

**FITOTOXINAS DE *Fusarium solani***  
**ASSOCIADAS A LIMÃO CRAVO COM**  
**SINTOMAS DE MORTE SÚBITA DOS CITROS**

**JULIANO DOS SANTOS**

**2009**

**JULIANO DOS SANTOS**

**FITOTOXINAS DE *Fusarium solani* ASSOCIADAS A LIMÃO CRAVO  
COM SINTOMAS DE MORTE SÚBITA DOS CITROS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, para a obtenção do título de "Doutor".

Orientador

Prof. Dr. Ludwig H. Pfenning

LAVRAS  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2009

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da  
Biblioteca Central da UFLA**

Santos, Juliano dos.

Fitotoxinas de *Fusarium solani* associadas a limão Cravo com sintomas de morte súbita dos citros / Juliano dos Santos. – Lavras : UFLA, 2009.

53 p. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2009.

Orientador: Ludwig H. Pfenning.

Bibliografia.

1. *Haematonectria*. 2. Doença de planta. 3. Etiologia. 4. Fitotoxinas. 5. Naftazarinas. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 634.334943

**JULIANO DOS SANTOS**

**FITOTOXINAS DE *Fusarium solani* ASSOCIADAS A LIMÃO CRAVO  
COM SINTOMAS DE MORTE SÚBITA DOS CITROS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, para a obtenção do título de "Doutor".

APROVADA em 24 de junho de 2009.

Prof. Dr. Mário Lúcio Vilela Resende	UFLA
Prof. Dr. Eduardo Alves	UFLA
Prof. Dr. Mário Cesar Guerreiro	UFLA
Dr. Marcos Antônio Machado	IAC

Prof. Dr. Ludwig H. Pfenning

UFLA

(Orientador)

LAVRAS

MINAS GERAIS - BRASIL

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Fitopatologia, pela oportunidade da realização do Doutorado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pela concessão da bolsa de estudos.

Aos membros da banca examinadora, Dr. Marcos Antonio Machado, Prof. Dr. Mário Cesar Guerreiro, Prof. Dr. Mário Lúcio V. Resende e Prof. Dr. Eduardo Alves, pelas valiosas sugestões.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Sistemática e Ecologia de Fungos, cujos nomes não me arriscarei em citar para evitar esquecimentos, mas todos os que fazem e já fizeram parte da equipe foram muito importantes nestes três anos, por todo o auxílio dedicado, pela amizade e boa convivência.

Ao Professor Ludwig Pfenning, pela orientação e incentivo a prosseguir sempre, e cujos ensinamentos me acompanharão pelo resto da minha vida profissional.

Ao Prof. Renê Luís de Oliveira Rigitano, pelas análises de cromatografia de camada delgada e pelas sugestões oferecidas.

Às equipes dos laboratórios de Fisiologia do Parasitismo (DFP), Bioquímica e Biologia Molecular de Plantas (DBI) e Centro de Análise e Prospecção Química (DQI), pela colaboração e por nos abrirem suas portas para a realização deste trabalho.

Ao Centro de Citricultura Sylvio Moreira, IAC, em especial ao Dr. Marcos A. Machado, pelo incentivo para o desenvolvimento deste projeto e pela ajuda na realização deste trabalho.

A Fischer Agropecuária S/A, por ceder o material vegetal estudado, em especial a Helton Leão e a todos os funcionários que colaboraram nas coletas.

Aos colegas e professores do Departamento de Fitopatologia, aos amigos da UFLA, do Fitopatorracha e a toda a colônia gaúcha em Lavras, em especial a Carla, ao Eder, a Mirella e a Vanessa, pelos momentos agradáveis que passamos juntos.

Aos meus pais, Luis Antonio e Maria Helena, por tudo o que já fizeram por mim, por todas as lições que não podem ser encontradas em livros; a minha irmã Luciana, meus avos e demais familiares, por compreenderem a distância e a minha ausência durante este período.

A minha amada esposa, Ilisandra, que sempre me incentivou a seguir em frente e a quem devo, em grande parte, esta conquista, agradeço pelo companheirismo, dedicação e por toda a ajuda oferecida na parte prática e intelectual, o que foi muito importante para a realização deste trabalho.

A Deus, pelas bênçãos maravilhosas em minha vida.

## **BIOGRAFIA**

Juliano dos Santos nasceu em Palmeira das Missões, RS, em 17 de outubro de 1980. Filho de Luis Antonio e Maria Helena dos Santos, estudou na Escola Pio X, em sua cidade natal e concluiu o ensino médio no Colégio Gonzaga, em Pelotas, no ano de 1997. Em 1998 ingressou no curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pelotas, onde se graduou bacharel e licenciado no ano de 2002. Pela mesma universidade, obteve o título de mestre em Fitossanidade em 2006. No mesmo ano, ingressou no doutorado em Agronomia/Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras, MG, encerrando esta etapa profissional com a defesa da presente tese.

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
LISTA DE TABELAS.....	i
LISTA DE FIGURAS.....	ii
RESUMO.....	iii
ABSTRACT.....	iv
CAPÍTULO 1: Citros, morte súbita e <i>Fusarium solani</i> .....	01
1 Introdução Geral.....	02
2 Referencial Teórico.....	04
3 Referências .....	12
CAPÍTULO 2: Fitotoxinas de <i>Fusarium solani</i> associadas a limão Cravo com sintomas de morte súbita dos citros.....	17
Resumo.....	18
Abstract.....	19
1 Introdução .....	20
2 Material e Métodos.....	22
2.1 Isolamento e caracterização morfológica de <i>Fusarium solani</i> .....	22
2.2 Produção de filtrados de <i>F. solani</i> .....	23
2.3 Efeito tóxico de filtrados de <i>F. solani</i> na germinação de sementes de alface.....	24
2.4 Efeito tóxico de filtrados de <i>F. solani</i> em folhas e ramos destacados de limão Cravo.....	25
2.5 Detecção e quantificação de naftazarinas nos filtrados de <i>F. solani</i> .....	26
2.6 Detecção e quantificação de naftazarinas em plantas de citros .....	26
2.7 Efeito tóxico de filtrados de <i>F. solani</i> em plantas de limão Cravo em sistema hidropônico .....	27



3 Resultados.....	31
3.1 Frequência e caracterização de isolados de <i>F. solani</i> .....	31
3.2 Efeito tóxico de filtrados de <i>F. solani</i> .....	32
3.3 Detecção e quantificação de naftazarinas nos filtrados de <i>F. solani</i> .....	33
3.4 Detecção e quantificação de naftazarinas em plantas de citros .....	36
3.5 Efeito tóxico de filtrados de <i>F. solani</i> em plantas de limão Cravo em sistema hidropônico .....	37
4 Discussão.....	41
5 Referências.....	48
CONCLUSÕES GERAIS.....	52
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	53

## LISTA DE TABELAS

	<b>Página</b>
TABELA 1 Isolados de <i>Fusarium solani</i> utilizados neste estudo.....	29
TABELA 2 Efeito de filtrados de <i>Fusarium solani</i> (CML 1152) cultivado em meio Czapek-Dox líquido a 25°C sob diferentes condições de luminosidade e agitação sobre ramos destacados de limão Cravo.....	34
TABELA 3 Efeito tóxico de filtrados de <i>Fusarium solani</i> com 14 dias de cultivo em meio Czapek-Dox e quantificação de naftoquinonas.....	35
TABELA 4 Espectrofotometria dos filtrados antes e após a purificação de naftazarinas por Cromatografia de Camada Delgada (TLC).....	36

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Página</b>
FIGURA 1 Frequência (%) de <i>Fusarium solani</i> em solo rizosférico, raízes e radículas de plantas de citros com e sem sintomas de morte súbita em áreas afetadas pela doença e de plantas sadias em áreas não afetadas .....	32
FIGURA 2 Concentração de naftazarinas ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) presentes no sistema vascular de plantas de citros com diferentes níveis de sintoma de morte súbita.....	37
FIGURA 4 Efeito de filtrados de <i>Fusarium solani</i> em plantas de Limão Cravo após 60 dias em sistema hidropônico.....	38
FIGURA 5 Efeito de filtrados de <i>Fusarium solani</i> em plantas de Limão Cravo após 60 dias em sistema hidropônico.....	39
FIGURA 6 Toxicidade de filtrados de <i>Fusarium solani</i> em folhas e ramos destacados de limão Cravo, plântulas de alface e plantas de limão Cravo em sistema hidropônico .....	40

## RESUMO

SANTOS, Juliano dos. **Fitotoxinas de *Fusarium solani* associadas a limão Cravo com sintomas de morte súbita dos citros**. 2009. 53 p. Tese (Doutorado em Agronomia/Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG. \*

A morte súbita dos citros (MSC) é uma doença associada ao porta-enxerto de citros, que afeta principalmente o limão Cravo (*Citrus limonia*) e limão Volkamerino (*Citrus volkameriana*). Com sintomatologia semelhante à tristeza, a doença é restrita à região Norte do Estado de São Paulo e ao triângulo mineiro. Apesar de sua importância econômica, a etiologia ainda não é esclarecida. No sistema radicular de plantas com MSC é possível observar a colonização de fungos como *Fusarium solani*. O objetivo deste estudo foi verificar o envolvimento de fitotoxinas produzidas por fungos do complexo *F. solani* (FSSC) na produção de sintomas da MSC. Fungos do FSSC associados a raízes de porta-enxertos de citros aparentemente saudáveis e com sintomas de MSC foram isolados e seus marcadores morfológicos determinados. Isolados selecionados com base na morfologia e produção de pigmentos solúveis foram cultivados em meio Czapek-Dox líquido e filtrados a vácuo. Os filtrados demonstraram efeito fitotóxico em bioensaios com sementes de alface, folhas e ramos destacados de limão Cravo. Filtrados foram purificados por TLC e submetidos a espectrofotometria a 304 nm para verificar a possível produção de naftazarinas, pigmentos tóxicos que absorvem a este comprimento de onda. O filtrado do isolado CML 1152 apresentou 13,7 µg.mL<sup>-1</sup> de naftazarinas. Filtrados supostamente produtores de naftazarinas aplicados em plantas de limão Cravo em sistema hidropônico causaram redução no crescimento, murcha, seca e queda de folhas. Fluidos dos vasos condutores de plantas de citros foram extraídos, purificados por TLC e submetidos a espectrofotometria. Nas raízes a quantidade de naftazarinas não diferiu significativamente entre plantas aparentemente saudáveis e plantas com sintomas. No caule a quantidade foi menor em plantas assintomáticas e aumentou até níveis intermediários da doença. Os resultados aqui apresentados fornecem evidências para embasar a hipótese do envolvimento das toxinas de *F. solani* no quadro de síndrome da morte súbita dos citros.

Palavras-chave: *Haematonectria*, doença de planta, etiologia, fitotoxinas, naftazarinas.

---

\* Comitê Orientador: Ludwig H. Pfenning – UFLA (orientador), Mário Lucio Vilela de Resende – UFLA.

## ABSTRACT

SANTOS, Juliano dos. ***Fusarium solani* phytotoxins associated with Rangpur lime showing citrus sudden death symptoms.** 2009. 53p. Thesis (Doctorate in Agronomy/Plant Pathology) - Federal University of Lavras, Lavras, MG.<sup>1</sup>

Citrus sudden death (CSD) is a plant disease associated with rootstock, which especially affects *Citrus limonia* (Rangpur lime) and *Citrus volkameriana* (Volkamerino lemon). With a symptomatology similar to tristeza disease, it is limited to northern São Paulo State and Western Minas Gerais State. Despite its economic importance, its etiology has not yet been elucidated. In the root system of a CSD symptomatic tree it is possible to observe colonization with *Fusarium solani*. The objective of this study was to verify if phytotoxins produced by isolates of the *Fusarium solani* species complex (FSSC) could play a role in the development of typical symptoms of CDS. Root-associated FSSC isolates were obtained from both apparently healthy and diseased plants and their morphological markers determined. Based on morphology and capacity for production of soluble pigments, selected isolates were cultivated on liquid Czapek-Dox culture medium and then filtered by vacuum. Culture filtrates showed toxicity in biotests to lettuce seeds, as well as to *Citrus limonia* twig cuts and leaves. Filtrates were also purified through TLC and submitted to spectrophotometry at 304 nm, to verify production of naphthazarins, which are phytotoxic pigments with absorbance at this wavelength. Culture filtrate of isolate CML 1152 showed the presence of 13.7  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  naphthazarins. Plants of Rangpur lime were exposed to culture filtrates of putative naphthazarin producers in hydroponic culture, where growth reduction, wilt, drying and leaf fall could be observed. Xylem fluids were extracted, purified through TLC and submitted to spectrophotometry. In roots, naphthazarin contents from diseased and apparently healthy plants were similar. In the shoot, these toxin contents were lower in asymptomatic plants and increased up to intermediate disease symptom stages. Methods tested on this survey could efficiently evaluate the toxic effect of *F. solani* culture filtrates on citrus plants, especially in the hydroponic system, which could be recommended for use in other systems involving phytotoxins. The results obtained give enough evidence to hypothesize the participation of *F. solani*-produced naphthazarins in the development of citrus sudden death syndrome.

Key-Words: *Haematonectria*, plant disease, etiology, phytotoxins, naphthazarins.

---

<sup>1</sup> Guidance Committee: Ludwig H. Pfenning – UFLA (Adviser), Mario Lucio Vilela de Resende - UFLA.

## **CAPÍTULO 1**

### **CITROS, MORTE SÚBITA E *Fusarium solani***

## 1 INTRODUÇÃO

A morte súbita dos citros (MSC), uma nova e destrutiva doença identificada em 2001, no município de Comendador Gomes (MG), encontra-se hoje disseminada por municípios do sul do Triângulo Mineiro e no norte e noroeste do estado de São Paulo. A doença causa o definhamento de plantas de citros enxertadas em limão Cravo (*Citrus limonia* Osb.) e representa uma ameaça potencial à citricultura nacional. São afetadas todas as variedades comerciais de laranja doce e tangerinas cravo e poncan enxertadas sobre o limão Cravo, que representam cerca de 85% dos pomares paulistas e mineiros.

