

**COMUNIDADE FÚNGICA ASSOCIADA A BROTAÇÕES DE
Eucalyptus EM JARDIM CLONAL E SEU ENVOLVIMENTO
NA ETIOLOGIA DA PODRIDÃO DE ESTACAS
UTILIZADAS PARA A PRODUÇÃO DE MUDAS.**

ANDRÉ LUIS PARADELA

Engenheiro Agrônomo

Orientador: Prof. Dr. IVAN PAULO BEDENDO

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Agronomia. área de concentração: Fitopatologia.

P I R A C I C A B A

Estado de São Paulo – Brasil

Junho – 1998

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - campus "Luiz de Queiroz"/USP

Paradela, André Luis

Comunidade fúngica associada a brotações de *Eucalyptus* em jardim clonal e seu envolvimento na etiologia da podridão de estacas utilizadas para a produção de mudas / André Luis Paradela. - Piracicaba, 1998.

43 p.

00000001 de 00000001 - 00000001

00000001 de 00000001 - 00000001 Dissertação (mestrado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 1998.
00000001 de 00000001 - 00000001 Bibliografia.

1. Brotação 2. Etiologia 3. Fungicida 4. Fungo endofítico 5. Muda de eucalipto 6. Patogenicidade 7. Podridão-de-estaca 8. Tratamento químico I. Título

CDD 634.49734

A minha noiva

Minéia

dedico

Aos meus pais

Oswaldo

e

Marlene

e aos meus irmãos

Afonso

e

Juliana

ofereço

AGRADECIMENTOS

O autor agradece a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, em especial:

- Ao Prof. Dr. Ivan Paulo Bedendo, pela orientação e dedicação demonstradas durante o curso.
- A todos os professores, funcionários e alunos do Departamento de Fitopatologia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, pelos ensinamentos e amizade demonstrados.
- Ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento – CNPq, pela bolsa de estudo concedida.
- Ao Prof. Dr. Tasso Leo Krüger pela co-orientação e amizade demonstradas durante o curso.
- A VCP (Votorantin Celulose e Papel) por colaborar com a condução do ensaio.
- Aos funcionários João Luiz Florcovski e Elizandra Mangili do Departamento de Fitotecnia da Faculdade de Agronomia “Manoel Carlos Gonçalves” pelo apoio e amizade demonstrados.
- Ao diretor da Faculdade de Agronomia “Manoel Carlos Gonçalves”, Eng. Agr. Celso Henrique Zuppi da Conceição, pelo apoio e confiança demonstrados durante o curso.
- À Fundação Pinhalense de Ensino pelo estímulo, apoio e compreensão demonstrados durante o curso.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
RESUMO	viii
SUMMARY	x
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. Produção comercial de mudas propagadas vegetativamente	4
2.2. Etiologia da podridão de estacas	5
2.3. Ocorrência endofítica de fungos	7
2.4. Controle químico da podridão de estacas de eucalipto	10
3. MATERIAL E MÉTODOS	12
3.1. Levantamento da Comunidade fúngica endofítica em jardim clonal	12
3.2. Teste de patogenicidade	16
3.3. Tratamento de touças no jardim clonal	18
3.4. Tratamento químico de estacas	18
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
4.1. Levantamento da Comunidade fúngica endofítica em jardim clonal	20
4.2. Teste de patogenicidade	25
4.3. Tratamento de touças no jardim clonal	31
4.4. Tratamento químico de estacas	33
5. CONCLUSÕES	36
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Incidência (%) de fungos endofíticos em brotos de eucalipto provenientes de touças tratadas e não tratadas com fungicidas durante o período de um ano correspondente a seis ciclos de corte comercial	21
Tabela 2. Patogenicidade e reisolamento dos fungos endofíticos mais freqüentemente associados às brotações assintomáticas de jardim clonal e seu efeito sobre a formação de calos de estacas de eucalipto, avaliados aos 12 dias após a estaquia	28
Tabela 3. Patogenicidade e reisolamento dos fungos endofíticos mais freqüentemente associados às brotações assintomáticas de jardim clonal e seu efeito sobre o enraizamento de estacas de eucalipto, avaliados aos 25 dias após a estaquia	29
Tabela 4. Efeito de tratamento fungicida sobre a ocorrência de podridão e formação de calos em estacas de eucalipto, avaliado 12 dias após a estaquia	35
Tabela 5. Efeito de tratamento fungicida sobre a ocorrência de podridão e enraizamento em estacas de eucalipto, avaliado 25 dias após a estaquia	35

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Quantidade de chuva (mm) durante os meses de outubro/96 a novembro/97 no jardim clonal onde as amostras foram coletadas. Santa Rita do Passa Quatro – SP 14
- Figura 2. Média das temperaturas máximas e mínimas (° C) anotadas durante os meses de outubro/96 a novembro/97 no local do experimento. Santa Rita do Passa Quatro – SP 15

COMUNIDADE FÚNGICA ASSOCIADA A BROTAÇÕES DE *Eucalyptus* EM
JARDIM CLONAL E SEU ENVOLVIMENTO NA ETIOLOGIA DA PODRIDÃO DE
ESTACAS UTILIZADAS PARA A PRODUÇÃO DE MUDAS.

Autor: André Luis Paradela

Orientador: Prof. Dr. Ivan Paulo Bedendo

RESUMO

A podridão de estacas se constitui num sério problema para a produção de mudas de eucalipto através de estaquia. Brotos provenientes do jardim clonal infectados por fungos endofíticos podem ser responsáveis pela introdução do inóculo primário nas casas de vegetação. A doença é comprovadamente causada por espécies do gênero *Cylindrocladium* e *Rhizoctonia*, porém outros fungos são suspeitos de estarem associados à podridão.

Com o objetivo de se conhecer a comunidade fúngica endofítica possivelmente associada à podridão e de se estudar a etiologia da doença, foi feito um levantamento em um jardim clonal de um híbrido de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*, localizado em Santa Rita do Passa Quatro, SP, através de isolamentos em meio de cultura, durante o período de outubro de 1996 a novembro de 1997. Foram realizados testes de patogenicidade em casa de vegetação com os fungos que predominaram neste levantamento.

Visando avaliar o controle químico da doença, foram efetuadas aplicações foliares semanais de benomyl (0,5 kg/ha) e oxicloreto de cobre (1,1 kg/ha) iniciadas, duas semanas após o corte comercial, durante a etapa de levantamento. Posteriormente, foi também testada a imersão de estacas comerciais em suspensões de captan (1,5 g i.a./l) e de benomyl (0,75 g i.a./l).

Diversos gêneros foram detectados como ocorrendo endofiticamente nos brotos, aparecendo com maior frequência *Botryosphaeria*, *Colletotrichum* e *Guignardia*. Foi demonstrado que *Colletotrichum* e *Botryosphaeria* estão envolvidos na etiologia da doença e que *Cylindrocladium candelabrum* é o principal patógeno responsável pela redução do enraizamento das estacas.

Quanto ao tratamento químico, a pulverização das touças no jardim clonal não se mostrou eficiente, o mesmo ocorrendo com o tratamento de imersão das estacas.

FUNGAL COMMUNITY OF EUCALYPTUS SPROUTS IN A CLONAL GARDEN
AND ITS ROLE ON THE ETIOLOGY OF CUTTING ROT.

Author: André Luis Paradela

Adviser: Prof. Dr. Ivan Paulo Bedendo

SUMMARY

Cutting rot is a serious problem in the vegetative propagation of *Eucalyptus*. *Cylindrocladium* and *Rhizoctonia* are known to be the major genera of pathogens involved in the etiology of the problem. Other fungi, however, are also commonly associated endophytically with symptomless sprouts originated from the clonal garden which could also contribute to the causality of the disease after their introduction in the greenhouse with the cuttings.

A survey was carried out in order to evaluate the fungal community possibly associated with the cutting rot in the greenhouse in a commercial clonal garden located in Santa Rita do Passa Quatro, SP, during the period of october 1996 to november 1997. Two sprout samplings were made for each of the 6 commercial harvest cuts that were performed during the survey period and fungal community evaluated by plating sprout stem pieces on potato-dextrose-agar. Fungi which predominated in the survey had their pathogenicity tested trough cutting inoculation in a commercial greenhouse.

During the survey of the fungi, foliar applications of benomyl (0.5 kg/ha) alternated with copper oxichloride (1.1 kg/ha) were done weekly in part of the clonal garden, in order to test an alternative for the control of the disease. In addition, a trial was carried out to test the fungicidal treatment of the cuttings before planting, by immersion in a suspension of captan (1.5 g/l) or benomyl (0.75 g/l).

Several genera of fungi were detected in association with the sprouts, *Colletotrichum*, *Guignardia* and *Botryosphaeria* being the most common ones among those that were identified. It was also demonstrated that *Colletotrichum* and *Botryosphaeria* may be involved in the etiology of the cutting rot, but were less aggressive than *Cylindrocladium candelabrum*, a common species found in the study area, which reduced the rooting of the cuttings.

