todas as mudas de acácia-negra inoculadas com o patógeno apresentaram sintomas de murcha e morte.

Palavras-chave: Murcha-de-ceratocystis. Patogenicidade. Espécies nativas.

ABSTRACT

Master thesis
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal
Universidade Federal de Santa Maria

***Ceratocystis fimbriata* Ellis & Halsted IN FOREST SPECIES IN RIO GRANDE DO SUL STATE: BEHAVIOR AND BIOLOGICAL CONTROL**

AUTHOR: RICARDO MEZZOMO

ADVISOR: MARLOVE FÁTIMA BRIÃO MUNIZ

Santa Maria, February 25th, 2014.

Pathogens of the genus *Ceratocystis* are polyphagous, attacking several species of economic importance, such as black wattle, eucalyptus, mango and cocoa, these have wide variability even within a single genus or species, the result of adaptations to the environment they live in and the hosts available. Study the behavior of these pathogens such as *Ceratocystis fimbriata* in forest species is important to understand the ways of survival variability and fungus resistance mainly native species. The use of biocontrol as of the genera *Trichoderma* and *Bacillus*, have been widely studied as an alternative for the biological control of soil borne pathogens. Hence, the present work aims to study the behavior of different isolates of *C. fimbriata* obtained from kiwi (*Actinidia deliciosa*) in forest species as black wattle (*Acacia mearnsii*), guava (*Psidium cattleianum*), araucaria (*Araucaria angustifolia*), cherry (*Eugenia involucreta*) and inga (*Inga marginata*); potential biocontrol *in vitro* *Trichoderma* spp. and *Bacillus subtilis* about *C. fimbriata* and the *in vivo* behavior of *B. subtilis* in seedlings of black wattle, against *C. fimbriata* as an alternative control. For this purpose, we used isolates of *C. fimbriata* obtained and identified in kiwi plantations. In the pathogenicity test isolates were evaluated for their pathogenic variability and behavior on seedlings of black wattle, guava, araucaria, cherry and inga. Through direct confrontation testing was analyzed *in vitro* antagonistic potential of *Trichoderma* spp. and *B. subtilis* on the pathogen. For the evaluation of the *in vivo* behavior of *B. subtilis* black wattle seedlings were inoculated with product Rizolyptus[®], seven days before and seven days after pathogen inoculation. Seedlings inoculated with native species *C. fimbriata* showed no sign of wilting or discoloration of the tissues. However, in seedlings of *Acacia mearnsii* isolates of *C. fimbriata* exhibited severity percentage ranging from 44.15 to 100%. In direct confrontation testing isolates of *Trichoderma* spp. and *B. subtilis* demonstrated to be effective *in vitro* on biocontrol isolates of *C. fimbriata* with percentages of inhibition ranging from 46.48 to 57.76 and from 14.12 to 32.20 % respectively. In biocontrol *in vivo* test, the Rizolyptus[®] product was not effective in controlling *C. fimbriata* and all black wattle seedlings inoculated with the pathogen showed symptoms of wilting and death.

Keywords: Ceratocystis wilt. Biological control. Native species.

LISTAS DE TABELAS

Tabela 1- Coordenadas geográficas dos locais de coleta dos isolados de <i>Ceratocystis fimbriata</i> na região de Farroupilha-RS.....	31
Tabela 2 - Escalas utilizadas no teste de pareamento de culturas.....	36
Tabela 3 - Composição dos tratamentos do teste de biocontrole com <i>B. subtilis</i> em mudas de <i>Acacia mearnsii</i> , na forma comercial Rizolyptus [®] , sobre os isolados PM29 e PP08 de <i>C. fimbriata</i>	39
Tabela 4 - Médias de severidade (%) de isolados de <i>Ceratocystis fimbriata</i> obtidos de kiwi em mudas de araçá, araucária, cerejeira e ingá. Santa Maria, RS, 2014.	42
Tabela 5 - Médias das notas do teste de confrontação direta obtidas pelos isolados de <i>Trichoderma</i> spp. contra isolados de <i>Ceratocystis fimbriata</i> utilizando a escala de Bell et al. (1982) e Rodrigues (2010). Santa Maria, RS. 2014.	51
Tabela 6 - Crescimento e percentagem de inibição do crescimento micelial (CM) <i>in vitro</i> de <i>Ceratocystis fimbriata</i> no teste de confrontação direta com isolados de <i>Trichoderma</i> spp.. Santa Maria, RS, 2014.	55

LISTAS DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 - Árvore baseada nas sequências ITS-rDNA de isolados de *Ceratocystis* sp. pelo método Inferência Bayesiana. Com valores das probabilidades a posteriori (pp). Com os valores de *Bootstrap* e *Ceratocystis albofundus* como *outgroup*. A identificação dos isolados e do hospedeiro/local (entre parênteses) está indicada à frente do nome da espécie. As barras indicam a fração de substituição por sítios (PIVETA, 2013).....32
- Figura 2 - Gabarito com a escala utilizada para atribuição das notas no teste de pareamento de culturas. Fonte: Rodrigues (2010).37
- Figura 3 - Representação da escala de notas proposta por Bell et al. (1982), adaptado Montalvão (2012).....37
- Figura 4 - Teste de patogenicidade em mudas de *Araucaria angustifolia*. (A): Testemunha inoculada apenas com água destilada e esterilizada; (B): Muda inoculada com isolado PM29 de *C. fimbriata*. (C): Cortes de A e B, exibindo as lesões. (T) testemunha e (C.f.) *C. fimbriata*.43
- Figura 5 - Médias de severidade (%) de murcha-de-ceratocystis em mudas de *Acacia mearnsii* inoculadas com isolados de *C. fimbriata* obtidos de kiwi. (*) médias seguidas pela mesma letra, não diferem entre si pelo teste de agrupamento Scott- Knott ($p \leq 0,05$).....45
- Figura 6 - Teste de patogenicidade de *C. fimbriata* em mudas de *Acacia mearnsii*. (A): Planta morta inoculada com o isolado PB01. Ao lado testemunha inoculada apenas com água destilada e esterilizada (B): Testemunha e planta morta inoculada com o isolado PC03.46
- Figura 7 - Médias do comprimento de lesão (cm) de murcha-de-ceratocystis em mudas de *Acacia mearnsii* inoculadas com isolados de *Ceratocystis fimbriata* obtidos de kiwi. (*) médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de agrupamento Scott- Knott ($p \leq 0,05$).47
- Figura 8 - Teste de patogenicidade de *C. fimbriata* em mudas de *Acacia mearnsii*. (A): Caule com lesão causada pelo ataque do isolado PM08; (B): Caule sem sintomas da testemunha; (C): “Isclas de cenoura” utilizadas no reisolamento do fungo; (D): Colônia mono-ascospórica do isolado PM08 em meio BDA.....47
- Figura 9 - Pareamento de culturas de *Trichoderma* spp. sobre o isolado PC03 de *C. fimbriata*. (A): Agrotich Plus[®] (AG) x PC03; (B): *T.asperellum* (CP21) x PC03; (C): *T. koningiopsi* (SP13) x PC03; (D): Testemunha apenas com PC03.....52
- Figura 10 - Médias do crescimento micelial (mm) dos isolados PP08, PM29, PM08, PC03 e PB01 de *C. fimbriata* obtidos de kiwi quando pareados com *Bacillus subtilis* na forma comercial Rizolyptus[®]. (*) médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de agrupamento Scott- Knott ($p \leq 0,05$).57

- Figura 11 - Pareamento de cultura de *B. subtilis* na forma comercial Rizolyptus® sobre o isolado PC03 de *C. fimbriata*. (A): Rizolyptus® x PC03; (B): Testemunha contendo apenas o isolado PC03.....57
- Figura 12 - Percentuais de inibição do crescimento micelial dos isolados PP08, PM29, PM08, PC03, e PB01 de *C. fimbriata* obtidos de kiwi pareados com *Bacillus subtilis* na forma comercial Rizolyptus®58
- Figura 13 - Médias de severidade (%) no biocontrole de *B. subtilis* na forma comercial Rizolyptus® sobre os isolados PM29 e PP08 de *C. fimbriata* obtidos de kiwi em mudas de *Acacia mearnsii*. Onde, RZ: mudas inoculadas apenas com Rizolyptus®; TEST: mudas inoculadas apenas com água destilada e esterilizada; RZxPM29 e RZxPP08: mudas inoculadas com Rizolyptus® sete dias antes a inoculação do fungo; PM29xRZ e PP08xRZ: mudas inoculadas com Rizolyptus® sete dias após a inoculação do fungo. (*) médias seguidas pela mesma letra, não diferem entre si pelo teste de agrupamento Scott-Knott ($p \leq 0,05$).....61
- Figura 14 - Teste de biocontrole de *B. subtilis* na forma comercial Rizolyptus® sobre o isolado PP08 de *C. fimbriata* em mudas de *Acacia mearnsii*. (A): muda inoculada apenas com Rizolyptus®; (B): Testemunha inoculada apenas com água destilada e esterilizada; (C): muda inoculada com Rizolyptus® sete dias antes do isolado PP08; (D): muda inoculada apenas com o isolado PP08; (E): muda inoculada com Rizolyptus® sete dias após o isolado PP08.61

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1 - Descrição dos meios de cultura utilizados no trabalho.....	77
Anexo 2 - Descrição dos produtos comerciais utilizados no trabalho.	78

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 <i>Ceratocystis fimbriata</i>	17
2.2 <i>Acacia mearnsii</i>	19
2.3 <i>Psidium cattleianum</i>	21
2.4 <i>Araucaria angustifolia</i>	21
2.5 <i>Eugenia involucrata</i>	22
2.6 <i>Inga marginata</i>	23
2.7 Variabilidade de agentes patogênicos	23
2.8 Gênero <i>Trichoderma</i> e seu uso como controlador biológico	25
2.9 <i>Bacillus subtilis</i> como agente biocontrolador	28
3 MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1 Localização e características gerais do experimento	30
3.2 Preparação dos isolados de <i>Ceratocystis fimbriata</i>	30
3.3 Teste de patogenicidade em mudas de espécies florestais	33
3.3.1 Avaliação da severidade	34
3.3.2 Reisolamento de <i>Ceratocystis fimbriata</i>	34
3.3.3 Obtenção das culturas mono-ascospóricas	34
3.4 Pareamento de culturas entre <i>Ceratocystis fimbriata</i> e <i>Trichoderma</i> spp.	35
3.5 Pareamento de culturas entre <i>Ceratocystis fimbriata</i> e <i>Bacillus subtilis</i>	38
3.6 Teste <i>in vivo</i> de <i>Ceratocystis fimbriata</i> x <i>Bacillus subtilis</i> em mudas de acácia-negra	38
3.7 Análise estatística	40
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
4.1 Testes de patogenicidade de isolados de <i>Ceratocystis fimbriata</i> em espécies florestais	41
4.2 Pareamento de culturas entre <i>Ceratocystis fimbriata</i> e <i>Trichoderma</i> spp.	50
4.3 Pareamento de culturas de <i>Bacillus subtilis</i> sobre <i>Ceratocystis fimbriata</i>	55
4.4 Teste <i>in vivo</i> de <i>Ceratocystis fimbriata</i> e <i>Bacillus subtilis</i> em mudas de acácia-negra	59
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63
7 ANEXOS	77
Anexo 1 - Descrição dos meios de cultura utilizados no trabalho	77
Anexo 2 - Descrição dos produtos comerciais utilizados no trabalho	78

1 INTRODUÇÃO

No Brasil as florestas ocupam dois terços do território nacional, o que corresponde a aproximadamente 544 milhões de hectares. Dessa cobertura florestal o equivalente a 1%, cerca de 5,5 milhões de hectares são ocupados por florestas plantadas. O restante, cerca de 538 milhões de hectares, correspondem às áreas ocupadas por florestas nativas. O setor florestal brasileiro possui importância significativa na economia sendo responsável pela geração de 4,1% do PIB do país gerando cerca de 6,5 milhões de empregos diretos e indiretos (BNDES, 2007).

Neste contexto, as regiões de plantio de acácia-negra exercem grande importância econômica e social, principalmente, nas pequenas propriedades, diversificando a renda e proporcionando desenvolvimento e qualidade de vida. A agricultura familiar representa 60% das áreas cultivadas com essa espécie no país (TONIETTO & STEIN 1997). Entretanto, o desmatamento e a crescente diminuição dos ecossistemas e florestas para produção agrícola e áreas de pastagens, desencadearam a conscientização e o desenvolvimento de diversos estudos, a fim de restabelecer as áreas naturais que sofreram degradação (ESPÍNDOLA et al., 2005). A produção de mudas de espécies florestais de qualidade e livre de patógenos é vital para a viabilidade e o sucesso tanto de florestas plantadas como nos programas de recuperação de áreas naturais degradadas.

Ceratocystis fimbriata é um fungo cosmopolita, conhecido na área florestal por causar doenças em diversas plantas lenhosas. No Brasil, este patógeno afeta vários hospedeiros como *Eucalyptus*, *Hevea*, *Mangifera*, *Platanus*, *Populus*, *Coffea*, entre outros, causando murcha, descoloração dos tecidos internos do caule e até morte da planta (ALFENAS et al., 2007). Este fungo é conhecido por produzir aroma que atrai insetos vetores, facilitando sua penetração pela epiderme da planta (BARNES et al., 2003). Os primeiros relatos de murcha-de-ceratocystis em eucalipto ocorreram em 1997, em reflorestamentos clonais no sudeste da Bahia (FERREIRA, 1999). Tem-se verificado, a partir de 2001, em plantios comerciais de acácia-negra no RS, a presença do ataque de *C. fimbriata* em pontos isolados (SANTOS, 2004); em plantios de kiwi na região de Farroupilha, RS, foram coletadas plantas com sintomas de murcha, causadas por *Ceratocystis fimbriata* (SONEGO et al., 2010).

Apesar de *C. fimbriata* causar danos em plantios comerciais de acácia-negra e kiwi, pouco se sabe a respeito da sobrevivência e disseminação deste patógeno em outras espécies, principalmente, florestais nativas da região da Serra Gaúcha. Através de testes de patogenicidade em inoculações cruzadas são obtidas informações sobre o comportamento do patógeno. Essas são importantes para subsidiar estratégias de controle e prevenção de doenças, evitando danos e/ou perdas em espécies florestais. O controle genético vem sendo empregado, entretanto, os resultados são obtidos à longo prazo. O emprego de técnicas alternativas no controle a murcha-de-ceratocystis são importantes, pois o uso de fungicidas é restrito, devido à ausência de registro no Ministério da Agricultura e Abastecimento. Estudos envolvendo controle biológico vem crescendo, entre os quais, estão os testes *in vitro* e *in vivo* com *Bacillus subtilis* e *Trichoderma* spp..

O gênero *Trichoderma* possui muitas espécies, podendo ser encontrado habitando, praticamente, todos os tipos de solos espalhados por diversas regiões do mundo (HARMAN et al., 2004). A capacidade de controle do *Trichoderma* sobre vários fitopatógenos se deve a diversos mecanismos de ação e produção de substâncias antimicrobianas, garantindo um amplo espectro de controle. Além disso, algumas espécies de *Trichoderma* aumentam a disponibilidade de nutrientes e a produção de hormônios, promovendo o crescimento de plantas (LUCON, 2008).

O gênero *Bacillus* é composto por bactérias gram positivas, com formato de bastonete que formam endósporos resistentes ao calor (LIMA, 2010). Organismos endofíticos, como *Bacillus subtilis*, possuem mecanismos de controle que envolvem a produção de substâncias antibacterianas e antifúngicas (CASTILLO et al., 2006), interferindo no crescimento e na colonização dos fitopatógenos.

Diante do exposto, os objetivos do presente trabalho são estudar o comportamento de diferentes isolados de *Ceratocystis fimbriata* obtidos de kiwi (*Actinidia deliciosa*) em espécies florestais como, acácia-negra (*Acacia mearnsii*), araçá (*Psidium cattleianum*), araucária (*Araucaria angustifolia*), cerejeira (*Eugenia involucrata*) e ingá (*Inga marginata*); o potencial de biocontrole *in vitro* de *Trichoderma* spp. e *Bacillus subtilis* sobre *C. fimbriata* e o comportamento *in vivo* de *B. subtilis* em mudas de acácia-negra, frente a *C. fimbriata*, como alternativa de controle.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Ceratocystis fimbriata*

O fungo *Ceratocystis fimbriata* Ellis & Halsted, pertence à classe Pyrenomycetes, ordem Ophiostomatales, subdivisão Ascomycotina, produz peritécios negros, eruptivos. Os ascósporos são unicelulares, hialinos e são liberados em massa gelatinosa. Microconídios hialinos são produzidos no interior dos conidióforos, ao passo que os macroconídios pigmentados são produzidos nas extremidades destes (TRINDADE et al., 1997).

Conhecido por causar a murcha-de-ceratocystis, o fungo produz aroma que atrai insetos vetores como moscas (Diptera) ou microcoleópteros (Coleoptera: Nitidulidae), facilitando sua penetração pela epiderme da planta. Tanto o besouro (*Xyleborus affinis*) quanto os resíduos de seu ataque podem ser considerados agentes potenciais de dispersão, contribuindo para epidemiologia do patógeno. A penetração pode ocorrer por ferimentos e, também, diretamente pelas raízes (anastomose), não havendo necessidade de ferimento ou vetor, uma vez infectado, o tecido morto, pode servir como fonte de inóculo no solo por até cinco anos (BARNES et al., 2003; OEPP, 2002; SOUZA et al., 2013).

Ceratocystis fimbriata coloniza, inicialmente, o câmbio entre a casca e o lenho, sendo esta uma característica típica de patógeno de xilema. Um de seus sintomas típicos é visível nas secções transversais de órgãos lenhosos, na forma de estrias radiais escuras (BAKER et al., 2004);

Ceratocystis fimbriata é uma das espécies do gênero *Ceratocystis* importante na área florestal, é um fungo polífago, com ampla distribuição geográfica causando doenças em diversas plantas lenhosas como, por exemplo, *Platanus* (Armênia, Itália, França, Suíça, EUA), *Syngonium* (Austrália), *Mangifera* (Omã, Paquistão), *Colocasia* (China), *Coffea* (Colômbia), (ALFENAS et al., 2007; FATEH et al., 2006; HUANG et al., 2008; MARIN et al., 2003; OEPP, 2002; VOGELZANG et al., 1990; WYK et al., 2003). No Japão, o cancro causado por *C. fimbriata* é considerada uma grave doença, dificultando o cultivo de *Ficus carica* (HOSOMI et al., 2012).

No Brasil esse patógeno ataca vários hospedeiros, tais como os gêneros: *Eucalyptus*, *Hevea*, *Ipomoea*, *Mangifera*, *Platanus*, *Populus*, *Prunus*, *Coffea*. Recentemente, observado em *Carapa guianensis*, *Tectona grandis* e *Passiflora edulis*. O ataque pode causar murcha, descoloração dos tecidos internos do caule, colonização de haste, pecíolos e apodrecimento de frutos (ALFENAS et al., 2007; FIRMINO et al., 2012; FIRMINO et al., 2013; HALFELD-VIEIRA et al., 2012).