Estudos epidemiológicos forneceram indícios de que se trata de uma doença de origem biótica (Bassanezi et al., 2003; Jesus Junior & Bassanezi, 2004). Desde então, esforços têm sido feitos na tentativa de se elucidar seu agente etiológico. O padrão de distribuição da doença no campo fez com que pesquisadores suspeitassem que o agente fosse uma variante do *Citrus tristeza virus* (CTV). Em 2005, um novo vírus foi relatado em plantas afetadas pela MSC, denominado *citrus sudden death-associated virus* (CSDaV) (Maccheroni et al., 2005). Porém, até o momento, hipóteses que levam à possibilidade de se tratar de um vírus não foram respondidas com êxito, já que sintomas da doença não foram reproduzidos inoculando-se esses organismos em plantas sadias.

Estudos preliminares sobre fungos associados a raízes e solo rizosférico de plantas de citros com e sem sintomas de morte súbita evidenciaram a presença constante de fungos do complexo *Fusarium solani* (Pfenning et al., 2006). Em países como a África do Sul e os Estados Unidos, uma síndrome semelhante à morte súbita foi alvo de intensivos estudos durante as últimas décadas. Estes estudos evidenciaram a participação de fungos do tipo *Fusarium solani* no desenvolvimento dos sintomas em plantas de citros por meio da produção de fitotoxinas do grupo naftarazinas.

Considerando-se que a MSC ainda não tem agente etiológico conhecido, que fungos do complexo *F. solani* são habitantes frequentes de solos de pomares de citros e que estes fungos produzem toxinas capazes de causar sintomas em plantas de citros nos Estados Unidos e na África do Sul, este trabalho foi realizado com o objetivo principal de comprovar a participação das toxinas de *F. solani* como um dos fatores de virulência ligados ao desenvolvimento dos sintomas da morte súbita dos citros.



## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 A citricultura no Brasil

Citros compreendem um conjunto de laranjeiras doces e azedas, limoeiros, tangerineiras, pomeleiros, etc., pertencentes aos gêneros *Citrus*, *Poncirus* e *Fortunella*, família Rutaceae, originárias de regiões tropicais do continente asiático, entre a Índia e o sudeste do Himalaia. Os citros podem ser propagados por sementes, porém, esta propagação restringe-se a porta-enxertos devido à ocorrência de juvenilidade. A enxertia por borbulhas consiste no sistema de propagação predominante para os citros, por apresentar uniformidade na produção e na qualidade dos frutos, precocidade na produção, maior facilidade na colheita e nos tratos culturais (Medina et al., 2008).

A citricultura merece importante destaque dentre as atividades agrícolas do Brasil, devido ao volume de produção e à renda gerada ao país. A citricultura brasileira é a maior do mundo em número de plantas e em importância econômica, envolvendo milhares de empregos diretos e indiretos. A cadeia produtiva movimenta mais de US\$ 5 bilhões por ano. Entretanto, a citricultura é bastante vulnerável à ocorrência de epidemias, devido a alguns fatores importantes, tais como: baixa diversidade genética de variedades, baixa diversidade de porta-enxertos, continuidade temporal de plantas cítricas e continuidade espacial dos pomares (Zambolim & Bassanezi, 2006).

Limão Cravo (*Citrus limonia* Osb.) é considerado o principal porta-enxerto da citricultura brasileira, devido à sua característica de tolerância à seca, já que a maior parte dos plantios feitos no Brasil não é irrigada, dependendo exclusivamente do regime pluviométrico, além de outras características consideradas positivas para a sua utilização, como tolerância ao vírus da tristeza. Porém, não é tolerante a nematoides e é suscetível à gomose. Para a morte súbita dos citros, doença de fundamental importância em nossa citricultura, esse porta-

enxerto é considerado altamente suscetível, sendo, na prática, sua maior limitação. É um porta-enxerto utilizado em grande extensão apenas na citricultura brasileira, tendo espécies similares quanto ao seu comportamento na Flórida, como o limão rugoso (Pozzan, 2006).

## **2.2 Morte súbita dos citros**

A citricultura brasileira ressenete-se de vários problemas de ordem fitossanitária, muitas vezes relacionados à qualidade da muda, os quais afetam a produtividade e a longevidade dos pomares. Dentre esses vários problemas, estão incluídos gomose de *Phytophthora*, clorose variegada dos citros, declínio dos citros e morte súbita dos citros, uma doença de etiologia desconhecida (Medina et al., 2008).

A morte súbita dos citros (MSC), observada na região sul do Triângulo Mineiro e norte do estado de São Paulo desde 1999 e descrita pela primeira vez no início de 2001, no município de Comendador Gomes, MG (Gimenes-Fernandes & Bassanezi, 2001; Müller et al., 2002), é uma doença cujo agente etiológico ainda é desconhecido (Müller et al., 2002; Libanore et al., 2002; Yamamoto et al., 2003; Jesus Junior et al., 2004).

A denominação morte súbita dos citros foi atribuída à doença porque todo o quadro sintomatológico pode ocorrer rapidamente, dependendo da época do ano e da variedade (Centro de Citricultura Sylvio Moreira, 2001). Essa rapidez é maior na primavera e em variedades tardias, como ‘Valência’ e ‘Natal’ (Zambolim & Bassanezi, 2006). Por afetar pomares de laranjeiras doces das variedades ‘Hamlim’, ‘Pêra’, ‘Valência’ e ‘Natal’ enxertadas sobre limão ‘Cravo’, que representam 85% das plantas no estado de São Paulo (Bassanezi et al., 2003), a MSC representa séria ameaça à citricultura brasileira.

As plantas afetadas pela MSC apresentam sintomas de definhamento generalizado. Inicialmente, toda a copa da planta afetada apresenta folhas sem

brilho e de coloração verde pálida, poucas brotações, ausência de brotações internas e queda de folhas. O sistema radicular apresenta poucas radículas e grande quantidade de raízes podres e mortas. Os tecidos internos da casca do porta-enxerto abaixo da região da enxertia apresentam coloração amarelada a alaranjada, contrastando com a coloração creme dos tecidos da casca da copa (Gimenes-Fernandes & Bassanezi, 2001). Estes tecidos do porta-enxerto abaixo da zona de enxertia apresentam colapso e degradação dos tubos crivados, superprodução e degradação do floema, ocorrendo acúmulo de floema não funcional e invasão do córtex pelo floema velho e não funcional (Román et al., 2004; Bassanezi et al., 2005).

Quando ocorre acentuado desequilíbrio entre a demanda de água e sais minerais pela copa e o suprimento fornecido pelo sistema radicular, comum em plantas com alta carga de frutos, a planta entra em colapso e o quadro de morte súbita é observado em poucas semanas após o aparecimento dos primeiros sintomas. Entretanto, na maioria dos casos, ocorre o declínio gradual das plantas por até alguns anos, durante os quais são alternados períodos de declínio com períodos de recuperação até que seja atingido um estado de equilíbrio entre a copa e o sistema radicular. Neste caso, as plantas afetadas se mantêm vivas por mais tempo, porém, são pouco produtivas (Bassanezi et al., 2003).

O tempo transcorrido entre o aparecimento dos primeiros sintomas visíveis na planta e a sua morte varia de algumas semanas a mais de 12 meses, dependendo da época do ano e da variedade. Na época de florescimento e no início do período chuvoso, os sintomas aparecem com mais intensidade. O número de árvores sintomáticas na área onde a doença foi inicialmente observada aumentou de 500, em 1999, para mais de quatro milhões em fevereiro de 2006, causando preocupação na indústria cítrica brasileira (Bassanezi et al., 2003; Fundo de Defesa da Citricultura, FUNDECITRUS, 2007). Com o aparecimento da morte súbita dos citros (MSC), a diversificação de porta-

enxertos, o adensamento de plantio, a irrigação e o melhor preparo de solo estão sendo revistos. A subenxertia tem sido utilizada como uma das estratégias de prevenção da MSC. No entanto, sua eficiência depende da idade da planta, da qualidade e do número de subenxertos por planta (Centro de Citricultura Sylvio Moreira, 2004).

Como alterações no sistema vascular da plantas são características da morte súbita, buscas por bactérias e fitoplasmas que colonizam os vasos da planta foram realizadas, porém, sem sucesso (Müller et al., 2002; Zambolim & Bassanezi, 2006). Fatores abióticos, como alta temperatura, estresse nutricional ou químico, por acúmulo de compostos nocivos ou, ainda, estresse hídrico direto, devem ser vistos como fatores capazes de acelerar e/ou induzir os sintomas da doença, considerando os principais locais de sua ocorrência. Mas, o fato de esses fatores de estresse serem comuns a todas as combinações copa/porta-enxertos na região, não estando restritos somente às combinações em limão 'Cravo', enfraquece as hipóteses da origem abiótica da MSC (Müller et al., 2002).

Estudos epidemiológicos e a comparação dos dados sobre a distribuição espacial e a análise de focos com modelos já conhecidos permitiram que pesquisadores sugerissem um agente biótico na etiologia da morte súbita, o qual poderia ser uma variante do *citrus tristeza virus* (CTV) (Bassanezi et al., 2003; Jesus Junior & Bassanezi, 2004). A constatação da transmissibilidade por enxertia do amarelecimento interno da casca do porta-enxerto reforçou a hipótese do envolvimento de algum agente viral na etiologia da morte súbita (Roman et al., 2004), porém, os demais sintomas da doença, incluindo a morte da planta, ainda não foram relatados em experimentos utilizando esta técnica. Maccheroni et al. (2005) chegaram a identificar um novo vírus associado a plantas com morte súbita, denominado CSDaV (*citrus sudden death associated virus*), mas os sintomas típicos da doença não foram reproduzidos por meio da

inoculação deste vírus em plantas saudáveis, não completando, assim, os postulados de Koch, fato necessário para se comprovar o papel do organismo como agente causador da doença. Dessa forma, até o momento, não há nenhum patógeno comprovadamente envolvido com a sintomatologia da MSC (Zambolim & Bassanezi, 2006).

### **2.3 *Fusarium solani* Species Complex**

*Fusarium solani* é uma espécie morfológica, ou seja, a determinação é baseada apenas em caracteres morfológicos de conídios e da colônia. Nos últimos anos, ficou evidente que se trata de um grupo de diversas espécies biológicas e filogenéticas, denominado atualmente *Fusarium solani species complex* - FSSC (O'Donnell, 2000). Estes fungos são cosmopolitas, encontrados em uma ampla gama de substratos. São regularmente isolados de solos nos mais diversos ambientes e considerados patógenos de muitas espécies de plantas cultivadas (Leslie & Summerell, 2006).

Em citros, *F. solani* é considerado patógeno oportunista, causando sintomas de podridão nas raízes e cancos em troncos e ramos (Nemec et al., 1989; Strauss & Labuschagne, 1995), mas pode ser consistentemente isolado da rizosfera e raízes de plantas com sintomas de declínio dos citros (Janse van Rensburg & Labuschagne, 1996). Inicialmente, os sintomas de podridão consistem em uma área escura na casca que, eventualmente, poderá adquirir uma aparência seca, rachada. A madeira abaixo desta lesão estará seca e com uma mancha castanho-cinzenta, podendo tornar-se ligeiramente púrpura. A doença pode progredir por muitos anos, apresentando apenas um sintoma de murcha leve em condições de seca. Porém, esta doença pode alcançar a fase de morte súbita quando ocorrem repentinas murchas nas folhas, causando amarelecimento e rápida morte da árvore. Este fenômeno é observado frequentemente em plantas de citros sob condições de stress (Labuschagne et al., 1996).

#### **2.4 *Fusarium solani* e fitotoxinas**

Fitotoxinas são amplamente representadas por metabólitos secundários de baixo peso molecular capazes de desorganizar a atividade vital de células vegetais ou causar a sua morte a baixas concentrações. Fitotoxinas são produzidas por diversos organismos (bactérias, plantas e alguns insetos fitófagos), no entanto, são os fungos, particularmente os fitopatogênicos, os principais produtores de fitotoxinas (Berestetskiy, 2008). São produtos de patógenos microbianos que causam danos aos tecidos vegetais e que estão reconhecidamente envolvidos no desenvolvimento da doença, sendo importantes no estabelecimento do patógeno no interior do hospedeiro e na manifestação dos sintomas (Pascholati et al., 1998).

Fitotoxinas podem ser classificadas de acordo com a seletividade ao hospedeiro em fitotoxinas seletivas ou específicas e fitotoxinas não seletivas ou não específicas. Fitotoxinas seletivas mostram-se tóxicas, em concentrações fisiológicas, somente às espécies de plantas ou de cultivares que servem de hospedeiros do microrganismo produtor. Fitotoxinas não seletivas mostram-se tóxicas a várias espécies de plantas, independentemente das mesmas serem ou não hospedeiras do microrganismo toxigênico (Pascholati et al., 1998). São consideradas como fatores de virulência ou determinantes secundários de patogenicidade, pois contribuem apenas para a severidade da doença, não sendo essenciais para a produção da mesma (Knogge, 1996).

Sob determinadas condições, fungos do FSSC podem produzir um grande número de naftoquinonas, substâncias tóxicas a plantas com características de pigmentos (Baker et al., 1981; Baker & Tatum, 1983). Estes pigmentos são chamados naftazarinas e podem exercer importante papel na sintomatologia de plantas de citros infectadas por *F. solani* (Janse van Rensburg & Labushagne, 2001). Naftazarinas, tais como as isomarticanas e as fusarubinas,

podem causar sintomas característicos, como clorose das nervuras, murcha de folhas e entupimento dos vasos (Nemec et al., 1988). Existem relatos de pelo menos onze tipos de naftazarinas produzidas por isolados de *F. solani* (Nemec, 1995).