The fungicidal sprays in disease incidence and severity as well the fungicidal cutting treatment gave no differences in relation to the non treated controls.

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Eucalyptus* conta com aproximadamente 600 espécies e variedades disseminadas pelos continentes, havendo espécies adaptadas para as diferentes regiões do globo (Andrade, 1961). O eucalipto foi introduzido no Brasil no ano de 1904, sendo que aproximadamente 1 milhão de hectares estão plantados com a cultura (ONU, 1989). A planta é utilizada para diversas finalidades, entre elas o fornecimento de lenha, como madeira para construção, produção de carvão vegetal, extração de fibras para a indústria de papel e celulose, produtora de néctar para a apicultura, além da produção de óleos e taninos. Segundo a Organização das Nações Unidas (1989), o eucalipto é a espécie florestal mais amplamente disseminada, sendo cultivada em mais de cem países do mundo.

A planta de eucalipto pode ser propagada através de sementes (propagação sexuada) e através de estacas (propagação vegetativa), sendo que a opção por um desses métodos pode ser feita através da análise de vantagens e desvantagens proporcionadas por esses dois tipos de propagação. As vantagens proporcionadas pela propagação

vegetativa (estaquia) são principalmente a maior uniformidade genética das plantas e um menor período para a produção de mudas (80 dias), enquanto as desvantagens envolvem um maior custo de produção destas mudas (R\$ 120,00/milheiro). As vantagens da propagação sexuada envolvem menor custo de produção (R\$ 46,00/milheiro) e maior rendimento quanto ao número final de mudas obtidas; no entanto, apresentam as desvantagens da desuniformidade genética das mudas e a exigência de um maior período de tempo para a formação das mesmas (110 dias). Apesar do custo maior, as empresas florestais apresentam a tendência de aumentar o número de mudas propagadas vegetativamente e de diminuir a propagação de mudas por sementes.

A produção de mudas por estaquia se inicia a partir da coleta de brotos obtidos de touças que constituem o jardim clonal. A partir desses brotos são obtidas as estacas de aproximadamente 80 mm que são plantadas em tubetes plásticos contendo o substrato específico utilizado para o enraizamento. Os tubetes plantados são colocados em bandejas de aproximadamente 200 células e são levados para viveiros localizados em casa de vegetação onde permanecem por um período de 25 dias para o desenvolvimento de novas brotações e início do enraizamento.

Um dos grandes problemas da propagação vegetativa é a diminuição na porcentagem de enraizamento das estacas, frequentemente associada à ocorrência de podridão. A perda causada pela doença nos viveiros comerciais pode chegar a 40%, conforme constatado durante visitas em algumas empresas florestais.

Em relação à etiologia da podridão de estacas, tanto patógenos primários (*Cylindrocadium* spp. e *Rhizoctonia solani* Kuhn) como patógenos secundários (*Colletotrichum* spp.; *Botryosphaeria ribis* Grossb & Duggar (sin. *B. dothidea* Moug :

Fr. Ces. & De Not) e *Alternaria* spp.) podem estar envolvidos no processo (Alfenas et al., 1989; Ferreira, 1989; Vitti et al., 1989).

Existem evidências de que os fungos envolvidos na podridão de estacas ocorrem endofiticamente em brotações sem sintomas presentes em jardins clonais (Fischer & Petrini, 1987; Souza & Krügner, 1995; Smith & Wingfield, 1996). Além da possibilidade da ocorrência de fungos patogênicos endofiticamente, existe uma variação sazonal na ocorrência desses fungos em brotações, sendo que a frequência está relacionada com as variações de temperatura e umidade durante as diferentes épocas do ano (Souza & Krügner, 1995).

Embora não existam fungicidas registrados para o controle desses fungos patogênicos, é provável que alguns produtos fungicidas aplicados no jardim clonal possam exercer algum controle, proporcionando a coleta de brotos saudáveis e o consequente aumento da porcentagem de enraizamento de estacas.

Em razão das vantagens na obtenção de mudas através de processo vegetativo, da importância de podridão de estacas neste sistema de produção de mudas e do possível papel dos fungos endofíticos sobre a podridão de estacas, o presente trabalho teve por objetivos: detectar através de um levantamento a ocorrência de fungos endofíticos presente em brotações assintomáticas provenientes de jardim clonal e que possam estar associados à podridão de estacas; demonstrar a patogenicidade dos fungos mais frequentemente associados à podridão; avaliar a aplicação de fungicidas no jardim clonal, visando o controle da podridão de estacas verificada nos viveiros comerciais; avaliar o tratamento químico de estacas previamente ao plantio, visando o controle dos agentes de podridão.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Produção comercial de mudas propagadas vegetativamente

A produção de mudas por estaquia se inicia a partir da coleta de brotos obtidos de touças que constituem o jardim clonal. O jardim clonal se constitui em uma matriz de plantas da qual brotos são retirados periodicamente, após a brotação das plantas existentes. A partir desses brotos são obtidas as estacas de aproximadamente 80 mm que são tratadas com hormônio para enraizamento e plantadas em tubetes plásticos contendo o substrato específico utilizado para o enraizamento. Os tubetes plantados são colocados em bandejas de aproximadamente 200 células e são levados para viveiros localizados em casa de vegetação, onde permanecem por um período de 25 dias para o desenvolvimento das brotações iniciais. Após essa etapa, as bandejas são levadas para viveiros a céu aberto, onde permanecem por um período de tempo variável até a formação final da muda.

2.2. Etiologia da podridão de estacas

A podridão tem sido relatada como a grande responsável pela redução na obtenção final de mudas de eucalipto, por prejudicar o enraizamento das estacas (Demuner et al., 1988; Carvalho et al., 1989; Vitti et al., 1989). O inóculo inicial responsável pela introdução da doença nos viveiros de produção de mudas pode ser proveniente do substrato de plantio, dos tubetes usados para conter o substrato, do material cortante utilizado durante os tratos culturais ou durante a coleta de brotos no jardim clonal, da casa de vegetação que abriga o viveiro ou dos brotos assintomáticos provenientes de jardim clonal, nos quais o(s) patógeno(s) pode(m) ocorrer endofiticamente. Segundo os referidos autores, a etiologia desta podridão envolve patógenos primários como *Cylindrocladium* sp. e *Rhizoctonia solani*, e secundários como, *Colletotrichum* sp., *Botryosphaeria ribis* e *Alternaria* sp. Esses patógenos têm sido freqüentemente isolados de estacas que apresentam problemas de podridão.

Um estudo da etiologia da podridão de estacas conduzido por Vitti et al. (1989) evidenciou que fungos dos gêneros *Rhizoctonia* (28%) e *Cylindrocladium* (20%) foram aqueles mais freqüentemente associados à podridão basal, quando estacas foram obtidas quinzenalmente de plantas de *E. grandis*, *E. saligna* e alguns híbridos de eucalipto. Foi detectado também a presença dos gêneros *Colletotrichum* (15%) e *Dothiorella* (11%), o que não descarta a possibilidade de serem prováveis patógenos associados à podridão.

Resultados semelhantes foram obtidos por Carvalho et al. (1989), os quais verificaram também uma maior freqüência de *Cylindrocladium scoparium*,

Cylindrocadium clavatum e *Rhizoctonia* sp em estacas de eucalipto na fase de enraizamento. Fungos como *Botryosphaeria* sp. e *Coniella fragariae* também foram identificados após o isolamento e considerados como secundários ou como saprófitas, devido ao resultado negativo no teste de patogenicidade.

Punithalingam & Holliday (1973), ao descreverem o gênero *Botryosphaeria*, relataram algumas de suas características, tais como distribuição em regiões tropicais e temperadas, causadores de sintomas tipo “die back” em culturas como abacate, olmo e *Pinus*, forma de penetração indireta através de ferimentos ou aberturas naturais. Mais especificamente em relação a plantas do gênero *Pinus*, foi observado que esse patógeno ataca mais freqüentemente quando a planta se encontra sob condições adversas de crescimento, demonstrando pouca habilidade para ser considerado patógeno principal nessa cultura.

Botryosphaeria ribis foi isolado de sintomas do tipo cancos presentes em árvores de *Eucalyptus saligna*. Através do teste de patogenicidade, foi demonstrado que este fungo pode realmente ser o agente causal desta doença (Fraser & Davidson, 1985).

Smith et al. (1994), ao estudarem o cancro do eucalipto na África do Sul, concluíram que o aparecimento da doença era bastante influenciado pelas condições ambientais. Além disso, o fungo *Botryosphaeria dothidea* Moug & Fr. Ces. & De Not (sin. *B. ribis* Grossb & Duggar) conhecido como causador do cancro em muitas espécies de eucalipto, foi consistentemente isolado a partir de tecidos com sintomas, sendo a sua patogenicidade confirmada através de inoculações do fungo em *Eucalyptus nitens*.