Ribeiro et al. (1988) relataram pela primeira vez no Brasil, a ocorrência do ataque de *C. fimbriata* em acácia-negra. As plantas apresentavam sintomas de murcha ou morte. Os caules quando cortados, transversalmente, apresentavam coloração cinza-escuro, também exibiam rachaduras e exsudação de goma. Em 2001, Santos (2004) verificou em plantios comerciais de acácia-negra no estado do Rio Grande do Sul, a presença do ataque de *C. fimbriata* causando murcha da acácia-negra.

Em plantios de kiwi na região de Farroupilha, RS, foram coletadas plantas com sintomas de murcha, escurecimento do lenho e frutos com tamanho reduzido, causados por *Ceratocystis fimbriata*. Este patógeno vem causando prejuízos aos produtores, assumindo importância econômica, devido a alta suscetibilidade do material enxertado, comprometendo o estabelecimento da cultura (PIVETA et al., 2013; SONEGO et al., 2010).

Em eucalipto, a murcha-de-ceratocystis foi relatada pela primeira vez em 1997, em reflorestamentos clonais no sudeste da Bahia (FERREIRA, 1999), onde se observaram talhões monoclonais de híbridos com mortalidade de plantas superior a 40%. Ferreira (2000), verificou-se no primeiro ano de observação, que a doença se limitava a plantações monoclonais de dois genótipos, passando a atacar mais três genótipos, sendo esses cinco genótipos, clones nobres do ponto de vista silvicultural e tecnológico. As áreas livres de inóculo do patógeno correm grande risco de introdução da doença via mudas propagadas vegetativamente.

A partir de 2001, foi relatada também a ocorrência da doença em plantios monoclonais de eucaliptos nos Estados de Mato Grosso do Sul, Bahia, Minas Gerais e São Paulo (FERREIRA et al., 2006). O Brasil e o Uruguai são os únicos países das Américas onde foi constatada a murcha-de-ceratocystis em eucalipto. A doença foi também registrada em Uganda, República do Congo e África do Sul (ROUX et al., 2000; ROUX et al., 2001; ROUX et al., 2004). Os isolados oriundos de eucalipto aparentemente, são patogênicos somente ao eucalipto, podendo ser observada uma

especialização do patógeno em relação ao hospedeiro (BAKER et al., 2003; ZAUZA, 2004). A variação da agressividade entre isolados, apresenta um desafio para criação e seleção de materiais resistentes. No Brasil, isolados de *C. fimbriata* tem se mostrado agressivos a *Eucalyptus* spp. e *Mangifera indica* (HARRINGTON et al., 2011).

Do ponto de vista epidemiológico, a murcha-de-ceratocystis em eucalipto é considerada uma doença poliética, ou seja, o progresso da epidemia se verifica ao longo dos anos. A partir dessa afirmação, existem estudos de análise de dinâmica e estrutura de focos (ADEF) que foram desenvolvidos para caracterizar espacialmente epidemias, cujas avaliações são baseadas na incidência. Assim, um foco de doença é definido como árvores com sintomas imediatamente adjacentes no padrão de proximidade vertical, horizontal ou diagonal (NELSON, 1996).

O uso de material genético resistente é considerado o método de controle mais econômico e eficiente para murcha-de-ceratocystis (SILVA et al., 2004). Há várias características que dificultam o controle do patossistema *C. fimbriata* x *Eucalyptus* spp. entre elas: a sobrevivência do patógeno no solo e nos resíduos culturais, disseminação do fungo por mudas contaminadas, natureza sistêmica das infecções e a potencialidade de transmissão do mesmo por implementos florestais e ferramentas de corte (MAFIA et al., 2011).

2.2 *Acacia mearnsii*

Acacia mearnsii (De Wild.), popularmente conhecida como acácia-negra é uma espécie originária da Austrália e pertence à família Fabaceae, subfamília Mimosoideae, é uma árvore de porte médio, copa arredondada e casca castanho-escura dividida em pequenas placas (MARCHIORI, 1997).

No Brasil, a acácia-negra compõe maciços florestais homogêneos e ocupa aproximadamente 160 mil hectares, onde estão inseridas 10 mil propriedades da agricultura familiar concentradas no Rio Grande do Sul nas regiões da Depressão Central, Encosta do Sudeste e Encosta Inferior do Nordeste (FOWLER et al., 1999; SANTOS, et al., 1998; SCHNEIDER et al., 2000).

A presença desta espécie nos diferentes segmentos da economia e da indústria é ampla e bem distribuída, tanto para extração de tanino, a partir da casca, até o uso da madeira para produção de celulose, papel, chapas de fibra e energia. O aproveitamento integral da madeira, associado ao rápido crescimento, tornam a espécie ideal para o reflorestamento e para o uso industrial (SANTOS et al., 1998a).

Uma característica importante da espécie é o cultivo em pequenas propriedades, em sistemas agrossilvipastoris. Nos estágios iniciais, enquanto as árvores apresentam pequena altura e o dossel da floresta está aberto, os agricultores fazem o plantio, em consórcio com a acácia-negra, de diversas culturas agrícolas como, por exemplo: milho, mandioca, melancia entre outras. Com o desenvolvimento das árvores, quando o dossel da floresta está fechado, a área passa a ser aproveitada para o pastoreio, diversificando e aumentando a rentabilidade dos investimentos aos pequenos produtores (SCHNEIDER et al., 2000).

Para suprir os programas de plantio são necessárias grandes quantidades de sementes. Em condições naturais, as sementes são coletadas por formigas e estocadas em seus formigueiros. Alguns reflorestamentos estão sendo plantados com sementes coletadas em formigueiros, devido à facilidade e abundância na quantidade de sementes estocadas nos mesmos, porém, estas sementes são de baixa qualidade e não sofrem nenhuma seleção. A baixa qualidade das sementes aliadas às restrições genéticas tem limitado a produtividade da espécie (CHARÃO, 2005).

No Brasil, a gomose, causada por *Phytophthora* spp., é o principal problema fitossanitário da acácia-negra. Entretanto tem-se verificado em plantios comerciais na região sul, a presença de murcha-de-ceratocystis, cujo principal sintoma é o aparecimento de murcha seguido de morte das plantas. Para a penetração na planta, o fungo *C. fimbriata* necessita de ferimentos, que podem ser provocados por ventos, granizo, insetos e tratamentos silviculturais. A transmissão do patógeno de uma árvore doente para uma árvore sadia está associada a insetos vetores (SANTOS, 2004).

Na África do Sul, onde são característicos os plantios monoculturais de acácia-negra, foram isolados e identificados *Ceratocystis albobundus* e *Erythricium salmonicolor* causando, respectivamente, murcha e cancro em árvores desta espécie (WINGFIELD et al., 1995; ROUX et al., 2005).

2.3 *Psidium cattleianum*

Psidium cattleianum Sabine, é uma espécie da Mata Atlântica pertencente a família Myrtaceae, conhecida popularmente como araçá, ocorrendo desde a Bahia até o Rio Grande do Sul, na Floresta Ombrófila Densa, com altura de três a seis metros com tronco liso e casca descamante. A espécie cresce em lugares úmidos a beira de rios, riachos e lagos (LORENZI, 1992).

O fruto é uma baga de coloração amarelada ou avermelhada, de acordo com o genótipo, cuja safra ocorre nos meses de fevereiro a abril, sendo muito apreciados pela avifauna (MANICA, 2000). O araçá não é explorado industrialmente, o fruto em sua maioria é consumido in natura ou em sucos e sorvetes, além de ser muito difundido na medicina popular que utiliza as cascas e folhas para o preparo de infusões (HAMINIUK et al., 2006).

Esta espécie foi introduzida e, atualmente, é cultivada como ornamental em diversos países, como Estados Unidos, Bermudas, Bahamas entre outros países da América Central e Sul. O araçá tem como uma de suas características, a facilidade de adaptação à diversos climas, sendo o tropical o mais favorável ao seu crescimento. No Havaí, já estão sendo implantados programas de combate a proliferação desenfreada dessa espécie que ameaça a rara flora endêmica local, porém até o momento sem sucesso (BIEGELMEYER et al., 2011; ORTEGA et al., 2006; PATEL, 2012).

2.4 *Araucaria angustifolia*

Araucaria angustifolia (Bert.) O. Kuntze é uma espécie perenifólia, variando de 10 a 35 m de altura e 50 a 120 cm de diâmetro, podendo chegar a 50 m de altura e 250 cm de diâmetro na idade adulta. Quando adulta, é heliófila e tolerante a temperaturas baixas. A espécie apresenta adaptabilidade fisiológica às condições de luminosidade do ambiente (CARVALHO, 2003). A Floresta Ombrófila Mista pertencente a Mata Atlântica, é a única a abrigar a araucária e apresenta grande importância ecológica (NARVAES et al., 2005). Com a exploração excessiva, aliada

a falta de conhecimento do comportamento e requisitos silviculturas da espécie e sem a devida reposição está atualmente ameaçada de extinção (SCHEEREN, 1999).

Por se tratar de uma espécie ameaçada de extinção, pesquisas envolvendo *A. angustifolia* são importantes tanto na ecologia como na economia, as quais, abrangem a conservação de germoplasmas, exploração econômica, sementes e regeneração das populações naturais (MANTOVANI et al., 2004).

Dentre as doenças observadas em araucária, a podridão de raiz e colo causada por *Fusarium* spp. e *Phellinus* spp. chamam a atenção pela destruição de plantas e pelo potencial de perdas para as florestas. Os sintomas reflexos da podridão de raiz aparecem na parte aérea, expressos por cloroses, seca e morte. Quando é observada alguma anomalia na copa, a doença já apresenta estágio avançado no sistema radicular (AUER et al., 1997). Em 2011, Santos et al. (2011) relataram a presença de *Phytophthora cinnamomi* causando morte de árvores de *A. angustifolia*.

2.5 *Eugenia involucrata*

Eugenia involucrata, popularmente conhecida como cerejeira-do-mato ou cereja do-rio-grande, quando adulta, pode atingir de 5 a 10 m de altura. Tendo sua distribuição desde São Paulo até o Rio Grande do Sul, nas formações florestais da Mata Atlântica e nas florestas e cerrados da bacia do Paraná, ocorrendo ainda em outros estados como Goiás, Minas Gerais e Mato Grosso do Sul (MENDONÇA, 2009).

Eugenia involucrata possui flores brancas, melíferas e frutos do tipo drupa, glabra e brilhante, de cor vermelha ou vinácea-escura, com polpa cremosa adocicada e comestível, contendo de uma a três sementes (LORENZI, 2002).

Sua principal utilização está concentrada na construção civil, na produção de cabos de ferramentas, para lenha e carvão, destacando-se pela durabilidade e qualidade da madeira (LORENZI, 1992; CARVALHO, 2008).

Possui grande importância ecológica, atuando na recuperação de áreas degradadas e largamente dispersada pela avifauna, possuindo também

propriedades medicinais como antirreumática e antidiarreica (RODRIGUES & CARVALHO, 2001). Possui sementes recalcitrantes, que perdem sua viabilidade durante seu armazenamento dificultando os métodos de propagação (GOLLE et al., 2012).

É comum algumas mudas se contaminarem com cochonilhas, principalmente, na fase de viveiro. As espécies *Pseudokermis nitens* e *Ceroplastes janeirensis* são as mais encontradas atacando mudas, que devem ser tratadas com óleo mineral (CARVALHO, 2009).

2.6 *Inga marginata*

O ingá também conhecido como ingá-mirim, é uma espécie nativa da Mata Atlântica pertencente a família Mimosaceae e ocorre nos países da América do Sul e Central. No Brasil, está distribuída do Rio Grande do Sul ao Amapá, com uma ampla faixa de adaptação ecológica e de altitude, entretanto, é mais encontrada em matas fluviais (BARROSO et al., 1999).

A espécie é muito procurada por abelhas por ser considerada como grande produtora de néctar e pólen. Seus frutos são comestíveis e de agradável sabor, sendo utilizados na fabricação de refrigerantes. Na medicina popular, o fruto é indicado no tratamento de úlceras (DURIGAN & NOGUEIRA, 1990).

É uma espécie muito importante na ocupação de áreas degradadas e na restauração da mata ciliar, por ser uma planta que contribui na fertilização e auxilia a recuperação dos solos pobres ou esgotados pelo cultivo. Suporta encharcamento e inundação (BARROSO et al., 1999; BARROSO et al., 2002; DURIGAN et al., 1990).

2.7 Variabilidade de agentes patogênicos

Dependendo do hospedeiro em que o patógeno for inoculado, podem ocorrer diferenças em seu ataque, podendo assim, caracterizar isolados mais ou menos agressivos na colonização e no desenvolvimento de uma doença. Essas

informações sobre a variabilidade de agentes patogênicos são importantes para entender a dinâmica populacional e traçar estratégias para o estudo da patogenicidade (PIVETA, 2013).

Do ponto de vista epidemiológico, a variabilidade patogênica tem implicações diretas no manejo da doença. Já do ponto de vista evolutivo, a variabilidade genética das populações é importante por determinar o potencial de adaptação do organismo às condições adversas, o que implica na escolha do material genético resistente e no uso de fungicidas, de acordo com a agressividade do patógeno (MICHEREFF et al., 2003).

Agentes fitopatogênicos, devido à alta plasticidade genética e ao elevado grau de dependência dos fatores ambientais, estão sujeitos às constantes transformações, fisiológicas e morfológicas e às mudanças no comportamento patogênico dificultando a avaliação da patogenicidade e a identificação do patógeno (MICHEREFF, 2000; POLONI et al., 2008). Ferreira (2009a) sugeriu que a divergência e a evolução das espécies de *Ceratocystis* podem ter sido desencadeadas pela especialização por hospedeiro, já que foram observadas pequenas diferenças morfológicas entre as espécies. Engelbrech & Harrington (2005) consideraram a especialização de hospedeiro um fator importante na condução de especiação dentro do gênero *Ceratocystis*.

A análise das características reprodutivas entre isolados de *Ceratocystis* sugere que isolados de espécies diferentes, ou coletados em lugares distintos, podem estar estreitamente relacionados (FIRMINO, 2011). Harrington et al. (2002) estudaram a interfertilidade de diferentes isolados de *C. laricicola* e *C. polonica*, coletados na Europa e Japão. Estes autores citados anteriormente concluíram que as duas espécies de fungos estão intimamente relacionadas e somente se diferenciam pela sua especialização fisiológica pelo hospedeiro e pelos seus vetores.

A velocidade do aparecimento dos sintomas no hospedeiro esta relacionada com a diferença na quantidade de doença induzida pelo patógeno. Estes componentes da doença podem ser considerados na caracterização da variabilidade de isolados de um patógeno (PARLEVLIT, 1979).

A inoculação em diversos hospedeiros utilizando testes de patogenicidade em inoculações cruzadas objetiva a caracterização patogênica de fungos, bactérias e vírus visando demonstrar a especificidade ou a quantidade de hospedeiros

susceptíveis a determinados isolados (FURTADO et al., 1999; MUNIZ et al., 1998; PERES et al., 2003).

Segundo Baker et al. (2003), a grande variabilidade fisiológica nas populações de *C. fimbriata*, pode determinar se uma espécie vegetal hospedeira será ou não infectada pelo patógeno proveniente de isolamento de outro hospedeiro. Em seus estudos, os autores verificaram através de inoculações cruzadas que isolados obtidos de *Eucalyptus* spp. foram capazes de infectar outros gêneros como, por exemplo, *Crotalaria*, *Mangifera* e *Coffea*. Ribeiro et al. (1988) promoveram inoculações cruzadas com isolados de *C. fimbriata* identificados de acácia-negra e mangueira. Os isolados apresentaram a mesma patogenicidade em ambas as espécies testadas.

2.8 Gênero *Trichoderma* e seu uso como controlador biológico

O gênero *Trichoderma* compreende fungos de vida livre pertencente à Subdivisão Deuteromycotina, família Moniliaceae e possui muitas espécies que são geneticamente distintas, podendo ser encontrado habitando solos das regiões de clima tropical e temperado (HARMAN et al., 2004).

Isolados de *Trichoderma* podem ser reconhecidos, normalmente, através de características macroscópicas, rede micelial aérea hialina, septada, bastante ramificada e esparsa e produção de pústulas conidiógenas diferenciais (brancas ou verdes). Para determinação da espécie são levados em consideração a estrutura e tamanho dos conidióforos. Os conídios subglobosos, ovóides elipsóides ou elíptico-cilíndricos, são produzidos em série e acumulados no ápice das fiálides formando uma estrutura globosa ou subglobosa com menos de 15 µm de diâmetro. Podem ser lisos ou ligeiramente rugosos, hialinos ou com coloração variando do amarelo ao verde-escuro (ADELL, 2004).

Segundo Benítez et al.(2004), alguns isolados de *Trichoderma* foram capazes de ativar os mecanismos de defesa à estresses abióticos e à doenças. Também estimularam o crescimento das plantas com a produção de compostos. Além de estimularem o crescimento, junto à síntese ou ativação de fitohormônios, alguns

isolados secretam ácidos orgânicos, provenientes de seu metabolismo de compostos carbônicos e como consequência acidificam o ambiente à sua volta, havendo uma ligação com a capacidade de solubilizar micronutrientes e fostato.

O controle biológico de doenças pode ser definido como sendo a aplicação massal de microorganismos, como, por exemplo, o gênero *Trichoderma*, capazes de controlar os fitopatógenos e proteger as plantas. Esta forma de controle vem sendo desenvolvida há vários anos em muitos países, seu sucesso consiste no desenvolvimento de formulações estáveis capazes de carregar uma grande quantidade de esporos viáveis, sendo assim, competitivos no local de ação, o solo (LOBO JÚNIOR et al., 2009). Segundo estes autores, o controle biológico pode ser empregado onde outros métodos de controle são ineficientes, favorecendo a obtenção de resultados em curto prazo.

Ao contrário do controle químico, que apresenta efeito imediato e muitas vezes total, o controle biológico pode apresentar rendimento abaixo do desejado, havendo necessidade de integração com outros métodos de controle, caracterizando o que se chama de controle integrado. A ausência de estudos sobre ecologia do patógeno e do antagonista impedem a implantação com sucesso do controle biológico (GRIGOLETTI JUNIOR et al., 2000).

A capacidade de controle de *Trichoderma* spp. sobre vários fitopatógenos se deve a diversos mecanismos de ação e produção de substâncias antimicrobianas, garantindo um amplo espectro de controle. Além disso, algumas linhagens de *Trichoderma* aumentam a disponibilidade de nutrientes e a produção de hormônios, promovendo o crescimento de plantas (LUCON, 2008).

Muitos isolados de *Trichoderma* spp. possuem crescimento rápido, produzindo esporos e antibióticos eficazes. Essas características tornam esses fungos organismos ecologicamente bem sucedidos, podendo ser encontrados em solos, restos culturais, raízes de várias espécies vegetais, sementes e ar. Muito utilizado na indústria e na agricultura, este microorganismo possui fácil reprodução pela grande quantidade de conídios que produz e pelas várias formulações possíveis, como líquida (óleo e água) e seca (granulado e pós molháveis) (MILANESI, 2009).

