



RENATA CRISTINA MARTINS PEREIRA

**INFLUENCE OF THE ENVIRONMENT AND NUTRITION ON
THE FATAL YELLOWING OF PALM OIL AND POWDERY
MILDEW OF EUCALYPTUS**

**LAVRAS – MG
2022**

RENATA CRISTINA MARTINS PEREIRA

**INFLUENCE OF THE ENVIRONMENT AND NUTRITION ON THE FATAL
YELLOWING OF PALM OIL AND POWDERY MILDEW OF EUCALYPTUS**

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

Orientador

Prof. Dr. Edson Ampélio Pozza

Coorientadores

Prof. Dra. Adélia Alexandre Aziz Pozza

Dr. Rafael Valadares

Lavras – MG

2022

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Pereira, Renata Cristina Martins.

INFLUENCE OF THE ENVIRONMENT AND NUTRITION
ON THE FATAL YELLOWING OF PALM OIL AND
POWDERY MILDEW OF EUCALYPTUS / Renata Cristina
Martins Pereira. - 2022.

97 p.

Orientador(a): Edson Ampélio Pozza.

Coorientador(a): Adélia Alexandre Aziz Pozza, Rafael
Valadares.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2022.

Bibliografia.

1. Epidemiologia. 2. Óleo de Palma. 3. Amarelecimento Fatal.
I. Pozza, Edson Ampélio. II. Pozza, Adélia Alexandre Aziz. III.
Valadares, Rafael. IV. Título.

RENATA CRISTINA MARTINS PEREIRA

**INFLUENCE OF THE ENVIRONMENT AND NUTRITION ON THE FATAL
YELLOWING OF PALM OIL AND POWDERY MILDEW OF EUCALYPTUS**

**INFLUÊNCIA DO MEIO AMBIENTE E DA NUTRIÇÃO NO AMARELECIMENTO
FATAL DO ÓLEO DE PALMA E DO OÍDIO DO EUCALIPTO**

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

APROVADA EM 29 DE JUNHO DE 2022

Dr. Hudson Texeira

Dr. Paulo Estevão de Souza

Dr. Humberson Rocha Silva

Dr. Helon Santos Neto

Prof. Dr. Edson Ampélio Pozza
Orientador

**LAVRAS – MG
2022**

RESUMO

Vários fatores podem influenciar o progresso da doença, incluindo o ambiente e a nutrição da planta. O clima desempenha papel fundamental no metabolismo do patógeno e do hospedeiro, podendo favorecer ou não a maior intensidade da doença. Assim, quantificar essas variáveis é essencial para relacioná-las com a o progresso espaço temporal da doença e definir estratégias de manejo. Além disso, para entender a origem e a quantidade do inóculo inicial, o mecanismo de disseminação do patógeno e o comportamento do patossistema, é necessário também, estudar o progresso temporal. Posteriormente, a nutrição correta e equilibrada das plantas deve constituir sempre a primeira linha de defesa contra os patógenos. Os micronutrientes são capazes de mediar a ativação de produtos de defesa da planta quando disponíveis em quantidades adequadas e equilibradas no tecido vegetal. Diferentes fontes desses micronutrientes e de elementos não essenciais, porém benéficos, estão sendo avaliadas no mundo para verificar o seu efeito em reduzir a intensidade de doenças. Sendo assim, esse trabalho teve como objetivo avaliar a influência das variáveis ambientais e avaliar a nutrição mineral da planta no progresso espaço temporal do Amarelecimento Fatal do dendezeiro e no oídio do eucalipto. Os resultados dessa pesquisa foram divididos em três artigos. O primeiro objetivou avaliar a relação da incidência do Amarelecimento fatal em Dendezeiro com o estado nutricional da planta, a classe e a fertilidade do solo e as variáveis climáticas. As condições edafoclimáticas geraram acúmulo de água em determinadas classes de solo sendo estas relacionadas ao Amarelecimento Fatal do dendezeiro, causando deficit na nutrição da planta. Essa hipótese também foi confirmada pela análise proteômica, que identificou as condições de estresse ambiental das raízes em plantas com sintomas. Nessas condições, vários patógenos, tanto no solo quanto na parte aérea, podem ser oportunistas e associados aos sintomas observados, mas podem não ser a causa primária da doença. O segundo artigo objetivou estudar a severidade da doença ao longo do tempo e ajustar modelos não lineares ao progresso temporal do oídio do eucalipto em mini jardim clonal. Concluiu-se que o emprego de clones com menor intensidade da doença pode reduzir as perdas por oídio em eucalipto e assim aumentar a produção de estacas. O terceiro artigo teve como objetivo selecionar nanopartículas para o manejo do oídio do eucalipto. As nanoparticuladas de boro, prata e sílcio reduziram significativamente a severidade da doença comparado com a testemunha. Dessa forma foi constatado o potencial da adequada nutrição no manejo de doenças de plantas.

PALAVRAS CHAVE: Epidemiologia. Amarelecimento fatal. Oídio.

ABSTRACT

Several factors can influence the progress of the disease, including the environment and plant nutrition. The climate plays a fundamental role in the metabolism of the pathogen and the host, and may or may not favor the greater intensity of the disease. Thus, quantifying these variables is essential to relate them to the spatial and temporal progress of the disease and define management strategies. Furthermore, to understand the origin and quantity of the initial inoculum, the pathogen dissemination mechanism and the pathosystem behavior, it is also necessary to study the temporal progress. Subsequently, the correct and balanced nutrition of the plants must always constitute the first line of defense against pathogens. Micronutrients are able to mediate the activation of plant defense products when available in adequate and balanced amounts in plant tissue. Different sources of these micronutrients and non-essential but beneficial elements are being evaluated around the world to verify their effect in reducing the intensity of diseases. Therefore, this study aimed to evaluate the influence of environmental variables and to evaluate the plant's mineral nutrition on the temporal progress of Fatal Yellowing of oil palm and powdery mildew of eucalyptus. The result of this research was divided into three articles. The first aimed to evaluate the relationship between the incidence of fatal yellowing in oil palm with the nutritional status of the plant, soil class and fertility and climatic variables. Checking if, after all the analyzes carried out, the soil and climate conditions generated water accumulation in certain soil classes, which are related to the Fatal Yellowing of oil palm, causing a deficit in plant nutrition. This hypothesis was also confirmed by proteomic analysis, which identified the environmental stress conditions of roots in plants with symptoms. Under these conditions, several pathogens, both in the soil and in the shoot, may be opportunistic and associated with the observed symptoms, but may not be the primary cause of the disease. The second article aimed to study the disease severity over time and adjust nonlinear models to the temporal progress of eucalyptus powdery mildew in a mini clonal garden. It was concluded that the use of clones with lower intensity of the disease can reduce the losses by powdery mildew in eucalyptus and thus increase the production of cuttings. The third article aimed to select nanoparticles for the management of eucalyptus powdery mildew. Boron, silver and silicon nanoparticles significantly reduced the severity of the disease compared to the control. Thus, the potential of adequate nutrition in the management of plant diseases was verified.

KEY WORDS: Epidemiology. Fatal Yellow. Powdery Mildew.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	11
REFERENCIAL TEÓRICO	13
Morfologia, composição química e utilidade do óleo de Dendê	13
Manejo da cultura do óleo de palma	15
Amarelecimento fatal do dendezeiro	15
Aspectos econômicos da eucaliptocultura	17
Produção de mini estacas clonais.....	18
Oídio em eucalipto.....	18
Morfologia, composição química e utilidade do óleo de Dendê	16
Influência das variáveis ambientais no crescimento do patógeno	19
Distribuição espaço-temporal de doenças de plantas.....	20
Nutrição de plantas	22
Aplicabilidade de Nanopartículas na agricultura	24
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	26
SEGUNDA PARTE – ARTIGO 1	33
The Rain Forest Environment and Oil palm fatal Yellowing	33
ABSTRACT	33
INTRODUCTION	34
MATERIALS AND METHODS	37
Characterization of the experimental area	37
Data collection, incidence frequency intervals and area under the progressive disease curve (AUPDC)	37
Relationship of climatic variables with oil palm FY	38
Relationships of classification, soil fertility and plant nutrition with the progress of FY in oil palm	38
Statistical analysis.....	39
Proteomic analysis	40
RESULTS	42
Analysis of frequency ranges.....	42
Relationship of climatic variables in rain forest with oil palm FY	45

Relationship of soil classification and fertility and plant nutrition with the progress of FY in oil palm	49
Protein profile	51
DISCUSSION	55
CONCLUSION	61
ACKNOWLEDGMENTS	62
LITERATURE	62
TERCEIRA PARTE – ARTIGO 2	66
Temporal progression of eucalyptus powdery mildew in a microclonal propagation nursery	67
ABSTRACT	67
INTRODUCTION	68
MATERIAL AND METHODS	69
Delimitation of instalments	69
Quantification of the severity of eucalyptus powdery mildew and climatic variables	70
Temporal analysis and fit of nonlinear models to the progression of powdery mildew in eucalyptus	71
Producing and rooting of the cuttings	72
Statistical analysis	72
RESULTS	73
Quantification of the severity of eucalyptus powdery mildew and climatic variables	73
Number of cuttings, cuttings that rooted and productivity index	76
Temporal analysis and adjustment of nonlinear models to the progression of powdery mildew in eucalyptus.	77
DISCUSSION	79
CONCLUSION	81
Declarations	81
Conflicts of interest	81
REFERENCES	82
QUARTA PARTE – ARTIGO 3	84
NANOPARTÍCULAS NO MANEJO DO OÍDIO DO EUCALIPTO	84
ABSTRACT	81
INTRODUÇÃO	84
1. MATERIAL E MÉTODOS	86

2.1. Caracterização experimental.....	86
Preparo das nanopartículas	86
Efeito de nanopartículas na germinação de Oídio (<i>Oidium</i> sp.) <i>in vitro</i>	86
Screening de nanopartículas para controle de oídio em mudas de eucalipto.....	87
Preparo e inoculação do material vegetal	87
Avaliações de incidência e da severidade da doença.....	87
Seleção de nanopartículas para controle de oídio em matrizes de eucalipto	88
Preparo das nanopartículas e inoculação do patógeno.....	88
Produção e enraizamento das estacas	89
Análises estatísticas	89
RESULTADOS	89
Efeito de nanopartículas na germinação de Oídio (<i>Oidium</i> sp.) <i>in vitro</i>	89
Screening de nanopartículas para controle de oídio em mudas de eucalipto.....	90
Seleção de nanopartículas para controle de oídio em matrizes de eucalipto	93
Produção e enraizamento das estacas	95
DISCUSSÃO	95
REFERÊNCIAS	98

O saber a gente aprende com os mestres e os livros. A sabedoria, se aprende é com a vida e com os humildes.” (Cora Coralina)

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras, especialmente ao Departamento de Ciência do Solo, pela oportunidade.

À FAPEMIG, CAPES e ao CNPq pela concessão da bolsa de doutorado. Aos servidores públicos e professores que me ajudaram nessa jornada. Ao professor Edson Ampélio Pozza, pela orientação, paciência e disposição para ajudar.

A todos funcionários do DFP/UFLA. A todos os colegas de departamento, pois muitos se tornaram amigos!

Aos meus pais, Mauricio e Iara pelo amor e apoio incondicional, em todas as minhas decisões nas diferentes etapas da minha vida e a meu irmã Bianca.

MUITO OBRIGADO!

PRIMEIRA PARTE – INTRODUÇÃO GERAL

INTRODUÇÃO

O Brasil destaca-se no agronegócio mundial, produzindo alimentos e matéria-prima para diversas atividades industriais, dentre essas, a palma produtora de óleo e o eucalipto, para produção de celulose, madeira e energia. No entanto, a produtividade dessas culturas pode ser reduzida por diversos fatores, entre eles, as doenças de origem biótica e abiótica.

As plantações de dendê (*Elaeis guineenses* Jacq.), palmeira nativa da África ocidental, destacam-se por terem a maior produção de óleo por unidade de área no mundo. Uma planta pode fornecer de três a oito vezes mais óleo em comparação com outras de clima temperado ou tropical (BARCELOS et al. 2015). Diante desse potencial, sua produção teve incremento de 16,5% de 2012 para 2014, e representa 39% de todos os óleos vegetais consumidos mundialmente (OIL WORLD 2013). Esse crescimento é explicado por diversos fatores, entre os quais podem ser citados o forte apelo ecológico da cultura, dado seu expressivo nível de sequestro de carbono, seu baixo impacto ambiental, pouca mecanização no processo de colheita, menores custos de produção e a versatilidade do uso dos seus produtos (HENKES et al. 2015).

Os principais países produtores do óleo de palma são a Malásia e a Indonésia, liderando 85% do mercado mundial. Outros países como a Nigéria, Tailândia, Colômbia, Equador e Nova Guiné detém juntos 6,6% da produção (HENDERS et al. 2015; Furamo e Aide 2017). Atualmente o Brasil tem pouca representatividade nesse setor, entretanto o país possui 31,8 milhões de hectares de solo aptos e com clima ideal para a plantação de dendê, tornando-o o país de maior potencial para o seu cultivo (INDEXMUNDI 2018). Só na Amazônia Legal cerca de 29 milhões de hectares podem ser utilizados para plantar essa cultura (RAMALHO FILHO et al. 2010; PIRKER et al. 2016). Em contrapartida, apenas 78 mil hectares estão sendo destinados a plantações de dendê no Brasil (IBGE 2020). Apesar da região amazônica apresentar boas condições para o cultivo de dendê, o Amarelecimento Fatal (AF) é fator limitante para sua produção nessa região.

O AF do dendezeiro é considerado a doença com maior importância econômica no Brasil, causando perdas desde 1984. Os sintomas começam com amarelecimento dos folíolos basais das folhas intermediárias, posteriormente ocorrem necroses nas

extremidades dos folíolos, resultando em sua seca total (BOARI 2008). Embora seja considerado o maior problema fitossanitário dessa palmácea, o AF ainda não tem agente etiológico ou causa definida, portanto não possui medidas de controle eficazes (TRINDADE 1997). Assim, devido à falta de conhecimento sobre a causa da doença e possíveis medidas de controle, mesmo com extensiva área promissora para o seu plantio, essa doença tem desmotivado a expansão do cultivo de dendê no Brasil.