Smith (1934), ao pesquisar sobre hospedeiros de *Dothiorella* sp (estágio imperfeito de *B. ribis*) realizando experimentos de inoculação cruzada com isolados de

Dothiorella sp obtidos de várias culturas, concluiu que todas as espécies do fungo são idênticas. Estas espécies estão distribuídas em países de clima tropical e temperado, atacando 34 gêneros de 20 famílias de plantas, incluindo rosáceas, palmáceas, mirtáceas e outras famílias de importância econômica. Esse autor concluiu também que quando se promove ferimentos nas plantas e se emprega quantidades adequadas de inóculo, determinadas espécies hospedeiras se mostram altamente suscetíveis, enquanto outras, se apresentam como resistentes.

2.3. Ocorrência endofítica de fungos

Fisher et al. (1993) constataram a presença de *B. dothidea* ocorrendo endofiticamente em plantas de eucalipto, após sucessivos isolamentos. Evidência da ocorrência endofítica de patógenos foi obtida em outros trabalhos destes mesmos autores (Fisher & Petrini, 1987), os quais isolaram 12 espécies de fungos endofíticos provenientes de folhas e caules de *Suaeda fruticosa*, onde *Colletotrichum phyllachoroides* foi consistentemente isolado de folhas.

Carroll (1990), em trabalho de pesquisa com fungos endofíticos como patógeno de plantas, enfatizou particularmente a ocorrência dos gêneros *Fusarium*, *Phyllosticta* e fungos da família Xylariaceae. Fisher et al. (1992) relataram que aproximadamente 30 isolados de diversos fungos endofíticos foram obtidos de 5 espécies de *Thymus*; a

espécie *Colletotrichum gloeosporioides* foi encontrada em somente uma espécie (*T. serpyllum*), enquanto que *Alternaria alternata*, *Alternaria* sp., *Colletotrichum dematium* e *Pleurospora herbarum* foram predominantes em caules de outras 4 espécies desta planta.

Dothiorella dominicana, *Dothiorella mangiferae*, *Lasiodiplodia (Botryopodia) theobromae*, *Phomopsis mangiferae*, *Cytosphaera mangiferae*, *Pestalotiopsis* sp., *Dothiorella* sp. e *Alternaria alternata*, entre outros, foram encontrados ocorrendo endofiticamente nos tecidos de caule de mangueira, antes da emergência da inflorescência. Colonização endofítica por *Dothiorella* spp. e *P. mangiferae* foi detectada em tecidos do caule, inflorescência e do pedicelo do fruto maduro provenientes de árvores não tratadas e árvores tratadas regularmente com fungicidas cúpricos. A colonização por fungos endofíticos de tecidos da inflorescência e do pedicelo pode ser uma via primária para a infecção do fruto por outros patógenos principalmente *Glomerella cingulata*, agente causal de antracnose (Johnson et al., 1992).

A ocorrência endofítica de *B. dothidea* em tecidos saudáveis de pêssego, foi relatada por Pusey & Bertrand (1993), os quais concluíram que a severidade da doença foi positivamente correlacionada com a disponibilidade de água para germinação dos esporos e que tecidos de planta, mesmo sem ferimentos, são suscetíveis à invasão pelo patógeno durante quase toda a estação de crescimento.

Gindrat & Pezet (1994) utilizaram Paraquat como ferramenta para detecção rápida de infecção latente de fungos não endofíticos e fungos endofíticos na cultura da videira. Os resultados revelaram que este produto químico induziu o desenvolvimento de infecção latente do fungo *Botrytis cinerea*.

Após levantamento realizado em jardim clonal de eucalipto, Souza & Krügner (1995) constataram a ocorrência de *B. ribis* e *Colletotrichum* sp. que, segundo os autores, podem se destacar como potenciais causadores da doença na cultura. Verificaram também que existe uma sazonalidade de ocorrência desses microrganismos potencialmente patogênicos, pois em período de estiagem prolongada não verificaram a ocorrência desses fungos, mediante isolamentos feitos a partir de brotações sem sintomas.

Fungos endofíticos foram isolados de 45 espécies e variedades de plantas do gênero *Pinus* plantados na cidade de Kyoto, no Japão. *Phialocephala* sp. foi a espécie mais freqüentemente obtida em isolamentos feitos a partir da porção basal do caule de plantas (Hata & Futai, 1996).

Smith et al. (1996) também encontraram o fungo *Phialocephala* sp. em várias espécies de eucalipto com freqüências de 93% em *E. smithii*, 77% em *E. camaldulensis*, 63% em *E. grandis* e 57% em *E. nitens*. Este fungo, causador de cancro e doenças do tipo “die back”, ocorria endofiticamente nas amostras provenientes de plantas que sofreram um estresse e passaram a manifestar sintomas.

2.4. Controle químico da podridão de estacas de eucalipto

Alfenas et al. (1988) constataram que um dos isolados de *C. scoparium* foi resistente ao fungicida benomyl mesmo quando se utilizou concentrações de 960 ppm de ingrediente ativo; no entanto, outros isolados patogênicos deste fungo foram inibidos com 30 ppm do produto. Ensaio conduzido por Bedendo & Krüger (1987) mostraram que 10 e 100 ppm de benomyl promoveram, respectivamente, a inibição total de crescimento micelial e da germinação de esporos de *Cylindrocladium pteridis*. Estes mesmos autores relataram que chlorothalonil na concentração de 100 ppm reduziu em 60% o crescimento micelial deste fungo. Alfenas et al. (1988) encontraram tolerância de *C. scoparium* a benomyl na concentração de 1000 ppm e sensibilidade a thiram na concentração de 2000 ppm, sugerindo que fungicidas com modo de ação diferente devem ser usados alternadamente para evitar o aparecimento de raças tolerantes.

Estudando o efeito de alguns fungicidas na erradicação “in vitro” de conídios e micélio de *C. scoparium*, Demuner et al. (1988 a) mostraram que a erradicação total de esporos foi obtida com os fungicidas captan a 1600 ppm/10 minutos, thiram a 2500 ppm/10 minutos, captan a 2400 ppm + benomyl a 480 ppm/2 minutos, thiram a 3300 ppm + benomyl a 480 ppm/2 minutos e hipoclorito de sódio (NaOCl) a 130 ppm de cloro ativo por 0,5 minuto. Em outro trabalho, estes mesmos autores (Demuner et al., 1988 b) não conseguiram erradicar “in vitro” conídios e micélio de *C. scoparium*, quando benomyl foi usado na concentração de 0,5 g i.a./l por um tempo de exposição de 20 minutos; no entanto, o micélio do fungo foi erradicado em tratamentos com 0,12 g

do produto/l de água durante 2 minutos. Fegatex na dose de 2 l/300 l de água foi o produto mais eficiente testado por Takahashi et al. (1998) no controle de *Cylindrocladium* spp., *Fusarium* spp., *Pythium* spp., *Phytophthora* spp., *Botrytis cinerea*, em ensaios realizados “in vitro”.

Ferreira et al. (1992) analisaram o tratamento rotineiro de estacas de eucalipto para enraizamento feito pela imersão das estacas em suspensão aquosa de benomyl a 500 ppm e constataram que este fungicida nesta concentração não foi assimilado pelas estacas, nem via casca e nem via corte basal, após imersão por até 20 minutos. Constataram também que benomyl a 480 ppm não foi eficiente para erradicar conídios de *C. scoparium*, mesmo após 30 minutos de tratamento das estacas com este produto.

Takahashi et al. (1998), na tentativa de controlar as principais doenças que ocorrem em estacas de eucalipto, testaram alguns fungicidas visando o controle de *Cylindrocladium* spp., *Fusarium* spp., *B. ribis*, *Colletotrichum* spp. e *B. cinerea*. Os tratamentos captan + Benlate pulverizados em jardim clonal, captan + Benlate pulverizados no jardim clonal associado com captan + Benlate em tratamento de estacas, captan + Benlate pulverizados no jardim clonal associado com Fegatex em tratamento de estacas, Fegatex pulverizado em jardim clonal associado com captan + Benlate em tratamento das estacas e Fegatex pulverizado em jardim clonal associado com Fegatex em tratamento das estacas destacaram-se como os melhores tratamentos.

Em relação à persistência de fungicidas em plantas, Bedendo & Krügner (1988) demonstraram que a incorporação de benomyl ao solo pode proteger mudas de eucalipto em relação ao ataque de *Cylindrocladium* sp. por até 53 dias após a emergência das plantas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Levantamento da comunidade fúngica endofítica em jardim clonal

A coleta de brotos de eucalipto sem sintomas foi efetuada em touças do jardim clonal localizado na Fazenda Cara Preta pertencente ao grupo Votorantin Celulose e Papel - VCP/CELPAV, situada no município de Santa Rita do Passa Quatro, Estado de São Paulo. Os dados pluviométricos e de temperatura registrados para o local durante o período de realização dos ensaios estão apresentados nas Figuras 1 e 2.