Ainda não são completamente conhecidos os mecanismos utilizados pelas espécies de *Trichoderma* para reconhecer, inibir ou atacar fungos fitopatogênicos. Podem atuar por mecanismos diretos e/ou indiretos de ação, que incluem a

antibiose- inibição ou supressão do patógeno pela produção de diversas substâncias tóxicas, voláteis e não voláteis, com amplo espectro de atividade antimicrobiana; a competição por nutrientes e/ou espaço com o patógeno, levando o seu deslocamento do sítio de infecção, impedindo a germinação de seus propágulos ou o processo de infecção da planta; o micoparasitismo – o antagonista utiliza o fitopatógeno como alimento, pois crescem em direção ao patógeno, se enrolam em suas hifas, degradam a parede celular pela secreção de enzimas líticas (quitinases, celulasas, glucanases e proteases) e delas se alimentam; a indução de resistência- algumas linhagens de *Trichoderma* possuem capacidade de desencadear uma série de alterações morfológicas e bioquímicas na planta, levando à ativação dos seus mecanismos de defesa contra vários fitopatógenos (LUCON, 2008).

O gênero é conhecido pela habilidade em produzir enzimas que degradam celulose e quitina sendo utilizados na biodegradação do papel e no controle de fungos fitopatogênicos como, por exemplo, *Fusarium* spp. , *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Phytophthora nicotianae* (ETHUR, 2006; LOBO JUNIOR et al., 2009; PUGLIESE et al., 2008; SHARMA, 2011). Maciel et al. (2012), constataram em seus estudos que produtos comerciais à base de *Trichoderma* spp., foram eficientes no controle *in vitro* e *in vivo* de *Cylindrocladium candelabrum* em mudas de *Eucalyptus saligna*.

No controle de fitopatógenos de solo, pode ser aplicado *Trichoderma* spp. isoladamente ou combinado com outros antagonistas ou ainda com fungicidas comumente empregados no controle destes patógenos. Podem ser utilizadas linhagens resistentes ao fungicida de interesse ou linhagens selvagens, tendo como finalidade desenvolver produtos biológicos capazes de serem utilizados no manejo integrado de doenças (LUCON, 2008).

Conforme Machado et al. (2012), no Brasil a baixa aplicabilidade de produtos à base de *Trichoderma* se dá pela falta de registro no Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Outro fator apontado pelos autores é a carência em difundir conceitos, principalmente sobre os benefícios e vantagens desencadeadas pelo uso de biocontroladores, favorecendo o uso de agrotóxicos, além de, limitar o conhecimento aos consumidores sobre as consequências do uso destes produtos para saúde e meio ambiente.

2.9 *Bacillus subtilis* como agente biocontrolador

Bacillus subtilis é uma bactéria em forma de bastonete Gram-positiva, aeróbio facultativo, não patogênico, produtor de ácido acético e formador de endósporo (MAZZA, 1994).

Quanto à ecologia, as populações de *B. subtilis* habitam naturalmente o solo juntamente com outros microrganismos procariontes e eucariontes em grande número e diversidade. Os organismos procariontes, como o *B. subtilis*, podem ocupar nichos ecológicos distintos em associação com plantas, e sendo endofíticos estabelecendo-se nos tecidos internos, na rizosfera, rizoplane, filoplane, onde se multiplicam, sobrevivem e se protegem da ação antagonística do restante da microflora (CAMPOS et al., 2008; ONGENA et al., 2005).

Em condições desfavoráveis como, por exemplo, variação de temperatura, osmolaridade ou a disponibilidade de fontes de carbono, condicionam a célula bacteriana a entrar em estágio de crescimento lento ou de fase estacionária. Neste estágio, as células buscam medidas adaptativas como: transformação genética por DNA exógeno, enzimas degradativas extracelulares e produção de antibióticos (LANNA FILHO et al., 2010; STRAGIER et al., 1996).

A formação de endósporo ocorre em resposta à escassez de nutrientes, acarretando na paralisação do ciclo de crescimento e divisão celular. O endósporo é altamente resistente a agressões externas, sendo, muito importante para a sobrevivência das populações de *B. subtilis*, quando estas são expostas a condições ambientais desfavoráveis (CANO et al., 1995; HENRIQUES et al., 2000; STRAGIER et al., 1996).

Manjula et al. (2005), constataram em seus estudos com feijão guandu que, *B. subtilis* favorece a promoção do crescimento podendo levar as sementes à rápida germinação. Cabe destacar que o rápido desenvolvimento da plântula ocasiona um desenvolvimento precoce, proporcionando à planta alcançar a fase adulta em menos tempo o que ajuda a diminuir os riscos de ataque a patógenos presentes no solo (LANNA FILHO et al., 2010).

A resistência ao calor dos metabólitos produzidos por *B. subtilis*, permanecendo ativos após autoclavagem do meio a 121°C/20 min, e a formação de endósporos altamente resistentes ao calor são características de

grande importância e que favorecem o desenvolvimento de formulações comerciais desta bactéria (BAKER et al., 1983; BETTIOL & KIMATI, 1990; LANNA FILHO et al., 2010; LAZZARETTI, 1993; NORRIS et al., 1981).

O uso de bactérias benéficas sejam endófitas, rizobactéria ou habitantes de filoplano, é importante por proporcionar o controle biológico de doenças em plantas. A busca por resultados sobre sua viabilidade como agente de biocontrole desenvolvem-se em todo mundo com o objetivo de reduzir o uso de agrotóxicos na agricultura. Essas bactérias podem atuar por indução de resistência, por antagonismo direto ou das duas formas concomitantemente (ROMEIRO et al., 2009).

Produtos a base de *B. subtilis* vêm sendo testados nos EUA desde o início na década de 80 para o tratamento de sementes de amendoim, entre outras culturas, contra vários fitopatógenos (WELLER, 1988).

Isolados de *B. subtilis* produzem um grande espectro de metabólitos antifúngicos, como, por exemplo, lipopeptídeos das famílias da surfactina, iturina e fengicina (ONGENA et al., 2005).

Pesquisas recentes revelam que *B. subtilis* é capaz de produzir substâncias voláteis com atividade antifúngica. Porém, uma parcela dessas substâncias voláteis produzidas por esta bactéria ainda são desconhecidas (KAI et al., 2007). Dados obtidos por Chen et al. (2008) mostram que 14 compostos voláteis de *B. subtilis*, identificados através da cromatografia gasosa de espectro de massa (CG-MS), apresentam aparente fonte de compostos bioativos. A natureza antifúngica de alguns dos compostos, tais como 2-etil-hexanol, 2,4-bis (2-metilpropil) fenol, 4-hidroxibenzaldeído e 2-nonanona, foi também demonstrada em outros patossistemas (ALMENAR et al., 2007; WANG et al., 2004).

Mesmo com a crescente procura por alternativas para o controle de fitopatógenos, ainda há muitas barreiras para que o produto final chegue ao consumidor, devido a problemas burocráticos e legislativos. No entanto, é notório o aumento na procura de empresas com interesse de produzir e comercializar produtos a base de microrganismos com potencial de biocontrole (LANNA FILHO et al., 2010).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Localização e características gerais do experimento

Os ensaios experimentais com as mudas de espécies florestais foram realizados no Viveiro Florestal “Juarez Martins Hoppe” pertencente ao Departamento de Ciências Florestais (DCF) do Centro de Ciências Rurais (CCR) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), localizado nas coordenadas 29°42' de latitude sul e 53°42' de longitude oeste e com altitude de 95m.

Os experimentos com avaliação da patogenicidade em mudas de espécies florestais foram conduzidos de outubro de 2012 a fevereiro de 2013, em casa de vegetação, com quatro irrigações diárias com duração de 15 min, realizadas por aspersores fixos com lâmina d'água de 5 mm. Durante os períodos de dias chuvosos, a irrigação foi desligada, a fim de evitar o excesso de água nas mudas.

O clima da região caracteriza-se como subtropical úmido, do tipo “Cfa”, segundo a classificação de Köppen, com temperatura média do mês mais frio entre -3 e 18 °C, e do mês mais quente superior a 22 °C e precipitação média anual de 1.769 mm (MORENO, 1961).

Os experimentos laboratoriais foram realizados no Laboratório de Fitopatologia “Eloicy Minussi” pertencente ao Departamento de Defesa Fitossanitária (DFS) do CCR da UFSM.

3.2 Preparação dos isolados de *Ceratocystis fimbriata*

Foram utilizados cinco isolados (PM08, PM29, PP08, PC03 e PB01) de *Ceratocystis fimbriata* pertencentes à micoteca do Laboratório de Fitopatologia “Eloicy Minussi” da UFSM, onde permaneceram armazenados sob refrigeração em *ependorffs* contendo solução salina. Os isolados foram obtidos de amostras de solo e material vegetal de plantas de kiwi (cultivares Monty, Elmwood e Hayward) que

apresentavam sintomas típicos da doença, em quatro pomares localizados na região de Farroupilha - RS (Tabela 1) no mês de julho de 2010 (PIVETA, 2013).

Tabela 1 - Coordenadas geográficas dos locais de coleta dos isolados de *Ceratocystis fimbriata* na região de Farroupilha-RS.

Pomar/Sigla	Isolados	Coordenadas
Pomar Miguel (PM)	PM08 e PM29	S 29 ⁰ 14'.242" W 51 ⁰ 23'.187"
Pomar Bohn (PB)	PB01	S 29 ⁰ 09'.022" W 51 ⁰ 24'.805"
Pomar Colussi (PC)	PC03	S 29 ⁰ 09'.505" W 51 ⁰ 22'.783"
Pomar Pasa (PP)	PP08	S 29 ⁰ 11'.751" W 51 ⁰ 24'.118"

Posteriormente, estes isolados de *Ceratocystis* foram identificados como componentes do complexo *fimbriata* dentro de quatro regiões do clado América Latina (Figura 1) (PIVETA, 2013). Os mesmos foram cultivados em placas de Petri contendo meio Batata-Dextrose-Ágar (BDA) (200g de batata, 20g de dextrose, 17 g de ágar e um litro de água destilada) a 25°C, fotoperíodo de 12 h, durante dez dias.

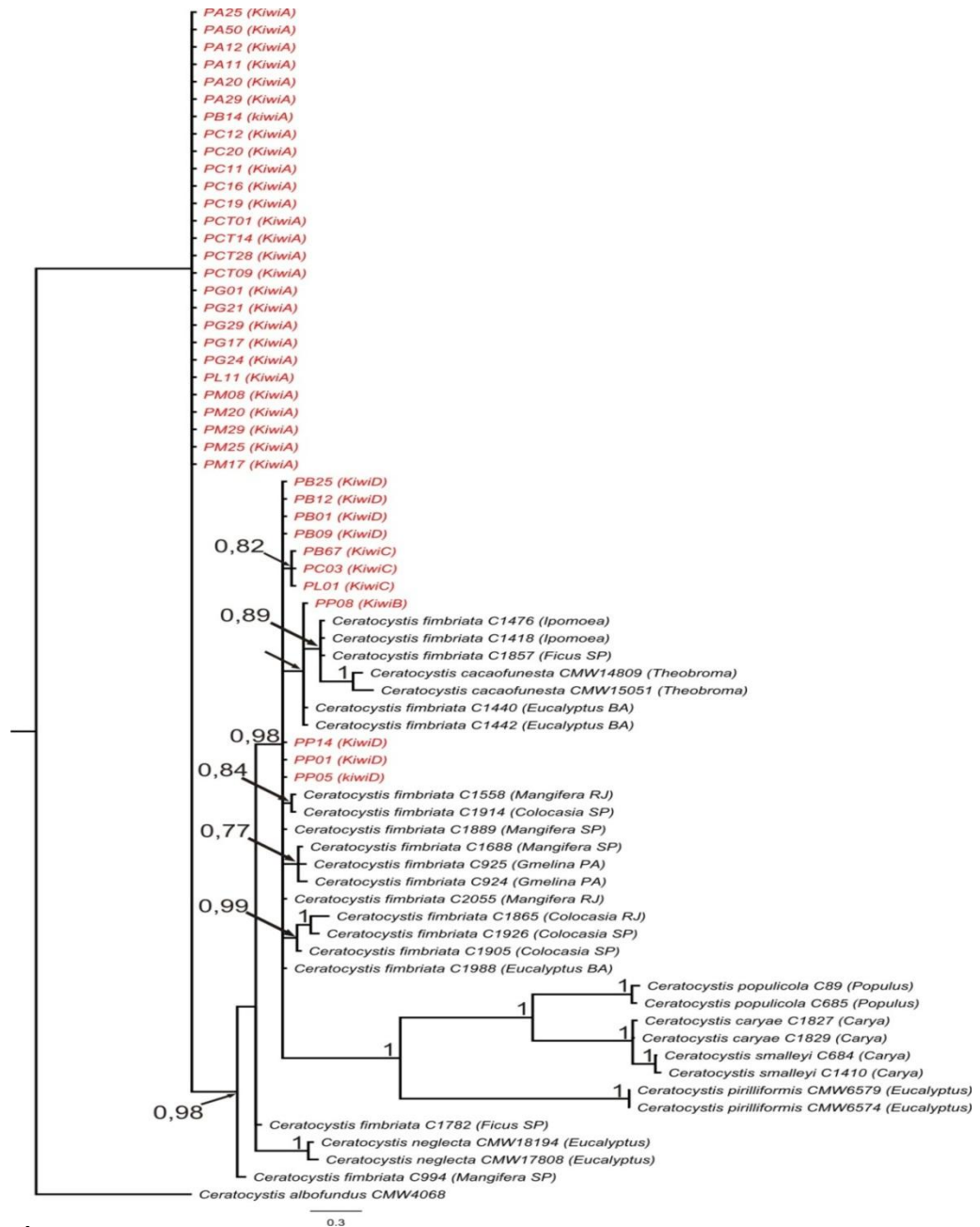


Figura 1 - Árvore baseada nas sequências ITS-rDNA de isolados de *Ceratocystis* sp. pelo método Inferência Bayesiana. Com valores das probabilidades a posteriori (pp). Com os valores de *Bootstrap* e *Ceratocystis albofundus* como *outgroup*. A identificação dos isolados e do hospedeiro/local (entre parênteses) está indicada à frente do nome da espécie. As barras indicam a fração de substituição por sítios (PIVETA, 2013).

3.3 Teste de patogenicidade em mudas de espécies florestais

Para o teste de patogenicidade com isolados de *Ceratocystis fimbriata* foram utilizadas mudas de acácia-negra (*Acacia mearnsii*), araucária (*Araucaria angustifolia*), cerejeira (*Eugenia involucrata*), ingá (*Inga marginata*) e araçá (*Psidium cattleianum*).

As mudas de espécies florestais com idade aproximada de seis meses, medindo entre 0,5 e 1,0 m de altura, foram adquiridas em um viveiro comercial em Farroupilha, na Serra Gaúcha. As mudas de acácia-negra, cerejeira e ingá foram transplantadas para sacos plásticos maiores de 1,5, 2,0 e 2,0 L, respectivamente, contendo substrato comercial.

Os cinco isolados de *C. fimbriata* selecionados foram transferidos para placas de Petri (90mm) contendo meio de cultura BDA e mantidas em incubadora com fotoperíodo de 12 horas a 25°C durante 10 dias. Após esse período, foram adicionados 10 mL de água destilada esterilizada às placas e, após raspagem da superfície da colônia com alça de Drigalski, a suspensão de esporos (conídios, ascósporos e aleuroconídios) foi filtrada em camada dupla de gaze. A concentração da suspensão de inóculo foi determinada sob microscópio de luz com o auxílio de um hemacitômetro. A suspensão foi calibrada para $2,5 \times 10^6$ esporos mL⁻¹ (LAIA et al., 2000).

A inoculação das plantas foi realizada por meio de uma incisão longitudinal superficial no caule de, aproximadamente, 5 cm acima da área do coleto das plantas. A abertura do corte foi realizada com auxílio de um estilete e em seguida, foram depositados, aproximadamente, 0,5 mL da suspensão de esporos com o auxílio de uma seringa milimetrada. O ferimento foi coberto com filme plástico de PVC para evitar o secamento e a entrada de outros microrganismos. Para as plantas controle foi empregada água destilada esterilizada no lugar da suspensão de inóculo. Após a inoculação, as plantas foram mantidas em casa de vegetação por 30 dias (acácia-negra) e 120 dias (espécies nativas) quando procedeu-se a avaliação (adaptado OLIVEIRA, 2010). Para cada espécie florestal foram utilizadas quatro repetições contendo três mudas cada.

3.3.1 Avaliação da severidade

Conforme descrito por Oliveira (2010) a avaliação da severidade ocorreu medindo-se a altura das plantas e o comprimento das lesões (sintoma típico de escurecimento do lenho causados pelo patógeno colonizando o sistema vascular da planta). Com esses dados, foi calculada a agressividade dos isolados (percentagem de tecido doente), dado pela equação:

$$S = CL \times HP^{-1} \times 100,$$

Onde:

CL = comprimento da lesão e

HP = altura da planta.

3.3.2 Reisolamento de *Ceratocystis fimbriata*

Para o reisolamento dos isolados de *C. fimbriata* a partir das mudas inoculadas, foram utilizados fragmentos do caule dos hospedeiros, através do método de sanduíche de cenoura, de acordo com Laia et al. (2000). Para isso, foram realizadas quatro repetições de cinco sanduíches de cenoura com pedaços de tecido infectados e incubados em câmara úmida a 25°C por 10 dias.

3.3.3 Obtenção das culturas mono-ascospóricas

De cada cultura reisolada de *C. fimbriata*, crescida em BDA e com 10 dias de idade, foi retirada, com auxílio de uma agulha flambada e resfriada, uma massa de ascósporos de um único peritécio e transferida para outra placa contendo meio Ágar-Água (AA) (20g de ágar e um litro de água destilada) acrescido de antibiótico

(estreptomicina), na concentração de 100 $\mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$. Após a transferência, com auxílio de uma alça de Drigalski esterilizada, a massa de ascósporos foi espalhada em uma placa de Petri. Posteriormente, as placas foram incubadas a 25 °C no escuro por 24 horas. Após esse período, os ascósporos germinados (formação de cadeias de endoconídios) foram visualizados, perpendicularmente à placa, sob microscópio estereoscópico. Após a visualização dos esporos germinados, a cadeia de endoconídios foi extraída com uma agulha flambada e resfriada. Os conídios aderidos à agulha flambada e resfriada foram transferidos para o centro de outra placa de Petri contendo meio BDA, suplementado com antibiótico (estreptomicina). As placas foram colocadas novamente para incubar nas mesmas condições por 15 dias (ALFENAS et al., 2007).

3.4 Pareamento de culturas entre *Ceratocystis fimbriata* e *Trichoderma* spp.

A ação antagonista do fungo *Trichoderma* spp. sobre os cinco isolados patogênicos (PM08, PM29, PP08, PC03 e PB01) de *C. fimbriata* foi avaliada através do teste de confrontação direta. Para cada ensaio, efetuaram-se quatro repetições, sendo cada repetição constituída por uma placa de Petri.

Foram testados os isolados de *Trichoderma* CP21 (*Trichoderma asperellum*), SP13 (*Trichoderma koningiopsis*) (SILVA, 2013), disponibilizados pela micoteca do Laboratório de Fitopatologia “Elocy Minussi” da UFSM, mais um produto comercial, Agrotrich Plus[®] (AG) a base de *Trichoderma* spp..