Outra cultura de grande importância para a economia brasileira é o eucalipto, possuindo 6,97 milhões de hectares plantados no território nacional (IBÁ, 2020). Nos últimos anos ocorreu o aumento exponencial da produtividade dessa cultura, devido a fatores como clima e solo favoráveis, à pesquisa, a organização do setor privado e as boas práticas de manejo. Entre essas práticas destaca-se o plantio de clones, capazes de produzir florestas homogêneas com maior qualidade de madeira e celulose, fatores fundamentais para aumentar a produtividade e a competitividade das empresas florestais (ASSIS et al., 2004). O sistema de clonagem é feito por mini estacas retiradas de matrizes pré-selecionadas em minijardins clonais. As mini estacas são caules ou ramos tenros ainda não lignificados, estimuladas a produzir raízes por contato com imersão em solução de hormônios. No entanto, esse enraizamento é influenciado por fatores intrínsecos e extrínsecos ao material vegetal. Uma das causas da perda de eficiência na produção de mini estacas é a presença do Oídio nas folhas, cujo agente etiológico é *Oidium* sp. (MUCCI et al., 1980).

Nas matrizes utilizadas para produzir mini estacas os sinais desse patógeno aparecem na superfície da folha, onde pode ser observado micélio, conidióforos e conídios brancos. O aumento da severidade dessa doença causa encarquilhamento e superbrotamento (FERREIRA, 1997), diminuindo a produtividade, causando até 50% de perdas de mudas no viveiro, reduzindo o número de estacas e o tempo de crescimento e desenvolvimento de mudas tanto na casa de vegetação quanto na de sombra (MUCCI et al., 1980). Esse fungo ocorre com frequência em mini jardins clonais, onde as condições ambientais são favoráveis, devido ao adensamento de plantas, o contato constante entre as folhas e a irrigação por gotejamento. Esses fatores associados à baixa disponibilidade de água livre nas folhas e ao material genético suscetível proporcionam condições perfeitas para a ocorrência de epidemias de Oídio. Além disso, essa doença pode atingir até 100% de severidade no mês de julho, quando é iniciada a produção de mini estacas para o plantio no período chuvoso.

O ciclo de produção do eucalipto dura entre 5 e 7 anos. Portanto, o plantio de novas áreas deve ser contínuo para se manter a colheita durante todo o ano. Entretanto, com a incidência dessa doença, a produção de mudas pode ser interrompida, causando prejuízos não só nos viveiros, mas em todo processo logístico no campo. Assim, entender o progresso da doença e conhecer as variáveis ambientais favoráveis ao Oídio do eucalipto, pode ajudar em seu manejo.

Ao longo dos anos novos métodos estatísticos surgiram para quantificar doenças em plantas, explicando cada vez mais a dinâmica de patógenos e de doenças nos hospedeiros. Entretanto pouco se sabe sobre o Oídio do eucalipto e o AF do dendezeiro. Portanto, os principais objetivos desse estudo foram avaliar a relação da incidência do Amarelecimento fatal em Dendezeiro com o estado nutricional da planta, a classe e fertilidade do solo e as variáveis climáticas; avaliar o progresso espaço temporal do Oídio (*Oidium* sp.) em matrizes de eucalipto (*Eucalyptus* sp.) em mini jardim clonal e correlaciona-lo com variáveis ambientais e selecionar nanopartículas para o manejo de oídio em mudas e matrizes de eucalipto.

REFERENCIAL TEÓRICO

Morfologia, composição química e utilidade do óleo de Dendê

O gênero *Elaeis*, pertence à classe Liliopsida (Monocotiledônea), ordem arcales, família Arecaceae, subfamília Arecoideae, tribo cocoseae, subtribo Elaeidinae (RIOS et al., 2012). A espécie *Elaeis guineensis* Jacq. pode chegar a 20 metros de altura e tem apenas um ponto de crescimento terminal, cujo estipe é colunar solitária, com internódios curtos. Essa palmeira possui cerca de 40 a 60 folhas pinadas, sendo seu desenvolvimento inicialmente muito lento, pois permanecem guardadas por aproximadamente dois anos, posteriormente uma "lança" central se abre. A ráqui é dura e fibrosa, podendo atingir até oito metros. No pecíolo da folha e dentro dos cachos de frutos podem ser encontrados espinhos curtos. Para cada folha uma inflorescência é formada, cujo tamanho depende do estado fisiológico da planta. O dendezeiro é monóico, possuindo flores masculinas e femininas separadas na mesma planta, em inflorescências distintas, desenvolvidas nas axilas das folhas. Os frutos são agrupados em cachos grandes e compactos, sendo drupa séssil variando de esférico a ovóide ou alongado com abaulamento no topo. O comprimento varia de 2 a 5 cm e seu peso pode ser de 3 a 30 g. O pericarpo da fruta é composto por exocarpo externo (pele), mesocarpo (polpa) e

endocarpo (casca). A polpa do fruto envolve uma noz com a semente da palmeira (JOURDAN e REY, 1997; CORLEY e TINKER, 2003).

Quanto às raízes, Jourdan e Rey (1997) observaram 6 tipos de raízes na fase juvenil e 8 tipos na fase adulta usando critérios morfológicos e geométricos simples. O sistema radicular é fasciculado e a maior parte das raízes ficam entre 0 e 60 cm de profundidade, necessitando de boa drenagem e pH entre 4,5 e 6 (FERWERDA, 1975; LODY, 2009; NUNES et al., 2009). Quando as condições se tornam desfavoráveis, como na estação seca, as raízes localizadas na superfície morrem e se decompõem. Posteriormente, em períodos chuvosos, as raízes subterrâneas sobreviventes começam a emitir radículas para alcançar os horizontes superficiais ricos em matéria orgânica (RAMALHO FILHO, 2010).

As três variedades de dendê utilizadas para exploração de óleo são a Psifera, com fruto sem casca protetora da amêndoa; Dura, com casca de no mínimo 2 mm envolvendo a amêndoa; e Tenera, com espessura da casca inferior a 2 mm.

O dendezeiro produz dois óleos com composições químicas diferentes, o da polpa e o da amêndoa, chamados de óleo de palma e de palmiste, respectivamente (SAMBANTHAMURTHI et al., 2000). O primeiro possui cor avermelhada devido à presença de carotenoides, sendo utilizado na alimentação, e o segundo serve como matéria prima para o setor cosmético e farmacêutico (POKU, 2002; SEAGRI, 2013). Os produtos para a indústria farmacêutica são extraídos do mesocarpo do fruto, contendo cerca de 22% de óleo de palma, e da amêndoa, com teor de até 55% de óleo de palmiste (MAPA, 2011). A produção desses óleos em relação à soja é maior, pois essa possui teores entre 16,58 e 20,75% (ESPINDOLA et al., 2008).

O óleo de palma possui características anti-oxidantes utilizadas na prevenção de doenças cardíacas e câncer, além de ajudar na redução do colesterol sérico sanguíneo (LDL) e aumento do índice de HDL (AGROPALMA, 2002; SEAGRI, 2013). Também é composto por fitonutrientes como tocoferol, carotenóide, tocotrienol, esteróis e sitosterol e ácidos graxos como ácido palmítico, ácido oléico e ácido linoléico (ONG et al., 2012). Já o óleo de palmiste é rico em ácido láurico, semelhante ao óleo de coco.

O óleo de palma é utilizado na fabricação de margarinas, biscoitos, pães, sorvetes, óleo de cozinha, sabões, detergentes, velas, corantes naturais e biodiesel. Já o óleo de palmiste é utilizado na produção de pomadas, maionese, sabonetes, detergentes e chocolates. Ambos podem ser utilizados na composição de tintas, lubrificantes, plastificantes, polidores, resinas e chapa de aço (BOARI, 2008).

A extração desses produtos do mesocarpo e da amêndoa é feita principalmente por método mecânico, prensando e esmagando (PARENTE et al., 2003; SLUSZZ e MACHADO, 2006; MDA, 2007; RAMALHO FILHO, 2010). Após esse processamento, seus resíduos ainda podem ser destinados a alimentação de caldeiras a vapor devido a presença de fibras e a casca pode ser empregada na indústria de carvão pois tem alto poder calorífico (SLUSZZ e MACHADO, 2006). Portanto, devido a suas múltiplas utilidades, o óleo de palma teve incremento de 16,5% de 2012 para 2014, sendo o óleo vegetal mais consumido no mundo (OIL WORLD, 2013).

Manejo da cultura do óleo de palma

A cultura do dende é perene, por esse motivo deve seguir algumas especificações técnicas para obter boa produtividade. O seu plantio deve ser conduzido em áreas com declividade de até 10%, para reduzir custos de manejo da cultura. O espaçamento utilizado é de 9 x 7,8 m, sendo recomendado sua implantação no período de chuvas (MÜLLER, 1980; SEAGRI, 2013; MDA, 2007). Além disso, a consorciação com leguminosas pode ser opção para combater plantas daninhas, reduzir a compactação e erosão do solo, melhorar a fixação de nitrogênio e possibilitar renda extra. As condições edafoclimáticas exigidas são temperatura média entre 25 e 27° C, com incidência solar de 1.500 a 2.000 horas por ano, e pluviosidade média de 1.800 mm distribuídos regularmente durante o ano (BARCELOS et al., 1987; BASTOS et al., 2001; LODY, 2009).

A produção dos frutos começa entre 3 e 4 anos, aumentando sua produtividade até os 8 anos, quando se estabiliza e o decréscimo gradual inicia-se. A colheita é feita manualmente e os produtos devem ser processados em até 24 horas para garantir a qualidade do óleo (MDA, 2007). Além disso, a colheita deve ser feita imediatamente após seu amadurecimento, devido à liberação de ácidos graxos comprometendo a qualidade do óleo (MÜLLER, 1980).

Amarelecimento fatal do dendezeiro

O primeiro relato do Amarelecimento fatal (AF) ocorreu em 1967, no Pará, entretanto até 1984 a incidência da doença era considerada esporádica (VAN SLOBBE, 1988). Com o aumento do plantio dessa cultura em novas áreas, sem o cuidado do levantamento ou classificação do solo para averiguar sua aptidão agrônômica e das condições edafoclimáticas onde o plantio estava, a doença progrediu. Posteriormente, o AF passou a limitar a cultura do dendê na região amazônica, pois entre 1974 a 1991 mais

de 100 mil palmeiras apresentaram sintomas da doença (VAN SLOBBE, 1991). Como medida de manejo, plantas sintomáticas foram cortadas, para evitar a propagação do inóculo, entretanto essa técnica não foi eficiente. Além disso, dendezeiros apresentaram a mesma sintomatologia em outros países da América latina, como Colômbia, Costa Rica, Panamá, Nicarágua e Suriname, onde também seu agente causal não foi identificado (DE FRANQUEVILLE, 2003; CORLEY et al., 2015.).

Os sintomas do AF começam com o amarelecimento dos folíolos basais das folhas intermediárias, posteriormente ocorre a necrose e seca total dessas folhas. Consequentemente a palmeira morre entre 7 e 10 meses após o aparecimento dos primeiros sintomas (VAN SLOBBE, 1991). Quando ocorre a recuperação da planta e os sintomas diminuem, o sistema radicular não se desenvolve, reduzindo sua produtividade (AYALA, 2001; BERNARDES, 1999).

Para investigar a causa da doença tecidos de folhas, radículas e do meristema apical de palmeiras apresentando AF e aparentemente saudáveis foram coletados e analisados utilizando microscópio de luz por Kastelein et al. (1990). As plantas com sintomas não tinham radículas, ao contrário das saudáveis. Nas lesões necróticas das folhas foram encontrados fungos e bactérias, entretanto essa associação não era constante. Além disso, esses patógenos não foram observados em tecidos vasculares ou fora das lesões das plantas com AF.

Assis et al. (2018), usando ferramentas de biologia molecular, caracterizaram a diversidade fúngica em folhas doentes com AF e saudáveis de dendê no Brasil. Os autores utilizaram primers específicos para o gênero *Phytophthora*, entretanto apenas uma das amostras foi amplificada para esse fungo. Na análise da região ITS predominaram grupos diferentes em todas as amostras sintomáticas, enquanto os fungos *Pyrenochaetopsis* e não classificados predominaram em todas as amostras assintomáticas. Os resultados mostram comunidades de fungos distintas entre as amostras no mesmo estágio da doença ou entre todas as amostras sintomáticas, e os fungos do gênero *Phytophthora* não estão relacionados a essa doença.

Até o momento, várias pesquisas visando descobrir a causa do AF foram realizadas. Entretanto, nenhum estudo realizado com agentes fitopatológicos (BRIOSO et al., 2003; ALVAREZ E CLAROZ, 2002; SILVA, 1989; VAN SLOBBE, 1988; BERNARDES, 1999; MARTINS, 2001; FURTADO, 2001; TRINDADE et al., 2005; LIN, 1989; FERRAZ, 2001), insetos (CELESTINO FILHO et al., 1993; LOUISE, 1990),

epidemiologia e medidas de controle da doença, chegaram a uma conclusão definitiva (SILVEIRA et al., 2000; BERGAMIN et al., 1998; LARANJEIRA et al., 1998).

Aspectos econômicos da eucaliptocultura

O eucalipto e seus produtos são considerados umas das principais ‘*commodities*’ no mercado mundial. No Brasil, o setor de reflorestamento ocupa 9,5 milhões de hectares, sendo 78% desse total destinado a plantios de eucalipto. A produção de árvores é responsável por 91% da madeira produzida para fins industriais e teve PIB setorial de R\$71,1 bilhões, além de receita bruta estimada em R\$ 116,6 bilhões em 2020. Além disso, a produtividade florestal no Brasil liderou o ranking global em 2020 com média de 36,8 m³/ha ao ano para plantios de eucalipto (IBÁ, 2021).