Foi escolhido o clone G-31, híbrido de *E. grandis* x *E. urophylla* plantado no dia 02/05/1995, no espaçamento de 0,5 x 0,5 m ocupando uma área total de 3.570 m². No plantio, foi utilizado para esta área, 130 kg da fórmula 06-28-06 e a adubação de manutenção foi feita com a fórmula 10-05-10, em aplicação foliar. As plantas também receberam tratos culturais do tipo limpeza de touças, adubação orgânica com esterco de frango e irrigação.

As amostras foram colhidas durante o período compreendido entre outubro/96 e novembro/97. Doze coletas foram feitas durante o período de ensaio, representando seis ciclos de corte: out-nov/96, dez 96/jan 97, fev-mar/97, maio-junho/97, agosto-outubro/97 e nov/97. Para cada ciclo foram coletadas duas amostras, uma aos 40 e outra aos aproximadamente 60 dias após o último corte comercial. Ressalta-se que para o 5º ciclo de corte, uma das amostras foi coletada aos 40 dias e a outra aos 100 dias, acompanhando o cronograma de corte da empresa.

As amostras constaram de brotos provenientes de oito touças, sendo quatro touças tratadas com fungicida e quatro não tratadas. Em cada coleta, foram amostrados quatro brotos, de aproximadamente 20 cm de comprimento, por touça, totalizando 32 brotos. Assim, obteve-se metade dos brotos provenientes de touças tratadas e outra metade de touças não tratadas.

Os brotos amostrados foram lavados em água corrente e em seguida sub-amostras de 5 mm de comprimento foram obtidas de cada broto, em número de três, correspondentes às partes basal, mediana e apical dos brotos.

As sub-amostras foram desinfestadas superficialmente com álcool 70% e posteriormente imersas em uma solução de hipoclorito de sódio (1% de cloro ativo) por um período de 30 segundos. O plaqueamento foi feito em BDA (batata-dextrose-àgar) e o material foi incubado a 22 °C, sob condições de 12 h de luz/12 h de escuro, durante 07 dias. A identificação dos fungos foi feita usando microscópio óptico e, particularmente, para a determinação da espécie de *Cylindrocladium* foi utilizado microscópio eletrônico de varredura.

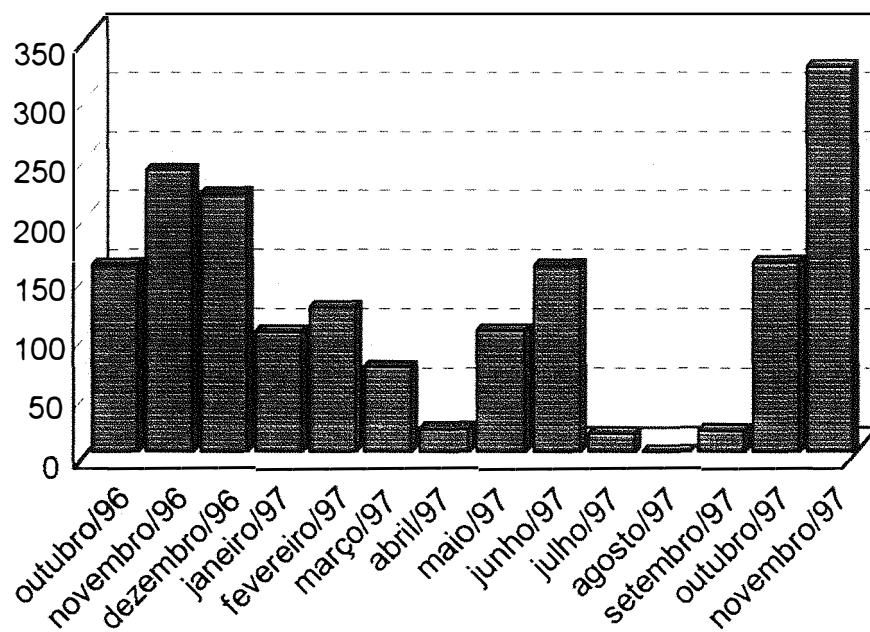


Figura 1. Quantidade de chuva (mm) durante os meses de outubro/96 a novembro/97 no jardim clonal onde as amostras foram coletadas. Santa Rita do Passa Quatro – SP.

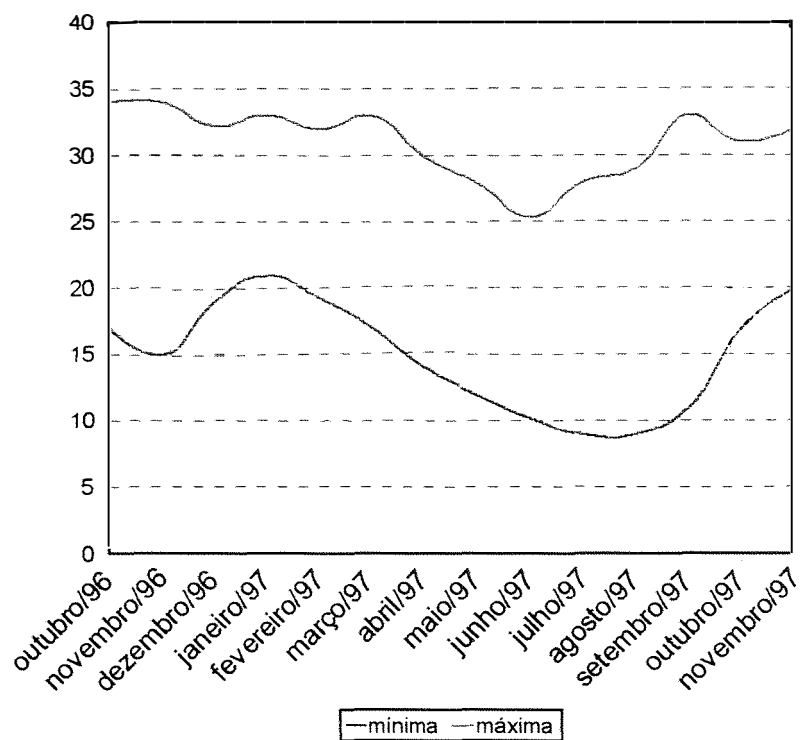


Figura 2. Média das temperaturas máximas e mínimas ($^{\circ}$ C) anotadas durante os meses de outubro/96 a novembro/97 no local do experimento. Santa Rita do Passa Quatro – SP.

3.2. Teste de patogenicidade

Os fungos mais freqüentemente isolados a partir dos brotos, provenientes de plantas do jardim clonal, foram mantidos em tubos de ensaio contendo BDA. A partir dos tubos, cada isolado foi repicado para placas contendo BDA e mantido à temperatura ambiente em torno de 22° C, sob condições de 12 h de luz/12 h de escuro. Discos de micélio de aproximadamente 0,5 cm de diâmetro foram retirados dos bordos de colônias com 7 dias de idade e transferidos para frascos de Erlenmeyer contendo 100 g de sementes de trigo, previamente umedecidas em 70 ml de água e autoclavadas. Uma semana após esta transferência, as sementes de trigo colonizadas foram incorporadas ao substrato normalmente utilizado pela VCP para a produção de mudas, na proporção de 1 parte de inóculo para 5 partes de substrato. O substrato foi constituído por uma mistura de 60% de palha de arroz carbonizada, 30% de vermiculita e 10% de substrato denominado Estaca 1, produzido comercialmente pela Eucatex. O substrato infestado pelos diversos isolados foi acondicionado em tubetes plásticos utilizados rotineiramente para o desenvolvimento de mudas a partir do enraizamento das estacas. Cerca de 80 % do volume do tubete foi primeiramente preenchido com o substrato normal utilizado pela empresa, e os 20 % restante (aproximadamente 2 cm), foram preenchidos com o substrato infestado pelos isolados. Estacas de aproximadamente 8 cm de comprimento obtidas dos brotos originalmente retirados das touças foram tratadas com hormônio AIB (ácido indol butílico) e individualmente plantadas nos tubetes contendo substrato inoculado com as sementes de trigo colonizadas pelos diferentes isolados. O tratamento

testemunha foi representado por substrato contendo sementes de trigo autoclavadas, porém não colonizadas pelos fungos.

O delineamento estatístico utilizado foi o de blocos ao acaso com seis tratamentos e quatro repetições, totalizando vinte e quatro parcelas sendo que cada parcela foi representada por 32 tubetes. Cada tratamento foi representado pela infestação do solo por um isolado pertencente a um dos cinco diferentes gêneros de fungos mais frequentemente isolados dos brotos provenientes de touças do jardim clonal. O outro tratamento foi representado pela testemunha, cujo substrato não foi infestado.