Para tanto, um disco de 7 mm de diâmetro com meio de cultura BDA contendo micélio com 10 dias de idade, foi transferido, para uma placa de Petri (90mm de diâmetro) a uma distância de 0,5 cm da extremidade, também contendo BDA. As placas foram incubadas durante sete dias a 25°C ($\pm 2^\circ\text{C}$) com fotoperíodo de 12 horas. Após esse período, foi acrescentado mais um disco de 7 mm de diâmetro, desta vez, contendo micélio de *Trichoderma* spp. na extremidade oposta ao disco de BDA contendo *C. fimbriata* na placa de Petri (adaptado ETHUR, 2006). As placas foram incubadas em câmara de crescimento a 25°C ($\pm 2^\circ\text{C}$), com fotoperíodo de 12h, por sete dias. Como testemunha, o patógeno foi cultivado separadamente.

Durante o período de incubação, as placas foram avaliadas mensurando-se, diariamente, o crescimento micelial dos isolados do patógeno com o auxílio de um paquímetro digital. O cálculo da porcentagem de inibição do crescimento micelial foi determinado aplicando a fórmula: % inibição = $[(crtest - crtrat) / crtest] \times 100$, onde: crtest = crescimento radial da testemunha; crtrat = crescimento radial do tratamento (MENTEN et al., 1976).

Para a avaliação do potencial de biocontrole de *Trichoderma* spp. sobre *C. fimbriata* foram adotadas duas escalas de notas. Uma delas, seguindo a escala de Bell et al. (1982) que baseia-se na observação visual, atribuindo notas de 1 a 5 (Tabela 2), e outra seguindo a escala de Rodrigues (2010), onde as placas são sobrepostas em um croqui, que atribui notas variando de 1 a 7, conforme Tabela 3.

Tabela 2 - Escalas utilizadas no teste de pareamento de culturas

Notas	Escala de avaliação proposta por Bell et al. (1982)
1	Antagonista cresce e ocupa toda placa.
2	Antagonista cresce e ocupa uma parte do patógeno (2/3 da placa).
3	Antagonista e patógeno crescem até a metade da placa (nenhum domina o outro).
4	Patógeno cresce e ocupa uma parte do antagonista (2/3 da placa).
5	Patógeno cresce e ocupa toda a placa.
Notas	Escala de avaliação proposta por Rodrigues (2010)
1	Antagonista cresce por toda a placa de Petri e sobre o disco o patógeno.
2	Antagonista cresce por toda a placa de Petri, porém não sobrepõe-se sobre o disco do patógeno.
3	Antagonista cresce sobre 3/4 da placa.
4	Antagonista cresce sobre 2/3 da placa.
5	Antagonista e patógeno crescem até a metade da placa.
6	Patógeno cresce sobre 2/3 da placa.
7	Patógeno cresce por toda a placa de Petri.

No momento da avaliação, quando as notas foram atribuídas, para uma melhor uniformidade, foi utilizado um gabarito sob o fundo das placas, sendo possível visualizar as notas conforme o crescimento das colônias (Figuras 2 e 3).

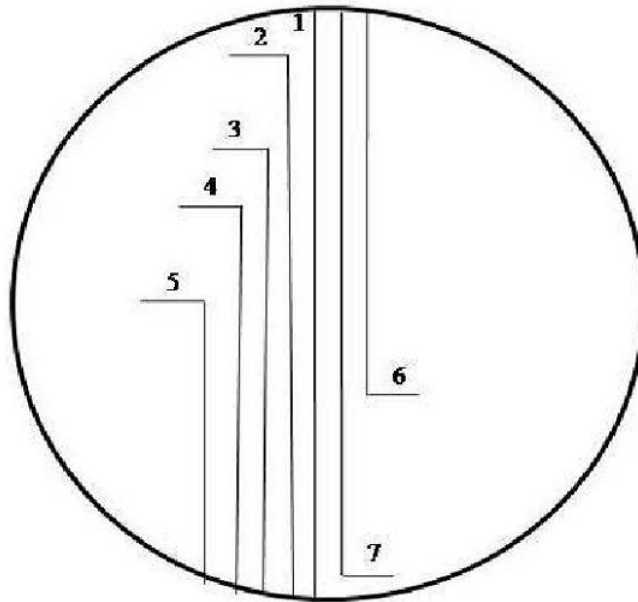


Figura 2 - Gabarito com a escala utilizada para atribuição das notas no teste de pareamento de culturas. Fonte: Rodrigues (2010).

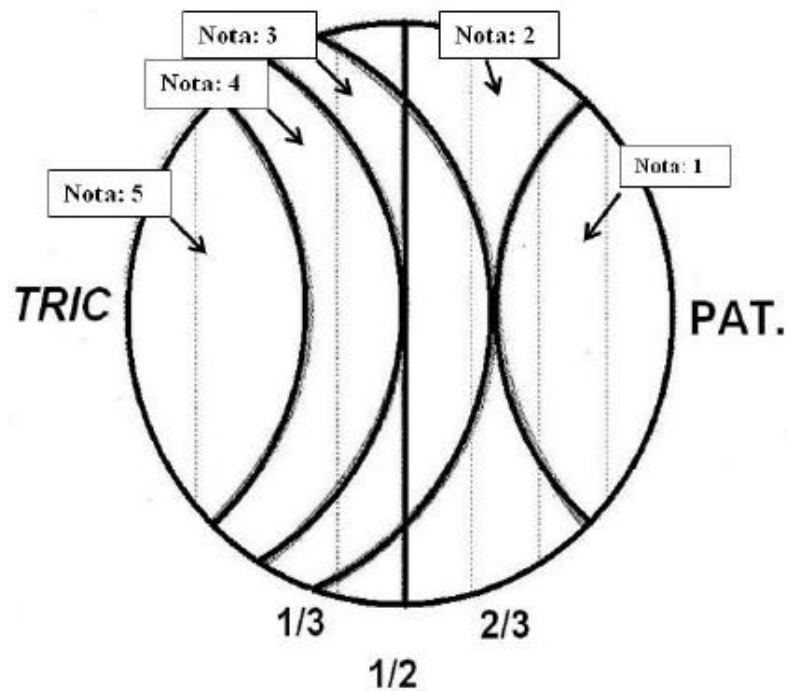


Figura 3 - Representação da escala de notas proposta por Bell et al. (1982), adaptado Montalvão (2012).

3.5 Pareamento de culturas entre *Ceratocystis fimbriata* e *Bacillus subtilis*

A ação antagonista da bactéria *Bacillus subtilis* sobre isolados patogênicos de *C. fimbriata* também foi avaliada através do teste de confrontação direta. Para o teste de pareamento de culturas foi utilizado o produto comercial Rizolyptus[®] a base de *B. subtilis* e os mesmos isolados de *C. fimbriata* utilizados no teste de patogenicidade em mudas de espécies florestais. Para cada ensaio, efetuaram-se quatro repetições, sendo cada repetição constituída por uma placa de Petri.

Para os ensaios, um disco de meio de cultura BDA de 7 mm de diâmetro contendo micélio de *C. fimbriata* foi transferido para o centro das placas de Petri (90mm de diâmetro), contendo meio de cultura BDA. Em seguida, as placas foram incubadas a 25°C com fotoperíodo de 12 h por sete dias. Após esse período, quatro discos de meio de cultura BDA contendo células bacterianas de *B. subtilis*, crescidas por 48 h a 25°C, foram dispostas equidistantes entre si e do centro da placa de Petri. As placas foram mantidas em incubadora nas mesmas condições por mais sete dias, a ocorrência de antagonismo foi avaliada após esse período, comparando com as placas controle (somente com patógeno) (adaptado SOTTERO et al., 2006). A mensuração do crescimento micelial dos isolados de *C. fimbriata* e o percentual de inibição do crescimento micelial dos mesmos, segue a metodologia descrita no item 3.4.

3.6 Teste in vivo de *Ceratocystis fimbriata* x *Bacillus subtilis* em mudas de acácia-negra

A partir dos resultados obtidos nos testes dos itens 3.3 e 3.5, fez-se a composição dos tratamentos (Tabela 3), da espécie florestal (acácia-negra) e dos isolados de *C. fimbriata* para o teste de biocontrole *in vivo* utilizando *Bacillus subtilis* na forma comercial Rizolyptus[®] (RZ).

Tabela 3 - Composição dos tratamentos do teste de biocontrole com *B. subtilis* em mudas de *Acacia mearnsii*, na forma comercial Rizolyptus[®], sobre os isolados PM29 e PP08 de *C. fimbriata*.

Tratamentos	Códigos	Composição dos tratamentos
T1	RZxPP08	Rizolyptus [®] inoculado sete dias antes do patógeno
T2	RZxPM29	
T3	PP08	Mudas inoculadas apenas com o patógeno.
T4	PM29	
T5	PP08xRZ	Rizolyptus [®] inoculado sete dias após o patógeno.
T6	PM29xRZ	
T7	RZ	Mudas inoculadas apenas com Rizolyptus [®] .
T8	TEST	Mudas controle, empregado apenas água destilada e esterilizada.

Para o teste *in vivo* de *C. fimbriata* e *B. subtilis* foram utilizadas mudas de acácia-negra com, aproximadamente, 10 meses de idade adquiridas do mesmo viveiro descrito no item 3.3. As mudas foram transferidas para sacos de 1,5 L, preenchidos com substrato comercial e mantidas em casa de vegetação, como descrito no item 3.1.

Com o auxílio de um estilete, foi feita uma pequena incisão longitudinal, de aproximadamente 5 cm acima da área do coleto das mudas de acácia-negra. Em seguida, com o auxílio de uma seringa milimetrada, foi depositado 1mL do produto comercial Rizolyptus[®] a base de *B. subtilis*. O ferimento foi coberto com filme plástico de PVC para evitar o secamento.

Após sete dias, foram inoculadas as suspensões de esporos dos isolados PM29 e PP08 de *C. fimbriata* conforme descrito no item 3.3, a 1 cm no sentido longitudinal da área de inoculação do produto comercial Rizolyptus[®] (T1 e T2). Foram inoculadas mudas contendo apenas suspensão de esporos dos isolados (T3 e T4) e apenas com Rizolyptus[®] (T7). As plantas controle foram inoculadas apenas com água destilada e esterilizada (T8).

Passados sete dias da inoculação do patógeno, as mudas foram inoculadas com Rizolyptus[®] (T5 e T6), conforme descrito anteriormente (BROOKS et al., 1994). As plantas foram mantidas em casa de vegetação por 30 dias. A avaliação do

potencial antagonista de *B. subtilis* através do percentual de severidade dos isolados, o reisolamento do patógeno e a obtenção das culturas mono-ascospóricas segue as metodologias descritas nos itens 3.3.1, 3.3.2 e 3.3.3, respectivamente.

3.7 Análise estatística

Os testes de patogenicidade em mudas de espécies florestais, pareamento de culturas e biocontrole *in vivo* foram realizados em delineamento inteiramente casualizado. Nos testes de pareamento de culturas foram utilizadas quatro repetições por tratamento. Os testes de patogenicidade e *in vivo* foram realizados com quatro repetições onde, cada repetição foi composta por três mudas.

Para análise da variância (ANOVA), os dados que não seguiram a distribuição normal, quando submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk e homogeneidade de variância pelo teste de Bartlett foram transformados segundo função arcoseno $(x/100)^{0,5}$. Os resultados em unidades decimais não sofreram transformações. Para comparação de médias foi utilizado teste de agrupamento Tukey a 5% de significância, com o auxílio do *software* estatístico SISVAR 5.3 (FERREIRA, 2009).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Testes de patogenicidade de isolados de *Ceratocystis fimbriata* em espécies florestais

No teste de patogenicidade de isolados de *Ceratocystis fimbriata* em mudas de araçá, araucária, cerejeira e ingá (espécies nativas), não foram observadas manifestações de sintomas de murcha e/ou secamento das plantas (Figura 4). Nas quatro espécies testadas as médias de severidade (%) (Tabela 4), não diferiram estatisticamente quando foram comparados os isolados e as testemunhas inoculadas apenas com água destilada e esterilizada.

A variação nos percentuais de severidade (entre 3,88 e 5,30%) apresentado pelas espécies testadas, é equivalente à lesão causada em resposta ao ferimento provocado durante as inoculações e o comprimento das plantas, o que explica os valores do percentual de severidade menores dos isolados PB01 (araucária, cerejeira), PC03 (araucária, cerejeira e ingá) quando comparados aos valores das testemunhas. Ocorreram cicatrizações nas lesões de plantas de cerejeira inoculadas com os isolados PM08 e PB01. Constatou-se que os isolados de *C. fimbriata* obtidos de kiwi não foram patogênicos às espécies nativas testadas. Segundo Firmino (2011), plantas assintomáticas podem estar relacionadas com a idade e as condições de crescimento, o que não se aplica neste trabalho, visto que o tempo de exposição das mudas com o patógeno seria, em tese, suficiente para que o fungo colonizasse os tecidos e a planta manifestasse os sintomas do ataque, o que não foi evidenciado, pois, durante o período de duração do experimento (120 dias), as mudas não exibiram qualquer sinal de anomalia ou sintoma da doença.

Tabela 4 - Médias de severidade (%) de isolados de *Ceratocystis fimbriata* obtidos de kiwi em mudas de araçá, araucária, cerejeira e ingá. Santa Maria, RS, 2014.

Espécies	Isolados de <i>Ceratocystis fimbriata</i>						
	TEST	PB01	PC03	PM08	PP08	PM29	C. V. (%)
Araçá	3,88 ^{ns}	4,42	4,31	4,37	4,11	4,08	18,59
Araucária	5,22	4,66	4,67	5,90	5,67	5,28	7,27
Cerejeira	5,29	4,67	5,20	4,68	5,29	5,30	12,78
Ingá	4,20	4,43	3,77	4,37	4,96	4,81	11,29

ns: efeito não significativo pelo teste de agrupamento Tukey ($p \leq 0,05$); C.V. (%): Coeficiente de variação.

Os valores não significativos dos percentuais de severidade podem estar relacionada com o processo de cicatrização dos cortes e a resistência ao ataque de patógenos podendo variar de acordo com a fisiologia de cada planta. Conforme Pascholati et al. (1995), fatores estruturais podem atuar como fonte de resistência e devem ser considerados na ausência da manifestação de sintomas. Segundo os autores, a cicatrização dos cortes durante a condução do teste de patogenicidade pode estar relacionada ao aumento da lignificação das paredes celulares e a formação de tiloses. Ainda segundo os mesmos autores, a lignificação das paredes celulares representa um aumento no sistema de defesa das plantas. Através das modificações químicas da parede celular, a lignificação pode interferir no crescimento dos agentes patogênicos aumentando a resistência ao ataque de enzimas degradadoras, interferindo no processo de difusão das toxinas do patógeno em direção ao hospedeiro e de nutrientes em direção ao patógeno.

Dickinson (2000) destaca que as tiloses resultantes do processo desencadeado pela hiperplasia do protoplasma das células parenquimáticas próximas ao xilema que crescem em direção ao elemento de vaso através das pontuações, podem levar à obstrução parcial ou total. Conseqüentemente, essa obstrução dificultará o transporte de água, podendo conter o avanço do patógeno através da translocação. A colonização do tecido vascular por *C. fimbriata* pode ser prejudicada pela formação das tiloses e a obstrução dos vasos, dificultando a translocação para outras partes da planta.

Para Daniel et al. (1995); Lo et al. (1996) e Sanier et al. (1992), uma das razões para que determinadas espécies sejam resistentes ao ataque de certos patógenos pode estar relacionada com a resistência provida de fatores bioquímicos. Segundo estes autores, as fitoalexinas são compostos secundários de baixo peso molecular formados nas células vegetais em resposta ao estresse físico, químico ou biológico como o ataque microbiano. Estes compostos atuam como uma barreira protetora, sendo capazes de impedir ou reduzir o ataque de patógenos, expressando uma importante fonte de resistência. Estes compostos fenólicos, quando presentes, inibem a germinação conidial dificultando a infecção. As fitoalexinas agem na ruptura da membrana plasmática dos fungos, resultando na granulação citoplasmática, na desorganização do conteúdo celular e na inibição das enzimas fúngicas refletindo na redução ou inibição do crescimento micelial. Neste trabalho, não foi possível constatar se o insucesso na colonização dos tecidos das mudas de espécies nativas pelos isolados de *C. fimbriata* estaria relacionado a fatores estruturais e/ou bioquímicos, sendo necessários mais estudos para elucidar as características envolvidas na colonização e manifestação de sintomas decorrentes do ataque de *C. fimbriata*.



Figura 4 - Teste de patogenicidade em mudas de *Araucaria angustifolia*. (A): Testemunha inoculada apenas com água destilada e esterilizada; (B): Muda inoculada com isolado PM29 de *C. fimbriata*. (C): Cortes de A e B, exibindo as lesões. (T) testemunha e (C.f.) *C. fimbriata*.

Em mudas de acácia-negra, os isolados de *C. fimbriata* apresentaram diferentes níveis de severidade (Figura 5). Os percentuais de severidade foram significativos para os isolados PM29, PP08, PM08 e PC03, diferindo estatisticamente da testemunha inoculada com água destilada e esterilizada, que não apresentou sintomas de seca ou murcha. Santos (2004) obteve o primeiro relato de murcha-de-ceratocystis em plantios comerciais de acácia-negra no RS. Segundo o autor, quando inoculados em mudas saudáveis, os isolados obtidos dos plantios comerciais sintomáticos produziram os mesmos sintomas observados a campo. Neste estudo, pode-se inferir que isolados PC03, PM08, PP08 e PM29 de *C. fimbriata* foram patogênicos a acácia-negra, colocando em evidência plantios comerciais livres do patógeno na região Serra Gaúcha. Por se tratar de um patógeno de solo, o uso de implementos agrícolas e ferramentas entre os agricultores pode acarretar a disseminação de *C. fimbriata*. Além disso, as mudas de acácia-negra utilizadas neste trabalho foram adquiridas em um viveiro comercial que abastece as propriedades da região. O isolado PM29 provocou a morte de todas as mudas em 28 dias, porém não diferindo estatisticamente do isolado PP08 que obteve média de 94,03% de severidade, estes isolados foram responsáveis pelo maior número de plantas com sintomas de murcha e morte (Figura 6).

Os isolados PC03 e PM08 seguiram a mesma tendência, apresentaram médias superiores a 50% de severidade, não diferiram estatisticamente entre si e dos isolados PP08 e PB01, contudo, diferindo da testemunha.