A cadeia produtiva do setor de base florestal é composta por complexas ramificações de produtos e aplicações energéticas e industriais. As principais funções comerciais do plantio florestal são o fornecimento de energia ou matéria-prima para o setor de construção civil e transformação. O Brasil, enquanto país detentor de abundantes recursos florestais e destaque mundial por inovação de sua indústria de papel e celulose, desenvolveu uma ampla e específica estrutura produtiva no setor. De acordo com Sampaio e Mazzochin (2010) e Valverde et al. (2012), os três principais modelos de organização industrial do setor de base florestal são a) celulose, papel, lâmina de madeira, chapa de fibra e madeira aglomerada. Este setor é caracterizado por poucas empresas de grande porte no domínio das atividades, integradas verticalmente ao longo de todas as suas etapas de produção: cultivo, indústria e comércio; b) Processamento mecânico da madeira: produção de madeira serrada, compensados e móveis. Este segmento é composto por grande número de empresas de pequeno e médio porte; desataca-se pela pulverização das preferências dos consumidores e fragmentação do mercado; c) Utilização da madeira para outras atividades, como para produção de energia (lenha, cavaco e carvão vegetal, por exemplo). As florestas plantadas brasileiras são predominantemente compostas por cultivo de espécies de Eucalipto e Pinus. Por razões estratégicas, o cultivo dessas árvores no Brasil se concentrou no Sul e Sudeste durante muitos anos, devido ao nível de desenvolvimento da indústria madeireira nestas regiões (MORALES et al., 2012).

Para o seu cultivo torna-se necessário a produção de mudas em viveiros, principalmente de clones de eucalipto. Para isso a metodologia que utiliza mini estacas se tornou fundamental para a produção em larga escala de mudas clonais.

Produção de mini estacas clonais.

A área de cultivo com espécies do gênero *Eucalyptus* no Brasil têm crescido nos últimos anos e, para estabelecer plantações florestais, a utilização de mudas de qualidade é um dos aspectos mais importantes para garantir o sucesso dos plantios. Portanto é essencial produzir mudas com características para resistir às condições adversas encontradas nas áreas dos reflorestamentos e com crescimento satisfatório. O plantio de mudas clonais é um fator fundamental para a eficiência e viabilidade econômica do setor florestal brasileiro, pois permite a preservação de genótipos que possuem alto rendimento e a homogeneidade das áreas plantadas.

O sistema de clonagem é feito por enraizamento de miniestacas a partir de matrizes localizadas em mini jardins clonais. A miniestaquia é uma variação da técnica de estaquia e foi desenvolvida a partir da década de 1990 para o eucalipto (XAVIER et al. 2013). De maneira geral, é similar à estaquia convencional, porém apresenta variações metodológicas para otimizar o enraizamento e a qualidade da muda clonal, principalmente de clones com maior dificuldade de enraizamento (XAVIER et al. 2013; WENDLING E DUTRA, 2017). Segundo Xavier e Wendling (1998), a alternativa da miniestaquia em substituição à microestaquia pode ser considerada uma boa estratégia, uma vez que não necessita de estruturas de laboratório de cultura de tecidos, reduzindo, portanto, os custos na produção das mudas. Entretanto existem diversos fatores limitantes para a produção de mini estacas, entre eles, a ocorrência de doenças como o oídio.

Oídio em eucalipto

O Oídio em eucalipto é uma doença cosmopolita, sendo o primeiro relato no Brasil em 1936, parasitando diversas espécies do gênero *Eucalyptus* (GRILLO, 1936). Seu agente etiológico foi determinado a partir de características morfológicas da fase anamórfica como *Oidium eucalypti* Rostrup ou *Oidium* spp. (MUCCI et al., 1980). Em plantas infectadas, é possível observar os sinais do patógeno na superfície adaxial da folha, apresentando micélio pulverulento, de crescimento esbranquiçado (ROBERTS e BOOTHROYD, 1975; ALEXOPOULOS, 1996).

Esse fungo é biotrófico e utiliza haustórios para retirar os nutrientes da célula do hospedeiro, reduzindo a fotossíntese, aumentando a respiração e a transpiração, e conseqüentemente diminuindo a produtividade do hospedeiro (AGRIOS, 1998). A planta pode apresentar como sintomas o encarquilhamento foliar e o superbrotamento

(FERREIRA, 1997), e a mortalidade das mudas no viveiro pode atingir até 50% (MUCCI et al., 1980). A disseminação ocorre entre o contato de plantas doentes e sadias, vento e respingos de chuva. Apesar de ser disseminado por meio da água, a presença dessa nas folhas do hospedeiro impede a germinação dos conídios do patógeno. Portanto, a incidência desse patógeno é maior em épocas de estiagem (CAIAFA, 2014). No Brasil, a doença é considerada de grande importância econômica em estufas e mini jardins clonais, pois as condições encontradas nesses locais os tornam ambientes adequados para a infecção desse fungo (BROWN et al., 2000; SILVA et al., 2003).

Apesar de ser um fator limitante para produzir mudas de eucalipto em algumas regiões do Brasil, o principal controle utilizado é o químico. No entanto, o uso contínuo de fungicidas induz a seleção de isolados resistentes (REIMANN e DEISING, 2000; DIANZ et al., 2002). Por isso muitos trabalhos têm estudado a associação de doses mais baixas de fungicidas com potenciais produtos alternativos, como no caso de Barbosa (2015), que utilizou o fungicida tebuconazole + trifloxistrobim $1,0\text{mL L}^{-1}$ e o extrato de *Gingko biloba* no controle de Oídio em mudas de eucalipto, reduzindo em 100% e 70,80%, respectivamente, a severidade do *Oidium* sp.

Influência das variáveis ambientais no crescimento do patógeno

O progresso de doenças de plantas está relacionado a três fatores, o patógeno, o hospedeiro e o ambiente (CAMPBELL e MADDEN, 1990). Assim, o ambiente desempenha papel determinante para o progresso da doença, pois influencia os demais fatores. As variáveis ambientais determinam a maior ou menor taxa de progresso da incidência e da severidade da doença, interferindo na infecção, colonização, esporulação, sobrevivência do patógeno e nos processos fisiológicos do hospedeiro (VALE et al., 2004). Dentre os fatores ambientais correlacionados com o progresso de doenças, destacam-se as variáveis microclimáticas ou meteorológicas, sendo as mais frequentes, a temperatura, a umidade e a luminosidade (COLHOUN, 1973), contudo cada patógeno é influenciado de maneira específica.

Apesar da importância do Oídio em mini jardins clonais em eucalipto, há pouca informação disponível referente às variáveis climáticas favoráveis ao seu progresso. Portanto, estudar um patossistema, sob condições controladas, permite avaliar o efeito da temperatura, da luminosidade e da umidade no progresso da doença. Além disso, essa informação é útil no âmbito acadêmico, para determinar condições ideais para inoculações artificiais de patógenos, visando à condução de experimentos científicos.

Em relação ao Oídio do eucalipto, também pouco se sabe sobre as condições ideais de temperatura para o progresso da doença. Cabel (2014) observou redução da incidência de *Oidium eucalypti* quando ocorreu o aumento da temperatura do ar (25°C).

Desse modo, é importante estudar a influência da interação da umidade, temperatura e fotoperíodo na severidade do Oídio em eucalipto, para assim prever em quais situações a doença pode iniciar o processo infeccioso em minijardins clonais e ajudar na tomada de decisão para o manejo da doença.

Distribuição espaço-temporal de doenças de plantas

Conhecer as características temporais e espaciais de uma epidemia ajuda a entender a estrutura e o comportamento do patossistema (VALE et al., 2004). A origem e a quantidade do inóculo inicial, as formas de disseminação do patógeno e as variáveis climáticas e ambientais influenciam o progresso espaço temporal da doença.

A epidemia ocorre quando a incidência da doença no número de plantas aumenta num determinado tempo (BERGAMIN FILHO e AMORIM,1996). Para entender a dinâmica de epidemias de doenças é importante analisar os efeitos da doença e quantificar as variáveis (VALE et al., 2004), por isso é comum empregar modelos estatísticos para descrever esses fenômenos (CAMPBELL e MADDEN, 1990). VanderPlank (1963) quantificou doenças utilizando a taxa de progresso (r), o inóculo (y_0), a intensidade máxima e final da doença, demonstrando como valores de parâmetros estimados e variáveis calculadas estatisticamente poderiam contribuir na comparação de táticas de manejo. Atualmente o estudo do progresso de doenças é feito utilizando modelos empíricos, e a escolha do melhor modelo é feita analisando o coeficiente de determinação ajustado da análise de regressão (R^2), o valor do quadrado médio dos desvios e o gráfico dos resíduos padronizados em função da variável dependente (CAMPBELL; MADDEN, 1990).

Outro aspecto das epidemias está associado à dinâmica espacial. Os mecanismos de dispersão do patógeno podem determinar a dispersão espacial do inóculo e o padrão espacial da doença (MCCARTNEY e FITT, 1998). A análise de padrões espaciais pode fornecer informações sobre o processo ecológico do patógeno e descrever sua dinâmica populacional (UPTON e FINGLETON, 1985). O conhecimento dessas informações pode ajudar na elaboração de metodologias de amostragem, monitoramento do patógeno e

manejo racional de doenças (HUGHES e GOTTWALD, 1999; RISTAINO e GUMPertz, 2000).

De acordo com Madden et al. (2007), o padrão espacial pode ser classificado em três tipos, aleatório, regular e agregado. No padrão aleatório todos os hospedeiros da área estudada têm a mesma probabilidade de ser infectado por propágulos do patógeno, sendo comum para patógenos dispersos por vento. No padrão agregado a probabilidade de plantas próximas à fonte de inóculo ser infectada é maior. Esse padrão é frequentemente observado para patógenos dispersos a curtas distâncias por respingos de chuva. O padrão regular ocorre de forma uniforme na área e não é considerado fenômeno natural.

O cálculo do progresso da doença no espaço pode ser feito com análises estatísticas descritivas de quadrats, testes de run e doublet, índice VM (variância/média) e lei de Taylor (BERGAMIN FILHO et al., 2004; CAMPBELL e MADDEN, 1990). Apesar de descrever de maneira eficiente a dinâmica e a estrutura de focos da doença, esses métodos não consideram a dependência espacial entre a intensidade da doença no ponto amostrado e seu ponto vizinho. Portanto é necessário empregar metodologias estatísticas capazes de representar a dependência espacial (SILVA et al., 2000).

Atualmente, uma das ferramentas mais utilizadas para evidenciar a relação entre variáveis do experimento e pontos amostrados no espaço é a Geoestatística. Essa análise permite comparar mudanças na distribuição espacial de doenças (GAVASSONI et al., 2001). Basicamente, a Geoestatística compreende três etapas, sendo elas, a verificação de estrutura de dependência espacial, via análise gráfica do semivariograma experimental, o ajuste de modelos teóricos ao semivariograma experimental e a krigagem dos dados (MARAVELLA, 1996).

O semivariograma determina a continuidade espacial para todas as distâncias (h) significativas. De acordo com Isaaks e Srivastava (1989), quanto maior distância (h) entre os pontos maior a variância $\gamma(h)$, esses valores aumentam até um valor máximo no qual se estabiliza. Quando $\gamma(h)$ se estabiliza é chamado de patamar ($C_0 + C$). A distância na qual $\gamma(h)$ atinge o patamar é chamada alcance, a partir dessa distância não ocorre mais a dependência espacial. Assim, as amostras cujas distâncias têm valores abaixo do valor do alcance estão correlacionadas. O efeito pepita pode interferir na análise estatística, esse parâmetro reflete o erro analítico, ele aponta variabilidade não explicada de um ponto para o outro, devido tanto a erros cometidos na avaliação ou a microvariação devido a distância mínima amostrada (CAMBARDELLA et al., 1994).

Após ajustar o modelo é feita a krigagem. Essa utiliza informações a partir do semivariograma para interpolar os pontos desconhecidos, utilizando os valores conhecidos. Também pode ser compreendida como técnicas de análise de regressão, buscando minimizar a $\gamma(h)$ a partir do modelo ajustado, e leva em consideração a dependência estocástica entre os pontos amostrados (LANDIM, 2003; STURARO, 2002). Os métodos mais utilizados de krigagem são a simples e a ordinária. A krigagem simples é empregada quando a média adotada é estatisticamente constante para toda a área, já a krigagem ordinária considera a média flutuante por toda a área.

Para o eucalipto, não foram encontrados trabalhos com análises espaço temporais em viveiros. Porém, no campo, Fernandes (2012) realizou o estudo temporal em plantios clonais da murcha de *Ceratocystis*, causado por fungo *Ceratocystis fimbriata*, patógeno típico de xilema secundário. A incidência da doença foi monitorada no período de 2005 a 2011, em 3 municípios de Minas Gerais, sendo o modelo monomolecular o de melhor ajuste, com coeficiente de regressão superior a 90%.

Fernandes (2012), fez análise geoestatística da murcha de *Ceratocystis* em eucalipto, e ajustou o modelo Exponencial e Esférico para parcelas em quatro fazendas diferentes. A murcha de *Ceratocystis* ocorreu de forma agregada e a dependência espacial ocorreu até 11,70 m do foco da doença. Alves et al. (2006) aplicou a geoestatística para caracterizar o progresso espaço-temporal da severidade da antracnose do feijoeiro e da ramulose do algodoeiro e ajustou os modelos de semivariograma isotrópicos esféricos e gaussianos para os dados observados, a doença tem padrão de distribuição agregado e há dependência espacial para ambos patossistemas. A análise da distribuição espacial para dispersão do Huanglongbing dos citros em São Paulo verificou raio de agregação da doença de 300 a 560 m, indicando distribuição agregada da doença, os mapas de krigagem mostraram o foco inicial ocorrendo nos limites da fazenda, com expansão do greening por toda a área (LEAL et al., 2010).

Nutrição de plantas

A fim de controlar as doenças das plantas cultiváveis, nos últimos anos tem sido implementado o uso de variedades resistentes como medida de longo prazo. No entanto, a introdução desses materiais nas lavouras ainda é lenta e muitas das áreas plantadas no Brasil ainda apresentam cultivares suscetíveis, geralmente em monocultura e a pleno sol. Portanto, o uso de fungicidas a curto e médio prazo continua sendo o principal método de controle de doenças em diferentes culturas. Fungicidas protetores à base e os sistêmicos

são aplicados em campo (POZZA et al., 2010). Tanto o manejo fitossanitário quanto o de cultivos, a mecanização, a irrigação, o manejo do solo e a fertilização conferem à agricultura nacional alta produtividade.