Após o plantio ou estaquia, os tubetes foram levados para a casa de vegetação da VCP, onde se encontravam os viveiros de produção de mudas. A primeira avaliação foi feita aos doze dias e a segunda aos vinte e cinco dias após o plantio. Como critério, foi considerada como doente a estaca que exibia área de coloração escura (lesão), supostamente causada pelo patógeno. A incidência foi representada pelo número de estacas exibindo área basal escura e a severidade foi avaliada através da medida (mm) da extensão desta área escurecida ou lesionada. Foi avaliado também o efeito dos fungos sobre a formação de calos e sobre o enraizamento das estacas, através da contagem de estacas apresentando calos ou primórdios de raiz.

Após a avaliação, procedeu-se ao reisolamento na tentativa de se recuperar os fungos associados à podridão da estaca. A metodologia utilizada para o reisolamento foi idêntica àquela descrita no item 3.1., referente ao isolamento.

3.3. Tratamento de touças no jardim clonal

As touças tratadas ocupavam uma área de aproximadamente 1.800 m² e receberam tratamento fungicida na forma de pulverizações semanais. Foi utilizado para aplicação um pulverizador costal com capacidade para 20 l, bico cônico 110/04, sendo as pulverizações feitas a partir da 2^a semana após o corte comercial. Estas pulverizações visavam proteger as novas brotações contra o ataque de patógenos. As aplicações foram feitas alternadamente com benomyl na dose de 0,5 kg/ha e oxiclureto de cobre na dose de 1,1 kg/ha com volume de calda de aproximadamente 300-400 l/ha, até uma semana antes da última coleta de amostras.

3.4. Tratamento químico de estacas

Para o tratamento químico das estacas, foram utilizados os fungicidas benomyl e captan na concentração de 0,75g/l e 1,5g/l, respectivamente. A escolha desses fungicidas foi feita em função do uso corrente desses produtos pelas empresas que utilizam a produção de mudas por propagação vegetativa. Estacas não tratadas serviram como testemunha.

Estacas de aproximadamente 70 mm foram obtidas de brotos oriundos de touças

do jardim clonal e imersas em suspensões fungicidas por um período de tempo de 5 minutos. Após o tratamento fungicida, a base das estacas foi imersa em hormônio AIB (ácido indol butílico) e plantadas em tubetes contendo o substrato comercial para produção de mudas descrito no item 3.2.. O material foi levado para a casa de vegetação, onde permaneceu por um período de 25 dias, tempo necessário para o enraizamento das estacas.

O delineamento estatístico utilizado foi o de blocos ao acaso com 3 tratamentos e 3 repetições, totalizando 9 parcelas com 70 tubetes por parcela. Os tratamentos foram representados por benomyl, captan e testemunha sem fungicida.

A primeira avaliação foi realizada aos doze dias e a segunda aos vinte e cinco dias após o plantio ou estaquia. Os critérios adotados foram idênticos aqueles descritos no item 3.2.. Após a avaliação, procedeu-se ao isolamento do patógeno a partir das áreas escurecidas (lesões) presentes nas estacas. O isolamento foi conduzido de modo idêntico ao isolamento de fungos descrito no item 3.1.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Levantamento da comunidade fúngica endofítica em jardim clonal

Com base no levantamento realizado no jardim clonal durante o período de um ano, os isolamentos realizados a partir das amostras coletadas de touças tratadas e não tratadas permitiram obter uma grande diversidade de fungos associados aos brotos assintomáticos de eucalipto (Tabela 1). Foram obtidos, em cultura pura; 20 isolados, inicialmente diferenciados entre si por algumas características apresentadas pelas colônias, principalmente coloração e tipo de micélio. Exames mais detalhados, realizados com o auxílio de microscopia, permitiram a identificação de 11 gêneros. A dificuldade para identificação dos demais isolados foi devida à ausência de esporos ou de qualquer outra estrutura típica de reprodução. Praticamente, a totalidade dos isolados não identificados ocorreu com baixa frequência durante o levantamento realizado no período de um ano. Mesmo alguns dos 11 gêneros identificados apareceram nos isolamentos numa frequência muito baixa.

Tabela 1. Incidência (%) de fungos endofíticos em brotos de eucalipto provenientes de touças tratadas e não tratadas com fungicidas durante o período de um ano correspondente a seis ciclos de corte comercial.

FUNGOS	OUT/NOV-96						DEZ/JAN-97						FEV/MAR-97						MAI/JUN-97						AGO/OUT-97						NOV/97	
	1º CICLO			2º CICLO			3º CICLO			4º CICLO			5º CICLO			6º CICLO			40 DIAS		100 DIAS		40 DIAS		40 DIAS							
	40 DIAS	60 DIAS	TN	40 DIAS	70 DIAS	TN	40 DIAS	60 DIAS	TN	40 DIAS	60 DIAS	TN	40 DIAS	60 DIAS	TN	40 DIAS	60 DIAS	TN	40 DIAS	60 DIAS	TN	40 DIAS	60 DIAS	TN	40 DIAS	60 DIAS	TN	TT	TN			
<i>Alternaria</i>	18,7*	6,2	25,0	---	31,2	18,7	6,2	---	6,25	6,25	6,25	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---		
<i>Botryosphaeria</i>	6,2	---	6,2	12,5	18,7	12,5	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---		
<i>Cladosporium</i>	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---		
<i>Colletotrichum</i>	---	18,7	12,5	31,2	6,2	25,0	81,2	50,0	43,7	68,7	18,7	18,7	12,5	6,2	12,5	6,2	12,5	6,2	12,5	6,2	25,0	25,0	12,5	---	---	---	---	---	25,0	37,50		
<i>Cylindrocleftidium</i>	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
<i>Diaphorthe</i>	---	---	6,25	---	---	6,25	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
<i>Fusarium</i>	6,2	6,2	31,25	18,75	12,5	12,5	---	12,5	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
<i>Gignardia</i>	---	---	37,5	42,8	18,7	31,2	18,7	6,2	12,5	18,7	37,5	18,7	12,5	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	18,75	
<i>Nigrospora</i>	---	12,5	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
<i>Penicillium</i>	---	---	---	---	---	6,2	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
<i>Phoma</i>	6,25	6,25	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	

TT= touças tratadas (4)

TN= touças não tratadas (4)

* total de brotos avaliados = 16

Representantes do gênero *Phoma*, apareceram somente no início do levantamento, correspondendo a isolamentos feitos a partir de material colhido no primeiro ciclo, ou seja nos meses de outubro/novembro de 96.

Os gêneros *Nigrospora* e *Penicillium* também ocorreram esporadicamente, sendo que *Nigrospora* apareceu pela primeira vez em outubro/96 e somente voltou a aparecer em junho/97. *Penicillium* apareceu uma única vez no mês de dezembro/96, sendo isolado de um único broto.

O gênero *Diaporthe* também apresentou baixa frequência de ocorrência, aparecendo apenas em três épocas de coleta, ou seja, nos meses de novembro/96, dezembro/96 e março/97, porém isolado de somente um broto em cada uma dessas épocas.

O gênero *Cladosporium* foi o único gênero que, apesar de se manifestar com baixa frequência durante o levantamento, apareceu constantemente no período de junho/97 até outubro/97.

O gênero *Cylindrocladium* apresentou baixa frequência, ocorrendo apenas no 2º e no 3º ciclos de corte, sendo que neste último caso, isolados foram obtidos tanto da amostra coletada aos 40 como aos 60 dias. Esses resultados concordam com as observações de Souza & Krüger (1995), Fisher et al. (1993) e Smith & Wingfield (1996) quanto à associação deste fungo patogênico com a podridão de estacas. Ressalta-se que dentre todos os gêneros identificados ao longo do trabalho, o reconhecimento de espécie só foi possível para o gênero *Cylindrocladium*. Os procedimentos para isto envolveram o uso de microscopia eletrônica de varredura, onde foram determinadas algumas características morfológicas do fungo como tamanho e

septação do conídio, tamanho de estipe, vesícula e fiálide. Estas características permitiram identificar a espécie *Cylindrocladium candelabrum* Viegas, conforme Crous & Wingfield (1994).

O gênero *Fusarium* foi constatado em isolamentos realizados com brotos provenientes do 1º e 2º ciclos de corte, sendo novamente detectado nos isolamentos subsequentes, correspondentes ao 4º e 5º ciclos de corte.

O fungo *Guignardia* sp apresentou uma alta frequência nos isolamentos, sendo encontrado no 1º ciclo de corte (segunda amostragem), 2º ciclo de corte (nas duas amostragens), 3º ciclo de corte (nas duas amostragens), 4º ciclo de corte (nas duas amostragens), 5º ciclo de corte (primeira amostragem) e 6º ciclo de corte (única amostragem). Em vários isolamentos a porcentagem de brotos portadores do fungo foi bastante alta, como por exemplo durante o 1º ciclo de corte (segunda amostragem), onde, entre touças tratadas e não tratadas, o isolamento do fungo foi positivo em mais de 80% dos brotos amostrados. A partir de abril/97, o fungo teve sua frequência diminuída e passou a ocorrer em baixa porcentagem de brotos, voltando a aparecer somente a partir de outubro/novembro/97.