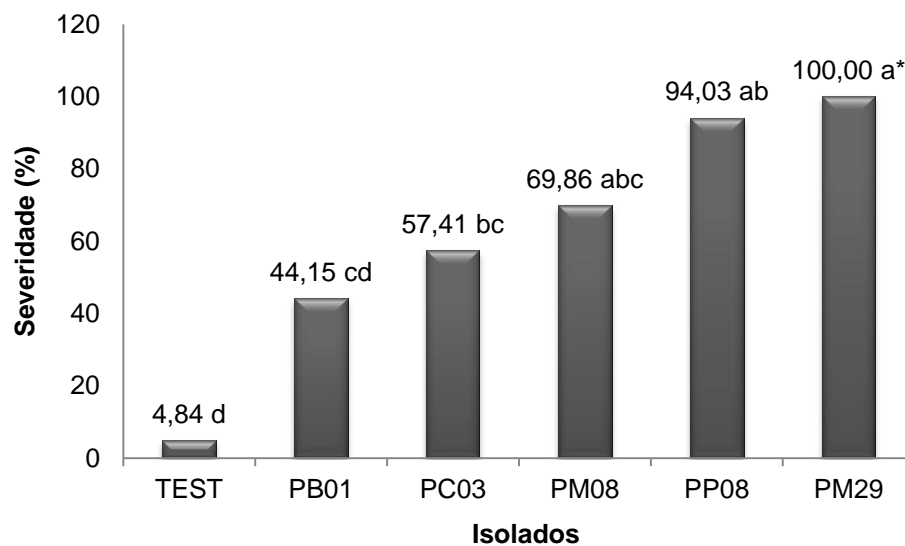


Figura 5 - Médias de severidade (%) de murcha-de-ceratocystis em mudas de *Acacia mearnsii* inoculadas com isolados de *C. fimbriata* obtidos de kiwi. (*) Médias seguidas pela mesma letra, não diferem entre si pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$).

O isolado PB01 exibiu o menor percentual de severidade (44,15%), não diferindo estatisticamente da testemunha e dos isolados PC03 e PM08 de *C. fimbriata*. Neste caso, vale ressaltar que estes valores correspondem a avaliação decorridos 30 dias após a inoculação. Certamente, este percentual aumentaria se as mudas continuassem em contato com o patógeno, visto que este isolado, em relação aos demais, necessitou de mais tempo para expressar os sintomas e causar a morte das plantas. Avigorando os resultados deste estudo, Piveta (2013), testando os isolados PC03, PB01, PP08 e PM08 em variedades de kiwi e clones de eucalipto, obteve médias de severidade significativas quando esses isolados foram comparados com as médias das testemunhas. Segundo a autora, os isolados PB01, PC03 e PP08 exibiram altos percentuais de severidade para as variedades de kiwi Mont e Hayward. O clone 37423 (*Eucalyptus urophylla* x *E. globulus*) mostrou-se altamente suscetível quando inoculado com os isolados, PC03, PB01 e PP08. O clone 35878 (*E. urophylla* x *E. grandis*) também foi altamente suscetível quando inoculado com os isolados PC03 e suscetível quando inoculado com o isolado PB01. Contudo, o clone 32864 (*E. grandis*) e a espécie de *E. dunnii* mostraram-se resistentes aos mesmos isolados, resultando em uma importante fonte de resistência.



Figura 6 - Teste de patogenicidade de *C. fimbriata* em mudas de *Acacia mearnsii*. (A): Planta morta inoculada com o isolado PB01. Ao lado testemunha inoculada apenas com água destilada e esterilizada (B): Testemunha e planta morta inoculada com o isolado PC03.

As médias dos comprimentos de lesões causadas pelos isolados de *C. fimbriata* (Figura 7 e 8), seguem a mesma tendência dos percentuais de severidade. O isolado PM29 não diferiu estatisticamente dos isolados PP08, PM08 e PC03, entretanto, diferiu do isolado PB01 e da testemunha inoculada apenas com água destilada e esterilizada, exibindo a maior média de comprimento de lesão de 50,01cm. Os isolados PC03, PM08 e PP08 diferiram da testemunha com médias de comprimento de lesão de 29,38, 32,29 e 40,42 cm respectivamente, porém, não diferiram entre si. O isolado PB01 apresentou a menor média de comprimento de lesão 21,07 cm não diferindo estatisticamente da testemunha e dos isolados PC03, PM08, PP08.

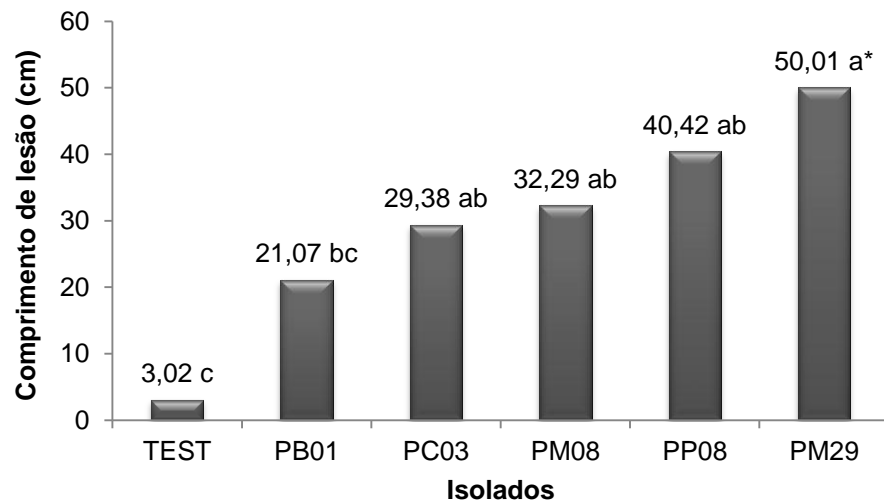


Figura 7 - Médias do comprimento de lesão (cm) de murcha-de-ceratocystis em mudas de *Acacia mearnsii* inoculadas com isolados de *Ceratocystis fimbriata* obtidos de kiwi . (*) Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$).

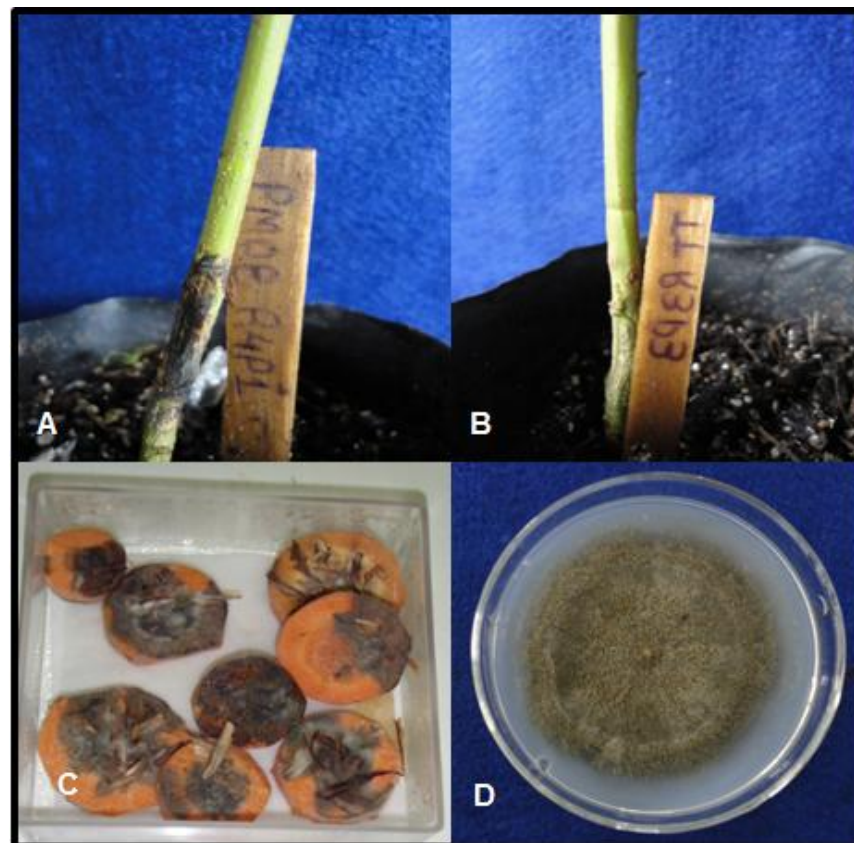


Figura 8 - Teste de patogenicidade de *C. fimbriata* em mudas de *Acacia mearnsii*. (A): Caule com lesão causada pelo ataque do isolado PM08; (B): Caule sem sintomas da testemunha; (C): “Isacas de cenoura” utilizadas no reisolamento do fungo; (D): Colônia mono-ascospórica do isolado PM08 em meio BDA.

Os sintomas do ataque de isolados de *C. fimbriata* obtidos de kiwi em mudas de acácia-negra foram observados inicialmente com o fechamento dos folíolos das plantas. Em seguida, o amarelecimento dos mesmos, evoluindo para murcha do ápice das mudas, secamento e queda dos folíolos e conseqüentemente, a morte da planta.

Os primeiros sintomas de murcha foram observados 15 dias após as inoculações das mudas com o isolado PP08, dois dias após o isolado PM29 também manifestou sinais de murcha nas plantas. Decorridos 21 dias após as inoculações, todos os isolados causaram morte em pelo menos duas mudas de acácia-negra inoculadas, seguindo em ordem decrescente os isolados PM29, PP08, PM08, PC03, PB01 com 7, 6, 4, 4 e 2 plantas mortas, respectivamente. Segundo Firmino (2011), isolados obtidos de cacau quando inoculadas no hospedeiro de origem mostram-se altamente agressivos, expressando sintomas de murcha em 15 dias após a inoculação. Neste mesmo estudo, a autora constatou que, no teste de patogenicidade cruzada com mudas de cacau e isolados obtidos de *Annona X atemoya* (atemóia), *Mangifera indica* (manga) e *Tectona grandis* (teca) foi verificado sintomas de escurecimento do xilema, acarretando na morte das plantas em aproximadamente 30 dias após as inoculações. Contudo, isolados proveniente de *Eucalyptus* spp. não foram capazes de manifestar sintomas de murcha em plantas de *Theobroma cacao* (cacau).

Quando analisados o tempo do surgimento dos sintomas até a evolução da morte das plantas no presente trabalho, os isolados PM29 e PP08 desencadearam a murcha das mudas em 48 horas, seguidos dos isolados PC03 e PM08, 96 horas e o isolado PB01 com 144 horas. Estes valores foram observados, desde o aparecimento dos primeiros sintomas (fechamento dos folíolos) até a murcha total das mudas de acácia-negra. Ribeiro et al. (1988) observaram que todas as mudas de acácia-negra inoculadas com *C. fimbriata*, manifestaram sintomas de murcha 14 dias após a inoculação. Em outro estudo de patogenicidade cruzada entre mudas de acácia negra e mangueira, os autores observaram que ambos isolados foram patogênicos aos hospedeiros exibindo sintomas da doença após duas semanas das inoculações, corroborando com os resultados obtidos neste estudo.

Além da variabilidade patogênica dos isolados de *C. fimbriata*, o rápido aparecimento dos sintomas nas mudas pode também, estar relacionado com as condições ambientais favoráveis, como temperatura e umidade presentes na época

das inoculações. Constatou-se que estes isolados de *C. fimbriata* são potencialmente capazes de colonizar tecidos de hospedeiros diferentes aos de origem, caracterizando variabilidade patogênica entre os isolados obtidos de kiwi na região de Farroupilha na Serra Gaúcha. Valdetaro (2012), testando dois isolados de *C. fimbriata* obtidos de seringueira, nos estados da Bahia e Acre e quando inoculados em *Crotalaria juncea* (crotalária), *Hevea brasiliensis* (seringueira), *Actinidia deliciosa* (kiwi), *Eucalyptus* spp., *Acacia mearnsii* (acácia-negra) e *Mangifera indica* (manga), exibiram diferentes níveis de agressividade em relação à acácia-negra. Os percentuais de severidade dos isolados RB17 e A50 obtidos foram 9,11 e 5,33%, respectivamente. Quando observados os percentuais de severidade dos mesmos isolados inoculados em kiwi, os valores aumentam para 21,51 e 21,26%, respectivamente. Segundo a autora, os resultados não evidenciam a especialização por hospedeiro dos isolados RB17 e A50 testados. Conforme Harrington et al. (2011), os isolados identificados no Brasil não possuem especialização com relação a hospedeiros, porém, quando relacionados a níveis de agressividade variam em proporção as espécies. Ao analisar os resultados do presente estudo pode-se afirmar que os isolados PB01, PC03, PM08 e PP08 de *C. fimbriata* obtidos de kiwi possuem diferentes níveis de agressividade e não possuem especificidade à hospedeiros, visto que foram capazes de expressar sintomas em acácia-negra e eucalipto (PIVETA, 2013).

Oliveira (2010) constatou que isolados obtidos de eucalipto em plantios comerciais em três estados no Brasil (SP, MG e BA) possuem variabilidade patogênica, pois, exibiram diferentes valores de severidade em 10 diferentes clones de eucalipto. Resultados semelhantes foram observados por Zauza et al. (2004), demonstrando que clones de eucalipto possuem diferentes faixas de resistência a *C. fimbriata*. Neste mesmo estudo, os autores verificaram que os dois isolados possuem níveis de severidade parecidos nos clones inoculados.

Em seus estudos, Johnson et al. (2005) verificaram em testes de inoculação cruzada, que isolados de *C. fimbriata* foram capazes de expressar sintomas em gêneros diferentes das utilizadas para obtenção dos isolados. Assim, isolados de *Quercus* spp. causaram sintomas de descoloramento de xilema em plantas de *Prunus* spp.. Quando inoculadas com isolados obtidos de *Prunus* spp., plantas de *Carya* spp. e *Populus* spp. também apresentaram sintomas da doença.

4.2 Pareamento de culturas entre *Ceratocystis fimbriata* e *Trichoderma* spp.

No teste de confrontação direta, os isolados de *Trichoderma* spp. e o composto Agrotich Plus[®] mostraram-se eficientes no biocontrole de *C. fimbriata*, quando avaliados pela escala de notas propostas por Bell et al. (1982) e Rodrigues (2010) (Tabela 5) apresentando notas inferiores a 2 (Figura 9). Porém, a redução do crescimento micelial dos isolados de *C. fimbriata* não foi significativa quando comparados os isolados de *Trichoderma* spp. e o composto Agrotich Plus[®]. Segundo Santos et al. (2012), isolados de *Trichoderma* spp. foram eficientes na inibição do crescimento micelial *in vitro* de *Thielaviopsis paradoxa*, anaforno ao ascomiceto *C. paradoxa*. Estes autores, concluíram que, seguindo a escala de Bell et al. (1982), sete dos 10 isolados de *Trichoderma* spp. testados obtiveram nota 1. Se compararmos as médias das notas obtidas pelo composto Agrotich Plus[®] quando avaliado pela escala de Bell et al. (1982) com as obtidas por Santos et al. (2012), podemos consolidar o potencial de inibição do crescimento micelial *in vitro* do gênero *Trichoderma* frente ao gênero *Ceratocystis*. Entretanto, os resultados devem ser interpretados com cautela, pois as condições *in vitro* podem, às vezes, superestimar os valores, favorecendo o aumento no potencial de biocontrole.

Trichoderma spp. na forma comercial Agrotich Plus[®] (AG), exibiu os melhores resultados obtendo a nota máxima em eficiência (nota 1) nas duas escalas avaliativas sobre todos os isolados de *C. fimbriata*. O isolado CP21 (*T. asperellum*) apresentou médias de notas satisfatórias 1,10 e 1,15 nas escalas de Bell et al. (1982) e Rodrigues (2010), respectivamente. O isolado SP13 (*T. koningiopsi*), apresentou o menor desempenho entre os demais testados, com médias de notas de 1,20 e 1,50 nas escalas anteriormente citadas, respectivamente. Entretanto, mostrou-se capaz de controlar o crescimento micelial do patógeno de forma satisfatória. Ethur (2006), em seus estudos, selecionou três isolados de *Trichoderma* spp. da rizosfera do tomateiro, com potencial antagônico frente a isolados de *Fusarium solani*. Segundo a autora, isolados de *Trichoderma* spp. que apresentarem notas inferiores a 2,0 quando avaliados pela escala de Bell et al. (1982), podem ser considerados muito eficientes no controle *in vitro*. No caso em tela, as notas dos isolados de *Trichoderma* spp. e do composto Agrotich Plus[®], variaram entre 1 e 1,75, portanto, muito eficientes no controle *in vitro* de *C. fimbriata*. Milanesi (2009) também

obteve resultados significativos do antagonismo de isolados de *Trichoderma* spp. sobre *Fusarium*, corroborando para o potencial antagonico e promissor de *Trichoderma* spp..

Tabela 5 - Médias das notas do teste de confrontação direta obtidas pelos isolados de *Trichoderma* spp. contra isolados de *Ceratocystis fimbriata* utilizando a escala de Bell et al. (1982) e Rodrigues (2010). Santa Maria, RS. 2014.

C. f. Tr.	PC03		PB01		PM08		PM29		PP08		
	B	R	B	R	B	R	B	R	B	R	
AG	1,00 ^{ns}	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
CP21	1,25	1,25	1,25	1,25	1,00	1,00	1,00	1,25	1,00	1,00	1,00
SP13	1,25	1,50	1,50	1,75	1,00	1,25	1,25	1,75	1,00	1,25	1,25
C. V (%)	15,82	16,55	16,55	14,86	0,00	11,56	11,56	18,73	0,00	11,56	11,56

Onde: C. f: isolados de *C. fimbriata*; Tr: isolados de *Trichoderma* spp.; AG : Agrotich Plus®; CP-21: *T. asperellum*; SP-13: *T. koningiopsi*; B: médias obtidas pela escala de Bell et al., 1982; R: médias obtidas pela escala de Rodrigues (2010); ns: efeito não significativo pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$); C.V.: Coeficiente de variação.

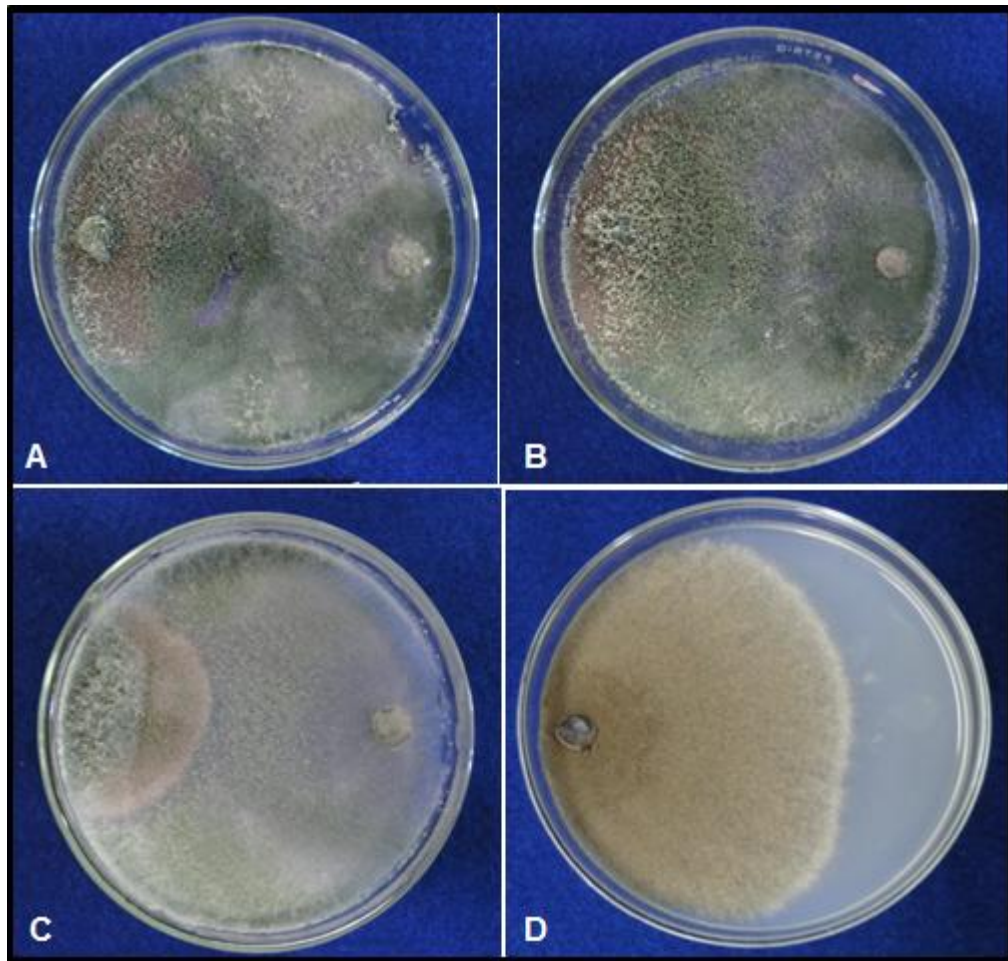


Figura 9 - Pareamento de culturas de *Trichoderma* spp. sobre o isolado PC03 de *C. fimbriata*. (A): Agrotich Plus® (AG) x PC03; (B): *T. asperellum* (CP21) x PC03; (C): *T. koningiopsi* (SP13) x PC03; (D): Testemunha apenas com PC03.