A agricultura brasileira é uma das mais exigentes em relação à sustentabilidade social e ambiental. Assim, a exigência de redução do uso de agroquímicos deve ser seguida de acordo com a legislação ambiental e trabalhista, visando preservar florestas e a fauna nativa, o controle da erosão do solo, bem como a proteção dos recursos hídricos, trabalhadores e consumidores.

Até que cultivares suscetíveis sejam substituídas por cultivares resistentes, uma alternativa para reduzir o uso de fungicidas é o controle cultural, como podas para modificar o microclima do dossel, uso racional da água de irrigação e fornecimento de nutrientes em equilíbrio. A adubação correta e balanceada, além de essencial para o crescimento e desenvolvimento das plantas, é considerada como o componente primário para a expressão completa da resistência genética das plantas e, assim, constituem suas barreiras de resistência (HUBER e HANEKLAUS, 2007).

Para ilustrar a importância da nutrição equilibrada das plantas, cita-se o nutriente cobre (Cu) e suas funções. Esse nutriente é componente da oxidase do ácido ascórbico, tirosinase, monoamina oxidase, uricase, citocromo oxidase, fenolase, lacase e plastocianina. Além de nutrir a planta, o Cu tem sido amplamente utilizado como fungicida. A quantidade necessária, neste caso, é muito maior em comparação com a exigência nutricional para a planta. A ação do Cu como fungicida baseia-se na aplicação direta na superfície da planta e do fungo em questão. Nas plantas deficientes em nutrientes, observa-se redução na síntese de compostos de defesa, acúmulo de carboidratos solúveis e redução da lignificação nas plantas deficientes desse nutriente, o que contribui para a redução da resistência das plantas a doenças (TAIZ e ZEIGER, 2013).

Outro nutriente, o zinco, pode contribuir para a tolerância da planta a fatores de estresse abiótico, desencadeando mecanismos de defesa por meio da ativação e regulação de genes (CAKMAK, 2000). Mas a aplicação de Zn também reduz a gravidade de doenças causadas por agentes bióticos devido ao seu efeito ser tóxico ao contato direto com patógenos ao invés de ser mediado nas reações metabólicas das plantas (GRAHAM e WEBB, 1991). As plantas absorvem zinco na forma bivalente (Zn^{2+}) (BROADLEY et al., 2012). O Zn está envolvido no metabolismo de carboidratos, manutenção da integridade da parede celular, síntese de proteínas, regulação da síntese de auxinas,

formação de pólen, além de contribuir para a respiração, fotossíntese, formação de clorofila, etc. (SAMANT, 2009). O uso de sulfato de zinco no manejo da goma de pêssego causada por *Lasiodiplodia theobromae* inibiu o crescimento micelial desse fungo e causou a formação de hifas anormais e inchaço da ponta (LI et al., 2016). A quitina é o principal polissacarídeo da parede celular. A morfologia anormal das hifas na presença de Zn pode ser causada pela deposição de quitina como verificado por Lanfranco et al. (2002). O modo de ação do sulfato de zinco contra o fungo *L. theobromae* foi estudado por Lew (2011). Os íons Zn na concentração de 50 mM rompem a pressão hidrostática interna da célula e inibem o alongamento das pontas das hifas fúngicas. Assim, a utilização desses nutrientes combinados com tecnologias como nanopartículas podem trazer diversos benefícios para a agricultura.

Aplicabilidade de Nanopartículas na agricultura

Nanopartículas podem ser definidas como partículas intencionalmente produzidas com características de dimensão entre 1 e 100 nm e com propriedades únicas, não compartilhadas por partículas maiores com mesma composição (AUFFAN et al., 2009). Vários materiais são usados para produzir nanopartículas, entre eles, os óxidos metálicos, as cerâmicas, os materiais magnéticos, os semicondutores, os pontos quânticos, lipídios, polímeros sintéticos e naturais, dendrímeros e emulsões (PUOCI et al., 2008). As aplicações das nanopartículas na agricultura incluem a proteção e a nutrição de plantas, pois sua absorção aumenta o crescimento e melhora as funções metabólicas dos vegetais. Assim a resposta do hospedeiro ao patógeno pode ser afetada (MARSCHNER, 2012).

Devido ao seu promissor papel na defesa de plantas, algumas nanopartículas foram estudadas, como Ag (ALI et al., 2015; LAMSAL et al., 2011; GAJBHIYE et al., 2009; JO et al., 2009), Si (SURIYAPRABHA et al., 2014), Cu (ELMER e WHITE, 2016; SERVIN et al., 2015; GIANNOUSI et al., 2013; WANG et al., 2012), Ti (PARET et al., 2015), Mn (ELMER e WHITE, 2016), Zn (GRAHAM et al., 2016; DIMPKA et al., 2013). Graham et al. (2016) realizou experimento utilizando a nanopartícula ZnO em plantas infectadas com cancro citrico, observando a redução da lesão em plantas doentes quando comparadas com as testemunhas. Além disso, o autor constatou a redução do cancro e da melanose (*Diaporthe citri*) em videira e da verrugose do citrus (*Elsinoe fawcetti*) utilizando ZnO e CuO, não ocorrendo fitotoxidez na planta.

Micronutrientes como o Cu, Mn e o Zn, são importantes para a proteção das plantas contra doenças na raiz, entretanto a aplicação foliar desses não é bem translocada. Além disso, aplicações no solo são ineficazes devido à baixa disponibilidade de nutrientes em pH neutro. Assim o uso de nanopartículas de micronutrientes para nutrir as raízes de plantas doentes tem grande potencial. Em casa de vegetação Elmer e White (2016) pulverizaram seis nanopartículas (AlO, CuO, FeO, MnO, NiO e ZnO) em folhas de tomateiro, crescidos sem solo e infestadas por *Fusarium* sp. e observaram a redução da área sob a curva de progresso da doença (AACPD) em 31%, 28% ou 28%, quando utilizaram as nanopartículas CuO, MnO e ZnO, respectivamente. Já para plantas infectadas por *Verticilium* sp. tratadas com CuO, ocorreu aumento de 64% no peso fresco, redução de 69% na AACPD, e teve 32% mais Cu nas raízes.

A prata é outra nanopartícula com alta atividade antimicrobiana, por isso pode ser utilizada para esterilização. Young-Ki Jo (2009) estudou várias formas de íons de prata e nanopartículas para examinar a atividade antifúngica contra dois fungos patogênicos para plantas, *Bipolaris sorokiniana* e *Magnaporthe grisea*. Os ensaios *in vitro* indicaram efeito significativo na redução de colônias desses dois patógenos. Os autores também inocularam os dois patógenos em *Lolium perenne* e confirmaram a redução das duas doenças quando aplicado 3 horas antes da inoculação a prata iônica e a nanopartícula. Desse modo, a eficácia de íons e nanopartículas de prata na planta é muito maior com a aplicação preventiva, promovendo o contato direto da prata com esporos e tubos germinativos inibindo sua viabilidade. Ocoy (2013) desenvolveu nanopartículas de prata dirigidas por DNA e cultivadas em óxido de grafeno. Estes compostos diminuem eficazmente a viabilidade celular de *Xanthomonas perforans* em cultura e em plantas. Em concentrações de 16 ppm apresentaram excelente capacidade antibacteriana em cultura, com vantagens significativas na melhoria da estabilidade, maior atividade antibacteriana e propriedades de adsorção mais fortes.

REFERÊNCIAS

- AGRIOS GN (1998) Plant Pathology. 3th ed. San Diego. Academic. 1998.
- BARCELOS. E.. PACHECO. A. R.. MÜLLER. A. A.. VIEGAS. I.. e TINOCO. P. B. (1987). Dendê: informações básicas para seu cultivo. Embrapa Amazônia Oriental- Documentos
- WANG W, VIGNANI R, SCALI M, CRESTI M. A universal and rapid protocol for protein extraction from recalcitrant plant tissues for proteomic analysis. Electrophoresis. 2006;27(13):2782–6. DOI: 10.1002/elps.200500722
- AGROPALMA. (2002) Óleo de palma: um produto natural. Documento interno. Controle de Qualidade Industrial, 14.
- ALVAREZ, E. e CLAROZ, J. L. (2002). Caracterización molecular y clasificación de fitoplasmas asociados com la palma de aceite. In: CONGRESO NACIONAL DE FITOPALOGÍA, 23, Bogotá. Ascolfi,
- ALVES MC, POZZA EA, MACHADO JC, ARAÚJO DV, TALAMINI V, OLIVEIRA MS (2006) Geoestatística como metodologia para estudar a dinâmica espaço-temporal de doenças associadas a Colletotrichum spp. transmitidos por sementes. Fitopatologia Brasileira 31:557-563.
- ASSIS COSTA, O. Y.; TUPINAMBÁ, D. D.; BERGMANN, J. C.; BARRETO, C. C.; QUIRINO, B. F. (2018). Fungal diversity in oil palm leaves showing symptoms of Fatal Yellowing disease. PloS one, 13, e0191884.
- AUFFAN, M, ROSE J, BOTTERO JY, LOWRY GV, JOLIVET JP, WIESNER MR (2009). Towards a definition of inorganic nanoparticles from an environmental, health and safety perspective. Nature nanotechnology 4:10- 634.
- AYALA, L. S. (2001). Pesquisa sobre amarelecimento fatal do dendezeiro. Belém, PA, v. 1, 319.
- BARBOSA MA (2015) Tecnologia de aplicação de produtos alternativos no controle de Oidium ssp. em eucalipto. Dissertação de Mestrado.
- BARCELOS, E. (2015). Pesquisa, desenvolvimento, inovação e ATER na dendecultura. In: I Workshop do programa de produção sustentável da palma de óleo no Brasil, Bele´m, Brazil; February.
- BASTOS, T. X.; MÜLLER, A. A.; PACHECO, N. A. (2001). Zoneamento de riscos climáticos para a cultura do dendezeiro no estado do Pará. Revista Brasileira de Agrometeorologia, v.9, 564-570.
- BERGAMIN FILHO A, HAU B, AMORIM L, LARANJEIRA FF (2002) Análise espacial de epidemias. Rev A Pat Plantas 10:155-218
- BERGAMIN FILHO, A.; AMORIM, L.; LARANJEIRA, F. F.; BERGER, R. D.; HAU, B. (1998). Análise temporal do amarelecimento fatal do dendezeiro como ferramenta para elucidar sua etiologia. Fitopatologia Brasileira, v. 23, 391-396.

- BERNARDES, M. S. R. (2001). Relatório de visitas à plantação de Paricatuba, na Denpasa, visando a identificação das causas do AF Pesquisa sobre amarelecimento fatal. Belém, PA.
- BOARI, A. de J. (2008). Estudos realizados sobre o amarelecimento fatal do dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.) no Brasil. Embrapa Amazônia Oriental-Documents (INFOTECA-E).
- BRIOSO, P. S. T. e MONTANO, H. G. (2003). Fitoplasma do grupo 16S rRNA I associado ao amarelecimento fatal de *Elaeis guineensis*. In: CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA, 26. Araras, SP.
- BROWN BN, FERREIRA FA (2000) Diseases during propagation of eucalypts. In: KEANE, P.J. et al. Diseases and pathogens of eucalypts. Collingwood: CSIRO. 119-151.
- CABEL, Sandra Regina. Relações entre condições meteorológicas com a ministaquia e a incidência de doenças bióticas em viveiro clonal de eucalipto no sul do Brasil. 2014. Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Engenharia Florestal.
- CAIAFA, Karine Fernandes et al. Silício na produção, enraizamento e severidade de oídio em miniestacas de eucalipto. 2014. Mestrado ufu
- CAMBARDELLA CA (1994) Field-scale variability of soil properties in Central Iowa soils. *Soil Science of America Journal* 58:1501-1511
- CAMPBELL, C. L. e MADDEN, L. V. (1990). Introduction to Plant Disease Epidemiology. New York, NY, John Wiley, p. 560.
- COLHOUN J (1973). Effects of environmental factors on plant disease. *Annual Review of Phytopathology* 11:343-364.
- CORLEY, R. H. V. e TINKER, P. B. H. (2003) The oil palm. Blackwell Science Ltd. 4ª ed. Oxford.
- CORLEY, R.H. V. e TINKER, P. B. H. (2015). Diseases of the oil palm. The Oil Palm. 5th ed. Oxford: Wiley-Blackwell.
- DE FRANQUEVILLE, H. (2003) Oil palm bud rot in Latin America. *Exp Agric*; 39, 225–40.
- Dhineshbabu, N. R., Karunakaran, G., Suriyaprabha, R., Manivasakan, P., & Rajendran, V. (2014). Electrospun MgO/Nylon 6 hybrid nanofibers for protective clothing. *Nano-Micro Letters*, 6(1), 46-54.
- DIANEZ F, SANTOS M, BLANCO R, TELLO JC (2002). Fungicide resistance in *Botrytis cinerea* isolates from strawberry crops in Huelva (southwestern Spain). *Phytoparasitica*, 30:5- 529.
- DOMSCH K (1953) ber den Einfluss photoperiodische Behandlung auf die Befallsintensität beim Gerstenmehltau. *Arch. Mikrobiol* 19: 287-318.

DOS SANTOS SAMPAIO, F., & DA SILVA MAZZOCHIN, M. (2010). Espacialidade da economia: inovação e estratégias espaciais no setor de base florestal brasileiro. *Raega-O Espaço Geográfico em Análise*, 20.

ELMER WH, WHITE JC (2016) The use of metallic oxide nanoparticles to enhance growth of tomatoes and eggplants in disease infested soil or soilless medium. *Environmental Science: Nano* 3:1072-1079.

ESPINDOLA, S. M. C. G.; CAVALCANTE, A. K.; GONÇALVES, D. A. R. (2008). Avaliação do teor de óleos e da produtividade em linhagens de soja para cultivo no Cerrado. In: IX Simpósio Nacional Cerrado e II Simpósio Internacional Savanas Tropicais. Anais... Embrapa Brasília-DF. CD-ROM 1.