O gênero *Botryosphaeria* também ocorreu com alta frequência durante o levantamento, sendo constatado no 1º, 2º e 3º ciclos de corte (duas amostragens) e no 4º ciclo de corte (segunda amostragem). Na segunda amostragem do 3º ciclo de corte, o fungo foi isolado de mais de 50% dos brotos coletados, considerando as touças tratadas e não tratadas. A partir de março/97 a frequência de ocorrência diminuiu consideravelmente.

O gênero *Alternaria* se manifestou com alta frequência, tendo aparecido durante os três primeiros ciclos de corte (nas duas amostragens) e no 4º e 5º ciclos de corte (segunda amostragem). A porcentagem dos brotos infectados no início do ensaio (1º e 2º ciclo) foi maior em relação à presença do fungo nos brotos coletados no 3º, 4º e 5º ciclos de corte.

O gênero *Colletotrichum* foi aquele que apresentou maior frequência, sendo constatado em todos os ciclos de corte, com exceção apenas na segunda amostragem do 5º ciclo. De acordo com os resultados, pode-se observar que, na maioria das amostragens, esse gênero esteve presente em uma porcentagem bastante alta dos brotos.

O levantamento da população fúngica endofítica associada a brotos de eucalipto evidenciou a presença de alguns gêneros previamente assinalados como endofíticos para outras espécies vegetais arbóreas, que não o eucalipto. Assim, Carrol (1990) relatou a ocorrência do gênero *Fusarium* em vários hospedeiros. Fischer et al. (1992) constataram a presença de mais de uma espécie de *Colletotrichum* e de *Alternaria* em plantas do gênero *Thymus*, enquanto Johnson et al. (1992) relataram o isolamento de *G. cingulata*, *Dothiorella* spp e de *A. alternata* em tecidos do caule de mangueira. Também Pusey & Bertrand (1993) detectaram a ocorrência endofítica de *B. dothidea* em material de pessegueiro aparentemente sadio.

Para o caso específico do eucalipto, alguns gêneros de fungos isolados e identificados neste trabalho também foram constatados por outros autores como ocorrendo endofiticamente em plantas deste gênero. Fischer et al. (1993) obtiveram frequentemente *B. dothidea* em isolamentos sucessivos feitos a partir da casca, ramos e folhas. Vitti et al. (1989) isolaram fungos do gênero *Cylindrocladium* de 20% das

estacas destinadas a produção de mudas, enquanto Souza & Krugner (1995) relataram a ocorrência de *B. ribis* e *Colletotrichum* sp em brotos provenientes de jardim clonal.

4.2. Teste de patogenicidade

Os resultados do teste de patogenicidade (Tabela 2 e Tabela 3) mostraram que dentre os gêneros de fungos mais freqüentemente isolados de amostras do jardim clonal, *Colletotrichum*, *Botryosphaeria* e *Cylindrocladium* estão envolvidos no complexo da podridão de estacas.

A espécie *C. candelabrum*, esteve associada a 82,8% das estacas plantadas em substrato infestado experimentalmente por este patógeno. Os dados de severidade, medida através do comprimento da lesão, mostraram um comprimento médio de área escurecida, da ordem de 33 mm. Os fungos pertencentes aos gêneros *Botryosphaeria* e *Colletotrichum* apresentaram uma incidência menor do que *C. candelabrum*, estando ambos associados a aproximadamente 32% das estacas plantadas em solo infestado experimentalmente por esses patógenos. Em relação à severidade, a média do comprimento de lesão de estacas do tratamento com o gênero *Colletotrichum* atingiu cerca de 12 mm, enquanto para o tratamento com o gênero *Botryosphaeria* a média do comprimento das lesões foi em torno de 20 mm.

Os resultados de reisolamento (Tabela 2) mostraram que o gênero *Colletotrichum* foi recuperado de 48% das estacas que apresentavam sintomas de escurecimento, enquanto *Botryosphaeria* foi reisolado de 66% das estacas plantadas em substrato infestado com este fungo e *C. candelabrum* apareceu em 95% das estacas com sintomas de podridão, provenientes do substrato artificialmente infestado. A presença de *C. candelabrum* também foi registrada em 9,5% das estacas infectadas pelo gênero *Colletotrichum* e em 28% das estacas infectadas por *Botryosphaeria*.

Apesar de *C. candelabrum* ter aparecido em reisolamentos dos gêneros *Colletotrichum* e *Botryosphaeria*, ficou evidente que estes dois gêneros estão consistentemente associados à podridão de estacas. Por outro lado, a alta patogenicidade de *C. candelabrum* ficou demonstrada pela sua alta incidência nas estacas plantadas em substrato infestado por ele próprio e pelo seu aparecimento em reisolamentos feitos em estacas plantadas em substratos infestados pelos gêneros *Colletotrichum*, *Botryosphaeria*, *Alternaria* e *Guignardia*.

O escurecimento da parte basal das estacas plantadas em substrato infestado com *Alternaria* e *Guignardia* e das estacas plantadas em substrato não infestado (tratamento testemunha), podem ser creditado ao gênero *Colletotrichum* e a espécie *C. candelabrum*, como pode ser visto nos resultados de reisolamento apresentados na Tabela 2. A incidência de podridão e o sintoma de escurecimento presente nas estacas plantadas em substratos sem infestação e em substrato infestado por *Alternaria* e *Guignardia* pode ser atribuído à presença de *Colletotrichum* e *C. candelabrum*, pois estes fungos foram detectados na fase de reisolamento, não sendo constatada a ocorrência nem de *Alternaria* nem de *Guignardia* neste material. Estes resultados não só demonstraram o

envolvimento destes fungos em relação à podridão como confirmam a ocorrência endofítica dos mesmos, os quais possivelmente vieram junto com as estacas obtidas a partir de brotos retirados de plantas do jardim clonal.

Os resultados obtidos na avaliação feita aos 12 dias foram confirmados pela avaliação feita aos 25 dias após a estaquia. Nesta última avaliação, os resultados obtidos para incidência e comprimento de área apodrecida foram maiores que aqueles obtidos aos 12 dias, porém a análise dos resultados leva a às mesmas conclusões, inclusive para o caso de reisolamentos (Tabela 3).

A associação de *C. candelabrum* e fungos dos gêneros *Colletotrichum* e *Botryosphaeria* à podridão de estacas também tem sido relatada por outros autores que se dedicaram ao estudo da etiologia da doença. Vitti et al. (1989) relataram a presença do primeiro gênero em 20% de estacas com podridão, enquanto o segundo e terceiro gêneros foram assinalados em 15% e 11% das estacas. Estes autores se referem ao *Cylindrocladium* como um gênero patogênico e fazem a suposição de que *Colletotrichum* e *Botryosphaeria* possivelmente possam atuar como patógenos secundários. Carvalho et al. (1989) isolaram, com maior frequência, fungos do gênero *Cylindrocladium* como patógenos de estacas em fase de enraizamento e consideraram *Botryosphaeria* sp como patógeno secundário. Também Souza & Krugner (1995) detectaram a presença de *B. ribis* e de *Colletotrichum* sp em brotos de jardim clonal e destacaram que estes gêneros poderiam atuar como potenciais patógenos em relação ao desenvolvimento de podridão em estacas. Apesar de constantemente apontados em vários artigos como patógenos secundários ou como potenciais patógenos, no presente trabalho foi evidenciada a associação de *Colletotrichum* e *Botryosphaeria* com a

podridão ocorrendo em uma elevada porcentagem de estacas sintomáticas e experimentalmente inoculadas, provocando escurecimento de áreas consideráveis em relação ao tamanho das estacas.

Tabela 2. Patogenicidade e reisolamento dos fungos endofíticos mais frequentemente associados às brotações assintomáticas de jardim clonal e seu efeito sobre a formação de calos de estacas de eucalipto, avaliados aos 12 dias após a estaquia.

	Incidência (%)	Tam. lesão (mm)	Formação de calos (%)	Reisolamento (%)	Fungos associados (%)
<i>Colletotrichum</i>	32,8 c	11,6 a	76,0 b	48	9,5 (Cy)
<i>Alternaria</i>	7,8 a	9,7 a	68,8 b	0	40 (Co) e 60 (Cy)
<i>Botryosphaeria</i>	31,3 bc	19,9 ab	81,3 b	66	28 (Cy)
<i>Guignardia</i>	7,8 a	8,5 a	65,6 b	0	40 (Co) e 40 (Cy)
<i>Cylindrocladium</i>	82,8 d	33,5 b	23,0 a	95	—
Testemunha	9,4 ab	11,0 a	62,5 b	—	50 (Cy) e 33 (Co)

* Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si (Tukey 5%).

Co= *Colletotrichum*

Cy = *Cylindrocladium*

Tabela 3. Patogenicidade e reisolamento dos fungos endofíticos mais frequentemente associados às brotações assintomáticas de jardim clonal e seu efeito sobre o enraizamento de estacas de eucalipto, avaliados aos 25 dias após a estaquia.