Neste trabalho, foi possível evidenciar que as escalas de notas utilizadas não foram eficientes para discriminar através de notas os melhores isolados antagonistas. Verificou-se que fungos de crescimento lento *in vitro* como *C. fimbriata*, necessitam em média de 21 dias para preencher toda superfície da placa de Petri e dessa maneira, não devem ser avaliados por metodologias que atribuem notas. O gênero *Trichoderma*, geralmente, é capaz de colonizar toda superfície da placa de Petri em média de quatro dias, sob pena de superestimar os resultados do teste de confrontação direta. Conforme Lazarotto et al. (2012) para a seleção de antagonistas em potencial, devem ser consideradas as diferenças de espécies do patógenos e mesmo variações interespecíficas dos mesmos. Neste estudo, foi

observada uma variação intraespecífica no crescimento micelial dos isolados de *C. fimbriata*, refletindo na ação de biocontrole de *Trichoderma* spp.

Figueirêdo et al. (2010), analisando o controle biológico de *Trichoderma* spp sobre *Sclerotinia sclerotiorum*, verificaram que entre os nove isolados de *Trichoderma* spp. avaliados para o potencial de biocontrole de *S. sclerotiorum*, apenas três apresentaram ação satisfatória obtendo nota 1 em antagonismo, na escala de Bell et al. (1982). Os demais isolados de *Trichoderma* spp. apresentaram potencial antagônico leve, sendo atribuída a nota 2 nesta mesma escala.

Resultados semelhantes foram obtidos por Santos (2008), avaliando a inibição da esporulação de *Fusarium oxysporum*, onde todos os isolados de *Trichoderma* spp. provocaram forte inibição do crescimento micelial do fitopatógeno. Seis isolados apresentaram excelente ação antagônica, pois foram capazes de esporular sobre toda superfície do meio e inibiram o crescimento micelial do fitopatógeno, obtendo, nota 1 de acordo com a escala de classificação de Bell et al. (1982). Outros quatro isolados colonizaram pelo menos 2/3 da superfície do meio, obtendo nota 2.

Maciel et al., (2012), constataram efeito significativo dos produtos Trichodel[®] e Agrotrich Plus[®], à base de *Trichoderma* spp., frente a isolados de *Cylindrocladium candelabrum*, onde o antagonista ocupou, no mínimo, 2/3 da placa de Petri.

Para Silva (2013), a escala proposta por Rodrigues (2010) obteve um coeficiente de variação menor quando comparado com a escala proposta por Bell et al. (1982), sendo assim, mais precisa para avaliação de testes de confrontação direta. Segundo a autora, a escala proposta por Rodrigues (2010) é mais objetiva, permitindo que vários avaliadores encontrem médias semelhantes, sendo mais vantajosa frente à escala proposta por Bell et al. (1982). Neste estudo, ao contrário de Silva (2013), a escala de Bell et al. (1982) apresentou menor coeficiente de variação (média de 8,63%), sendo mais precisa, quando comparada a escala proposta por Rodrigues (2010) (média de 10,60%).

Entretanto, constatou-se que a medida diária do crescimento micelial do patógeno durante a confrontação direta (Tabela 6), possibilitou a verificação de diferenças significativas no crescimento micelial dos isolados de *C. fimbriata* pareados quando comparados com a testemunha (Tabela 6). A interação antagonista x patógeno foi significativa, o que pode ser atribuído à agressividade de crescimento *in vitro* do patógeno, expressa por cada isolado. Segundo Silva (2013),

o isolado CP21 (*T. asperellum*) mostrou-se promissor no controle de *Sclerotinia sclerotiorum*, preconizando a interação de mais de um mecanismo de ação no controle de patógenos como, por exemplo, liberação de metabólitos ou parasitismo. O crescimento micelial dos isolados de *C. fimbriata* foi permitido até 72 horas após o início da confrontação direta, o que pode estar relacionado com a competição de nutrientes e espaço sobre a colonização do meio de cultura.

O isolado PC03 mostrou-se mais agressivo apresentando médias que variam de 41,66 a 45,70 mm enquanto que, para o isolado PM29, as médias de crescimento foram de 27,79 a 29,74 mm, mostrando-se menos agressivo em relação aos demais isolados. Lazarotto et al. (2012) em seu estudo, constataram diferença significativas mensurando o crescimento micelial de *Fusarium* spp. quando confrontados com isolados de *Trichoderma* spp. e Agrotich Plus®.

Em relação aos percentuais de inibição do crescimento micelial do antagonista sobre o patógeno (Tabela 6), o menor valor no percentual foi constatado sobre o isolado PC03 em média 48,79%, seguido dos isolados PP08, PM08 PB01 e PM29 com valores médios de 48,50, 48,96, 51,52 e 51,64% respectivamente. Neste estudo, foi possível observar que os isolados de *C. fimbriata* com menor velocidade de crescimento micelial apresentaram os maiores percentuais de inibição. *T. asperellum* (CP21) mostrou-se mais eficiente quando comparado com os demais antagonistas (em média de 51,31%) corroborando com os resultados relatados por Silva (2013). O isolado PM29 que exibiu maior número de plantas mortas no teste de patogenicidade foi o menos agressivo *in vitro*. Mahalingam et al. (2011), analisaram o percentual de inibição do crescimento micelial de isolados de *T. koeningii*, *T. viride*, *T. hirsuta*, *T. harzianum* e *T. glaucum* sobre *Ceratocystis paradoxa* obtendo percentuais de inibição de 75,00, 73,80, 72,3, 56,9 e 53,8%, respectivamente. Rhaman et al. (2009), testando o percentual de inibição *in vitro* de três isolados de *T. harzianum*, um isolado de *T. virens* e um isolado de *T. pseudokoningii* sobre um isolado de *C. paradoxa*, obtiveram resultados expressivos do percentual de inibição com valores variando de 40,47 a 80,82%. Vale ressaltar que os percentuais de inibição do crescimento micelial de *C. fimbriata*, do presente trabalho, assemelham-se aos dos autores anteriormente citados, enfatizando o potencial de biocontrole *in vitro* de *Trichoderma* spp. sobre *Ceratocystis* spp.

Tabela 6 - Crescimento e percentagem de inibição do crescimento micelial (CM) *in vitro* de *Ceratocystis fimbriata* no teste de confrontação direta com isolados de *Trichoderma* spp.. Santa Maria, RS, 2014.

Variáveis	<i>C. fimbriata</i>	<i>Trichoderma</i> spp.				CV (%)
		AG	CP21	SP13	TEST	
CM (mm)	PC03	42,53 aB*	45,70 aC	41,66 aB	84,55 bB	7,88
	PB01	40,43 aB	36,26 aB	41,21 aB	81,06 bB	5,71
	PM08	28,05 aA	28,49 aA	30,12 aA	56,59 bA	11,06
	PM29	29,74 aA	27,79 aA	27,88 aA	58,87 bA	8,20
	PP08	30,13 aA	30,77 aAB	30,35 aA	59,06 bA	4,63
C. V (%)		7,80				
% de inibição	PC03	49,70	45,95	50,73	0,00	
	PB01	50,12	55,27	49,16	0,00	
	PM08	50,43	49,66	46,78	0,00	
	PM29	49,48	52,79	52,64	0,00	
	PP08	48,98	47,90	48,61	0,00	

Onde: CM: Crescimento Micelial de *C. fimbriata*; AG: Agrotrich Plus[®]; CP21: *T. asperellum*; SP13: *T. koningiopsi*; (*) Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na vertical e minúscula na horizontal não diferem entre si pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$); C.V.: Coeficiente de variação.

Segundo Silva et al. (2008), isolados de *T. stromaticum*, *T. viride*, *T. virens* foram eficientes no controle *in vitro* quando pareados com isolado de *Phytophthora citrophthora* com percentuais de inibição de 52,21, 42,81 e 30,35% respectivamente.

4.3 Pareamento de culturas de *Bacillus subtilis* sobre *Ceratocystis fimbriata*

No teste de confronto direto entre isolados de *C. fimbriata* e do composto Rizolyptus[®] a base de *Bacillus subtilis* (Figura 10), as médias do crescimento micelial foram significativas, diferindo estatisticamente das médias do pareamento de culturas das testemunhas, que continham apenas o patógeno.

Bacillus subtilis na forma comercial Rizolyptus[®], mostrou-se eficiente no biocontrole *in vitro* apresentando zonas de inibição antes mesmo do contato direto com o patógeno (Figura 11), o que pode ser atribuído ao efeito de antibiose, que pode ser caracterizada pela síntese de metabólitos voláteis liberados pelas bactérias, além da competição por nutrientes e espaço, conseqüentemente, interferindo no crescimento dos isolados de *C. fimbriata*. Segundo Kim et al. (2008), o efeito inibitório de bactérias como *B. subtilis*, pode ser atribuído à produção de enzimas hidrolíticas, capazes de degradar a parede celular e ciclos de lipopeptídeos (LDP), interferindo diretamente no crescimento micelial de fungos fitopatogênicos. Em seus estudos, Seema e Devaki (2012) relatam que cepas de *B. subtilis* antagonizaram em 50% o crescimento micelial de *Rhizoctonia solani*, cinco dias após o início do pareamento das culturas. Segundo estes autores, a ação de antibióticos, como, Inturin A e Sufarctina podem ter influenciado no crescimento micelial e na coloração da colônia do patógeno.

Lee et al. (2008), confrontando 41 colônias de *B. subtilis*, isoladas da rizosfera de diferentes locais, sobre isolados de *Phytophthora capsici*, constataram que 12 colônias, entre elas, R15, R22, R30, R32 e R33, exibiram uma inibição máxima do patógeno com zonas de inibição de 11,5, 11, 11, 5, 12 e 12 mm, respectivamente. As mesmas colônias mostraram-se eficientes no biocontrole de *P. citrophthora*, *P. citricola* e *Colletotrichum coccodes*. Segundo os autores, o gênero *Bacillus*, já consolidado como promotor de crescimento de espécies vegetais, exerce também, um importante papel no controle de fitopatógenos de solo.

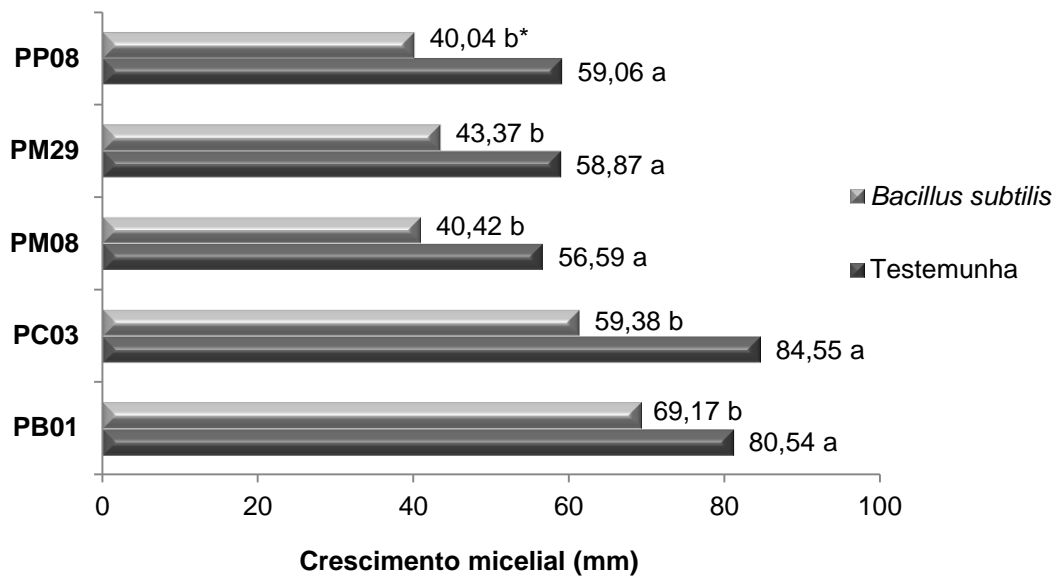


Figura 10 - Médias do crescimento micelial (mm) dos isolados PP08, PM29, PM08, PC03 e PB01 de *C. fimbriata* obtidos de kiwi quando pareados com *Bacillus subtilis* na forma comercial Rizolyptus®. (*) Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$).

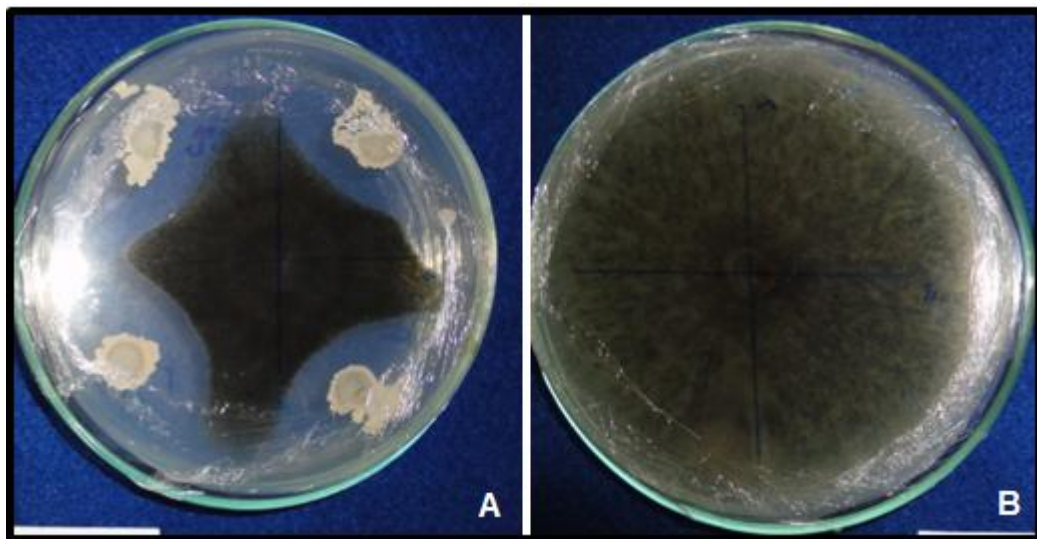


Figura 11 - Pareamento de cultura de *B. subtilis* na forma comercial Rizolyptus® sobre o isolado PC03 de *C. fimbriata*. (A): Rizolyptus® x PC03; (B): Testemunha contendo apenas o isolado PC03.

Quando observadas as médias dos percentuais de inibição do crescimento micelial dos isolados de *C. fimbriata* (Figura 12), o composto Rhizolyptus® mostrou-se mais eficiente no controle do isolado PP08, seguido dos isolados PC03, PM08 e PM29 com 32,2, 29,77, 28,58 e 26,33% de inibição, respectivamente. O isolado

PB01 obteve o menor percentual de inibição *in vitro* de 12,14%. Neste isolado, a bactéria permitiu o crescimento até 120 horas após o início do pareamento das culturas, ao contrário dos demais isolados de *C. fimbriata*, onde a interrupção do crescimento micelial pela bactéria foi observada 96 horas após o início da confrontação direta. Segundo Melo et al. (1995), os isolados OG e 5G de *B. subtilis* inibiram significativamente o crescimento micelial *in vitro* de *Fusarium solani*. Os percentuais de inibição foram de 53,37 (5G) e 71,750% (OG). Corroborando com os resultados obtidos pelos autores anteriormente citados, Shiomi et al. (2008) obtiveram com o mesmo isolado OG de *B. subtilis*, percentuais satisfatórios de inibição sobre *Fusarium moniliforme*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii* e *Exserohilum turcicum* com valores de 53,84, 48,97, 42,68 e 46,68%, respectivamente. Entretanto, os valores de percentual de inibição expressos neste trabalho são inferiores a 35%, o que pode estar relacionado com a fisiologia dos isolados de *C. fimbriata*, que possuem um crescimento micelial mais lento que os patógenos anteriormente citados.

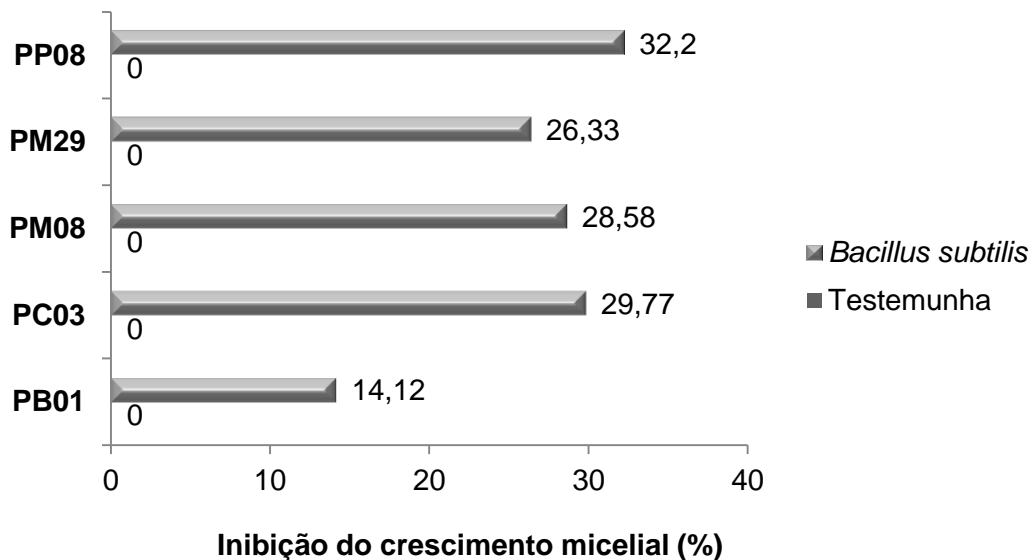


Figura 12 - Percentuais de inibição do crescimento micelial dos isolados PP08, PM29, PM08, PC03, e PB01 de *C. fimbriata* obtidos de kiwi pareados com *Bacillus subtilis* na forma comercial Rizolyptus®.