FERNANDES BV. Dinâmica espaço-temporal e quantificação dos danos e perdas da murcha de *Ceratocystis* em eucalipto na produção de carvão vegetal. 2012. Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrônômicas da UNESP

FERRAZ, L. C. C. B. (2001). Relatório final - Apoio técnico na especialidade de nematologia de plantas. In: DENPASA. Pesquisa sobre amarelecimento fatal. Belém, PA.

FERREIRA FA (1997) A cultura do eucalipto II. Enfermidades do eucalipto no Brasil. Doenças em viveiros de eucalipto. *Informe Agropecuário* 18:5-19.

FURUMO. P. R. E AIDE. T. M. (2017). Characterizing commercial oil palm expansion in Latin America: land use change and trade. *Environmental Research Letters*. 12(2). 024008.

GAJBHIYE M, KESHARWANI J, INGLE A, GADE A, RAI M (2009) Fungus-mediated synthesis of silver nanoparticles and their activity against pathogenic fungi in combination with fluconazole. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* 5: 382-386.

GRAHAM JH, JOHNSON EG, MYERS ME, YOUNG M, RAJASEKARAN P, DAS S, SANTRA S (2016) Potential of Nano-formulated zinc oxide for control of citrus canker on grapefruit trees. *Plant disease*, 100: 2442-2447.

GRILLO HVS (1936) Lista preliminar dos fungos assinalados em plantas do Brasil. *Rodriguesia* 2: 39-96.

HENKES. J. A.. and LEBID. T. (2015). Óleo de dendê na produção de biodiesel: um estudo de caso das vantagens e desvantagens econômica, ecológica e social da cultura desta oleaginosa para a produção de biodiesel. *Revista Gestão & Sustentabilidade Ambiental*. 4(1). 416-447.

INDEXMUNDI (2017). Palm oil Monthly Price Commod. Prices—Price Charts, Data, News 1–9 (www.indexmundi.com/commodities/?commodity=palm-oil&months=360)

INDÚSTRIA BRASILEIRA DE ÁRVORES (2017) Relatório IBÁ 2020.

INDÚSTRIA BRASILEIRA DE ÁRVORES (2017) Relatório IBÁ 2021.

ISSAKS EH, SRIVASTAVA RM (1989) An introduction to applied geostatistic. New York: Oxford University Press.

- JO YK, KIM BH, JUNG G (2009) Antifungal activity of silver ions and nanoparticles on phytopathogenic fungi. *Plant Disease* 93:1037-1043.
- JO, Y. K., KIM, B. H., & JUNG, G. (2009). Antifungal activity of silver ions and nanoparticles on phytopathogenic fungi. *Plant disease*, 93(10), 1037-1043.
- JOURDAN, C. e REY, H. (1997). Modelling and simulation of the architecture and development of the oil-palm (t *Elaeis guineensis* Jacq.) root system. *Plant and soil*, 190, 217-233.
- KASTELEIN, R. A. e VAN BATTUM, R. (1990). The relationship between body weight and morphological measurements in harbour porpoises (*Phocoena phocoena*) from the North Sea. *Aquat Mamm*, 16, 48-52.
- LAMSAL K, KIM SW, JUNG JH, KIM YS, KIM KS, LEE YS (2011) Inhibition effects of silver nanoparticles against powdery mildews on cucumber and pumpkin. *Mycobiology* 39: 26-32.
- LANDIM PMB (2003) Análise estatística de dados geológicos. Ed. UNESP 2:253 p.
- LANDIM, P. M. B., & STURARO, J. R. (2002). Krigagem indicativa aplicada à elaboração de mapas probabilísticos de riscos. DGA, IGCE, UNESP/Rio Claro, Lab. Geomatémática, Texto Didático, 6(2002.19).
- LARANJEIRA, F. F.; BERGAMIN FILHO, A.; AMORIM L.; BERGER, R. D.; HAU, B. (1998). Análise espacial do amarelecimento fatal do dendezeiro como ferramenta para elucidar sua etiologia. *Fitopatologia Brasileira*, v. 23, n. 3, p. 397- 403.
- LEAL RM (2010) Distribuição espacial de Huanglongbing (Greening) em citrus utilizando a geoestatística. *Revista Brasileira Fruticultura* 32: 808-818.
- LODY, R. G. da M. (2009). Dendê: símbolo e sabor da Bahia. Editora Senac São Paulo, 149.
- MADDEN LV, HUGHES G, VAN DEN BOSCH F (2007) The study of plant disease epidemics. American Phytopathological Society St Paul, MN.
- MAPA. Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas>>. Acesso em: 20 Out. 2018.
- MARTINS, A. N. (2001). Relatório referente às análises microbiológicas realizadas em amostras de raízes de dendezeiros com e sem sintomas de amarelecimento fatal, provenientes de plantios da Denpasa, Pará. In: DENPASA. Pesquisa sobre amarelecimento fatal. Belém, PA, 2001.
- MDA. Ministério de Desenvolvimento Agrário. Viabilidade de extração de óleo de dendê no Estado do Pará. Texto para revisão e crítica. UFV, Viçosa-MG, 2007.
- MUCCI ESF, PITTA GPS, YOKOMIZO NKS (1980) O Oídio em Mudanças de Eucalipto. São Paulo. Instituto Florestal/Instituto Biológico.
- MÜLLER, A. A. (1980). A cultura do dendê. Embrapa Amazônia Oriental-Séries anteriores (INFOTECA-E).

- MULLER, A. A. e ALVES, R. M. (1998). Avaliação de materiais genéticos de dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.) no Estado do Pará: uma alternativa de solução para o amarelecimento fatal. Belém, PA: Embrapa CPATU. (Embrapa CPATU. Pesquisa em Andamento, 174). 5 p.
- NUNES, A. S. (2009). A Utilização da Geologia na Identificação dos Hábitats mais adequados para o Estabelecimento de Áreas Marinhas Protegidas na Costa do Dendê, Bahia, Brasil.
- NUNES, C. F.; PASQUAL, M.; SANTOS, D. N.; CUSTÓDIO, T. N.; ARAUJO, A. G. (2008). Diferentes suplementos no cultivo in vitro de embriões de pinhão-mansão. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v.43, n.1, p.9-14.
- OCSOY I, PARET ML, OCSOY MA, KUNWAR S, CHEN T, YOU M, TAN W (2013) Nanotechnology in plant disease management: DNA-directed silver nanoparticles on graphene oxide as an antibacterial against *Xanthomonas perforans*. *Acs Nano* 7: 8972-8980.
- OCSOY, I., PARET, M. L., OCSOY, M. A., KUNWAR, S., CHEN, T., YOU, M., & TAN, W. (2013). Nanotechnology in plant disease management: DNA-directed silver nanoparticles on graphene oxide as an antibacterial against *Xanthomonas perforans*. *Acs Nano*, 7(10), 8972-8980.
- ONG, H. C., MAHLIA, T. M. I., MASJUKI, H. H., & HONNERY, D. (2012). Life cycle cost and sensitivity analysis of palm biodiesel production. *Fuel*, 98, 131-139.
- PARENT, C.; BERGER, A.; FOLZER, H.; DAT, J.; CREVECOEUR, M. (2008). A novel non symbiotic hemoglobin from oak: cellular and tissue specificity of gene expression. *New Phytol* 177(1): 142-154.
- PARENTE, C. (2003). Construção social das competências profissionais: dois estudos de caso em empresas multinacionais do sector metalomecânico.
- PIRKER J. MOSNIER A. KRAXNER F. HAVLÍK P AND OBERSTEINER M (2016) What are the limits to oil palm expansion? *Glob. Environ. Change* 40 73–81
- PIRKER, J., MOSNIER, A., KRAXNER, F., HAVLÍK, P., & OBERSTEINER, M. (2016). What are the limits to oil palm expansion?. *Global Environmental Change*, 40, 73-81.
- POKU, K. (2002) Small-scale palm oil processing in Africa. *FAO Agricultural Services Bulletin*, 148.
- POKU, K. (2002). Small-scale palm oil processing in Africa (Vol. 148). *Food & Agriculture Org.*.
- POZZA, A.A.A.; ALVES, E.; POZZA, E.A.; CARVALHO, J.G. DE; MONTANARI, M.; GUIMARÃES, P.T.G.; SANTOS, D.M. Efeito do silício no controle da cercosporiose em três variedades de cafeeiro. *Fitopatologia Brasileira*, v.29, n.2, p.185-188, 2012.
- PUOCI F, LEMMA F, SPIZZIRRI UG, CIRILLO G, CURCIO M, PICCI N (2008) Polymer in agriculture: a review. *Am. J. Agri. Biol. Sci.* 3:299–314.
- PUOCI, F., IEMMA, F., SPIZZIRRI, U. G., CIRILLO, G., CURCIO, M., & PICCI, N. (2008). Polymer in agriculture: a review. *American Journal of Agricultural and Biological Sciences*, 3(1), 299-314.

RAMALHO FILHO, A., MOTTA, P. D., FREITAS, P. D., & TEIXEIRA, W. G. (2010). Zoneamento agroecológico, produção e manejo para a cultura da palma de óleo na Amazônia. Rio de Janeiro: Embrapa Solos.

RAMALHO FILHO, A.; DA MOTTA, P. E. F.; FREITAS, P. L.; TEIXEIRA W G (2010). Zoneamento Agroecológico, Produção e Manejo para a Cultura da Palma de Oleo na Amazônia (http://www.cnps.embrapa.br/zoneamento_dende/ZonDende.pdf)

REIMANN S, DEISING HB (2000) Fungicides: risks of resistance development and search for new targets. Archives of Phytopathology and Plant Protection 33:329-349.

REIMANN, S., & DEISING, H. B. (2000). Fungicides: risks of resistance development and search for new targets. Archives of Phytopathology and Plant Protection, 33(4), 329-349.

RIOS, S. D. A.; DA CUNHA, R. N. V.; LOPES, R.; DA SILVA, E. B. (2012). Recursos genéticos de palma de óleo (*Elaeis guineensis* Jacq.) e caiuaé (*Elaeis oleifera* (HBK) Cortes). Embrapa Amazônia Ocidental-Documentos (INFOTECA-E).

RISTAINO, J. B., & GUMPERTZ, M. L. (2000). New frontiers in the study of dispersal and spatial analysis of epidemics caused by species in the genus *Phytophthora*. Annual Review of Phytopathology, 38(1), 541-576.

ROBERTS, D.A. AND C.W. BOOTHROYD. 1975. Fundamentals of plant pathology. W.H. Freeman and Company. pp. 107 – 113.

SAMBANTHAMURTHI, R., SUNDRAM, K., & TAN, Y. (2000). Chemistry and biochemistry of palm oil. Progress in lipid research, 39(6), 507-558.

SAMBANTHAMURTHI, R.; SUNDRAM, K.; TAN, Y. A. (2000). Chemistry and biochemistry of palm oil. Progress in Lipid Research, v.39, n.6, p.507-558.

SEAGRI - Secretaria da Agricultura. Irrigação e Reforma Agrária. Cultura de Dendê. 10.

SERVIN, A., ELMER, W., MUKHERJEE, A., LA TORRE-ROCHE, D., HAMDY, H., WHITE, J. C., ... & DIMKPA, C. (2015). A review of the use of engineered nanomaterials to suppress plant disease and enhance crop yield. Journal of Nanoparticle Research, 17(2), 1-21.

SILVA MDD (2001) Etiologia do oídio do eucalipto. Fitopatol. bras 26: 2.

SILVA MDD (2003) Germinação de conídios de *Sphaerotheca pannosa* obtidos de eucalipto. Fitopatol. bras.

SILVA. H. M. (1989) Relatório de avaliação dos trabalhos com amarelecimento fatal. Belém. PA: [s. n.]. 5 p.

SILVEIRA, R. I.; VEIGA, A. S.; RAMOS, E. J. A.; PARENTE, J. R. (2000). Evolução da sintomatologia do amarelecimento fatal a adubações com omissão de macro e micronutrientes. Belém, PA: Denpasa, 2000. 35 p.

SLUSZZ, T. e MACHADO, J. A. D. (2006). Características das potenciais culturas matérias-primas do biodiesel e sua adoção pela agricultura familiar. An. 6. Enc. Energ. Meio Rural.

SLUSZZ, T., & MACHADO, J. A. D. (2006). Características das potenciais culturas matérias-primas do biodiesel e sua adoção pela agricultura familiar. Proceedings of the 6. Encontro de Energia no Meio Rural.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. (2013) Fisiologia vegetal. 5. ed. Porto Alegre: Artmed. 954 p.

VALE FXR, ZAMBOLIM L (1997) Controle de doenças de plantas: grandes culturas. Suprema 2:1132.

VAN SLOBBE, W. G. (1988). Amarelecimento fatal na plantação de dendê na DENPASA - Brasil. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL SOBRE A SÍNDROME DA GUIA PODRE NO DENDEZEIRO, 1988, Paramaribo, Suriname.

VAN SLOBBE, W. G. e SOUZA, R. L. R. de. (1991) Amarillamiento fatal o pudrición de cogollo en Denpasa – Brasil. Revista Palmas, Santafé de Bogotá, Colombia, v. 12, n. 2, p.17-23.

VANderPLANK JVD (1963) Plant diseases: epidemics and control. Plant diseases: epidemics and control.

WANG, A. Z., LANGER, R., & FAROKHZAD, O. C. (2012). Nanoparticle delivery of cancer drugs. Annual review of medicine, 63, 185-198.

WENDLING, I., & DUTRA, L. F. (2017). Produção de mudas de eucalipto. Brasília: Embrapa Florestas.

XAVIER, A., SANTOS, G. A. D., WENDLING, I., & OLIVEIRA, M. L. D. (2003). Propagação vegetativa de cedro-rosa por miniestaquia. Revista Árvore, 27(2), 139-143.

XAVIER, A.; WENDLING, I.; SILVA, R. L. Silvicultura clonal: princípios e técnicas. Viçosa, MG: UFV, 2009. 272 p.