	Incidência	Tam. lesão	Enraizamento	Reisolamento	Fungos associados
	(%)	(mm)	(%)	(%)	(%)
<i>Colletotrichum</i>	37,5 bc	32,7 ab	23,4 a	36	24 (Cy)
<i>Alternaria</i>	20,6 ab	21,9 a	17,2 a	●	84,6 (Cy)
<i>Botryosphaeria</i>	51,9 c	31,8 ab	25,0 a	30	30 (Cy)
<i>Guignardia</i>	12,5 a	20,6 a	20,0 a	0	66 (Cy)
<i>Cylindrocladium</i>	96,8 d	51,2 b	1,5 a	100	—
Testemunha	9,4 a	20,4 a	23,4 a	—	24 (B); 20 (Co); 40 (Cy)

* Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si (Tukey 5%).

B= *Botryosphaeria*

Co= *Colletotrichum*

Cy = *Cylindrocladium*

O envolvimento de *Colletotrichum* e *Botryosphaeria* no complexo da podridão, pode ser explicado com base no artigo de Smith et al. (1996), os quais mencionam que a espécie *Phialocephala* sp que ocorria endofiticamente em eucalipto passou a induzir sintomas em plantas que sofreram estresse. Com base nessa observação, pode-se inferir que o estresse provocado durante a formação da muda, a partir dos brotos coletados em jardim clonal, poderia predispor a muda ao ataque tanto de *Colletotrichum* como de *Botryosphaeria*.

O gênero *Alternaria* foi isolado como um fungo endofítico, porém não foi evidenciada a sua patogenicidade, concordando com relatos feitos em outros trabalhos (Fischer et al. 1992; Johnson et al. 1992). O aparecimento de *Guignardia* nos brotos de jardim clonal é um fato novo, uma vez que não foram encontradas referências em outros trabalhos sobre a sua ocorrência como fungo endofítico. No entanto, o fungo se mostrou não patogênico em relação à podridão.

A ação dos diferentes gêneros de fungos mais frequentemente isolados de brotos do jardim clonal sobre a formação de calos e enraizamento de estacas pode ser interpretada com base nos resultados apresentados na Tabela 2 e Tabela 3.

Os gêneros *Alternaria* e *Guignardia*, embora aparentemente causem redução na formação de calos e enraizamento de estacas, não aparecem no reisolamento; no entanto, a presença marcante de *C. candelabrum* associada às estacas inoculadas com esses dois gêneros indica que esta espécie é a responsável pela doença e que a mesma está atuando na redução de calos e enraizamento. Por outro lado, os resultados mostram que os gêneros *Colletotrichum* e *Botryosphaeria* estão associados à podridão e que ambos podem estar interferindo na produção de calos e raízes pelas estacas, apesar de *C.*

candelabrum ter aparecido também associada a estes fungos durante o reisolamento. O fato de se observar lesões relativamente desenvolvidas nas estacas atacadas por *Colletotrichum* e *Botryosphaeria*, a formação de calos não foi afetada, pois as lesões estavam ocorrendo em grande parte das estacas superiormente em relação à região de formação de calos.

O papel de *C. candelabrum* sobre a formação de calos e enraizamento foi evidente, embora sem significância estatística, pois estacas plantadas em substrato infestado pelo fungo apresentaram redução de 70% e quase 100%, respectivamente, para estas características. Com base nos resultados obtidos neste trabalho e como já assinalado em outros artigos (Demuner et al., 1988 b; Carvalho et al., 1989 e Vitti et al., 1989), fungos do gênero *Cylindrocladium* são os grandes responsáveis pela redução na produção de mudas de eucalipto pelo método de estaquia, por causarem podridão e, conseqüentemente, afetarem o enraizamento das estacas.

4.3. Tratamento de touças no jardim clonal

De acordo com os resultados da Tabela 1, pode-se perceber que o tratamento das touças com os fungicidas benomyl intercalado com oxicloreto de cobre não foi eficiente para o controle de microrganismos endofíticos. Em alguns casos, touças tratadas chegaram a apresentar freqüência maior de microrganismos do que touças não tratadas.

No entanto, alguns fungos, como por exemplo os gêneros *Botryosphaeria*, *Guignardia* e *Colletotrichum*, foram isolados com maior frequência de touças localizadas em jardim clonal não tratado. O tratamento químico das touças somente mostrou algum efeito em relação a *C. candelabrum*, pois nos três isolamentos em que o fungo foi detectado, os brotos eram oriundos de touças não tratadas com os fungicidas.

A baixa eficiência do tratamento químico das touças talvez possa ser atribuído, entre outras causas, à época e forma de aplicação dos fungicidas. Em relação à época, quando os brotos são retirados das touças, os ferimentos, provocados pelo corte, servem como portas de entrada para patógenos. A aplicação de fungicidas somente é feita duas semanas após o corte, época em que estas touças apresentam novas brotações, justamente para a proteção desses novos brotos que fornecerão as estacas para produção de mudas. A penetração de fungos pode, portanto, ocorrer através dos ferimentos, cuja superfície se encontra desprotegida pelos fungicidas. Assim, quando as pulverizações são feitas os fungos já se encontram endofiticamente. Quanto à forma de aplicação, embora o benomyl tenha ação sistêmica, o seu efeito sobre o patógeno endofítico pode não ser exercido adequadamente em função da quantidade absorvida pela planta não ser suficiente, pois quando o produto é aplicado via folha o mesmo é muito pouco absorvido, como foi demonstrado por Bedendo & Krügner (1988). Estes mesmos autores relataram que aplicações feitas no solo controlaram mais eficientemente *Cylindrocladium* sp em eucalipto, pois o fungicida foi absorvido em maior quantidade e de maneira contínua (Bedendo & Krugner, 1987).

Diante dessas evidências, pode-se sugerir a aplicação de fungicidas imediatamente após o corte dos brotos, com o objetivo de prevenir a penetração de fungos através de ferimentos. Ainda, a aplicação de sistêmicos poderia ser feita na forma de rega, possibilitando às plantas maior absorção do produto. Quanto ao custo da aplicação no solo, este seria justificável, pois áreas de jardim clonal são relativamente pequenas quando comparadas com as áreas de campo comercial.

4.4. Tratamento químico de estacas

O tratamento químico de estacas feito com benomyl e captan não se mostrou eficiente. A incidência de podridão não foi reduzida em relação à testemunha, o mesmo ocorrendo com o tamanho das lesões e formação de calos/enraizamento, tanto para a avaliação realizada aos 12 como aos 25 dias (Tabelas 4 e 5). Comparando-se os resultados obtidos nas duas avaliações, pode ser notado que os valores para incidência e tamanho de lesão são maiores na segunda avaliação, porém somente reforçam os dados obtidos na primeira avaliação. A análise dos resultados mostra que não houve diferença significativa quando se comparou incidência e tamanho de lesão entre as estacas tratadas e não tratadas. Resultados semelhantes foram obtidos para as características formação de calos, medida aos 12 dias, e enraizamento, avaliado aos 25 dias.

Uma possível explicação para a ineficiência do tratamento fungicida possa ser baseada no fato dos fungos ocorrerem endofiticamente. A atuação do fungicida pode ficar restrita à superfície da estaca, não atingindo os tecidos mais internos onde se encontram os fungos. Embora o tratamento fungicida não reduza a incidência de podridão e o tamanho das lesões, o mesmo parece exercer um certo controle sobre *C. candelabrum*, pois este fungo não aparece nos tratamentos onde se utilizou benomyl. Como *C. candelabrum* tem sido apontado como o principal agente associado ao complexo da podridão e como o custo do tratamento fungicida não é relevante para a produção de mudas, sugere-se o emprego do mesmo como uma das etapas da produção comercial de mudas de eucalipto.

Tabela 4. Efeito de tratamento fungicida sobre a ocorrência de podridão e formação de calos em estacas de eucalipto, avaliado 12 dias após a estaquia.

	Incidência	Tamanho lesão	Formação	Isolamento
	(%)	(mm)	de calos (%)	de fungos (%)
Benlate	12,3 a	12,1 a	65,7 a	7,6 (B)
Captan	11,4 a	15,2 a	77,1 a	17 (Co)
Testemunha	25,7 a	12,2 a	65,7 a	18 (Co); 30 (B)

* Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si (Tukey 5%)

B= *Botryosphaeria*

Co= *Colletotrichum*

Tabela 5. Efeito de tratamento fungicida sobre a ocorrência de podridão e enraizamento em estacas de eucalipto, avaliado 25 dias após a estaquia.