## **2.5 *Fusarium solani* e citros**

Fungos do complexo *Fusarium solani* são habitantes comuns de solos de pomares de citros. Estes fungos são associados a uma doença denominada *dry root rot* ou *sudden death*, cujos sintomas iniciais são caracterizados por uma área escura na casca das raízes que podem, eventualmente, ter uma aparência ressecada e rachada. A doença pode progredir por muitos anos com os mesmos sintomas, produzindo apenas leve murcha sob condições de estresse hídrico. Porém, quando a planta é submetida a condições de estresse severo, tais como alagamentos, baixa aeração do solo, excesso de fertilizantes nitrogenados, depleção de amido nas raízes, dentre outros, a doença pode progredir para o estágio de morte súbita, no qual as folhas murcham e amarelecem repentinamente e as plantas rapidamente morrem (Labuschagne et al., 1996; Timmer et al., 2003).

Embora *F. solani* não seja considerado um patógeno vascular, ele pode invadir o xilema do caule de sistemas radiculares inoculados (Nemec et al., 1989). Porém, a chave para a explicação dessa doença pode estar na produção das naftazarinas, metabólitos tóxicos a plantas que se deslocam para as folhas no fluxo de água, onde comprometem a fotossíntese (Tatum et al., 1985; Nemec et al., 1988; Nemec, 1995; Janse van Rensburg et al., 2001). A presença das fitotoxinas no sistema vascular de plantas de citros sugere que trocas de substâncias podem ocorrer, conduzindo estas toxinas do sítio de infecção até a parte aérea da planta (Brlanski et al., 1984; Nemec, 1995).

Outra síndrome que afeta a cultura dos citros, denominada *citrus blight*, que causa declínio de planta no campo, foi exaustivamente estudada nas últimas décadas. Muitos estudos foram dedicados à tentativa de se associar algum patógeno aos sintomas da doença, inclusive *Fusarium solani*. Estudos indicaram que raízes de plantas sintomáticas de *citrus blight* contêm até onze vezes mais naftazarinas que raízes de plantas saudáveis. A presença de baixos níveis das toxinas em raízes de plantas assintomáticas reforça a suspeita de que o patógeno poderia estar colonizando raízes de plantas aparentemente saudáveis, e que a produção poderia ser aumentada em condição de excesso de adubação ou translocada com maior intensidade para a parte aérea em condições de encharcamento (Baker & Tatum, 1983; Nemeček et al., 1986; Nemeček et al., 1988, Nemeček et al., 1989; Nemeček et al., 1991; Nemeček, 1995; Janse van Rensburg & Labuschagne, 1996).

Apesar de indícios de que fitotoxinas de *F. solani* podem contribuir na sintomatologia desta síndrome, estudos neste sentido não foram conclusivos e até o momento nenhum agente causal ainda foi confirmado (Baker et al., 1981; Lindbeck & Brlansky, 2000; Janse van Rensburg & Labushagne, 2001).



### 3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAKER, R. A.; TATUM, J. H. Naphtoquinone production by *Fusarium solani* from blighted citrus tree: quantity, incidence and toxicity. **Proceedings Florida State Horticulture Society**, Lake Alfred, v. 96, p. 53-55, Jun. 1983.

BAKER, R. A.; TATUM, J. H.; NEMEC, S. Toxin production by *Fusarium solani* from fibrous roots of blight diseased citrus. **Phytopathology**, St. Paul, v. 71, n. 9, p. 951-954, Sept. 1981.

BASSANEZI, R. B.; BERGAMIN FILHO, A.; AMORIM, L.; GIMENES-FERNANDES, N.; GOTTWALD, T. R.; BOVÉ, J. M. Spatial and temporal analyses of citrus sudden death as a tool to generate hypotheses concerning its etiology. **Phytopathology**, St. Paul, v. 93, n. 4, p. 502-512, Apr. 2003.

BASSANEZI, R. B.; BUSATO, L. A.; SANCHES, A. L.; BARBOSA, J. C. Danos da morte súbita dos citros sobre a produção de laranja. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 5, p. 497-503, set./out. 2005.

BERESTETSKIY, A. O. A review of fungal phytotoxins: from basic studies to practical use. **Applied Biochemistry and Microbiology**, Heidelberg, v. 44, n. 5, p. 453-465, Sept./Oct. 2008.

BRLANSKI, R. H.; TIMMER, L. W.; LEE, R. F.; GRAHAM, J. H. Relationship of xylem plugging to reduced water uptake and symptom development in citrus trees with blight and like declines. **Phytopathology**, St. Paul, v. 74, n. 11, p. 1325-1328, Nov. 1984.

CENTRO DE CITRICULTURA SYLVIO MOREIRA. Nova doença já causa prejuízos a pomares de SP e MG. **Informativo Centro de Citricultura**, Cordeirópolis v. 76, n. 10, p. 1-4, out. 2001.

CENTRO DE CITRICULTURA SYLVIO MOREIRA. Situação da sub-enxertia no controle da MSC. **Informativo Centro de Citricultura**, Cordeirópolis, v. 79, n. 108, p. 3, 2004.

FUNDO DE DEFESA DA CITRICULTURA. **Morte súbita dos citros.**  
Disponível em: < [http://www.fundecitrus.com.br/doencas/morte\\_subita.html](http://www.fundecitrus.com.br/doencas/morte_subita.html)>.  
Acesso em: 05 mar. 2007.

GIMENES-FERNANDES, N.; BASSANEZI, R. B. Doença desconhecida afeta pomares cítricos no norte de São Paulo e sul do Triângulo Mineiro. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 27, n. 1, p. 93, fev. 2001.

JANSE VAN RENSBURG, J. C.; LABUSCHAGNE, N. Effect of naphthazarin toxins produced by *Fusarium solani*, on three citrus rootstocks in a hidroponic system. In: INTERNATIONAL CITRUS CONGRESS, 9., 1996, Riverside. **Proceedings...** Riverside: International Society of Citriculture, 1996. v. 1, p. 427-430.

JANSE VAN RENSBURG, J. C.; LABUSCHAGNE, N.; NEMEC, S. Occurrence of *Fusarium* produced naphthazarin in citrus trees and sensitivity of rootstocks to isomarticin in relation to citrus blight. **Plant Pathology**, Oxford, v. 50, n. 2, p. 258-265, Apr. 2001.

JESUS JUNIOR, W. C.; BASSANEZI, R. B. Análise da dinâmica e estrutura de focos da morte súbita dos citros. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 4, p. 399-405, jul./ago. 2004.

JESUS JUNIOR, W. C.; BASSANEZI, R. B.; BERGAMIN FILHO, A. Morte súbita dos citros ainda tem origem desconhecida. **Visão Agrícola**, Piracicaba, v.1, n. 2, v. 2, p. 34-39, dez. 2004.

KNOGGE, W. Fungal infection of plants. **The Plant Cell**, Waterbury, v. 8, n. 10, p. 1711-1722, Oct. 1996.

LABUSCHAGNE, N.; JANSE VAN RENSBURG, J. C.; STRAUSS, J.; GRUNDLING, G. The role of *Fusarium solani* in citrus root disease an overview of 10 years of research in South Africa. In: INTERNATIONAL CITRUS CONGRESS, 9., 1996, Riverside. **Proceedings...** Riverside: International Society of Citriculture, 1996. v. 1, p. 431-434.

LESLIE, J. F.; SUMMERELL B. A. **The Fusarium laboratory manual.** Malden: Blackwell, 2006. 420 p.

LIBANORE, A. C.; MASSARI, C. A.; BASSANEZI, R. B.; YAMAMOTO, P. T.; GIMENES-FERNANDES, N.; AYRES, A. J. Levantamento da ocorrência da morte súbita dos citros no estado de São Paulo e sul do triângulo mineiro. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 28, p. 72, fev. 2002. Suplemento.

LINDBECK, A. G. C.; BRLANSKY, R. H. Cytology of fibrous roots from citrus blight- affected trees. **Plant Disease**, St. Paul, v. 84, n. 2, p. 164-167, Feb. 2000.

MACCHERONI, W.; ALEGRIA, M. C.; GREGGIO, C. C.; PIAZZA, J. P.; KAMLA, R. F.; ZACHARIAS, P. R. A.; BAR-JOSEPH, M.; KITAJIMA, E. W.; ASSUMPCÃO, L. C.; CAMAROTTE, G.; CARDOZO, J.; CASAGRANDE, E. C.; FERRARI, F.; FRANCO, S. F.; GIACHETTO, P. F.; GIRASOL, A.; JORDÃO, H.; SILVA, V. H. A.; SOUZA, L. C. A.; AGUILAR-VILDOSO, C. I.; ZANCA, A. S.; ARRUDA, P.; KITAJIMA, J. P.; REINACH, F. C.; FERRO, J. A.; SILVA, A. C. R. da. Citrus sudden death (CSD) is a new disease that has killed approximately 1 million orange trees in Brazil. **Journal of Virology**, Washington, v. 79, n. 5, p. 3028-3037, Mar. 2005.

MEDINA, C. L.; CASTRO, P. R. C.; KLUGE, R. A.; SESTARI, I. Citros. In: CASTRO, P. R. C.; KLUGE, R. A.; SESTARI, I. **Manual de fisiologia vegetal: fisiologia de cultivos**. Piracicaba: Agronômica Ceres, 2008. 864 p.

MÜLLER, G. W.; DE NEGRI, J. D.; AGUILAR-VILDOSO, C. I.; MATTOS JÚNIOR, D.; POMPEU JÚNIOR, J.; TEÓFILO SOBRINHO, J.; CARVALHO, S. A.; GIROTTO, L. F.; MACHADO, M. A. Morte súbita dos citros: uma nova doença na citricultura brasileira. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 23, n. 2, p. 371-386, jul./dez. 2002.

NEMEC, S.; ARCHOR, D. S.; ALBRIGO, L. G. Microscopy of *Fusarium solani* infected rough lemon citrus fibrous roots. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 64, n. 12, p. 2840-2847, Dec. 1986.

NEMEC, S.; BAKER, R. A.; TATUM, J. H. Toxicity of dihydrofusariubin and isomarticin from *Fusarium solani* to citrus seedlings. **Soil Biology and Biochemistry**, Amsterdam, v. 20, n. 4, p. 493-499, 1988.

NEMEC, S.; JABAJI-HARE, S.; CHAREST, P. M. Elisa and immunocytochemical detection of *Fusarium solani*- produced naphthazarin toxins in citrus trees in Florida. **Phytopathology**, St. Paul, v. 81, n. 12, p. 1497-1503, Dec. 1991.

NEMEC, S.; PHELPS, D.; BAKER, R. Effects of dihydrofusarubin and isomarticin from *Fusarium solani* on carbohydrate status and metabolism of rough lemon seedlings. **Phytopathology**, St. Paul, v. 79, n. 6, p. 700-705, June 1989.

NEMEC, S. Stress-related compounds in xylem fluid of blight-diseased citrus containing *Fusarium solani* naphthazarin toxins and their effects on the host. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 41, n. 6, p. 515-524, June 1995.

O'DONNELL, K. Molecular phylogeny of the *Nectria haematococca-Fusarium solani* species complex. **Mycologia**, Lawrence, v. 92, n. 5, p. 919-938, May 2000.

PASCHOLATI, S. F.; STANGARLIN, J. R.; LEITE, B.; SCWAN-ESTRADA, K. R. F. Mecanismos de patogenicidade em fungos. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 6, p. 1-47, 1998.

PFENNING, L. H.; PAULINO, M. S.; ALMEIDA, A. R.; LEÃO, H.; ZANINI, A.; MACHADO, M. A. Fungi associated with sudden death affected citrus plants. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, p. 217, ago. 2006. Suplemento.

POZZAN, M. **Porta-enxertos para a citricultura**. Disponível em: <<http://www.megaagro.com.br/frutas/enxerto.asp#cravo>>. Acesso em: 26 nov. 2006.

ROMÁN, M. P.; CAMBRA, M.; JUÁREZ, J.; MORENO, P.; DURAN-VILA, N.; TANAKA, F. A. O.; ALVES, E.; KITAJIMA, E. W.; YAMAMOTO, P. T.; BASSANEZI, R. B.; TEIXEIRA, D. C.; JESUS JUNIOR, W. C.; AYRES, A. J.; GIMENES-FERNANDES, N.; RABENSTEIN, F.; GIROTTO, L. F.; BOVÉ, J. M. Sudden death of citrus in Brazil: a graft-transmissible bud union disease. **Plant Disease**, St. Paul, v. 88, n. 5, p. 453-467, May 2004.

STRAUSS, J.; LABUSCHAGNE, N. Pathogenicity of *Fusarium solani* isolates on citrus roots and evaluation of different inoculum types. **Applied Plant Science**, Reston, v. 9, n. 1, p. 48-52, Jan. 1995.

TATUM, J. H.; BAKER, R. A.; BERRY, R. E. Three further naphthoquinones produced by *Fusarium solani*. **Phytochemistry**, Amsterdam, v. 24, n. 12, p. 3019-3021, Nov. 1985.

TIMMER, L. W.; GARNSEY, S. M.; BROADBENT, P. Diseases of citrus. In: PLOETZ, R. C. (Ed.). **Diseases of tropical fruit crops**. Homestead: CABI, 2003. 527 p.

YAMAMOTO, P. T.; BASSANEZI, R. B.; SPÓSITO, M. B.; BELASQUE JUNIOR, J. Combate à morte súbita. **Cultivar**, Pelotas, v. 20, n. 3, p. 14-16, jun. 2003.

ZAMBOLIM, L.; BASSANEZI, R. B. **Doenças quarentenárias dos citros**. Viçosa: UFV, 2006. 194 p.

## CAPÍTULO 2

### **FITOTOXINAS DE *Fusarium solani* ASSOCIADAS A LIMÃO CRAVO COM SINTOMAS DE MORTE SÚBITA DOS CITROS**

#### ***Fusarium solani* phytotoxins associated to Rangpur lime with citrus sudden death symptoms**

Juliano dos Santos<sup>1</sup>, Marcos A. Machado<sup>2</sup>, Dayana A. Botrel<sup>1</sup> & Ludwig H.  
Pfenning<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras, 37200-000, Lavras, MG, Brasil; <sup>2</sup>Instituto Agronômico de Campinas – IAC, Centro de Citricultura Sylvio Moreira, 13490-970, Cordeirópolis, SP, Brasil.