YOUNG-KI JO, KIM BH, JUNG G (2009) Antifungal activity of silver ions and nanoparticles on phytopathogenic

SEGUNDA PARTE – ARTIGO 1

Artigo de acordo com as normas da revista Scientific Reports

The Rain Forest Environment and Oil palm fatal Yellowing

Renata Cristina Martins Pereira^a, Edson Ampélio Pozza^{a*}, Núbia Maia e Sá^b, Antônio Eduardo Furtini Neto^c, Adélia Aziz Alexandre Pozza^c, Sidney Vasconcelos do Nascimento^b, Humberson Rocha Silva^a, Roberto Lisboa Cunha^d, Marcelo Murad Magalhães^d Rafael Borges Valadares^b

^a Department of Plant Pathology, Federal University of Lavras, Lavras, Minas Gerais Brazil;

^b Instituto Tecnológico Vale – Desenvolvimento Sustentável, Belém, Pará, Brazil;

^c Department of soil, Federal University of Lavras, Lavras, Minas Gerais Brazil;

^d Embrapa Amazônia Oriental, Belém Pará, Brazil

*Corresponding author e-mail: Edson Ampélio Pozza, edsonpozza@gmail.com

ABSTRACT

Oil palm produces the most consumed vegetable oil in the world. In addition to being economically viable and having multiple uses, the crop has a strong ecological appeal, given its high level of carbon sequestration, its low environmental impact, and a low mechanization level in the harvest process, generating income and financial sustainability for the inhabitants of that biome. However, despite the large areas suitable for cultivation in harmony with the forest in Brazil, oil palm production has been limited by a disease known as fatal yellowing (FY). In 30 years of research to determine the causal agent of this disease, many epidemiology studies with insects and plant pathogens have been performed, but there is no consensus on its cause. Abiotic factors have also started to be considered a possible cause of these symptoms. Therefore, to clarify the relationship of

this disease to environmental variables, we studied the nutritional status of the plant, the soil class and fertility, the climatic variables and attempted to verify the set of proteins with higher levels in diseased palms showing FY symptoms and healthy palms. FY occurred under constant rain and in clay soils; consequently, the roots of these palm trees suffered anoxia, which caused nutritional problems and the increase in levels of stress-related proteins. Under these conditions, the usually observed symptom was yellowing, which can lead to the death of the plant, giving the disease its name. In other words, the symptomatic picture is not associated with only a biotic cause. Thus, a pedological survey of the area, planting in soils not subject to waterlogging or with good drainage conditions, and the correct maintenance of soil fertility and plant nutrition may certainly contribute to the management and reduction of fatal yellowing without the use of agrochemicals.

Keywords: *Elaeis guineensis* Jacq.; Oil palm; Precipitation, Soil class, Proteomics

INTRODUCTION

The demand for vegetable oils is expected to reach 240 million tons by 2050¹. Therefore, to serve this market, the expansion of oilseed crops is necessary. *Elaeis guineensis* Jacq. is considered the plant with the greatest economic viability that can achieve this goal because of factors such as high productivity, environmental and social sustainability, low mechanization in the harvesting process, low production costs and the versatility of its products². Oil palm plantations have the highest oil production per unit area in the world. One hectare planted with this palm can supply 3.74 tons of oil, while other oilseeds, such as soybean (0.38 ton/ha) and sunflower (0.48 ton/ha), have lower productivity than this specie^{3,4}. Given this potential, its production increased by 16.5% from 2012 to 2014, and it represented 39% of all vegetable oils consumed worldwide³. The main countries responsible for supplying this demand for palm oil are Malaysia and Indonesia, representing 85% of the world market. Other countries such as Nigeria, Thailand, Colombia, Ecuador, and New Guinea together hold 6.6% of production^{2,5}. Currently, Brazil has low representation in this sector; however, the country has 31.8 million hectares of suitable soil, sustainable agriculture and an ideal climate for planting oil palm, making it the country with the greatest potential for its cultivation⁶. In the Legal Amazon, approximately 29 million hectares may be used to grow oil palm⁷. In contrast, only 78 thousand hectares are being explored for this crop⁸. Although this region has good

conditions for the cultivation of this palm, fatal yellowing (FY) limits its production and discourages producers from investing in planting this palm.

FY is considered the most important oil palm disease in Latin America, causing losses since 1967. In Pará, the largest Brazilian state producing palm oil, approximately 5,000 hectares have already been eradicated due to this disease, leading to hundreds of unemployed in the sector, as this crop uses intense labor in cultural practices and harvesting⁹. Its symptoms can be identified initially with the yellowing of the basal leaflets of the intermediate leaves, necrosis in its extremities, and their evolution to the total drought and death of the plant¹⁰. Although it is considered the largest phytosanitary problem of this palm, there is still no consensus on the causal agent of FY, making it difficult to implement measures for effective control¹¹.

Several attempts to identify the biotic causal agent of FY have been made in recent decades aiming to expand oil palm production in the country; however, they have failed in discovering the cause of FY. Among these studies, epidemiological studies were conducted addressing the spatial and temporal patterns of FY^{12, 13, 14}, not getting enough results to determine the etiology of the disease. According to these studies, the spatial distribution of this disease is variable. FY starts with linear growth in incidence over time, changing to exponential over the years. Thus, both in the temporal and spatial analysis performed by Bergamin Filho et al.¹² and Laranjeira et al.¹³, the progress of FY did not have a pattern consistent with those of other biotic diseases, and it is not possible to pinpoint a probable cause of the disease. In addition, recently, modern molecular fungal diversity techniques were used to attempt to identify and clarify the cause of the disease, and a specific etiologic agent for the origin of the disease was not found.¹⁵

Accordingly, some studies have turned to the abiotic origin of FY, focusing on soil fertility and physical properties. According to Silva¹⁶, the occurrence of FY coincided with soil patches with characteristics considered unsuitable for agriculture since they are subject to periodic flooding due to poor drainage. Hartley¹⁷ found that approximately 60% of the oil palm field soil in Pará State, Brazil, should be avoided due to the edaphic characteristics inadequate for the cultivation of the palm. The interaction of clay soils with poor rainfall distribution and heavy rainfall concentrated in the first months of the year increases the chances of flooding and high soil moisture.

In addition to soil classification and climatic conditions, the nutritional status of plants can also be associated with disease progress^{18, 19, 20}. Crops planted in soils with good fertility and plants with balanced nutrition have lower losses in productivity and a

lower incidence of diseases than crops planted in soils with nutritional limitations^{21, 22}. This is because mineral elements are involved in the defense mechanisms of the plant, being components of cells and the cell wall, enzymes, inhibitors and regulators of secondary metabolites, and their deficiency damages the defense system of the plant^{19, 23}. Therefore, nutritional balance can be just as important to disease control as adequate soil fertility conditions and environmental variables. As shown by Silva et al.²¹, the incidence of coffee brown eye spot is correlated with Ca and Mg imbalance and with the leaf nutrients B, K and P, as there was a higher occurrence of the disease in plants with lower levels of these nutrients in the leaves. The differences in the concentration of Ca and K in the healthy and diseased areas of coffee leaves were also demonstrated by Belan et al.²⁴. Another example of a mineral element linked to disease control is silicon (Si); although Si is necessary for only some plant species, it can help in the management of diseases, forming physical barriers, preventing the penetration and colonization of pathogens in the host and activating defense biochemical mechanisms^{25, 26, 27}.

Consequently, in the face of factors such as waterlogging and nutritional deficiencies, plants cannot maintain their metabolic activities, as the root system cannot properly metabolize energy and undergoes fermentation^{28, 29}. This anaerobic metabolism causes increased gene transcription of enzymes related to ethanol fermentation and increased production of carbohydrates to serve as substrates in this process³⁰. Thus, identifying molecular changes in these plants can help in identifying the origin of the disease.

Nascimento et al.³¹ conducted the first study to describe oil palm root protein changes associated with FY. The authors observed proteins related to anaerobic metabolism in all sampled plants, symptomatic or not, suggesting recent or constant hypoxia in their respective environments. In comparisons of the severity of FY symptoms in different stages, increased levels of alcohol dehydrogenase and energy-related proteins since the onset of symptoms contrasted with an increase in proteins related to biotic stress in the late stages of the disease. This finding suggests that changes in abiotic factors may precede the occurrence of FY and may also open the way for opportunistic pathogens.

Thus, considering the importance of the environment in the progression of diseases, the objectives of this study were to evaluate the relationship between the incidence of FY in oil palm and the nutritional status of the plant, the class and soil fertility, and the climatic variables, as well as to verify the set of proteins related to response to biotic and

abiotic stimulus with higher levels in sick and healthy palm trees exposed to these environmental conditions.

MATERIALS AND METHODS

Characterization of the experimental area

The progress of FY in oil palm (*E. guineensis*) was monitored visually in plantations located in the municipality of Mojú, Pará State, Brazil, where the climatic type is Am, tropical monsoon, according to the Köppen classification, with an annual average temperature of 25 to 27 °C, monthly insolation from 148.0 to 275.8 h, relative humidity of approximately 85%, total annual precipitation from 2000 to 3000 mm, and a rainy period from January to June ³². The relief is flat, with small gaps varying from 0 to 3%, and the predominant soil is the yellow Latosol ³³. The disease progress data came from incidence surveys performed on all plants on Amanda's farm, latitude 2° 06'43" South and longitude 48° 52'38" West, and Bethânia's farm, latitude 2° 06'43" South and longitude 48° 48'18" West, with 9,984.66 and 119.14 ha, respectively, totaling 527 plots of variable size.

Data collection, incidence frequency intervals and area under the progressive disease curve (AUPDC)

The assessments were made monthly between 2012 and 2015. In each plot, the number of new sick plants was observed, and the position of the tree and the date of the first symptoms were recorded. The incidence of FY was calculated according to the equation ³⁴:

$$I (\%) = \text{NDP}/\text{NPT} * 100$$

Therefore:

I (%) = incidence of FY,

NDP = number of diseased palms,

NPT = total number of palm trees sampled.

Annual histograms were then constructed with cumulative frequencies of 1% intervals and new occurrences with 10% intervals. In addition, the data obtained were

integrated into the area under the disease progress curve metric according to the equation proposed by Shaner and Finney ³⁵.

$$\text{AUPDC} = \sum [((Y_i + Y_{i+1})/2) * (t_{i+1} - t_i)]$$

Therefore:

AUPDC = area under the progress curve of the incidence of FY,

Y_i = proportion of the disease in the i -th observation,

T_i = time in days in the i -th observation,

n = total number of observation.

Relationship of climatic variables with oil palm FY

The climatic variables were obtained from the INMET (Instituto Nacional de Meteorologia) climatological stations located in the Belém and Cametá municipalities, Pará State, Brazil. The data analyzed were averages of maximum and compensated temperatures (°C), relative air humidity and cloudiness (tenths) (%), precipitation (mm), average and maximum wind speeds (m/s), insolation (hs), tar evaporation (mm), potential and real evapotranspiration (mm).

The analyses were carried out jointly, with data from the two properties, as the study took into account meteorological variables of regional scope.

Relationships of classification, soil fertility and plant nutrition with the progress of FY in oil palm

The collection of soil and leaves was carried out in 2013 and 2014. Leaf tissue was sampled in each plot in the two properties randomly in 10 plants in the middle third of each leaf, with 4 leaflets per plant being collected. The tissues of the aerial parts were weighed to obtain the weights of these fresh organs. Subsequently, they were stored in an oven at 65 °C, and their dry weights were obtained. The dry samples were ground and weighed to 1 gram and then used to determine the levels of leaf nutrients according to the methodology described by Malavolta et al. ³⁶. The reference values for interpreting the results of the leaf analysis were based on Guzmán ³⁷ for the oil palm culture (Table 1).

Table 1 - Reference values for leaf content of macronutrients and micronutrients for oil palm according to Guzmán (2014).

Macronutrient	Range	Micronutrient	Range
N	19.62 - 28.81 g/kg	Cu	4.20 - 7.50 mg/kg
P	1.25 - 1.88 g/kg	Zn	12.40 - 20.60 mg/kg
K	7.98 - 12.10 g/kg	B	9.60 - 17.30 mg/kg
Ca	6.26 - 7.91 g/kg		
Mg	1.76 - 2.90 g/kg		
S	1.19 - 1.86 g/kg		

To obtain fertility in the sampled areas, the soil from each plot was collected from a composite sample of at least 12 points at a depth of 0 to 20 cm. These samples were sent to the laboratory and placed in 50 ml polypropylene digestion tubes with 5 ml of concentrated nitric acid at 115 °C for 45 min, which was maintained using a hot block (DigiPREP System®). The levels of K, Ca, Mg, B, Cu, Mn, Zn and Fe were quantified by optical emission spectroscopy with inductively coupled plasma (ICP-OES) in an iCAP 6500 instrument (Thermo Fisher Scientific®, Waltham, MA).

To assess the influence of soil classes on the accumulated incidence of FY in the years 2013 and 2014, soil classes obtained in a pedological survey carried out previously were selected, with the highest occurrence at the Mojú-Pa pole and with the greatest contrast between the quantities of clay and sand in horizons A and B. The selected classes were PACal md/arg (Gray Acrisols, medium/clayey texture), PACd md/arg (DYL-Gray Acrisols, medium/clayey texture), PACal + PACd md/arg (alkyd Gray Acrisols + Dystrophic Gray Acrisols, medium/clay texture), ESPd (dystrophic Podzols), RQGal (alkyd Arenosols) and RQd (dystrophic Arenosols).

Statistical analysis

The assumptions for the analysis of variance for AUPDC and accumulated and new cases of incidence were verified with the Shapiro-Wilk and Bartlett tests to verify their normality and homogeneity, respectively. The incidence data and AUPDC were submitted to analysis of variance, and the significance was verified by the F test ($p < 0.05$). The results for the average disease incidence index were plotted on graphs of the disease progress curve, along with the averages of the climatic variables. The data were analyzed, considering the monthly progress curves separately, according to the years with the highest intensity of the disease (January/December 2013 and January/December 2014).

Annual histograms were constructed, with frequencies ranging from 1 to 53% of incidence in the field to accumulated incidence and from 0 to 70% for new occurrences of the disease for all years. A histogram for the frequencies of plants with deficiencies and excesses of the nutrients N, P, K, Ca, Mg, S, Zn, Cu and B was constructed with the leaf nutrition data from 2014. To determine the correlations between the monthly incidence of the disease and the climatic variables and the relationships between AUDPC, soil fertility and plant nutrition, Pearson's correlation analysis was used ($p < 0.05$). The incidence data were related to the monthly averages of the climatic variables (nonlagged) and to the averages of the variables of the thirty days prior to the field incidence assessments (lagged), regardless of the day of the evaluation in the month. In each soil class, the percentages of plots in the two properties, Amanda and Bethânia, were evaluated with accumulated incidence intervals of 0-1, 1-10, 10-20 and 20-30% of the new cases in 2013 and 2014. All analyses were performed using R software (R Core Team 2013).