Remuska et al. (2007), confirmaram o potencial de biocontrole do gênero *Bacillus*. Em seus estudos, os autores constataram que *Sclerotinia sclerotiorum* foi

impedido de formar escleródios, importante estrutura de resistência, quando pareadas com *Bacillus thuringiensis*. A bactéria inibiu em 37,44% o crescimento micelial do patógeno. A presença do halo de inibição também foi observada pelas autoras.

Conforme Kupper et al. (2003), isolados de *B. subtilis* foram eficientes no controle *in vitro* de *Colletotrichum acutatum*. Segundo estes autores, bactérias antagonicas, como *B. subtilis* agem de modo geral, por antibiose, competição e parasitismo. A ação por antibiose em sua grande maioria, possui ampla variedade de inibição. A produção de substâncias tóxicas pode ser considerada, a forma mais eficiente, entre mecanismos envolvidos no controle dos fitopatógenos.

Marroni e Germani (2011), concluíram que *B. subtilis* antagonizou em 9% o crescimento micelial de *Macrophomina phaseolina*, quando pareadas *in vitro*. Com base em seus estudos, os autores, observaram que cepas isoladas de plantas selvagens exibiram maior potencial antagonista do que cepas isoladas de plantas cultivadas.

4.4 Teste *in vivo* de *Ceratocystis fimbriata* e *Bacillus subtilis* em mudas de acácia-negra

Ao contrário do controle *in vitro*, as cepas de *B. subtilis* não foram eficientes no controle *in vivo* de *C. fimbriata* (Figura 13). Todas as mudas inoculadas com os isolados PM29 e PP08 apresentaram sintoma de murcha e posteriormente morte. Bell et al. (1982) ressalta que os testes de biocontrole *in vitro* servem como prévia para seleção massal de possíveis candidatos a antagonistas. Os autores ressaltam que nem todos os biocontroladores *in vitro* conseguem exibir o mecanismo antagonista *in vivo*. Os resultados obtidos no presente trabalho corroboram com as afirmações dos autores anteriormente citados, pois as cepas de *B. subtilis* exibiram potencial promissor *in vitro*, porém, não consolidaram-se como antagonistas *in vivo*.

Os percentuais de severidade das mudas inoculadas apenas com Rizolyptus® (RZ) e das testemunhas (TEST), inoculadas apenas com água destilada e esterilizada não diferiram estatisticamente (Figura 14). Não há evidências de que as

cepas de *B. subtilis* influenciaram na cicatrização dos ferimentos, sendo necessários mais estudos para elucidar a interação acácia-negra x *B. subtilis*.

As mudas inoculadas com *B. subtilis* na forma comercial Rizolyptus[®] sete dias antes (RZxPM29 e RZxPP08) ou sete dias após ao patógeno (PM29xRZ e PP08xRZ) apresentaram as mesmas características das plantas inoculadas apenas com os isolados de *C. fimbriata* (PM29 e PP08). Os primeiros sintomas de murcha foram observados 15 dias após a inoculação do fungo. Os sintomas continuaram evoluindo gradativamente, independente da presença das cepas inoculadas antes e depois do patógeno. Decorridos 28 dias do experimento todas as plantas inoculadas com *C. fimbriata* estavam mortas, atingindo 100% nos valores de severidade.

Paz (2009) em seus estudos observou resultados significativamente negativos no controle de *B. subtilis* sobre *Botrytis cinerea* em eucalipto, os tratamentos contendo a bactéria resultaram na redução no número de folhas quando comparada com a testemunha. Moreira (2013) obteve resultados insatisfatórios no controle *in vivo* *Bacillus* sp. sobre *Colletotrichum acutatum* em macieira (*Malus domestica*). Segundo a autora, *B. subtilis* na forma comercial Serenade[®] expressou bons resultados no controle *in vitro*, porém não exibiu a mesma performance nos experimentos a campo. Cabe ressaltar que o gênero *Bacillus* habita naturalmente o solo, neste trabalho e nos citados anteriormente o biocontrole foi testado em condições ambientais diferentes (caule e folhas) o que pode naturalmente ter interferido nos mecanismos de ação.

Silva et al. (2012) também relataram resultados insatisfatórios de *B. subtilis* no controle *in vivo* de *Sclerotinia sclerotiorum* em alface. Stockwell et al. (1998) destacam que nem sempre resultados satisfatórios *in vitro* refletem eficácia a campo. Para estes autores, bons resultados *in vitro* devem servir como parâmetros para determinar a viabilidade no controle em condições reais de infecção. Neste trabalho, o insucesso no controle efetivo *in vivo* demonstra a necessidade de mais estudos, principalmente sobre metodologias de inoculação e concentração do bioprotetor.

Devido a complexidade envolvida no controle de patógenos causadores de murcha vascular, como *C. fimbriata*, a alternativa mais promissora para elucidar este patossistema é o controle genético, através de programas de melhoramento e o desenvolvimento de variedades resistentes.

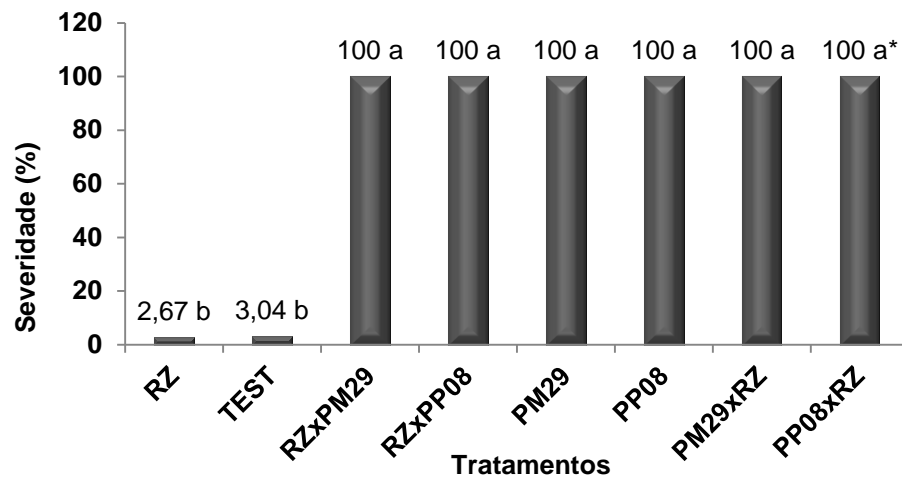


Figura 13 - Médias de severidade (%) no biocontrole de *B. subtilis* na forma comercial Rizolyptus[®] sobre os isolados PM29 e PP08 de *C. fimbriata* obtidos de kiwi em mudas de *Acacia mearnsii*. Onde, RZ: mudas inoculadas apenas com Rizolyptus[®]; TEST: mudas inoculadas apenas com água destilada e esterilizada; RZxPM29 e RZxPP08: mudas inoculadas com Rizolyptus[®] sete dias antes a inoculação do fungo; PM29xRZ e PP08xRZ: mudas inoculadas com Rizolyptus[®] sete dias após a inoculação do fungo. (*) Médias seguidas pela mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).



Figura 14 - Teste de biocontrole de *B. subtilis* na forma comercial Rizolyptus[®] sobre o isolado PP08 de *C. fimbriata* em mudas de *Acacia mearnsii*. (A): muda inoculada apenas com Rizolyptus[®]; (B): Testemunha inoculada apenas com água destilada e esterilizada; (C): muda inoculada com Rizolyptus[®] sete dias antes do isolado PP08; (D): muda inoculada apenas com o isolado PP08; (E): muda inoculada com Rizolyptus[®] sete dias após o isolado PP08.

5 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos no presente trabalho, pode se chegar as seguintes conclusões:

- Os isolados PC03, PM08, PP08 e PM29 de *C. fimbriata* obtidos de kiwi são patogênicos à *Acacia mearnsii*.

- Os mesmos isolados de *C. fimbriata* não são patogênicos à *Psidium cattleianum*, *Araucaria angustifolia*, *Eugenia involucrata* e *Inga marginata*.

- *Trichoderma* spp. e *Bacillus subtilis* foram eficientes no biocontrole *in vitro* sobre os mesmo isolados de *C. fimbriata*.

- *Bacillus subtilis* na forma comercial Rizolyptus[®], não foi capaz de controlar a murcha-de-ceratocystis em mudas de acácia-negra inoculadas com os isolados de *C. fimbriata*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADDEL, C.C. **Biodiversidade do gênero *Trichoderma* (Hypocreales-Fungi) mediante técnicas moleculares e análise ecofisiográfica**. 2004. 202f. Tese. (Doutorado em Ciências Biológicas). Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro, 2004.

ALFENAS, A. C. et al. Isolamento de fungos fitopatogênicos. In : ALFENAS, A. C.; MAFIA, R.G. (eds.). **Métodos em fitopatologia**. Editora: UFV, Viçosa, 2007. 382 p.

ALMENAR, E.; et al. Active package for wild strawberry fruit (*Fragaria vesca* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 55, p. 2240–2245, 2007.

AUER, C. G., GRIGOLETTI JR. A. Doenças registradas em *Araucaria angustifolia* e *Pinus* spp. os estados do Paraná e de Santa Catarina. **Pesquisa em andamento**. Colombo, n. 31, p. 1-3, 1997.

BANCO NACIONAL DO DESENVOLVIMENTO ECONÔMICO E SOCIAL. Panorama Setorial: Setor Florestal, Celulose e Papel. Brasília, 28p. 2007.

BAKER, C. J. et al. Inhibitory effect of *Bacillus subtilis* on *Uromyces phaseoli* and development of rust pustules on bean leaves. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 73, n. 8, p. 1148-1152, 1983.

BAKER, C. J.; HARRINGTON, T. C. *Ceratocystis fimbriata*. Surrey, England, **CABI Publishing**, 2004.

BAKER, C. J. et al. Genetic variability and host specialization in the Latin American clade of *Ceratocystis fimbriata*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 33, n. 10, p. 1274-1284, 2003.

BARNES, I. et al. *Ceratocystis fimbriata* infecting *Eucalyptus grandis* in Uruguay. **Australasian Plant Pathology**, [S.l.], v. 32, p. 361-366, 2003.

BARROSO, G. M. et al. **Sistemática de angiospermas do Brasil**. 2. ed. Viçosa, MG: UFV, 2002, v. 1, 304 p.

BARROSO, G. M. et al. **Frutos e sementes: morfologia aplicada à sistemática de dicotiledôneas**. Viçosa, MG: UFV, 1999. 443 p.

BELL, D. K. et al. *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 72, n. 4, p. 379-382, 1982.

BENÍTEZ, T. et al. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. **International Microbiology**, [S.l.], v. 7, p. 249-260, 2004.

BETTIOL, W.; KIMATI, H. Efeito de *Bacillus subtilis* sobre *Pyricularia oryzae* agente causal da Brusone do arroz. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.25, n.8, p.1165-1174, 1990.

BIEGELMEYER, R. et al. Comparative analysis of the chemical composition and antioxidant activity of red (*Psidium cattleianum*) and yellow (*Psidiumcattleianum* var. *lucidum*) strawberry guava fruit. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 76, n. 7, p. 991-996, 2011.

BROOKS, D. S. et al. Evaluation of endophytic bacteria as potential biological control agents for oak wilt. **Biological Control**, Orlando, v. 4, 373-381, 1994.

CAMPOS, J. R. S. et al. Bactérias endofíticas no controle e inibição in vitro de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, agente da pinta bacteriana do tomateiro. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, p. 1062-1072, 2008.

CANO, R.J.; BORUCKI, M.K. Revival and Identification of Bacterial Spores in 25- to 40-Million- Year-Old Dominican Amber. **Science**, [S.l.], v. 268, p. 1060-1064, 1995.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies arbóreas brasileiras**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Colombo: Embrapa Florestas, 2003. 1039 p.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies arbóreas brasileiras**. 1. ed. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2008. v. 3. 593 p.

CARVALHO, P.E.R. Cerejeira *Eugenia involucrata*. **Comunicado Técnico 224**. Colombo, p. 1-8, 2009.

CASTILLO, U. F. et al. Munumbicins E-4 and E-5 novel broad-antibiotics from *Streptomyces* NRRL3052. **FEMS Microbiology Letters**, Reading, v. 255, p. 296-300, 2006.

CHARÃO, L. S. Polinização em *Acacia mearnsii* De Wild. **Revista de Ciências Agro-Ambientais**, Alta Floresta, v. 3, p. 92-109, 2005.

CHEN, H. et al. Antagonistic effects of volatiles generated by *Bacillus subtilis* on spore germination and hyphal growth of the plant pathogen, *Botrytis cinerea*. **Biotechnology Letters**, v. 30, p. 919–923, 2008.

DANIEL, M.; PURKAYASTHA, R. P. **Handbook of phytoalexin metabolism and action**. Marcel Dekker. 615 p., 1995.

DICKINSON, W. C. **Integrative plant anatomy**. Academic Press, 533p., 2000.

DURIGAN, G.; NOGUEIRA, J. C. B. **Recomposição de matas ciliares**. IF: série registros, São Paulo, p. 1-14, 1990.

ENGELBRECHT, C. J.; HARRINGTON, T. C. Intersterility, morphology and taxonomy of *Ceratocystis fimbriata* on sweet potato, cacao and sycamore. **Mycologia**, New York, v. 97, p. 57-69, 2005.

ESPÍNDOLA, M. B. et al. Recuperação ambiental e contaminação biológica: aspectos ecológicos e legais. **Biotemas**, Florianópolis, v. 18, n. 1, p. 27-38, 2005.

ETHUR, L. Z. **Dinâmica populacional e ação de *Trichoderma* no controle de fusariose em mudas de tomateiro e pepineiro. 2006**. 155f. Tese. (Doutorado em Agronomia). Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2006.

EUROPEAN AND MEDITERRANEAN PLANT PROTECTION ORGANIZATION. Diagnostic protocols for regulated pests. **EPPO Bulletin** 33, Paris, p. 249–255, 2002.

FATEH, F. S. et al. *Ceratocystis fimbriata* isolated from vascular bundles of declining mango trees in Sindh, Pakistan. **Pak. J. Bot.**, [S.I.], v. 38, n. 4, p. 1257-1259, 2006.

FERREIRA, D. F. **Estatística básica**. Lavras: UFLA, 2. ed. Ampliada e revisada; 2009. 664p.

FERREIRA, F. A. Constatação rápida de *Ceratocystis fimbriata* na doença murcha de *Ceratocystis* em eucalipto por meio de cortes histopatológicos à mão livre. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 25, p. 372, 2000. Suplemento.

FERREIRA, F. A.; Murcha de *Ceratocystis* em eucalipto no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**. Brasília, v. 24, p. 284, 1999. Suplemento.

FERREIRA, F. A. et al. Sintomatologia da murcha de *Ceratocystis fimbriata* em eucalipto. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 30, n. 2, p. 155-162, 2006.

FERREIRA, M. A. **Estrutura genética de populações de *Ceratocystis fimbriata* e padrão espaço-temporal da murcha-de-ceratocystis**. 2009. 107 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2009a.

FIGUEIRÊDO, G. S. et al. Biological and chemical control of *Sclerotinia sclerotiorum* using *Trichoderma* spp. and *Ulocladium atrum* and pathogenicity to bean plants. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. Curitiba, v. 53, n.1, p. 1-9, 2010.

FIRMINO, A. C. **Caracterização de isolados de *Ceratocystis* sp., avaliação de resistência de eucalipto e sensibilidade deste fungo a diferentes fungicidas**. 2011. 110f. Tese. (Doutorado em Agronomia). Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2011.

FIRMINO, A. C. et al. First report of *Ceratocystis fimbriata* causing wilt in *Tectona grandis* in Brazil. **New Disease Reports**, [S.l.], v. 25, p. 24, 2012.

FIRMINO, A. C. et al. First report of *Ceratocystis fimbriata* causing fruit-rot of *Passiflora edulis* in Brazil. **New Disease Reports**, [S.l.], v. 27, p. 4, 2013.

FOWLER, J. A. P. et al. Germinação e vigor de sementes de *Acacia mearnsii* De Wild. coletadas em diferentes povoamentos do Estado do Rio Grande do Sul. **Comunicado Técnico 39**. Embrapa-CNPQ, Colombo. 1999. 4 p.

FURTADO, E. L. et al. Caracterização morfológica, patogênica, e isoenzimática de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* de seringueira. **Summa Phytopathologia**, Botucatu, v. 25, p. 222-227, 1999.

GOLLE, D. P. et al. Estabelecimento e desenvolvimento *in vitro* de *Eugenia involucrata* DC.: influência do tipo de explante e do meio nutritivo. **Revista Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 22, n. 1, p. 207-214, 2012.

GRIGOLETTI JÚNIOR, A. et al. Perspectivas do uso do controle biológico contra doenças florestais. **Revista Floresta**, Curitiba, v. 30, p. 155-165, 2000.

HALFELD-VIEIRA, B. A. et al. First record of *Ceratocystis fimbriata* on *Carapa guianensis*. **New Disease Reports**, [S.I.], v. 26, p. 13, 2012.

HAMINIUK, C. W. I. et al. Influence of temperature on the rheological behavior of whole araçá pulp (*Psidium cattleianum* Sabine). **Food Science and Technology (LWT)**, London, v. 39, p. 426-430, 2006.

HARMAN, G. E. *Trichoderma* not just for biocontrol anymore. **Phytoparasitica**, Bet Dagan, v. 39, p. 103-108, 2004.

HARRINGTON, T. C. et al. Species delimitation and host specialization of *Ceratocystis laricicola* and *C. polonica* to larch and spruce. **Plant Disease**, New York, v. 86, p. 418-422, 2002.

HARRINGTON, T. C. et al. Genetic variation and variation in aggressiveness to native and exotic hosts among Brazilian populations of *Ceratocystis fimbriata*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 101, n. 5, p. 555-566, 2011.

HENRIQUES, A.O.; MORAN JUNIOR, C.P. Structure and assembly of the bacterial endospore coat. **Methods**, [S.I.], v. 20, p. 95-110, 2000.

HOSOMI, A. et al. Growth of fig varieties resistant to ceratocystis-canker infection with *Ceratocystis fimbriata*. **Journal of the Japanese Society for Horticultural Science**, Tokyo, v. 81, n. 2, p. 159-165, 2012.

HUANG, Q. et al. First report of taro black rot caused by *Ceratocystis fimbriata* in China. **Plant Pathology**, Oxford, v. 57, p. 780, 2008.

JOHNSON, J. A. et al. Phylogeny and taxonomy of the North American clade of the *Ceratocystis fimbriata* complex. **Mycologia**, New York, v. 97, p. 1067-1092, 2005.

KAI, M. et al. Volatiles of bacterial antagonists inhibit mycelial growth of the plant pathogen *Rhizoctonia solani*. **Archives of Microbiology**, Berlin, v. 187, p. 351–360, 2007.

KIM, H. S. et al. Sequential selection and efficacy of antagonistic rhizobacteria for controlling Phytophthora blight of pepper. **Crop Protection**, Guildford, v. 27, n. X, p. 436-443, 2008.

KUPPER, K. C. et al. Controle biológico de *Colletotrichum acutatum*, agente causal da queda prematura dos frutos cítricos. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 3, p. 251-257, 2003.