(artigo submetido à revista Tropical Plant Pathology – junho/2009)

## RESUMO

A morte súbita dos citros (MSC) é uma doença associada ao porta-enxerto de citros, que afeta principalmente o limão Cravo (*Citrus limonia*) e limão Volkamerino (*Citrus volkameriana*). Com sintomatologia semelhante à tristeza, a doença é restrita à região Norte do Estado de São Paulo e ao triângulo mineiro. Apesar de sua importância econômica, a etiologia ainda não é esclarecida. No sistema radicular de plantas com MSC é possível observar a colonização de fungos como *Fusarium solani*. O objetivo deste estudo foi verificar o envolvimento de fitotoxinas produzidas por fungos do complexo *F. solani* (FSSC) na produção de sintomas da MSC. Fungos do FSSC associados a raízes de porta-enxertos de citros aparentemente saudáveis e com sintomas de MSC foram isolados e seus marcadores morfológicos determinados. Isolados selecionados com base na morfologia e produção de pigmentos solúveis foram cultivados em meio Czapek-Dox líquido e filtrados a vácuo. Os filtrados demonstraram efeito fitotóxico em bioensaios com sementes de alface, folhas e ramos destacados de limão Cravo. Filtrados foram purificados por TLC e submetidos a espectrofotometria a 304 nm para verificar a possível produção de naftazarinas, pigmentos tóxicos que absorvem a este comprimento de onda. O filtrado do isolado CML 1152 apresentou 13,7 µg.mL<sup>-1</sup> de naftazarinas. Filtrados supostamente produtores de naftazarinas aplicados em plantas de limão Cravo em sistema hidropônico causaram redução no crescimento, murcha, seca e queda de folhas. Fluidos dos vasos condutores de plantas de citros foram extraídos, purificados por TLC e submetidos a espectrofotometria. Nas raízes a quantidade de naftazarinas não diferiu significativamente entre plantas aparentemente saudáveis e plantas com sintomas de MSC. No caule a quantidade destas substâncias foi menor em plantas assintomáticas e aumentou até níveis intermediários da doença. Os resultados aqui apresentados fornecem evidências para embasar a hipótese do envolvimento das toxinas de *F. solani* no quadro de síndrome da morte súbita dos citros. Os métodos testados neste trabalho mostraram-se eficientes na avaliação do efeito tóxico de filtrados de *F. solani* em citros, destacando-se o método através do cultivo em sistema hidropônico, cujos resultados permitem sugerir-lo para a utilização em outros patossistemas que envolvem fitotoxinas.

Palavras-chave: *Haematonectria*, doença de planta, etiologia, fitotoxinas, naftazarinas.

## ABSTRACT

Citrus sudden death (CSD) is a plant disease associated with rootstock, which especially affects *Citrus limonia* (Rangpur lime) and *Citrus volkameriana* (Volkamerino lemon). With a symptomatology similar to tristeza disease, it is limited to northern São Paulo State and Western Minas Gerais State. Despite its economic importance, its etiology has not yet been elucidated. In the root system of a CSD symptomatic tree it is possible to observe colonization with *Fusarium solani*. The objective of this study was to verify if phytotoxins produced by isolates of the *Fusarium solani* species complex (FSSC) could play a role in the development of typical symptoms of CDS. Root-associated FSSC isolates were obtained from both apparently healthy and diseased plants and their morphological markers determined. Based on morphology and capacity for production of soluble pigments, selected isolates were cultivated on liquid Czapek-Dox culture medium and then filtered by vacuum. Culture filtrates showed toxicity in biotests to lettuce seeds, as well as to *Citrus limonia* twig cuts and leaves. Filtrates were also purified through TLC and submitted to spectrophotometry at 304 nm, to verify production of naphthazarins, which are phytotoxic pigments with absorbance at this wavelength. Culture filtrate of isolate CML 1152 showed the presence of  $13.7 \mu\text{g.mL}^{-1}$  naphthazarins. Plants of Rangpur lime were exposed to culture filtrates of putative naphthazarin producers in hydroponic culture, where growth reduction, wilt, drying and leaf fall could be observed. Xylem fluids were extracted, purified through TLC and submitted to spectrophotometry. In roots, naphthazarin contents from diseased and apparently healthy plants were similar. In the shoot, these toxin contents were lower in asymptomatic plants and increased up to intermediate disease symptom stages. Methods tested on this survey could efficiently evaluate the toxic effect of *Fusarium solani* culture filtrates on citrus plants, especially in the hydroponic system, which could be recommended for use in other systems involving phytotoxins. The results obtained give enough evidence to hypothesize the participation of *F. solani*-produced naphthazarins in the development of citrus sudden death syndrome.

Keywords: *Haematonectria*, plant disease, etiology, phytotoxins, naphthazarins.



## 1 INTRODUÇÃO

A morte súbita dos citros (MSC) foi registrada, pela primeira vez, em 2001 e é hoje uma das doenças mais graves e destrutivas dos citros no Brasil. Embora seja restrita a alguns municípios do sul do Triângulo Mineiro e do norte do estado de São Paulo, foi responsável, nestas regiões, pelo declínio e a erradicação de milhões de árvores. A alta suscetibilidade de porta-enxertos normalmente tolerantes ao estresse hídrico, como limão Cravo e limão-volkameriano, tem obrigado a sua substituição por outros tolerantes à doença, porém, suscetíveis ao déficit hídrico, típico das regiões de ocorrência da doença. Isso tem aumentado a demanda por irrigação, representando aumento nos custos de produção (Gimenes-Fernandes & Bassanezi, 2001; Müller et al., 2002; Bassanezi et al., 2003).

Estudos epidemiológicos forneceram indícios de que se trata de uma doença de origem biótica e, desde então, tem se tentado elucidar seu agente etiológico (Bassanezi et al., 2003; Jesus Junior & Bassanezi, 2004). O padrão de distribuição da doença no campo forneceu indícios que o agente poderia ser o *citrus tristeza virus* (CTV). Em 2005, foi caracterizado um novo vírus, antes não associado a citros e que teria mostrado correlação entre sua ocorrência e os sintomas de MSC (Maccheroni et al., 2005). Embora alguns sintomas de MSC, particularmente o espessamento e o amarelecimento da região cambial, possam ser reproduzidos após enxertia com borbulhas provenientes de plantas doentes, ainda não foi possível confirmar a etiologia viral da doença.

Na África do Sul e nos Estados Unidos, síndrome com características semelhantes à MSC, denominada *dry root rot* ou *sudden death*, foi estudada, constatando-se a ocorrência de fungos do complexo *Fusarium solani* (FSSC) associados ao desenvolvimento dos sintomas. Estes fungos são habitantes naturais de solo, particularmente em novas áreas de plantio e podem, quando

associados a condições recorrentes de estresse hídrico, ocasionar podridões radiculares nas plantas. Porém, a chave para o desenvolvimento dos sintomas desta síndrome está na produção de substâncias do grupo das naftoquinonas, denominadas naftazarinas, que são tóxicas às plantas (Labuschagne et al., 1996; Janse van Rensburg et al., 2001).

Durante estes estudos, foi demonstrado que filtrados culturais de *F. solani* produzem efeito fitotóxico em citros cultivado em sistema hidropônico, causando sintomas de murcha, clorose e entupimento dos vasos condutores. Isolados de *F. solani* de citros na Flórida-EUA, em meio de cultura, produziram pelo menos onze naftazarinas estruturalmente relacionadas, o que permitiu inclusive o desenvolvimento de diagnóstico sorológico para a detecção das toxinas nas plantas. Normalmente, estas toxinas seriam produzidas por *F. solani* nas raízes sob condições de estresse e conduzidas até a parte aérea, onde desencadeariam os sintomas de murcha e queda de folhas (Tatum et al., 1985; Phelps et al., 1990; Nemeč et al., 1991; Janse van Rensburg et al., 1996).

Embora possam não ser os agentes da doença, fungos do complexo *Fusarium solani* poderiam atuar no desenvolvimento da síndrome da morte súbita dos citros. Fitotoxinas produzidas por fungos do FSSC poderiam ser um destes fatores. Dessa forma, o trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar a ocorrência e a frequência de fungos do complexo *Fusarium solani* (FSSC) associados a plantas de citros com e sem sintomas de morte súbita e avaliar o efeito fitotóxico de filtrados de culturas de *F. solani* em plantas de limão Cravo, sugerindo uma possível correlação entre fitotoxinas e a doença.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Isolamento e caracterização morfológica de *Fusarium solani*

Solo rizosférico, radículas e raízes de plantas de limão Cravo (*Citrus limonia* Osb.), assim como ramos da variedade copa (Valência, *C. sinensis* L. Osb.), com diferentes severidades de sintomas de MSC, foram coletados em Colômbia (SP) e em Comendador Gomes (MG). Como controle sem MSC, foram coletadas amostras no Centro de Citricultura Sylvio Moreira, em Cordeirópolis, SP. Os níveis de sintomas estabelecidos para este trabalho foram: a) nível 1, sintomas iniciais em plantas com as folhas da copa sem o brilho e sem a coloração verde-escura, característicos de uma planta sadia e amarelecimento interno da casca do porta-enxerto abaixo da zona de enxertia; b) nível 2, sintomas intermediários, desfolha parcial da planta e poucas brotações internas, além dos sintomas descritos para o nível inicial e c) nível 3, sintoma avançado ou terminal com plantas com desfolha severa, poucas radículas e grande quantidade de raízes podres e mortas.

Amostras de solo rizosférico foram submetidas a três lavagens sucessivas com água esterilizada, por 10 minutos, sob agitação a 180 rpm e, em seguida, passadas por peneiras com malhas em série decrescente de 1 a 0,2 mm. Foram utilizados os fragmentos retidos na última peneira. Raízes e radículas foram lavadas, desinfestadas superficialmente e cortadas em segmentos transversais, que foram plaqueados em meio de malte a 2% (MA2%) com 50 mg L<sup>-1</sup> de sulfato de streptomicina (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>) e 50 mg L<sup>-1</sup> de cloranfenicol (Vetec<sup>®</sup>). A taxa de colonização por *F. solani* foi calculada para cada tipo de material e para cada nível de sintoma, de acordo com a fórmula:

$$F = \frac{\text{Número de fragmentos com crescimento fúngico}}{\text{Numero total de fragmentos plaqueados}}$$

Colônias com características de *F. solani* foram identificadas e transferidas para novas placas com MA2%. Cultivos monospóricos desses isolados foram preservados em água destilada esterilizada e depositados na Coleção Micológica de Lavras (CML) (Tabela 1). Em meio BDA (batata dextrose ágar), após sete dias de incubação no escuro, a 25°C, foram avaliados taxa de crescimento micelial, pigmentação das colônias e formação do micélio aéreo. Em meio SNA (*spezieller naehrstoffarmer agar*), após 10 dias de incubação a 20°C, sob fotoperíodo de 12 horas, foram avaliadas as características micromorfológicas, como coloração de esporodóquio, tamanho, formato e septação de macro e microconídios, presença de clamidósporos, tipo de fiálides e ramificação de conidióforos.

## 2.2 Produção de filtrados de *F. solani*

Frascos com 100 mL de meio de cultura Czapek-Dox (CZ) líquido foram inoculados com 5 mL de suspensão de conídios de *F. solani* em água destilada esterilizada ajustada a  $10^5$  conídios mL<sup>-1</sup> e incubados por 14 dias no escuro, sem agitação e, em seguida, filtrados com Whatman<sup>®</sup> n° 1 e membranas Millipore<sup>®</sup> de 0,22 µm, respectivamente. Os filtrados foram armazenados no escuro a 4°C. Para avaliar o efeito da luz, da agitação e do tempo de incubação nos cultivos de *F. solani* em meio CZ, o isolado CML 1152, cuja atividade fitotóxica já era previamente conhecida, foi submetido a três diferentes tempos de cultivo (7, 14 e 21 dias), duas condições de luminosidade (fotoperíodo 12 horas e escuro contínuo) e dois tipos de incubação (estacionária e sob agitação contínua). Estes filtrados foram submetidos a testes em ramos destacados de

limão Cravo (*Citrus limonia* Osb.). Como controles foram utilizados meio CZ, água destilada esterilizada e solução padrão de naftazarina (1,4-dihidroxi-5,8-naftoquinona, Sigma-Aldrich®) a 10 µg.mL<sup>-1</sup>, diluída em CZ. O experimento foi realizado em esquema fatorial 3x2x2+3, em um delineamento inteiramente casualizado com três repetições.

### **2.3 Efeito tóxico de filtrados de *F. solani* na germinação de sementes de alface**

Testes de germinação de sementes de alface (*Lactuca sativa*) foram realizados com duas folhas de papel de germinação (10,5 x 10,5 cm), dispostas em caixas tipo Gerbox, embebidas com o filtrado a ser avaliado em quantidade igual a 2,5 vezes a sua massa e secas em câmara de fluxo laminar (Carvalho et al., 2006). Depois de secas e reumedecidas com água destilada esterilizada, 25 sementes foram dispostas uniformemente em cada caixa e incubadas a 25°C, sob fotoperíodo de 12 horas. Depois de três dias, foram avaliados: número de sementes não germinadas, plântulas saudáveis e plântulas com malformação da radícula e/ou da parte aérea. Controles negativos foram meio CZ filtrado e água destilada esterilizada. Os controles positivos foram soluções padrão de naftazarina a 5 e 10 µg.mL<sup>-1</sup>. O experimento foi conduzido com quatro repetições em delineamento inteiramente casualizado. Os resultados foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

## **2.4 Efeito tóxico de filtrados de *F. solani* em folhas e ramos destacados de limão Cravo**

Folhas destacadas de limão Cravo passaram por desinfestação superficial com álcool 70%, por 30 segundos, hipoclorito de sódio (NaClO) 2%, por 1 minuto, sendo, em seguida, lavadas com água destilada e secas ao ar. As injeções dos filtrados foram feitas com seringa em três pontos distintos da nervura central da folha e foram utilizadas três folhas para cada filtrado. Testemunhas foram folhas com aplicação de água destilada esterilizada, folhas com aplicação do meio de cultura CZ filtrado e folhas com o padrão de naftazarinas a 5, 10 e 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . As folhas foram incubadas em câmara úmida a  $\pm 25^\circ\text{C}$ . Duas avaliações foram realizadas, aos 7 e aos 14 dias após a aplicação, quando se avaliou a formação de mancha necrótica ao redor do ponto de aplicação do filtrado.