Proteomic analysis

Sampling was carried out in field conditions in February 2017, during a period of higher rainfall, in a sandy yellow dystrophic latosol in a farm also located in municipality of Mojú, Pará state, in northern Brazil. Roots of asymptomatic (Asy) and symptomatic (FY, fatal yellowing) plants in the intermediate stage of FY were collected according to the classification proposed by Souza et al. ³⁸. After washing with water, the roots were kept in liquid nitrogen and transported to the laboratory of Instituto Tecnológico Vale – Desenvolvimento Sustentável.

Roots from fifteen plants were pooled to obtain three biological replicates for each condition, and each replicate consisted of five plant roots (obtaining 3 g of fresh matter for each replicate). Proteins were isolated following the SDS (sodium dodecyl sulfate)/phenol protocol proposed by Wang ³⁹, and their concentrations were measured on a Qubit 2.0 fluorometer (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) using a Qubit protein assay kit according to the manufacturer's protocol. For protein digestion, 50 µg of protein was used from each sample for an in-solution digestion and desalting protocol according to Nascimento et al. ³².

An aliquot containing 4.5 µg of each digested protein sample was loaded for separation with a Nano Acquity UPLC[®] System (Waters Corp.) equipped with 2D online dilution technology. The peptide fraction was separated along the first chromatographic

dimension under basic (pH = 10) conditions in a BEH C₁₈ 300 Å, 5 µm 300 µm x 50 mm reversed-phase column (XBridge™, Waters Corp.). This was performed at a flow rate of 2 µL/min. Eluent A was aqueous 20 mM FA (pH = 10), and eluent B was neat ACN. All samples were analyzed using a five-step fractionation method. The fractions were eluted from the first dimension using a composition of 10.8, 14.0, 16.7, 20.4 or 65% eluent B.

The fractionation process was programmed to start immediately after completion of sample loading (20 min at 10 µL/min with 3% B). Each first-dimension elution step was performed with a 20 min run time using a flow rate of 2 µL/min. The eluent peptide was mixed online with 10 µL/min of 0.1% TFA solution (1:10 dilution) before being trapped in the trapping column (100 µm x 100 mm), which was packed with 1.7 µm 100 Å silica-based C₁₈ (Symmetry, Waters Corp, Milford, MA).

The mobile phase for the second chromatographic dimension (low pH RS) was 0.1% FA in water (immobile phase A) and 0.1% FA in ACN (mobile phase B). The second-dimension column was 100 µm x 10 mm C₁₈ packed with changed surface hybrid (CSH) 1.8 mm particles (Acquity UPLC M-Class CSH C₁₈, Waters Corp., Milford, MA). The flow rate for the second-dimension separation was 400 nL/min, while the column was maintained at 55 °C. A 40 min gradient from 3 to 40% B was used to separate peptides in the second separation dimension. The column was then washed using 90% B for 1 min and equilibrated with 3% B for 7 min before returning to the next fractionation step.

Mass spectra were obtained with a Synapt G2-S spectrometer equipped with a standard electrospray ionization (ESI) source (Waters). For all measurements, the mass spectrometer was operated in positive ion resolution mode. Mass spectra were acquired in continuum mode over an *m/z* range of 50-1200 using a capillary voltage of 3 kV, source temperature of 100 °C, source offset voltage of 30 V, cone gas flow of 50 L/h and cone voltage of 30 V. The spectral acquisition time at each energy setting was 0.5 s. A solution of 0.2 µM Glu¹-fibrinopeptide (785.8427 Da) was used as a lock-mass solution and delivered at a flow rate of 0.5 µL/min using an auxiliary pump of the liquid chromatography system. The lock mass was sampled every 30 s using 0.1-s scans over the same mass range.

The data were processed using the Progenesis QI software (Waters) for identification and quantification, using the Viridiplantae database from uniprot (uniprotkb/swiss-prot, uniprot.org). Protein identification was accepted only if the probability of identifying peptides was greater than 90 %, and proteins with 95 %. The

significance levels of the differential abundances of proteins were determined by applying the ANOVA test ($p < 0.05$). In order to compare the proteome of plants with and without symptoms of fatal yellowing, a principal component analysis (PCA) of the proteins with differential abundance and with $p < 0.05$ was produced in the R software v3.6.3 (R Core Team 2018; <https://www.R-project.org>), using packages FactoMineR, Factoshiny and factoextra. The Gene Ontology (GO) analyses of proteins were performed using the OmicsBox v1.2.4 (bioBam) and Uniprot (uniprotkb/swiss-prot, uniprot.org) database. Heatmaps were developed using R software v.3.6.3 (package pheatmap v.1.0.12, ggplot2 v.3.3.5, colorspace 2.0-2 and grid 4.0.4).

RESULTS

Analysis of frequency ranges

Over the years evaluated, there was significant disease progression over time ($p < 0.05$). In addition, there was variation in the mean disease intensity among the evaluation periods. In 2012, approximately 5% of the plots were evaluated with a 0% incidence, while in 2015, there were symptoms of FY in all plots (Table 2). The numbers of plots with an incidence of 0.1 to 1% changed from 81.8% in 2012 to 7.6% in 2014, with progress being made for the frequencies with the highest percentage of FY, as in the intervals from 1 to 15% (Table 2).

In an analysis of the histograms, migration of classes 0.1-1 and 1.1-2% of incidence occurred for intervals of 3 to 54%, with frequency distributions with a tendency to the right of the centers throughout the evaluated period (Figure 1).

In an analysis of new cases of FY, the percentage of plots in the class of 1 to 10% decreased from 94.1 to 84.8% in 4 years, while in the range of 11-20%, it increased from 0.4 to 10.1%. In 2014 and 2015, parcels in the ranges of classes above 40% were observed (Figure 2).

Table 2 - Frequency of new occurrences of fatal yellowing on palms between 2012 and 2015 in Mojú municipality, Pará State, Brazil, separated into classes of 1% incidence.

Incidence	Percentage of plots for				Incidence	Percentage of plots for			
	range of incidences					range of incidences			
	012	013	014	015		012	013	014	015
0	5.3%	1.7%	0.6%	0.0%	31.1 – 32	0.0%	0.4%	0.2%	0.0%
0.1 – 1	81%	32.3%	12.5%	7.6%	32.1 – 33	0.0%	0.2%	0.4%	0.0%
1.1 – 2	7.8%	28.5%	23.0%	18.8%	33.1 – 34	0.0%	0.2%	0.4%	0.2%
2.1 – 3	0.9%	11.2%	16.9%	16.9%	34.1 – 35	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
3.1 – 4	0.4%	13.7%	11.0%	13.7%	35.1 – 36	0.0%	0.2%	0.0%	0.0%
4.1 – 5	1.3%	4.7%	7.4%	6.8%	36.1 – 37	0.0%	0.0%	0.2%	0.4%
5.1 – 6	0.9%	1.5%	7.6%	5.7%	37.1 – 38	0.0%	0.4%	0.4%	0.0%
6.1 – 7	0.4%	0.8%	5.5%	4.0%	38.1 – 39	0.0%	0.0%	0.4%	0.2%
7.1 – 8	0.2%	0.6%	3.0%	4.2%	39.1 – 40	0.0%	0.0%	0.0%	0.4%
8.1 – 9	0.6%	0.2%	2.7%	4.9%	40.1 – 41	0.0%	0.0%	0.2%	0.2%
9.1 – 10	0.0%	0.2%	1.3%	2.3%	41.1 – 42	0.0%	0.0%	0.2%	0.0%
10.1 – 11	0.0%	0.0%	1.5%	1.5%	42.1 – 43	0.0%	0.0%	0.0%	0.4%
11.1 – 12	0.2%	0.2%	0.8%	2.1%	43.1 – 44	0.0%	0.0%	0.0%	0.2%
12.1 – 13	0.0%	0.0%	1.1%	2.3%	44.1 – 45	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
13.1 – 14	0.0%	0.2%	0.2%	1.1%	45.1 – 46	0.0%	0.0%	0.0%	0.4%
14.1 – 15	0.0%	0.0%	0.2%	0.6%	46.1 – 47	0.0%	0.0%	0.2%	0.0%
15.1 – 16	0.0%	0.0%	0.0%	1.3%	47.1 – 48	0.0%	0.0%	0.0%	0.2%
16.1 – 17	0.0%	0.2%	0.0%	0.2%	48.1 – 49	0.0%	0.0%	0.6%	0.0%
17.1 – 18	0.0%	0.0%	0.0%	0.4%	49.1 – 50	0.0%	0.0%	0.8%	0.2%
18.1 – 19	0.0%	0.0%	0.0%	0.4%	50.1 – 51	0.0%	0.0%	0.2%	0.0%
19.1 – 20	0.2%	0.6%	0.2%	0.2%	51.1 – 52	0.0%	0.0%	0.0%	0.2%

20.1 – 21	0.0%	0.2%	0.0%	0.0%	52.1 – 53	0.0%	0.0%	0.0%	0.6%
21.1 – 22	0.0%	0.2%	0.0%	0.2%	53.1 – 54	0.0%	0.0%	0.0%	0.6%
22.1 – 23	0.0%	0.4%	0.0%	0.2%	54.1 – 55	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
23.1 – 24	0.0%	0.2%	0.2%	0.0%	55.1 – 56	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
24.1 – 25	0.0%	0.4%	0.2%	0.0%	56.1 – 57	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
25.1 – 26	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	57.1 – 58	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
26.1 – 27	0.0%	0.4%	0.2%	0.2%	58.1 – 59	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
27.1 – 28	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	59.1 – 60	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
28.1 – 29	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	60.1 – 61	0.0%	0.0%	0.0%	0.2%
29.1 – 30	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	61.1 – 62	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
30.1 – 31	0.0%	0.6%	0.0%	0.2%	62.1 – 63	0.0%	0.0%	0.0%	0.2%

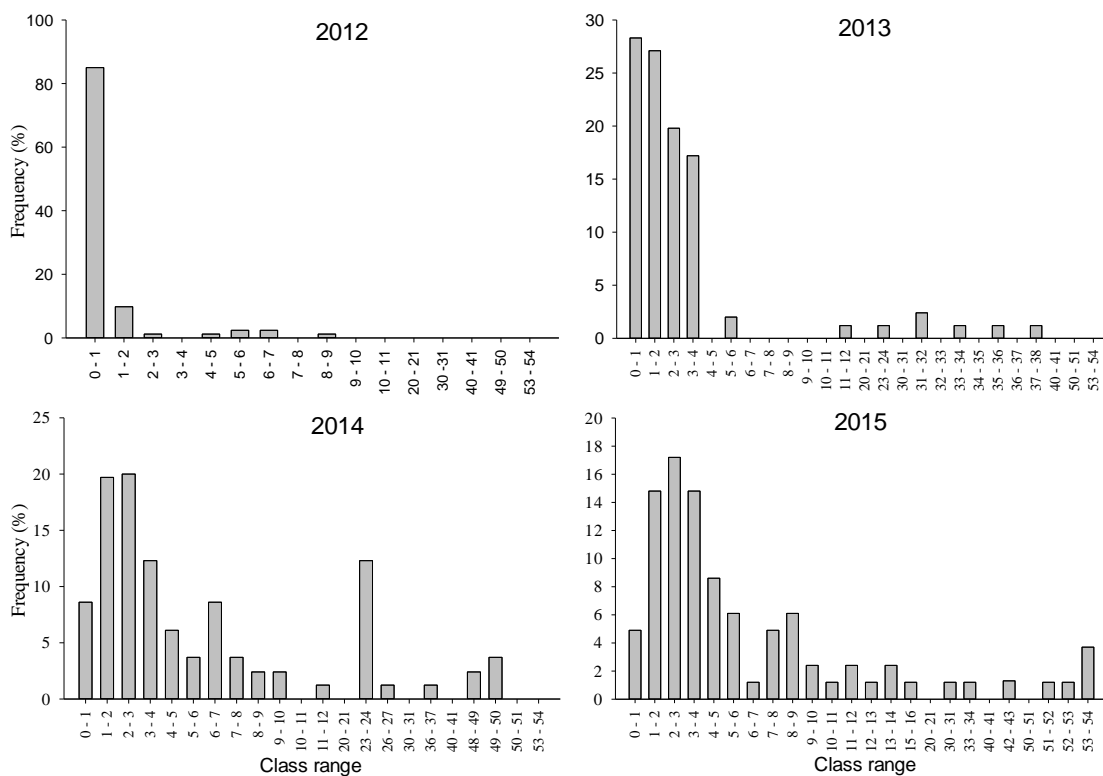


Figure 1 - Distribution of the accumulated frequency classes (with 1% intervals) of fatal yellowing between 2012 and 2015.