	Incidência	Tamanho lesão	Enraizamento	Isolamento
	(%)	(mm)	(%)	de fungos (%)
Benlate	16,2 a	23,4 a	25,6 a	13 B; 53 (Co)
Captan	14,3 a	30,2 a	29,5 a	13 (Cy); 40 (Co)
Testemunha	15,1 a	26,0 a	31,4 a	13 (Cy); 40 (Co)

* Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si (Tukey 5%)

B= *Botryosphaeria*

Co= *Colletotrichum*

Cy= *Cylindrocladium*

5. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos no levantamento da população fúngica associada a brotos do jardim clonal, nos testes de patogenicidade realizados com os fungos mais frequentemente isolados dos brotos e no tratamento químico de matrizes e de estacas utilizadas para a produção de mudas, pode-se concluir que:

- a) Os gêneros *Colletotrichum*, *Botryosphaeria* e *Guignardia* foram aqueles que ocorreram com maior frequência em brotos assintomáticos.
- b) A espécie *Cylindrocladium candelabrum* se mostrou altamente patogênica, causando podridão e redução de enraizamento em estacas de eucalipto.
- c) Os gêneros *Colletotrichum* e *Botryosphaeria* estão também associados ao complexo da podridão de estacas, sem no entanto causar redução significativa no enraizamento das estacas.

- d) O tratamento semanal de touças com os fungicidas benomyl (0,5 kg/ha) e oxiclóreto de cobre (1,1 kg/ha), aplicados duas semanas após o corte de brotos em pulverização foliar, não foi eficiente para controlar os fungos que ocorreram endofiticamente.
- e) O tratamento de estacas obtidas de brotos do jardim clonal com os fungicidas benomyl (0,75 g/l) e captan (1,5 g/l) por imersão durante 5 minutos não apresentou efeito positivo sobre o controle da podridão de estacas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALFENAS, A.C.; DEMUNER, N.L.; SILVA, A.R. Resistência de *Cylindrocladium scoparium*, agente etiológico de podridão em estacas de *Eucalyptus* a benomyl.

Fitopatologia Brasileira, v. 12, n. 2, p. 158, 1989 (Resumo).

ALFENAS, A.C.; DEMUNER, N.L.; SILVA, A.R. Benomyl resistant strain of *Cylindrocladium scoparium*, causal agent of cutting rot of *Eucalyptus grandis* in

Brazil. **ISPP - Chemical Control Newsletter**, n. 10, p. 23-25, 1988.

ANDRADE, E.V. **O Eucalipto**. São Paulo, 1961, 667 p..

BEDENDO, I.P.; KRÜGNER, T.L. Persistence of Benomyl in seedlings of *Eucalyptus cloeziana* and *Eucalyptus grandis* after soil application. **Fitopatologia Brasileira**, v.

13, n. 3, p. 227-230, 1988.

- BEDENDO, I.P.; KRÜGNER, T.L. Fungitoxicidade de benomyl e chlorothalonil a *Cylindrocladium pteridis* e sua persistência após pulverização em folhas de *Eucalyptus cloezina*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 12, n. 3, p. 236-239, 1987.
- CARDOSO, J.E.; COSTA, J.L.S. Efeito do tratamento de semente de feijão e caupi no controle da podridão radicular de *Rhizoctonia* e da podridão do colo de *Sclerotium*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 13, n. 2, p. 136, 1988.
- CARROL, G.C. Fungal endophytes in vascular plants: mycological research opportunities in Japan. **Transactions of the Mycological Society of Japan**, v. 31, n. 1, p. 103-116, 1990.
- CARVALHO, A.O.; ALFENAS, A.C.; DEMUNER, N.L. Patogenicidade de fungos isolados de estacas de eucalipto para enraizamento em casa de vegetação. **Fitopatologia Brasileira**, v. 14, n. 2, p.122, 1989 (Resumo).
- CROUS, P.W.; WINGFIELD, M.J. A monograph of *Cylindrocladium* including anamorphus of calonectria. **Mycotaxon**, Ithaca, v. 51, p. 341-345, 1994.
- DEMUNER, N.L.; FERREIRA, F.A.; ALFENAS, A.C.; DEMUNER, A.J. Erradicação “in vitro” de conídios e micélio de *Cylindrocladium scoparium* com benomyl, captan, thiram e hipoclorito de sódio. **Fitopatologia Brasileira**, v. 13, n. 2, p. 127, 1988 a (Resumo).

DEMUNER, N.L.; FERREIRA, F.A.; ALFENAS, A.C.; REZENDE, D.V. Análise técnica da prática de imersão de base de estacas em suspensão de benomyl para prevenção do apodrecimento de estacas de eucalipto para enraizamento. **Fitopatologia Brasileira**, v. 13, n. 2, p. 307-313, 1988 b (Resumo).

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

FERREIRA, F.A.; DEMUNER, N.L.; ALFENAS, A.C.; DEMUNER, A.J. Análise do tratamento de estacas de eucalipto para enraizamento com benomyl e bioensaios para erradicação de esporos e outras estruturas fúngicas em BDA. **Fitopatologia Brasileira**, v. 17, n. 3, p. 307-313, 1992.

FISHER, P.J.; PETRINI, O. Location of fungal endophytes in tissues of *Suaeda fruticosa*: a preliminary study. **Transactions of the British Mycological Society**. v. 89, n. 2, p. 246-249, 1987.

FISHER, P.J.; PETRINI, O.; AMEZQUITA, M.M. Endophytic fungi from Alpine and Mediterranean species of *Thymus*. **Nova Hedwigia**, v. 55, n. 3-4, p. 473-477, 1992.

FISHER, P.J.; PETRINI, O.; SUTTON, B.C. A comparative study of fungal endophytes in leaves, xylem and bark of *Eucalyptus* in Australia and England. **Sydowia**, v. 45, n. 2, p. 338-345, 1993.

FRASER, D.; DAVISON, E.M. Stern cankers of *Eucalyptus saligna* in western Australia. **Australian - Forestry**, v. 48, n. 4, p. 220-226, 1985.

GINDRAT, D.; PEZET, R. Paraquat, a tool for rapid detection of latent fungal infections and of endophytic fung. **Journal of Phytopathology**, v. 141, n. 1, p. 86-98, 1994.

HATA, K.; FUTAI, K. Variation in fungal endophyte populations in needles of the genus *Pinus*. **Canadian Journal of Botany**, v. 74, n. 1, p. 103-114, 1996.

JOHNSON, G.I.; MEAD, A.J.; COOKE, A.W.; DEAN, J.R. Mango stem end rot pathogens - fruit infection by endophytic colonization of the inflorescence and pedicel. **Annals of Applied Biology**, v. 120, n. 2, p. 225-234, 1992.

ONU- Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura. Roma, 1989.

PUNITHALINGAN, E.; HOLLIDAY, P. *Botryosphaeria ribis*. **CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria**. N. 395, 1973.

PUSEY, P.L. & BERTRAND, P.L. Seasonal infection of nonwounded Peach Bark by *Botryosphaeria dothidea*. **Phytopathology**. v. 83, n. 8, p. 825-829, 1993.

SMITH, O.C. Inoculations showing the wide host range of *Botryosphaeria ribis*. **Journal of Agricultural Research**, v. 49, n. 5, p. 467-476, 1934.

SMITH, H.; KEMP, G.H.J.; WINGFIELD, M.J.; Canker and “die back” of *Eucalyptus* in South Africa caused by *Botryosphaeria dothidea*. **Plant Pathology**, v. 43, n. 6, p. 1031-1034, 1994.

SMITH, H.; WINGFIELD, M.J.; CROUS, P.W.; COUTINHO, T.A. *Sphaeropsis sapinea* and *Botryosphaeria dothidea* endophytica in *Pinus* spp. and *Eucalyptus* spp. in South Africa. **South African Journal of Botany**, v. 62, n. 2, p. 86-88, 1996.

SOUZA, M.F.; KRÜGNER, T.L. Ocorrência de *Botryosphaeria ribis* e *Colletotrichum* sp. associados a brotações em jardim clonal e a podridão de estacas de *Eucalyptus*. **III simpósio de Iniciação Científica da Universidade de São Paulo**, p. 400, Novembro 1995.

TAKAHASHI, S.S.; FURTADO, E.L.; CAMARGO, F.R.A.; RAMIRO, G.A. Controle das principais doenças que ocorrem em estacas de *Eucalyptus* spp. na fase de enraizamento. **In: XXI Congresso Paulista de Fitopatologia, Faculdade de Ciências Agrônomicas, Botucatu, 1998. Anais. Botucatu, 1998. p. 121.**

TAKAHASHI, S.S.; FURTADO, E.L. Avaliação da sensibilidade “in vitro” dos principais patógenos que ocorrem em viveiros de *Eucalyptus* spp. a diferentes doses e formulações de Fegatex. **In: XXI Congresso Paulista de Fitopatologia, Faculdade de Ciências Agrônomicas, Botucatu, 1998. Anais. Botucatu, 1998. p. 122.**

VITTI, A.N.; KRÜGNER, T.L.; VIEIRA, J.D. Etiologia da podridão de estacas de *Eucalyptus* spp. em casa de vegetação. **Fitopatologia Brasileira**, v. 14, n. 2, p. 116, 1989 (Resumo).