Testes de toxicidade dos filtrados a ramos jovens de limão Cravo com, aproximadamente, 15 cm e 6 folhas, foram realizados em vidros de penicilina com 5 mL de cada filtrado, de modo que a absorção deste filtrado ocorreu à medida que ocorreu a transpiração da planta. O sistema foi montado em delineamento inteiramente casualizado com três repetições por filtrado e avaliado após sete dias sob fotoperíodo de 12 horas, a  $25^\circ\text{C}$ . Os controles foram os mesmos utilizados no experimento com folhas destacadas. O experimento foi repetido três vezes. Para expressar os resultados, foi desenvolvida uma escala de severidade baseada em quatro diferentes níveis de efeito tóxico, em que se estabeleceu 1 = ausência de toxicidade, 2 = baixa toxicidade (murcha), 3 = toxicidade moderada (amarelecimento e murcha) e 4 = alta toxicidade (amarelecimento, seca e queda de folhas) (Figura 5). Os resultados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas utilizando-se o teste de Scott-Knott, a 5% de significância.

## **2.5 Detecção e quantificação de naftazarinas nos filtrados de *Fusarium solani***

Os filtrados aquosos de *F. solani* foram examinados por espectrofotometria a 304 nm, em leitor de microplacas PowerWave XS (BioTek®). A absorbância neste comprimento de onda foi comparada com uma curva-padrão preparada com uma sequência de diluições do padrão de naftazarinas em diferentes concentrações, já que todas as naftoquinonas identificadas de *F. solani* absorvem nesse comprimento de onda (Baker & Tatum, 1983). Como controle negativo utilizou-se meio de cultura CZ líquido, cujo efeito foi descontado nas leituras dos tratamentos.

A purificação das naftazarinas presentes nos filtrados foi realizada por cromatografia de camada delgada (TLC), conforme descrito por Baker et al. (1981). Para isso, os filtrados foram extraídos três vezes (V/V) com diclorometano, evaporados em evaporador rotativo, dissolvidos em acetona e fracionados por cromatografia em placas de sílica gel de 20x20 cm, utilizando-se hexano-acetona-ácido acético (150:50:4) como fase móvel. As bandas foram eluídas da sílica-gel com acetona. Os extratos recuperados em acetona foram secos em evaporador a vácuo, ressuspensos em água ultrapura até um volume de 10 mL e submetidos à espectrofotometria de UV-Vis a 304 nm. O controle negativo consistiu de água ultrapura.

## **2.6 Detecção e quantificação de naftazarinas em plantas de citros**

Fragmentos de raízes e caules de plantas de laranja ‘Valência’ sobre o porta-enxerto limão Cravo, coletados de plantas com sintomas de morte súbita, foram utilizados para a extração do fluído do xilema a partir da metodologia adaptada de Guimarães et al. (2003). Os segmentos, com 10 cm de comprimento e 1 a 2 cm de diâmetro, foram acoplados a um quitassato adaptado, acoplado a uma bomba de vácuo (600 mmHg); 10 mL de etanol absoluto foram passados

pelos vasos lenhosos de cada amostra. Uma parte do extrato foi diluída dez vezes. O material concentrado e o diluído foram imediatamente armazenados a -20°C, para posterior análise. O material extraído foi submetido à espectrofotometria e as naftazarinas purificadas por TLC. Os eluatos purificados foram submetidos à espectrofotometria de UV-Vis.

### **2.7 Efeito tóxico de filtrados de *F. solani* em plantas de limão Cravo em sistema hidropônico**

Isolados cujos filtrados apresentaram atividade fitotóxica e um isolado supostamente não produtor de toxina nos experimentos anteriores foram cultivados em meio CZ líquido por quatorze dias no escuro, sem agitação e filtrados como descrito. Os filtrados foram aplicados em plantas de limão Cravo saudáveis por meio de sistema hidropônico em vasos plásticos de 5 L com pintura metalizada.

Plantas foram obtidas de sementes germinadas em bandejas com substrato Plantmax<sup>®</sup>, sendo o experimento montado 30 dias após a germinação. Antes, porém, alguns fragmentos das raízes de cada planta foram retirados e plaqueados em MA2%, para verificar a possível presença de fungos do tipo *F. solani* nas plantas. Os filtrados foram misturados à solução nutritiva de Hoagland à meia concentração (25:1000) e o sistema mantido em casa de vegetação, por 60 dias, sob constante borbulhação (Janse van Rensburg & Labushagne, 1996). O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com cinco repetições de três plantas, tendo cada tratamento consistido de plantas submetidas a um filtrado de cada isolado de *F. solani*. Os controles foram plantas em solução nutritiva com meio CZ e plantas em solução nutritiva sem a adição de filtrado. Os controles positivos foram plantas em solução nutritiva com adição do padrão de naftazarinas, a 10 e 50 µg.mL<sup>-1</sup>. Foram analisados: tamanho da raiz e da parte aérea, número de folhas, massa



foliar e radicular fresca e seca. O experimento foi repetido duas vezes e a análises de variância e os testes de comparação de médias foram realizados com auxílio do programa Sisvar (Ferreira, 1998).

TABELA 1 Isolados de *Fusarium solani* utilizados neste estudo

Isolado <sup>1</sup>	Origem <sup>2</sup>	Hospedeiro	Nível de sintoma <sup>3</sup>	Morfotipo <sup>4</sup>	Pigmentação <sup>5</sup>
CML 1181	Bar-SP	Valência/Cravo	F1	2	s/p
CML 1182	CG-MG	Hamlin/Cravo	F1	1	Vermelho
CML 1137	Bar-SP	Valência/Cleópatra	ASS	3	s/p
CML 1138	CG-MG	Hamlin/Cravo	F3	1	s/p
CML 1183	Bar-SP	Valência/Swingle	ASS	1	Vermelho
CML 1139	Bar-SP	Valência/Cravo	F1	2	Rosa
CML 1184	CG-MG	Valência/Cleópatra	ASS	1	s/p
CML 1140	Bar-SP	Valência/Cravo	F3	2	s/p
CML 1141	CG-MG	Hamlin/Cravo	F1	2	s/p
CML 1142	Bar-SP	Valência/Cravo	F1	2	s/p
CML 1143	Bar-SP	Valência/Cravo	F1	1	s/p
CML 1144	Bar-SP	Valência/Cravo	F3	3	Marrom
CML 1145	Bar-SP	Valência/Cravo	F1	2	s/p
CML 1146	Bar-SP	Valência/Cravo	F3	2	s/p
CML 1147	Bar-SP	Valência/Cravo	F2	1	Marrom
CML 1148	CG-MG	Hamlin/Cravo	F1	1	s/p
CML 1149	Bar-SP	Valência/Cravo	F3	1	s/p
CML 1150	Bar-SP	Valência/Cravo	F1	2	s/p
CML 1185	Bar-SP	Valência/Cravo	F2	2	Marrom
CML 1151	CG-MG	Hamlin/Cravo	F1	2	s/p
CML 1152	Bar-SP	Valência/Cravo	F3	2	Vermelho
CML 1153	Bar-SP	Valência/Cravo	F3	3	s/p
CML 1154	Cor-SP	Valência/cravo	ASS	1	s/p
CML 1155	Bar-SP	Valência/Cravo	F2	1	s/p
CML 1156	Cor-SP	Valência/cravo	ASS	3	s/p
CML 1157	Cor-SP	Valência/cravo	ASS	1	s/p
CML 1158	Bar-SP	Valência/Cravo	F2	3	Marrom
CML 1186	Bar-SP	Valência/Cravo	F2	5	s/p
CML 1159	Bar-SP	Valência/Cravo	F3	5	s/p
CML 1187	CG-MG	Hamlin/Cravo	F1	3	Marrom
CML 1160	Bar-SP	Valência/Cravo	F1	3	s/p
CML 1785	Bar-SP	Valência/Cravo	F3	1	s/p
CML 1786	Bar-SP	Valência/Cravo	F1	3	s/p
CML 1787	Bar-SP	Valência/Cravo	F1	3	s/p
CML 1788	Bar-SP	Valência/Cravo	F1	1	s/p
CML 1789	Bar-SP	Valência/Cravo	F1	3	s/p
CML 1790	Bar-SP	Valência/Cravo	F2	2	s/p
CML 1791	Bar-SP	Valência/Cravo	F2	4	Marrom
CML 1792	Bar-SP	Valência/Cravo	F2	3	s/p
CML 1793	Bar-SP	Valência/Cravo	F2	4	s/p
CML 1794	Bar-SP	Valência/Cravo	ASS	1	s/p
CML 1795	Bar-SP	Valência/Cravo	ASS	2	s/p
CML 1796	Bar-SP	Valência/Cravo	ASS	3	s/p
CML 1797	Bar-SP	Valência/Cravo	ASS	4	s/p

...continua...

TABELA 1, Cont.

CML 1798	Bar-SP	Valência/Cravo	F2	2	Marrom
CML 1799	Bar-SP	Valência/Cravo	F2	2	Marrom
CML 1800	Bar-SP	Valência/Cravo	F2	3	s/p
CML 1801	Bar-SP	Valência/Cravo	F2	2	Vermelho
CML 1802	Bar-SP	Valência/Cravo	F3	4	Vermelho
CML 1803	Bar-SP	Valência/Cravo	F3	4	s/p
CML 1804	Bar-SP	Valência/Cravo	F3	3	Vermelho
CML 1805	Bar-SP	Valência/Cravo	F3	2	s/p
CML 1806	Bar-SP	Valência/Cravo	F3	3	s/p
CML 1807	Bar-SP	Valência/Cravo	F2	4	s/p
CML 1808	Lav-MG	Cravo	ASS	2	s/p
CML 1809	Lav-MG	Cravo	ASS	2	s/p

<sup>1</sup> CML - Coleção Micológica de Lavras.

<sup>2</sup> Origem: Bar-SP = Barretos/SP, CG-MG = Comendador Gomes/MG, Cor-SP = Cordeirópolis/SP, Lav-MG = Lavras/MG.

<sup>3</sup> Nível de sintoma da morte súbita dos citros: ASS – plantas assintomáticas (candidatas a sadia), F1 – sintomas iniciais da doença, F2 – sintomas intermediários da doença, F3 – sintomas avançados da doença (severa queda de folhas).

<sup>4</sup> Morfotipos: **1** - Conidióforos ramificados e clamidósporos lisos, **2** - Conidióforos simples e clamidósporos lisos, **3** - Conidióforos simples, clamidósporos lisos e rugosos, **4** - Conidióforos ramificados, clamidósporos lisos e rugosos, **5** - Conidióforos simples, clamidósporos ausentes, macroconídios ausentes, microconídios 0 e 1 septos apenas, tel. *Neocosmospora* sp.

<sup>5</sup> Pigmentação em meio BDA. s/p – sem pigmentação

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 Frequência e caracterização de isolados de *F. solani*

Isolados de *F. solani* foram obtidos de solo rizosférico, radículas e raízes de porta-enxertos de citros, inclusive de plantas assintomáticas sobre porta-enxertos tolerantes a MSC. A maior frequência de *F. solani* foi observada em radículas (49%) do que em raízes (37%) ou no solo rizosférico (32%). Não houve diferença na frequência de *F. solani* em plantas com sintomas típicos de MSC ou de plantas assintomáticas de áreas próximas, nem de plantas saudáveis de áreas não afetadas pela doença (Figura 1).

Os isolados apresentaram características típicas do FSSC, tais como: colônias com coloração branca a bege, monofíalides em conidióforos simples ou ramificados, microconídios no micélio aéreo com zero a três septos, macroconídios do esporodóquio com três a cinco septos e presença de clamidósporos. Alguns isolados produziram pigmentos em BDA que variaram de marrom a vermelho (Tabela 1). A taxa de crescimento não diferiu significativamente entre os isolados. A taxa média de crescimento de *F. solani* dos citros foi de 10,65 mm dia<sup>-1</sup>. Quatro morfotipos foram separados de acordo com a variabilidade dos conidióforos e clamidósporos. Os conidióforos podem ser simples ou ramificados e os clamidósporos podem ter parede lisa ou rugosa. Os clamidósporos rugosos surgem a partir do décimo dia de incubação em SNA e não têm nenhuma relação com a idade da colônia. Os isolados CML 1159 e CML 1186 distinguiram-se dos demais por apresentar crescimento lento (8,6 mm dia<sup>-1</sup>), ausência de esporodóquios e macroconídios, e a formação da fase sexuada após trinta dias em SNA, identificada como *Neocosmospora* sp.

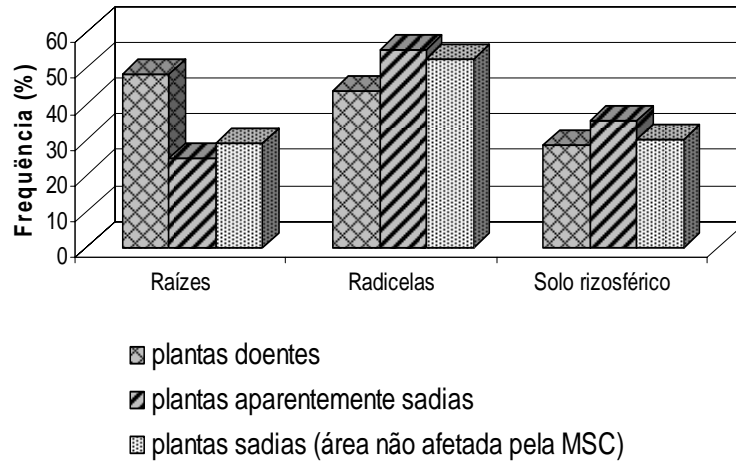


FIGURA 1 Frequência (%) de *Fusarium solani* em solo rizosférico, raízes e radicelas de plantas de citros com e sem sintomas de morte súbita em áreas afetadas pela doença e de plantas saudáveis em áreas não afetadas.