LAIA, M.L. et al. Isolation, detection in soil, and inoculation of *Ceratocystis fimbriata*, causal agent of wilting, die-back and canker in Eucalyptus (Abstract). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, n. 25, p. 384. 2000.

LANNA FILHO, R. et al. Controle biológico mediado por *Bacillus subtilis*. **Revista Tropica – Ciências Agrárias e Biológicas** v. 4, n. 2, p. 12, 2010.

LAZAROTTO, M. et al. Seleção *in vitro* de isolados de *Trichoderma* spp. com potencial de antagonismo a isolados patogênicos de *Fusarium* spp. In: SIMPÓSIO DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO, 16, 2012, Santa Maria. **Anais...** Santa Maria: Centro Universitário Franciscano, 2012. 7p.

LAZZARETTI, E. **Controle de fungos transportados por sementes de trigo com *Bacillus subtilis***. Piracicaba, 1993. 112p. Dissertação (Mestrado)-Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo.

LEE, K. J. et al. Biological control of *Phytophthora* blight in red pepper (*Capsicum annuum* L.) using *Bacillus subtilis*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 24, p. 1139-1145, 2008.

LIMA, F. F. ***Bacillus subtilis* e níveis de nitrogênio sobre o desenvolvimento e a produtividade do milho**. 2010. 54 f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) Universidade Federal do Piauí – PI, 2010.

LO, L. C. et al. Phytoalexin accumulation in sorghum: identification of a methyl ester of luteolinidin. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 49, n. 1, p. 21-31, 1996.

LOBO JUNIOR, M. et al. Controle biológico de patógenos habitantes do solo com *Trichoderma* spp., na cultura do feijoeiro comum. **Circular Técnica 85**, Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, p. 1-4, 2009.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de indentificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Plantarum, 1992. 352p.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras: Manual de Identificação e cultivos de plantas arbóreas do Brasil**. 2. ed. São Paulo: Nova Odessa. 2002.

LUCON, C. M. M. *Trichoderma* no controle de doenças de plantas causadas por patógenos de solo. Informativo n. 77. Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Vegetal. **Instituto Biológico**, São Paulo, 2008.

MACHADO, D. F. M. et al. *Trichoderma* no Brasil: o fungo e o bioagente. **Revista de Ciências Agrárias**, Belém, v. 35, n. 1, p. 274-288, 2012.

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

MAFIA, R. G. et al. Métodos de seleção e identificação de fontes de resistência à murcha do eucalipto causada por *Ceratocystis fimbriata*. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 35, n. 4, p. 817-824, 2011.

MAHALINGAM, R. et al. Biocontrol measures of pineapple disease in sugarcane. **European Journal of Experimental Biology**, [S.I.], v. 1, n. 2, p. 64-67, 2011.

MANICA, I. **Frutas nativas, silvestres e exóticas 1**. Porto Alegre: Cinco Continentes Editora, 2000. 327p.

MANJULA, K.; PODILE, A. R. Increase in seedling emergence and dry weight of pigeon pea in the field with chitin-supplemented formulations of *Bacillus subtilis* AF 1. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v. 21, p. 1057–1062, 2005.

MANTOVANI, A. et al. Fenologia reprodutiva e produção de sementes em *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 27, n. 4, p. 787-796, 2004.

MARCHIORI, J. N. C. **Dendrologia das angiospermas: leguminosas**. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 1997. 200p.

MARIN, M. et al. Relationships of *Ceratocystis fimbriata* isolates from Colombian coffee-growing regions based on molecular data and pathogenicity. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 151, p. 395-405, 2003.

MARRONI, I. V.; GERMANI, J. C. Eficiência de rizobactérias *Bacillus* spp. no controle in vitro de *Macrophomina phaseolina* agente etiológico da podridão de tronco da mamona (*Ricinus communis* L.). **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 6, n. 3, p. 159-167, 2011.

MAZZA, P. The use of *Bacillus subtilis* as an antidiarrhoeal microorganism. **Bollettino Chimico Farmaceutico**, [S.l.], n. 133, p. 3–18, 1994.

MELO, I. S.; VALARINI, P. J. Potencial de rizobactérias no controle de *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. em pepino (*Cucumis sativum* L.). **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 52, n. 2, p. 326-330, 1995.

MENDONÇA, V. et al. Crescimento inicial de mudas de cerejeira-do-mato (*Eugenia involucrata* DC) em substrato enriquecido com superfosfato simples. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 22, n. 2, p. 81-86, 2009.

MENTEN, J. O. M.; et al. Efeito de alguns fungicidas no crescimento micelial de *Macrophomina phaseolina* (Tass.) Goid. “in vitro”. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 1, n. 2, p. 57-66, 1976.

MICHEREFF, S. J. Quantificação de doenças de plantas. In: **desafio do manejo integrado de pragas e doenças**. Livro de palestras e minicursos. “Semana de Fitossanidade”, Recife, p. 63-77, 2000.

MICHEREFF, S. J. et al. Variabilidade de isolados de *Alternaria brassicicola* no estado de Pernambuco. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 6, n. 28, p. 656-663. 2003.

MILANESI, P. M. **Caracterização, toxicidade e patogenicidade de *Fusarium* spp. em genótipos de soja em sistema de plantio direto**. 2009. 91f. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2009.

MONTALVÃO, S. C. L. **Potencial de *Trichoderma* spp. no biocontrole de doenças do tomateiro**. 2012. 124f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia). Universidade Federal de Brasília, Brasília, 2012.

MOREIRA, R. R. **Bacillus spp. e Pseudomonas sp. no biocontrole de Colletotrichum do grupo acutatum, causador da mancha foliar de glomerella em macieira.** 2013. 108f. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

MORENO, J. A. **Clima do Rio Grande do Sul.** Secretaria da Agricultura, Porto Alegre, 1961. 73 p.

MUNIZ, M. F. S. et al. Patogenicidade de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* sobre algumas plantas frutíferas. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 24, n. 2, p. 177-179. 1998.

NARVAES, I. S. et al. Estrutura da regeneração natural em Floresta Ombrófila Mista na Floresta Nacional de São Francisco de Paula, RS. **Revista Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 15, n. 4, p. 331-342, 2005.

NELSON, S. C. A simple analysis of disease foci. **Phytopatology**, Saint Paul, v. 86, n. 4, p. 332-339, 1996.

NORRIS, J. R. et al. The genera *Bacillus* and *Sporolacto bacillus*. In: M.P. **The Prokaryotes**, Berlin, p. 1711-1742, 1981.

OLIVEIRA, L. S. S. **Agressividade de isolados de Ceratocystis fimbriata em clones de Eucalyptus spp.** 2010. 18f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2010.

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

ORTEGA, A. R. et al. Avaliação do crescimento de mudas de *Psidium cattleianum* Sabine a diferentes níveis de sombreamento em viveiro. **Revista Cerne**, Lavras, v. 12, n. 3, p. 300-308, 2006.

PARLEVLIET, J. E. Components of resistance that reduce the rate of epidemic development. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 17, p. 203-222, 1979.

PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B. Hospedeiro: mecanismos de resistência. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. Editora Ceres, 3. ed. v.1. 919 p., 1995.

PATEL, S. Exotic tropical plant *Psidium cattleianum*: a review on prospects and threats. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, [S.l.], v. 11, p. 243-248, 2012.

PERES, A. P. et al. Variabilidade morfocultural e genética de fungos associados à podridão peduncular do mamão. **Ciência Agrotécnica**, Lavras, v. 27, n. 5, p. 1053-1062, 2003.

PIVETA, G. **Morfologia, caracterização molecular e patogenicidade de *Ceratocystis fimbriata* no Rio Grande do Sul**. 2013. 67f. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal). Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2013.

PIVETA, G. et al. Ocorrência de *Ceratocystis fimbriata* em kiwi (*Actinidia deliciosa*) no sul do Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 35, n. 2, p. 665-669, 2013.

POLONI, A. et al. Análise da variabilidade morfológica e taxa de crescimento de culturas policonidiais e monoconidiais de *Bipolaris sorokiniana*. **Biociências**, v. 16, n. 1, p. 52-63, 2008.

PUGLIESE, M. et al. Selection of antagonists from compost to control soil-borne pathogens. **Journal of Plant Diseases and Protection**, [S.l.], v. 115, n. 5, p. 220 – 228, 2008.

RAHMAN, M. A. et al. Screening of *Trichoderma* isolates as a biological control agent against *Ceratocystis paradoxa* causing pineapple disease of sugarcane. **Mycobiology**, [S.l.], v. 37, n. 4, p. 277-285, 2009.

REMUSKA, A. C. et al. Efeito de *Bacillus thuringiensis* e *Trichoderma* sp. no crescimento de fungos fitopatogênicos. **Publicatio UEPG: Ciências Exatas e da Terra, Ciências Agrárias e Engenharias**, Ponta Grossa, v. 13, n. 3, p. 31-36, 2007.

RIBEIRO, I. J. A. et al. Gomose da acácia-negra causada por *Ceratocystis fimbriata*. **Revista Bragantia**, Campinas, v. 47, n. 1, p. 71-74, 1988.

RODRIGUES, J. *Trichoderma* spp. associado a níveis de adubação NPK no patossistema *Sclerotinia sclerotiorum* – feijoeiro. 2010. 84f. Dissertação (Mestrado em Agronomia), Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2010.

RODRIGUES, V. E. G.; CARVALHO, D. A. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais no domínio do cerrado na região do alto rio grande – Minas Gerais. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 25, n. 1, p. 102 - 123, 2001.

ROMEIRO, R. S.; et al.. Macromolecules released by a plant growth-promoting rhizobacterium as elicitors of systemic resistance in tomato to bacterial and fungal pathogens. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 153, p.120-123. 2005.

ROUX, J.; COETZEE, M. P. A. First report of pink disease on native trees in South Africa and phylogenetic placement of *Erythricium salmonicolor* in the Homobasidiomycetes. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 89, n. 11, p. 1158-1163, 2005.

ROUX, J. et al. A serious new wilt disease of eucalyptus caused by *Ceratocystis fimbriata* in Central Africa. **Forest Pathology**, Hoboken, v. 30, p. 175-184, 2000.

ROUX, J. et al. Ceratocystis especies infecting stem wounds on *Eucalyptus grandis* in South Africa. **Plant Pathology**, Malden, v. 53, n. 4, p. 414-421, 2004.

ROUX, J. et al. Diseases in plantation *Eucalyptus* in Uganda. **South African Journal of Science**, Pretoria, v. 97, n.1/2, p. 6-18, 2001.

SANIER, C. et al. Relationship between resistance to *Microcyclus ulei* and clonal foliarphenolics of rubber trees. **Journal Rubber Research Institute of Malaysia**, Kuala Lumpur, v. 7, n. 1, p. 38-59, 1992.

SANTOS, A. F. Murcha de Ceratocystis em acácia-negra. **Comunicado Técnico 125**, Embrapa Florestas, Colombo.p. 1-3, 2004.

SANTOS, A. F.; AUER, G. C.; Avaliação da gomose da acácia-negra em materiais genéticos de diferentes procedências. **Pesquisa e andamento**. Colombo. n. 62, p. 1-4, 1998.

SANTOS, A. F.; AUER, C. G.; GRIGOLETTI JR, A. Caracterização de tipos de sintomas da gomose da acácia-negra (*Acacia mearnsii*) no sul do Brasil. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, n. 37, p. 31-39, 1998a.

SANTOS, A. F. et al. Root and Crown Rot of Brazilian Pine (*Araucaria angustifolia*) Caused by *Phytophthora cinnamomi*. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 159, p. 194-196, 2011.

SANTOS, C. C. et al. Influência de *Trichoderma* spp. sobre o crescimento micelial de *Thielaviopsis paradoxa*. **Scientia Plena**, [S.l.], v. 8, n. 4, p. 1-5, 2012.

SANTOS, H. A. **Trichoderma** spp. como promotores de crescimento de plantas e como antagonista a *Fusarium oxysporum*. 2008. 94f. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Universidade Federal de Brasília, Brasília, 2008.

SCHNEIDER, P. R. et al. Crescimento da acácia-negra, *Acacia mearnsii* De Wild em diferente espaçamentos. **Revista Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 10, n. 2, p. 101-112, 2000.

SCHEEREN, L.W. et al. Crescimento em altura de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. em três sítios naturais, na região de Canela- RS. **Revista Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 9, n. 2, p. 23-40, 1999.

SEEMA, M; DEVAKI, N. S. *In vitro* evaluation of biological control agents against *Rhizoctonia solani*. **Journal of Agricultural Technology**, [S.l.], v. 8, n. 1, p. 233-240, 2012.

SHARMA, P. Complexity of *Trichoderma-Fusarium* interaction and manifestation of biological control. **Australian Journal of Crop Science**, [S.l.], v. 5, n. 8, p. 1027-1038, 2011.

SHIOMI, H. F. et al. Seleção de bactérias endofíticas com ação antagônica a fitopatógenos. **Scientia Agraria**, Curitiba, v. 9, n. 4, p. 535-538, 2008.

SILVA, D. V. M. et al. Cacau “jaca” resistente a *Ceratocystis fimbriata* na região cacauzeira da Bahia, Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 5, p. 538-540, 2004.

SILVA, G. B. P. **Utilização de Trichoderma** spp. no controle de *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary e no crescimento de alface. 2013. 89f. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, 2013.

SILVA, G. B. P. Biocontrole *in vivo* de *Sclerotinia sclerotiorum*, utilizando produtos comerciais à base de *Trichoderma* spp. e *Bacillus subtilis*. In: SIMPÓSIO DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO, 16º, 2012. Santa Maria. **Anais...** Santa Maria: Centro Universitário Franciscano, 2012. 6p.

SILVA, K. S. et al. Atividade antagônica *in vitro* de isolados de *Trichoderma* spp. ao fungo *Phytophthora citrophthora*. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 29, n. 4, p. 749-754, 2008.

SONEGO, O. R. et al. Primeiro relato da murcha-de-ceratocystis em kiwi. In: 42º Congresso Brasileiro de Fitopatologia **Suplemento – Tropical Plant Pathology**, v. 35. Cuiabá, 2010.

SOTTERO A. N. et al. Rizobactérias e alfaca: colonização rizosférica, promoção de crescimento e controle biológico. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 30, n. 2 p. 225-234, 2006.

SOUZA, A. G. C. et al. First Report on the Association Between Ceratocystis fimbriata, an Agent of Mango Wilt, *Xyleborus affinis*, and the Sawdust Produced During Beetle Colonization in Brazil. *Plant Disease*, Saint Paul, v. 97, n. 8, p. 1116, 2013.

STOCKWELL, V. O. et al. Establishment of bacterial antagonists of *Erwinia amylovora* on pear and apple blossoms as influenced by inoculum preparation. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 88, n. 6, p. 506-513, 1998.

STRAGIER, P.; LOSICK, R. Molecular genetics of sporulation in *Bacillus subtilis*. **Annual Reviews of Genetics**, [S.l.].v. 30, p. 297-341, 1996.

TONIETTO, L.; STEIN, P.P. Silvicultura da acácia negra (*Acacia mearnsii* De Wild) no Brasil. **Florestar Estatístico**, [S.l.], v. 4, n. 12, p. 11-16, 1997.

TRINDADE, D. R.; FURTADO, E. L. Doenças da seringueira. In: KIMATI, H. et al. (Eds). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 3. ed. v. 2. São Paulo: Ceres, 1997. p. 628-641.

VALDETARO, D. C. O. F. **Morfologia, variabilidade genética e patogênica de Ceratocystis fimbriata em Hevea brasiliensis**. 2012. 38f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2012.

VOGELZANG, B. K.; SCOTT, E. S. *Ceratocystis fimbriata*, causal agent of basal rot of *Syngonium* cultivars, and host range studies of isolates of *C. fimbriata* in Australia. **Australasian Plant Pathology**, [S.I.], v. 19, n. 3, p. 82-89, 1990.

WANG, J. et al. Electrospray ionization mass spectrometry in rapid typing of fengycin homologues produced by *Bacillus subtilis*. **Letters in Applied Microbiology**, [S.I.], v. 39, p. 98–102, 2004.

WELLER, D. M. Biological control of rhizosphere with bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, [S.I.], v. 26, p. 379-407, 1988.

WINGFIELD, M. J. et al. A new *Ceratocystis* species defined using morphological and ribosomal DNA sequence comparisons. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 19, p. 191-202, 1995.

WYK, M. V. et al. DNA based characterization of *Ceratocystis fimbriata* isolates associated with mango decline in Oman. **Australasian Plant Pathology**, [S.I.], v. 34, p. 587-590, 2005.

ZAUZA, E. A. V. et al. Resistance of *Eucalyptus* clones to *Ceratocystis fimbriata*. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 88, n. 7, 2004.

ANEXOS

Anexo 1 - Descrição dos meios de cultura utilizados no trabalho.

Meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar (BDA)

- 200 g de batatas descascadas e fatiadas;
- 20 g de dextrose;
- 15 g de ágar;
- 1 L de água destilada;
- 0,05 mg de estreptomicina/100 mL de meio de cultura.

DHINGRA, O. D.; SINCLAIR, J. B. **Basic Plant Pathology Methods**. 2. ed. Boca Raton: CRC Press, 1995. 434 p.

Meio de cultura Ágar-água (AA)

- 17 g de Ágar;
- 1 L de água destilada.

DHINGRA, O. D.; SINCLAIR, J. B. **Basic Plant Pathology Methods**. 2. ed. Boca Raton: CRC Press, 1995. 434 p.

Anexo 2 - Descrição dos produtos comerciais utilizados no trabalho.

AGROTRICH PLUS[®] é um produto biológico à base do fungo *Trichoderma* spp. na quantidade de 108 UFCs g⁻¹ de produto e farinha de arroz qsp 1,0 kg, na forma de pó seco solúvel altamente concentrado para o tratamento de sementes ou pulverização. É eficaz para prevenção de vários fungos e doenças de solo como *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Sclerotinia*, *Verticilium*, *Roselinea*, *Phytophthora*, *Pythium*, *Phomopsis*. Pode ser aplicado via substrato (2g kg⁻¹ de substrato), via adubo (2 kg ha⁻¹ misturado ao adubo) e via solo (2 g m⁻² incorporados superficialmente) sendo recomendado para as culturas de soja, trigo, feijão, café, batata, tomate, pimentão e demais hortaliças. Informações obtidas no rótulo do produto.

RIZOLYPTUS[®] é um inoculante biológico indicado para otimizar o enraizamento de estacas de eucalipto, tem como princípio ativo 108 células viáveis/mL da rizobactéria promotora do crescimento *Bacillus subtilis* (UFV – 3918. Registro no Mapa nº SP-00581 10010-7). Pode ser aplicado, misturado com a água utilizada para o umedecimento do substrato (1 litro de Rizolyptus[®] 50 l⁻¹ de substrato). Informações obtidas no rótulo do produto.

CAROLINA SOIL[®] é um substrato orgânico para plantas, indicado para a fase inicial de produção de mudas. Composição: turfa de Sphagno, vermiculita expandida, calcário dolomítico, gesso agrícola e fertilizante NPK. Com pH igual a 5,0 e densidade de 101 Kg m⁻³. Informações obtidas no rótulo do produto.