### 3.2 Efeito tóxico de filtrados de *F. solani*

Houve uma interação significativa entre os efeitos da luminosidade e da agitação no efeito tóxico do filtrado CML 1152 em ramos de limão Cravo destacados. Porém, efeito tóxico significativamente maior foi verificado nos filtrados do fungo cultivado continuamente no escuro e sem agitação (Tabela 2). Nessas condições, o efeito tóxico é mais acentuado nos cultivos com 14 dias em meio CZ. Quando submetidos aos bioensaios, oito filtrados produziram necrose em folhas destacadas. Destes, sete causaram reação em ramos destacados, com destaque para o filtrado CML 1152, que causou amarelecimento, seca e queda de folhas, ou seja, máxima toxicidade quando comparado aos demais (Tabela 3).

### 3.3 Detecção e quantificação de naftazarinas nos filtrados de *F. solani*

A análise dos filtrados em espectrofotômetro demonstrou ampla variação na quantidade de naftoquinonas totais (Tabela 3). Foram selecionados filtrados de três isolados para o processo de extração com diclorometano e purificação de naftazarinas por TLC: os isolados CML 1152 e CML 1158, por apresentarem alta produção de naftoquinonas, e CML 1141, por apresentar baixa produção de naftoquinonas, avaliada por espectrofotometria. A solução padrão de naftazarina foi aplicada diretamente na placa de TLC, com uma única banda com fator de retenção (Rf) de 0,45.

A cromatografia de camada delgada dos extratos de diclorometano CML 1158 e 1141 separou quatro bandas reveladas por luz UV. No extrato CML 1152, além destas, surgiu outra banda muito próxima àquela correspondente à naftazarina padrão. A porção da fase estacionária contendo a banda correspondente à solução de naftazarina (Rf=0,45) foi retirada e os possíveis compostos foram recuperados com acetona em todos os extratos, mesmo quando não houve a formação de uma banda visível, bem como a banda exclusiva do extrato CML 1152. Após a purificação, a quantidade de naftazarinas do filtrado CML 1152 foi de  $13,7 \mu\text{g.mL}^{-1}$  naftazarinas, quantidade bem menor quando comparada à avaliação inicial de naftoquinonas totais dos filtrados aquosos. Já nos filtrados CML 1158 e 1141 purificados não foi detectada a presença destas substâncias tóxicas (Tabela 4).

TABELA 2 Efeito de filtrados de *Fusarium solani* (CML 1152) cultivado em meio Czapek-Dox líquido, a 25°C, sob diferentes condições de luminosidade e agitação sobre ramos destacados de limão Cravo

AGITAÇÃO	LUMINOSIDADE	
	Escuro	Fotoperíodo 12h
Agitação constante	2,11* b A	1,00 b B
Sem agitação	3,55 a A	1,55 a B

\* médias de notas de níveis de toxicidade em ramos destacados de citros, sendo 1 = ausência de toxicidade, 2 = baixa toxicidade (murcha), 3 = toxicidade moderada (amarelecimento e murcha), 4 = alta toxicidade (amarelecimento, seca e queda de folhas). Médias seguidas pela mesma letra minúsculas nas colunas e maiúscula nas linhas não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de significância.

TABELA 3 Efeito tóxico de filtrados de *Fusarium solani* com 14 dias de cultivo em meio Czapek-Dox e quantificação de naftoquinonas

Isolado	Citros		Alface			Coloração do filtrado	Naftoquinonas totais ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )
	Folhas <sup>A</sup>	Ramos <sup>B</sup>	G% <sup>C</sup>	Plântula (cm) <sup>D</sup>	Plantas normais <sup>E</sup>		
CML 1139	+	2,0 c	96	42,2 d	25,0 a	Sem coloração	45,3 f
CML 1147	+	1,3 d	94	46,2 c	24,0 a	Marrom claro	118,8 d
CML 1152	+	4,0 a	96	26,5 h	19,7 c	Vermelho	417,7 a
CML 1156	+	1,0 d	96	26,7 h	25,0 a	Sem coloração	187,3 c
CML 1158	+	1,6 c	92	17,4 k	24,0 a	Marrom claro	274,6 b
CML 1160	+	1,3 d	96	36,0 e	22,5 b	Sem coloração	73,1 e
CML 1182	+	1,6 c	98	25,7 i	25,0 a	Sem coloração	20,8 g
CML 1183	+	2,6 b	100	28,9 g	25,0 a	Vermelho claro	266,3 b
Naftazarina 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	+	2,0 c	100	49,2 b	25,0 a	-	-
Naftazarina 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	+	3,0 b	90	32,2 f	25,0 a	-	-
Naftazarina 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	+	3,3 a	-	-	-	-	-
Czapeck-Dox	-	1,0 d	96	55,2 a	25,0 a	Sem coloração	-
Coef. Variação		17,3%	-	3,3%	3,9%	-	7,3%

**A.** Folhas destacadas de limão Cravo: (+) mancha necrótica ao redor do ponto de inoculação; **B.** ramos de limão-ravo com 6 folhas, 1 = ausência de toxicidade, 2 = baixa toxicidade (murcha), 3 = toxicidade moderada (amarelecimento e murcha), 4 = alta toxicidade (amarelecimento, seca e queda de folhas); **C.** percentual de germinação de sementes de alface; **D.** tamanho de plântulas sadias; **E.** número médio de plantas normais por repetição. Médias seguidas pela mesma letra minúscula nas colunas não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de significância.



TABELA 4 Espectrofotometria dos filtrados antes e após a purificação de naftazarinas por cromatografia de camada delgada (TLC).

Filtrado	Não purificado	Após purificação por TLC
	Naftoquinonas totais (µg.mL <sup>-1</sup> )	Naftazarinas (µg.mL <sup>-1</sup> )
CML 1152	417,6	13,7
CML 1158	274,6	0,0
CML 1141	13,8	0,0

### 3.4 Detecção e quantificação de naftazarinas em plantas de citros

Os fluidos extraídos dos vasos condutores das plantas laranja Valência sobre limão Cravo submetidos à espectrofotometria a 304 nm apresentaram forte absorvância nesse comprimento de onda, mesmo depois de diluídos à décima parte (Figura 2). A concentração dessas substâncias nas raízes foi sempre maior que no caule. Comparando-se os diferentes níveis de sintomas, verificou-se que, nas raízes, estas substâncias se mantêm em um mesmo nível, inclusive em plantas aparentemente saudias, com exceção das plantas com sintomatologia avançada, nas quais a quantidade foi menor. Estas substâncias também foram detectadas no caule de todas as plantas amostradas, tendo, nas aparentemente saudias, os níveis sido consideravelmente menores. Já nas plantas sintomáticas houve diferença significativa entre os diferentes estágios da MSC. Níveis mais elevados foram encontrados em plantas com sintomas intermediários e em plantas com sintomas avançados, a quantidade caiu significativamente.

### 3.5 Efeito tóxico de filtrados de *F. solani* em plantas de limão Cravo em sistema hidropônico

Não foi observado qualquer crescimento fúngico a partir dos fragmentos de raízes das plantas de limão Cravo em MA2% antes de iniciado o experimento. Os filtrados de *F. solani* avaliados provocaram redução no tamanho e na massa (Figura 5), com exceção do CML 1141, cujas variáveis analisadas não diferiram estatisticamente das testemunhas. O filtrado CML 1152 produziu efeito igual ao da solução de naftazarina, em todas as variáveis estudadas (Figuras 3 e 4). A solução de naftazarina, utilizada como controle positivo, teve efeito significativo sobre o crescimento e o desenvolvimento das plantas de limão Cravo, provocando redução do crescimento das plantas e impedindo a formação de novas folhas.

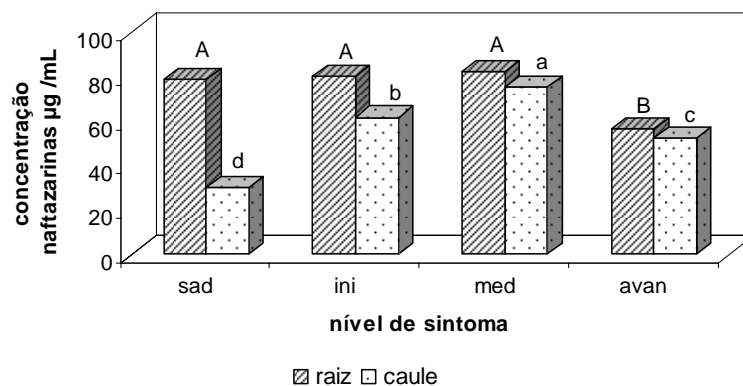


FIGURA 2 Concentração de naftazarinas ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) presentes no sistema vascular de plantas de citros com diferentes níveis de sintoma de morte súbita. *sad* = aparentemente sadias, *ini* = sintomas iniciais, *med* = sintomas intermediários, *avan* = sintomas avançados. Médias seguidas pela mesma letra minúscula nas barras correspondentes ao caule e maiúscula nas barras correspondentes as raízes não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de significância.

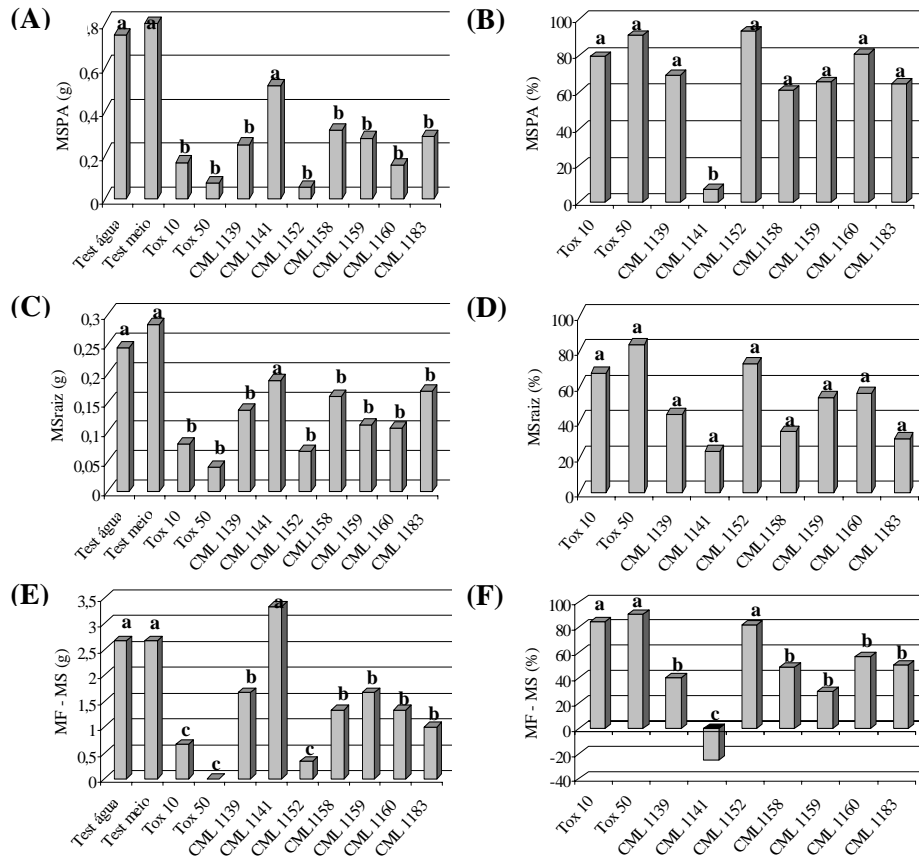


FIGURA 3 Efeito de filtrados de *Fusarium solani* em plantas de limão Cravo, após 60 dias em sistema hidropônico. **A.** massa seca da parte aérea, em gramas; **B.** massa seca da parte aérea – percentual de redução em relação à testemunha; **C.** massa seca da raiz, em gramas; **D.** massa seca da raiz – percentual de redução em relação à testemunha; **E.** diferença entre a massa fresca e a massa seca da planta, em gramas; **F.** diferença entre a massa fresca e a massa seca da planta – percentual de redução em relação à testemunha. *Tox 10* = naftazarinas 10  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , *Tox 50* = naftazarinas 50  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Médias em barras com a mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de significância.

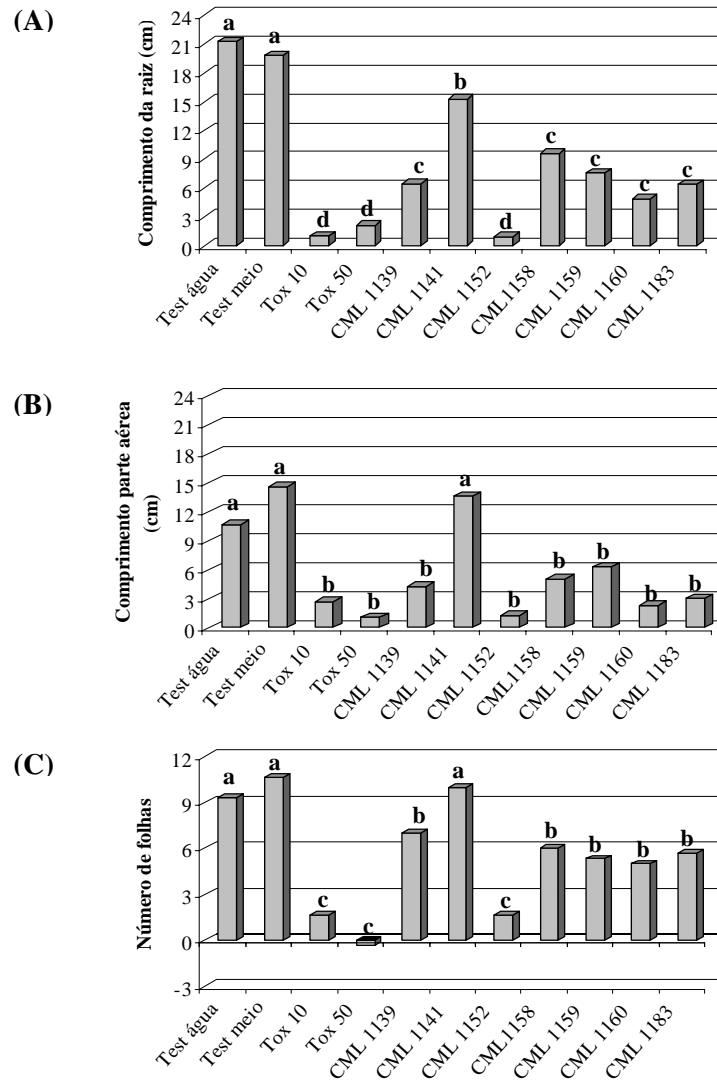


FIGURA 4 Efeito de filtrados de *Fusarium solani* em plantas de limão Cravo, após 60 dias em sistema hidropônico. **A.** crescimento radicular (em cm) durante o período do experimento; **B.** crescimento da parte aérea (em cm) durante o período do experimento; **C.** ganho de novas folhas após o início do tratamento. *Tox 10* = naftazarinas 10  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , *Tox 50* = naftazarinas 50  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Médias em barras com a mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de significância.

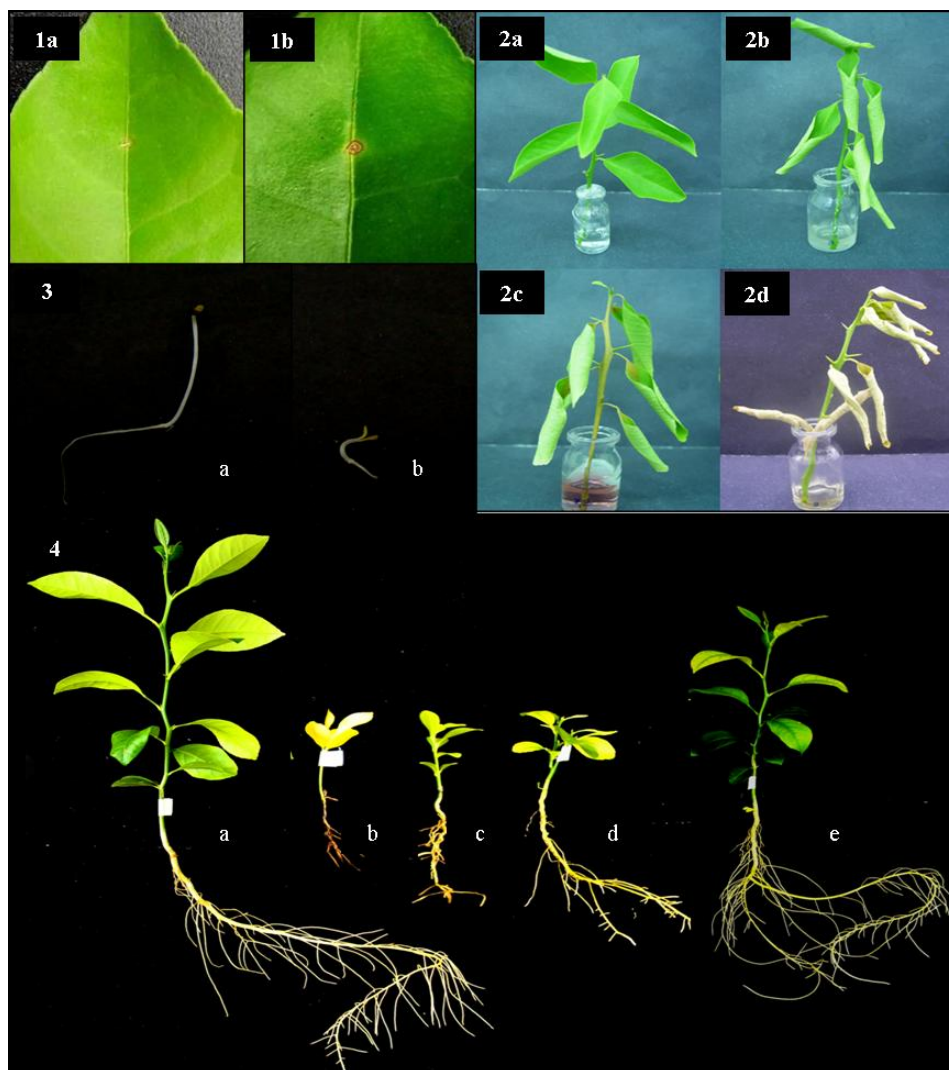


FIGURA 5 Toxicidade de filtrados de culturas de *F. solani* em: **1.** folhas destacadas de limão Cravo, 1a. ausência e 1b. presença de necrose ao redor do ponto de aplicação; **2.** ramos destacados de limão Cravo, 2a. ausência de toxicidade, 2b. baixa toxicidade, 2c. toxicidade moderada, 2d. alta toxicidade; **3.** plântulas de alfaca, 3a. testemunha, 3b. CML 1152; **4.** plantas de limão Cravo em sistema hidropônico, 4a. testemunha, 4b. naftazarina (10  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), 4c. naftazarina (50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), 4d. CML 1152, 3e. CML 1141.

## 4 DISCUSSÃO

Há quase uma década, quando foi detectada em pomares do sudeste brasileiro, a MSC vem sendo estudada, na tentativa de se elucidar o possível agente etiológico. A epidemiologia e a transmissibilidade via enxertia sustentaram a hipótese de ser uma doença de origem biótica, tal como uma virose (Bassanezi et al., 2003; Roman et al., 2004; Maccheroni et al., 2005). Porém, o envolvimento de vírus, seja o CSDaV seja o CTV, não foi suficientemente elucidado. Na tentativa de elucidar as causas da morte súbita dos citros, foi proposto, neste trabalho, que o efeito de metabólitos secundários de fungos do complexo *F. solani* (FSSC) pode estar diretamente envolvido na sintomatologia da MSC, embora possa não ser a causa direta da doença.

Foi demonstrado, pela primeira vez, que fungos do FSSC ocorrem em alta frequência nas áreas produtoras de citros no Brasil. Em oito isolados foi detectada a produção de fitotoxinas que apresentam efeito sobre folhas, ramos e plantas de citros. Além disso, essas toxinas foram encontradas nos vasos condutores de plantas no campo, o que contribui para o fortalecimento desta hipótese.

Trabalhos preliminares conduzidos na África do Sul e nos Estados Unidos demonstraram que uma série de naftoquinonas resultantes do metabolismo secundário de *F. solani* apresenta atividade fitotóxica, podendo desempenhar importante papel na sintomatologia de plantas de citros. Nestes trabalhos, foi sugerido também que essas toxinas podem estar envolvidas no desenvolvimento de sintomas de outra síndrome dos citros denominada *Blight*. Porém, os trabalhos não foram conclusivos e esta síndrome permanece com a etiologia desconhecida (Labuschagne et al., 1987; Nemeč, 1995; Janse van Rensburg & Labuschagne, 2001).

A frequência de *F. solani* foi alta em solo, raízes e radículas de citros. Estudos preliminares da diversidade de fungos associados a plantas com e sem sintomas de morte súbita demonstraram que *F. solani* é o mais frequente, representando 60% e 68% das unidades formadoras de colônias (CFUs), em áreas afetadas e não afetadas pela doença, respectivamente (Pfenning et al., 2006). Em plantas sintomáticas e assintomáticas (aparentemente sadias), em áreas afetadas pela MSC e em plantas sadias de áreas não afetadas a frequência de *F. solani* foi semelhante. Esses resultados indicam que a ocorrência do complexo de *Fusarium* associado a porta-enxerto de citros é comum. No entanto, fatores de estresse poderiam contribuir para o agravamento do quadro de síndrome de morte súbita.

Labuschagne et al. (1996) postularam o conceito do “balanço energético”, no qual é proposta uma relação endofítica entre *F. solani* e citros. Porém, fatores como estresse hídrico, altos níveis de fertilizantes nitrogenados e reduzidos níveis de amido nas raízes, devido a uma alta produção de frutos, por exemplo, podem alternar esta fase biotrófica para a fase necrotrófica, desencadeando a produção de metabólitos tóxicos pelos fungos (Labuschagne et al., 1996).

Diferenças morfológicas entre os isolados permitiram separá-los quatro morfotipos. Porém, esses morfotipos não tiveram nenhuma relação com a produção de pigmentos, a toxicidade em plantas, nem com a origem geográfica. A distinção de morfotipos em populações de *F. solani* pode ser de importância quando eles demonstram correlação com características como patogenicidade ou virulência. Assim, estudos morfológicos mais detalhados da população de *F. solani* dos citros, na tentativa de correlacionar morfotipos com produção de toxinas, poderão ser úteis para a elaboração de métodos diagnósticos da MSC. Os dois isolados identificados como *Neocosmospora* sp., apesar de sua fase anamórfica ser descrita como *Acremonium-like*, foram incluídos no estudo, pois

a filogenia molecular do FSSC demonstra claramente que *Neocosmospora* é fortemente agrupado dentro deste complexo (O'Donnell, 2000). Além disso, ambos, *Neocosmospora* e *Fusarium*, são capazes de produzir fitotoxinas naftazarinas (Medentsev & Akimenko, 1998).

Os resultados aqui apresentados sugerem que pigmentação vermelha ou marrom-avermelhada do meio de cultura pode ser um indicativo da produção de fitotoxinas. A produção desses pigmentos em *F. solani* pode ser um importante fator de virulência, mas não é determinante de patogenicidade. Em experimentos com pimenta-do-reino (*Piper nigrum*), verificou-se que filtrados de isolados de *F. solani* que produzem coloração vermelha em meio de cultura são mais eficientes em produzir efeito tóxico nas plantas (Duarte & Archer, 2003).

Quando inoculados em plantas de limão Cravo com 30 dias de idade, os isolados de *F. solani* não produziram sintomas de podridão de raízes. Mesmo sendo capazes de colonizar o sistema radicular em plantas no campo, estes fungos ainda não são considerados patogênicos aos citros. Apesar de alguns trabalhos relatarem que *F. solani* pode causar sintomas em plantas sob condições de estresse quando o nível de inóculo inicial é elevado (Strauss & Labuschagne, 1995), eles são considerados oportunistas, interagindo com outros patógenos (Dandurand & Menge, 1993). Assim, a chave para a manifestação de sintomas em citros deve ser a produção de metabólitos secundários por *F. solani* (Nemec et al., 1989; Janse van Rensburg et al., 1996).

Para acessar a atividade fitotóxica desses metabólitos, filtrados das culturas foram obtidos e testados em bioensaios. Os experimentos com sementes de alface, folhas e ramos destacados de citros apresentaram resultados concordantes quanto ao efeito tóxico dos filtrados. Apesar de não influenciarem significativamente na germinação das sementes de alface, os filtrados induziram a formação de plântulas defeituosas ou com crescimento inferior ao da testemunha. Como sementes de alface demonstraram sensibilidade aos filtrados



e apresentaram rapidez e alto percentual de germinação, este teste pode ser indicado para a identificação de isolados capazes de produzir substâncias fitotóxicas a espécies arbóreas como os citros.

Experimentos com folhas destacadas podem ser úteis para avaliar o efeito tóxico dos filtrados, porém, necessitam da complementação de outros testes quando a toxina não é causada por patógenos foliares. No caso de fitotoxinas produzidas por patógenos habitantes do solo, o mais indicado são bioensaios envolvendo plântulas, germinação e supressão da radícula (Berestetskiy, 2008). Ramos destacados de citros conseguiram absorver substâncias tóxicas dos filtrados exibindo diferentes níveis de toxicidade. A diluição desses filtrados em água destilada esterilizada (1:1) não altera o efeito tóxico e minimiza os riscos de contaminação com outros microrganismos. A testemunha meio de cultura e filtrados de alguns isolados não causaram efeito tóxico nos ramos, indicando que este teste, além de rápido, é seguro para se acessar a atividade fitotóxica de *F. solani*.

Em solução nutritiva, apesar da diluição de 40 vezes, os filtrados causaram sintomas de murcha, podridão de raízes, redução no sistema radicular, diminuição do crescimento e da massa fresca e seca das plantas. Sintomas semelhantes obtidos com filtrados de *F. solani* em plantas de citros sob sistema hidropônico foram observados na África do Sul (Janse van Rensburg et al., 1996). Filtrados de *F. solani* apresentaram efeitos semelhantes aos da solução de naftazarinas, utilizada como controle positivo. Dentre eles, destaque para o isolado CML 1152, que provocou redução de mais de 70% no peso seco das plantas em relação à testemunha, além de murcha seguida de seca e queda das folhas, evidenciada pela diferença mínima entre as massas fresca e seca (Figura 3). A alta quantificação de naftoquinonas totais em relação aos demais filtrados pode ter contribuído para esse fato, já que, mesmo quando diluído na solução nutritiva, este filtrado ficou com uma concentração semelhante ao padrão de

naftazarinas a  $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . A eficiência do sistema hidropônico em evidenciar efeito tóxico dos filtrados deve-se, provavelmente, à absorção facilitada das substâncias tóxicas pelas raízes de plantas de citros. No Brasil, este é o primeiro relato da utilização desse tipo de sistema no estudo de fitotoxinas de fungos.

Diversos fatores podem afetar a produção de fitotoxinas *in vitro*, tais como luz, temperatura, aeração e composição do meio de cultura (Berestetskiy, 2008). Neste trabalho foi verificado que um efeito tóxico mais acentuado em ramos de citros foi obtido a partir de cultivos incubados em meio Czapek-Dox líquido sem agitação e sob escuro constante. Algumas toxinas podem ser degradadas ou ter seu efeito afetado pela luz (Medentsev et al., 2005; Berestetskiy, 2008), como parece ser o caso das fitotoxinas de *F. solani*. A produção de fitotoxinas por fungos, muitas vezes, pode ser estimulada por condições de estresse. Baixa aeração causada pelo cultivo de *F. solani* sem agitação pode ser uma dessas condições. Associando esta informação ao fato de que plantas de citros no Brasil estão sujeitas a condições de encharcamento do solo devido a períodos de chuvas intensas, a hipótese do envolvimento de fitotoxinas na morte súbita pode ser fortalecida.

Todas as naftoquinonas produzidas por *F. solani*, não só as naftazarinas, absorvem a comprimento de onda de 304 nm (Tatum et al., 1985). Isso explica os valores de absorbância dos eluatos purificados por TLC em relação aos filtrados aquosos ou, mesmo, a ausência de naftazarinas em eluatos cujos filtrados apresentaram uma quantificação positiva. Porém, podem existir outras substâncias derivadas da naftoquinonas capazes de produzir fitotoxicidade. Neste caso, a espectrofotometria de filtrados do fungo na quantificação de naftazarinas pode superestimar ou não refletir a real produção dessas substâncias. Ainda assim, pode servir como um forte indicativo (Baker et al., 1981; Baker & Tatum, 1983).

Neste estudo foi demonstrado, pela primeira vez, que naftazarinas produzidas por *F. solani* são encontradas nos vasos condutores de plantas de citros com sintomas de morte súbita. Foi constatado que a quantidade destas toxinas foi significativamente maior na parte aérea de plantas sintomáticas do que em plantas aparentemente saudas. As plantas com sintomatologia terminal (nível 3) apresentaram menor teor de naftazarinas nas raízes que plantas com sintomas iniciais da doença e plantas aparentemente saudas. Isso pode ser explicado pelo fato de que nestas plantas houve também uma menor frequência de fungos do tipo *F. solani* e as plantas neste nível já se encontram praticamente mortas. Maior quantidade de naftazarinas nas raízes, em comparação com o caule, pode ser um indicativo que elas são produzidas nas raízes e translocadas para a parte aérea via xilema (Phelps et al., 1990). A presença de naftazarinas em plantas aparentemente saudas já era esperada, já que *F. solani* foi consistentemente isolado das raízes destas plantas.

A elevada ocorrência de *F. solani* em plantas assintomáticas, portanto, não exclui a possibilidade de que o fungo desempenhe um importante papel na síndrome da morte súbita. A possibilidade da ação de toxinas produzidas por estes fungos sob condições de estresse somente será expressa em plantas já debilitadas. A variabilidade de isolados de *F. solani* na capacidade de produzir toxinas pode explicar o aparecimento casual de plantas com sintomas semelhantes aos da morte súbita, como observado em plantas de citros com sintomas de *sudden death* na África do Sul (Baker et al., 1981).

Os métodos testados neste trabalho podem avaliar com eficiência o efeito tóxico de filtrados de *F. solani* em citros, podendo-se destacar o método por meio do cultivo em sistema hidropônico, cujos resultados permitem sugerir-lo para a utilização em outros patossistemas que envolvam fitotoxinas.

Este estudo demonstrou que fungos do complexo *F. solani* são encontrados em alta frequência no solo e no sistema radicular de citros no Brasil

e são capazes de produzir fitotoxinas do grupo das naftazarinas. Além disso, estas fitotoxinas estão presentes no sistema vascular de plantas de citros com sintomas de morte súbita no Brasil. Estes fatos fornecem evidências suficientes para embasar a hipótese do envolvimento das toxinas de *F. solani* no quadro de síndrome da morte súbita dos citros.

## 5 REFERÊNCIAS

BAKER, R. A.; TATUM, J. H. Naphthoquinone production by *Fusarium solani* from blighted citrus tree: quantity, incidence and toxicity. **Proceedings Florida State Horticulture Society**, Lake Alfred, v. 96, p. 53-55, June 1983.

BAKER, R. A.; TATUM, J. H.; NEMEC, S. Toxin production by *Fusarium solani* from fibrous roots of blight diseased citrus. **Phytopathology**, St. Paul, v. 71, n. 9, p. 951-954, Sept. 1981.

BASSANEZI, R. B.; BERGAMIN FILHO, A.; AMORIM, L.; GIMENES-FERNANDES, N.; GOTTWALD, T. R.; BOVÉ, J. M. Spatial and temporal analyses of citrus sudden death as a tool to generate hypotheses concerning its etiology. **Phytopathology**, St. Paul, v. 93, n. 4, p. 502-512, Apr. 2003.

BERESTETSKIY, A. O. A review of fungal phytotoxins: from basic studies to practical use. **Applied Biochemistry and Microbiology**, Heidelberg, v. 44, n. 5, p. 453-465, Sept./Oct. 2008.

CARVALHO, D. D. C.; OLIVEIRA, D. F.; CAMPOS, V. P.; PASQUAL, M.; GIMARÃES, R. M.; CORRÊA, R. S. B. Avaliação da capacidade de produzir fitotoxinas in vitro por parte de fungos com propriedades antagônicas a nematóides. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 30, n. 6, p. 1230-1235, nov./dez. 2006.

DANDURAND, L. M.; MENGE, J. A. Influence of *Fusarium solani* on citrus root growth and population dynamics of *Phytophthora parasitica* and *Phytophthora citrophthora*. **Phytopathology**, St Paul, v. 83, n. 7, p. 767-771, July 1993.

DUARTE, M. L. R.; ARCHER, S. A. *In vitro* toxin production by *Fusarium solani* f. sp. *piperis*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 3, p. 229-235, maio/jun. 2003.

FERREIRA, D. F. **Sisvar - sistema de análise de variância para dados balanceados**. Lavras: UFLA, 1998. 19 p.

GIMENES-FERNANDES, N.; BASSANEZI, R. B. Doença desconhecida afeta pomares cítricos no norte de São Paulo e sul do Triângulo Mineiro. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 27, n. 1, p. 93, fev. 2001.

GUIMARÃES, N. C. C.; TEIXEIRA, J. E. C.; PAIVA, L. V.; SANTOS, C. D. Quantificação de carboidratos presentes em tecidos condutores de laranja 'pêra' sobre limoeiro 'cravo' afetada pelo declínio dos citros. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 24, n. 1, p. 113-124, jan./jun. 2003.

JANSE VAN RENSBURG, J. C.; LABUSCHAGNE, N. Effect of naphthazarin toxins produced by *Fusarium solani*, on three citrus rootstocks in a hidroponic system. In: INTERNATIONAL CITRUS CONGRESS, 9., 1996, Riverside. **Proceedings...** Riverside: International Society of Citriculture, 1996. v. 1, p. 427-430.

JANSE VAN RENSBURG, J. C.; LABUSCHAGNE, N.; NEMEC, S. Occurrence of *Fusarium* produced naphthazarin in citrus trees and sensitivity of rootstocks to isomarticin in relation to citrus blight. **Plant Pathology**, Oxford, v. 50, n. 2, p. 258-265, Apr. 2001.

JESUS JUNIOR, W. C.; BASSANEZI, R. B. Análise da dinâmica e estrutura de focos da morte súbita dos citros. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 4, p. 399-405, jul./ago. 2004.

LABUSCHAGNE, N.; JANSE VAN RENSBURG, J. C.; STRAUSS, J.; GRUNDLING, G. The role of *Fusarium solani* in citrus root disease an overview of 10 years of research in South Africa. In: INTERNATIONAL CITRUS CONGRESS, 9., 1996, Riverside. **Proceedings...** Riverside: International Society of Citriculture, 1996. v. 1, p. 431-434.

LABUSCHAGNE, N.; KOTZÉ, J. M.; PUTTERILL, J. F. Incidence of *Fusarium solani* and *F. oxysporum* in citrus roots and infection by *F. solani*. **Phytophylactica**, Pretoria, v. 19, n. 2, p. 315-318, Feb. 1987.

MACCHERONI, W.; ALEGRIA, M. C.; GREGGIO, C. C.; PIAZZA, J. P.; KAMLA, R. F.; ZACHARIAS, P. R. A.; BAR-JOSEPH, M.; KITAJIMA, E. W.; ASSUMPÇÃO, L. C.; CAMAROTTE, G.; CARDOZO, J.; CASAGRANDE, E. C.; FERRARI, F.; FRANCO, S. F.; GIACHETTO, P. F.; GIRASOL, A.; JORDÃO, H.; SILVA, V. H. A.; SOUZA, L. C. A.; AGUILAR-VILDOSO, C. I.; ZANCA, A. S.; ARRUDA, P.; KITAJIMA, J. P.; REINACH, F. C.; FERRO, J. A.; SILVA, A. C. R. da. Citrus sudden death (CSD) is a new disease that has killed approximately 1 million orange trees in Brazil. **Journal of Virology**, Washington, v. 79, n. 5, p. 3028-3037, Mar. 2005.

MEDENTSEV, A. G.; AKIMENKO, V. K. Naphthoquinone metabolites of the fungi. **Phytochemistry**, Amsterdam, v. 47, n. 6, p. 935-959, Mar. 1998.

MEDENTSEV, A. G.; ARINBASAROVA, A. Y.; AKIMENKO, V. K. Biosynthesis of naphthoquinone pigments by fungi of the genus *Fusarium*. **Applied Biochemistry and Microbiology**, Heidelberg, v. 41, n. 5, p. 503-507, Sept. 2005.

MÜLLER, G. W.; DE NEGRI, J. D.; AGUILAR-VILDOSO, C. I.; MATTOS JÚNIOR, D.; POMPEU JÚNIOR, J.; TEÓFILO SOBRINHO, J.; CARVALHO, S. A.; GIROTTI, L. F.; MACHADO, M. A. Morte súbita dos citros: uma nova doença na citricultura brasileira. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 23, n. 2, p. 371-386, jul./dez. 2002.

NEMEC, S.; JABAJI-HARE, S.; CHAREST, P. M. Elisa and immunocytochemical detection of *Fusarium solani*- produced naphthazarin toxins in citrus trees in Florida. **Phytopathology**, St. Paul, v. 81, n. 12, p. 1497-1503, Dec. 1991.

NEMEC, S.; PHELPS, D.; BAKER, R. Effects of dihydrofusarubin and isomarticin from *Fusarium solani* on carbohydrate status and metabolism of rough lemon seedlings. **Phytopathology**, St. Paul, v. 79, n. 6, p. 700-705, June 1989.

NEMEC, S. Stress-related compounds in xylem fluid of blight-diseased citrus containing *Fusarium solani* naphthazarin toxins and their effects on the host. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 41, n. 6, p. 515-524, June 1995.

O'DONNELL, K. Molecular phylogeny of the *Nectria haematococca-Fusarium solani* species complex. **Mycologia**, Lawrence, v. 92, n. 5, p. 919-938, Sept./Oct. 2000.

PFENNING, L. H.; PAULINO, M. S.; ALMEIDA, A. R.; LEÃO, H.; ZANINI, A.; MACHADO, M. A. Fungi associated with sudden death affected citrus plants. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, p. 217, ago. 2006. Suplemento.

PHELPS, D.C.; NEMEC, S.; BAKER, R.; MANSELL, R. Immunoassay for naphthazarin phytotoxins produced by *Fusarium solani*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 80, n. 3, p. 298-302, Mar. 1990.

ROMÁN, M. P.; CAMBRA, M.; JUÁREZ, J.; MORENO, P.; DURAN-VILA, N.; TANAKA, F. A. O.; ALVES, E.; KITAJIMA, E. W.; YAMAMOTO, P. T.; BASSANEZI, R. B.; TEIXEIRA, D. C.; JESUS JUNIOR, W. C.; AYRES, A. J.; GIMENES-FERNANDES, N.; RABENSTEIN, F.; GIROTTO, L. F.; BOVÉ, J. M. Sudden death of citrus in Brazil: a graft-transmissible bud union disease. **Plant Disease**, St. Paul, v. 88, n. 5, p. 453-467, May 2004.

STRAUSS, J.; LABUSCHAGNE, N. Pathogenicity of *Fusarium solani* isolates on citrus roots and evaluation of different inoculum types. **Applied Plant Science**, Reston, v. 9, n. 1, p. 48-52, Jan. 1995.

TATUM, J. H.; BAKER, R. A.; BERRY, R. E. Three further naphthoquinones produced by *Fusarium solani*. **Phytochemistry**, Amsterdam, v. 24, n. 12, p. 3019-3021, Nov. 1985.



## CONCLUSÕES GERAIS

Fungos do complexo *Fusarium solani* são encontrados em alta frequência no solo e no sistema radicular de citros no Brasil.

*F. solani* associado a citros, no Brasil, são capazes de produzir fitotoxinas do grupo das naftazarinas.

É possível reproduzir o efeito dessas fitotoxinas em plantas de citros sob sistema hidropônico.

Fitotoxinas do grupo das naftazarinas estão presentes no sistema vascular de plantas de citros com sintomas de morte súbita no Brasil.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados apresentados neste trabalho fornecem evidências suficientes para embasar a hipótese do envolvimento de toxinas de *F. solani* nos sintomas da MSC. Neste caso, o efeito das toxinas pode não se manifestar imediatamente em plantas jovens e os sintomas podem ocorrer quando há uma elevada proporção de raízes com altos níveis de toxinas ocorrendo em plantas velhas, aliada a condições ambientais capazes de provocar estresse nestas plantas.

Resultados complementares podem ser alcançados com a utilização de técnicas mais modernas e sensíveis, como cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (HPLC-MS) para a purificação e a identificação de todas as naftazarinas produzidas por *F. solani*. As naftazarinas purificadas e isoladas em frações maiores podem, neste caso, ser testadas em hidroponia separadamente para saber quais moléculas são responsáveis pelo efeito tóxico. Além disso, estudos posteriores para a determinação do mecanismo de ação destas substâncias poderiam contribuir para o fortalecimento da hipótese do envolvimento das fitotoxinas de *F. solani* na sintomatologia da morte súbita dos citros.