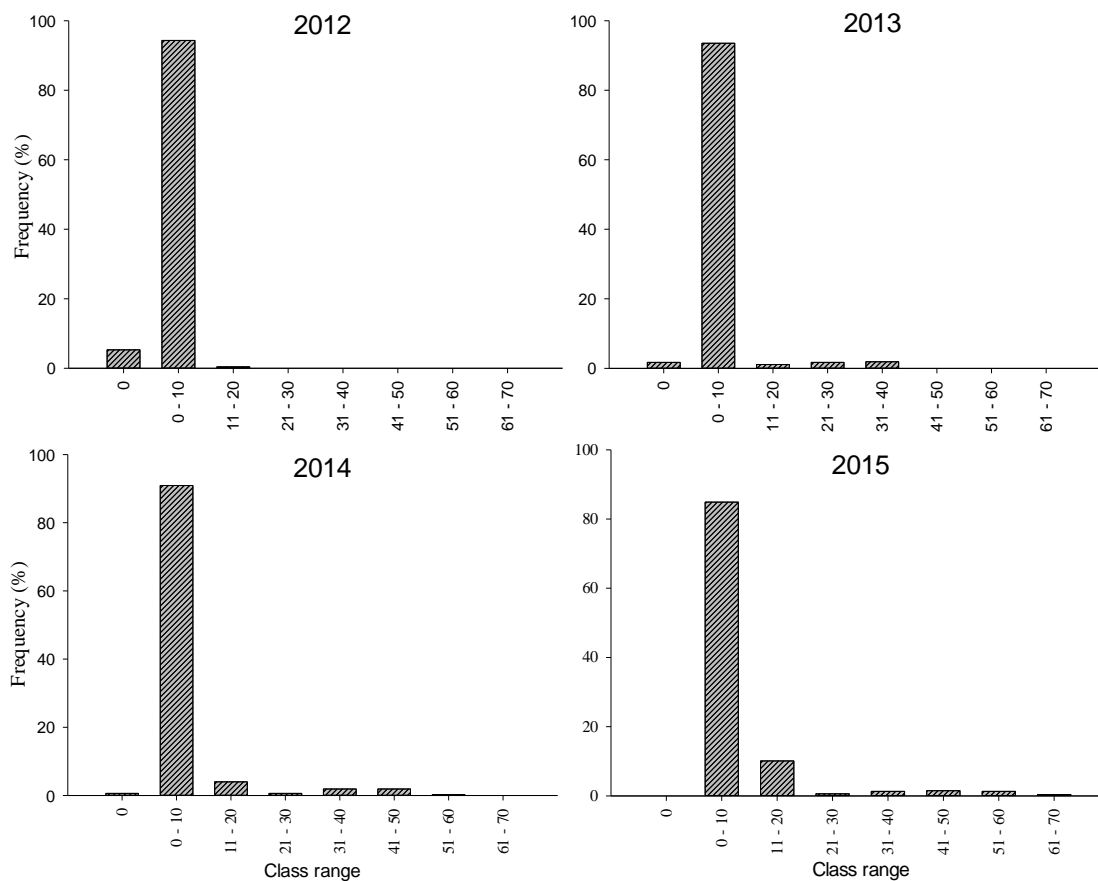


Figure 2 - Distribution of classes of new occurrences (with 10% intervals) of fatal yellow between 2012 and 2015.

Relationship of climatic variables in rain forest with oil palm FY

There was variation in the average disease intensity among the assessment periods. However, the years with the highest disease incidence were 2013 and 2014. In the average progress curve for 2013 of new plants with FY, there was an increase in the incidence from February to May, coinciding with increases in the rainfall and relative humidity to 500 mm and 86%, respectively. The maximum value of the average incidence was 7.95% in May. In the following months, there was a reduction in the disease incidence values, with decreases in the rainfall (180 mm) and relative humidity (80%) and increases in the average wind speed (2 m/s), real evapotranspiration (123 mm) and tar evaporation (64 mm) (Figure 3).

In 2014, the disease incidence of new cases also increased in February (3.2%), being lower than that observed in 2013. The increase in new cases was greater in the first half of the year. In this interval, there was also greater accumulated monthly rainfall, with

values of 476, 505, 482, 346 and 231 mm for the months of February, March, April, May and June, respectively. Consequently, there was a higher relative humidity of the air in the same interval, with the highest percentage in February (89%). In the dry months, relative humidity and precipitation decreased, reaching 76% and 78 mm, respectively, in October. In June, with the reduction in rainfall, the average temperature in the second half of the year was 33 °C, resulting in increased evaporation of water from the soil. With the lower availability of water in the soil, there was a reduction in evapotranspiration and in the incidence of FY (Figure 3).

For the nonlagged monthly data for 2013, the variable "real evapotranspiration" had a significant positive correlation with the incidence frequency for new cases of FY (Table 3). The variable "maximum wind speed" had a significant negative correlation with this incidence frequency. For the other meteorological variables, there was no significant correlation with the disease for the months of 2013 (Table 3). According to outdated monthly data for 2013, the variables "precipitation" and "relative air humidity" had a positive correlation, while the variables "tar evaporation" and "average wind speed" had a negative correlation with the FY (Table 3).

For the nonlagged monthly data for 2014, only the variable "real evapotranspiration" had a significant positive correlation with the incidence of new cases of FY from oil palm. However, when the data lagged, all meteorological variables correlated significantly with the incidence of FY. The variables "relative air humidity", "cloudiness", "real evapotranspiration" and "precipitation" had a positive correlation with the FY of the oil palm, with Pearson's correlation values of 0.42, 0.37, 0.35 and 0.31, respectively (Table 3).

In contrast, the variables "maximum wind speed", "tar evaporation", "average wind speed", "maximum wind speed", "potential evapotranspiration", "insolation", "maximum temperature" and "average temperature" had negative correlations with the disease (Table 3).

Table 3 - Correlation between new cases of fatal yellow incidence in oil palm in 2013 and 2014 with the average meteorological variables collected at Belém and Cametá.

Climatic variable	Monthly Incidence 2013	Monthly Incidence 2013 lagged	Monthly Incidence 2014	Monthly Incidence 2014 lagged
Precipitation (mm)	0.08	0.26*	-0.06	0.31*
Humidity (%)	0.01	0.23*	0.08	0.42*
Cloudiness (dec)	-0.08	0.1	-0.08	0.37*
Real evapotranspiration (mm)	0.28*	0.06	0.29*	0.35*
Potential evapotranspiration (mm)	0.19	-0.18	0.07	-0.33*
Tar evaporation (mm)	-0.05	-0.27*	-0.1	-0.48*
Average wind speed (m/s)	-0.21	-0.28*	-0.17	-0.39*
Maximum wind speed (m/s)	-0.27*	-0.14	-0.15	-0.56*
Average temperature (°C)	-0.07	-0.13	0.1	-0.25*
Maximum temperature (°C)	0.08	-0.06	0.08	-0.27*
Insolation (h)	0.17	-0.03	0.18	-0.27*

* Significant at the 5% probability level

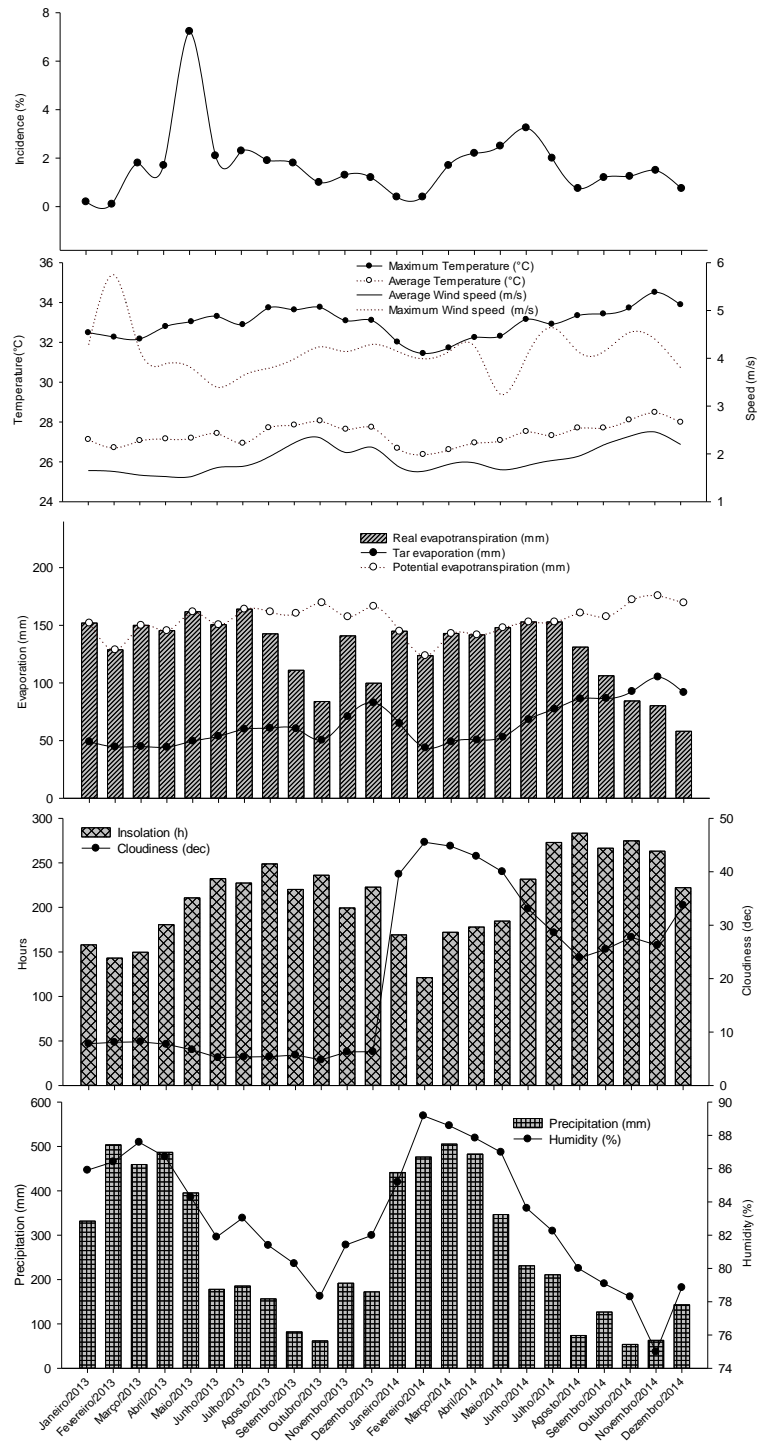


Figure 3 - Progress curve of new cases of fatal yellow incidence in 2013 and 2014, total precipitation (mm), relative humidity (%), actual and potential evapotranspiration (mm), tar evaporation (mm) and maximum and average wind speeds (m/s), obtained from the weather stations in the municipalities of Belém-PA and Cametá-PA.

Relationship of soil classification and fertility and plant nutrition with the progress of FY in oil palm

There was a significant correlation between soil fertility and plant nutrition with FY incidence of oil palm. In 2013, the nutrient Ca had a significant negative correlation (-0.74) with soil fertility. Because micronutrients Mn and Fe had positive correlations (0.64 and 0.48), there was a higher incidence of FY in areas with higher levels of these nutrients in the soil. In 2014, the same pattern was observed, but K had a positive correlation and P, Mg and B had negative correlations with incidence (Table 4).

According to Guzmán (2014), the frequencies of plants deficient in the nutrients N, P, Ca, Mg, S, Zn and Cu were 50, 37, 49, 66, 50, 50 and 46%, respectively. Sixty-five percent and 46% of the plants had excess K and B, respectively (Figure 4). The correlation between Ca and AUCPD was significantly negative in 2013, while in 2014, in addition to Ca, the nutrients N, Si, S, B, Mn and Fe also had significant negative correlations with AUDPC, while K correlated positively (Table 5).

Table 4 - Correlation of soil fertility with the Area under disease progress curve (AUDPC) of the fatal yellow in 2013 and 2014.

Soil nutrients	AUDPC	
	2013	2014
Water pH	0.05	0.13
P Mehlich	0.26	-0.67*
K	0.08	0.37*
Ca	-0.74*	-0.49*
Mg	-0.19	-0.56*
B	-0.24	-0.53*
Cu	0.16	0.07
Mn	0.64*	0.51*
Zn	0.03	0.12
Fe	0.48*	0.71*

* Significant at the 5% probability level

Table 5 - Correlation of plant mineral nutrition with the Area under disease progress curve (AUDPC) of the fatal yellow incidence in 2013 and 2014.

Leaf nutrient	AUCPD	
	2013	2014
N	0.03	-0.47*
P	0.18	0.27
K	0.35	0.59*
Ca	-0.48*	-0.54*
Mg	0.06	-0.31
S	0.35	0.17
Si	-0.37	-0.56*
B	-0.25	-0.62*
Cu	0.02	0.22
Mn	0.34	-0.53*
Zn	0.14	0.09
Fe	0.36	-0.45*

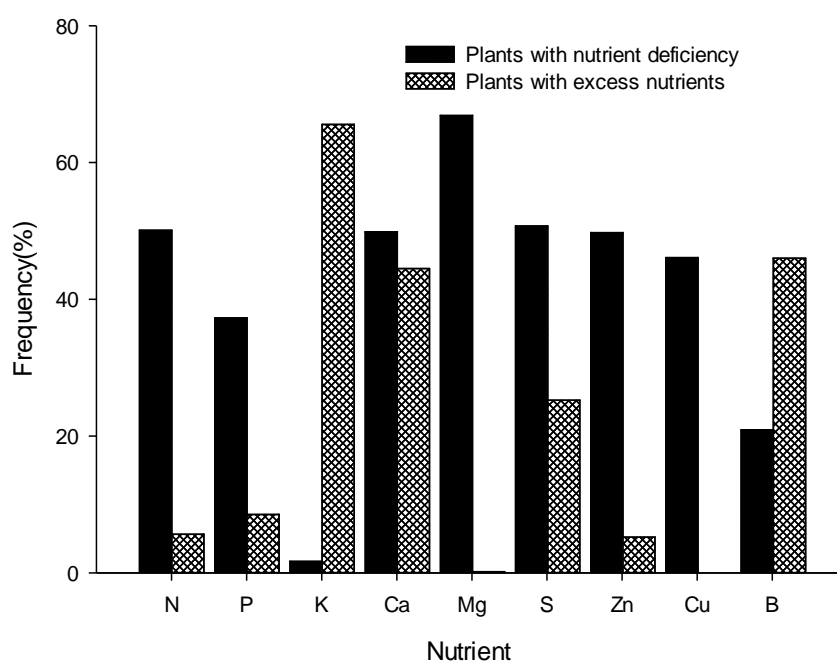


Figure 4 - Percentages of plants with nutrient deficiency and excesses in 2014 in Mojú-PA.

The soil classes with the highest amount of clay, specifically the PAC or Grayish Argisol (Ultisol), had the highest occurrences of FY in all intervals of incidence of the disease in both 2013 and in 2014 (Figure 5). In 2013, a total of 10.9% of the plots classified as PACal md/arg had an incidence from 0-1%, while only 1.8% were from 20-30%. In 2014, the number of plots in the soil class from 0-1% decreased to 9.5%, while it increased to 3.6% in the 20-30% range of incidence. Sandy soils also had an increase in incidence. However, for clayey soil, the frequency of plots was lower.

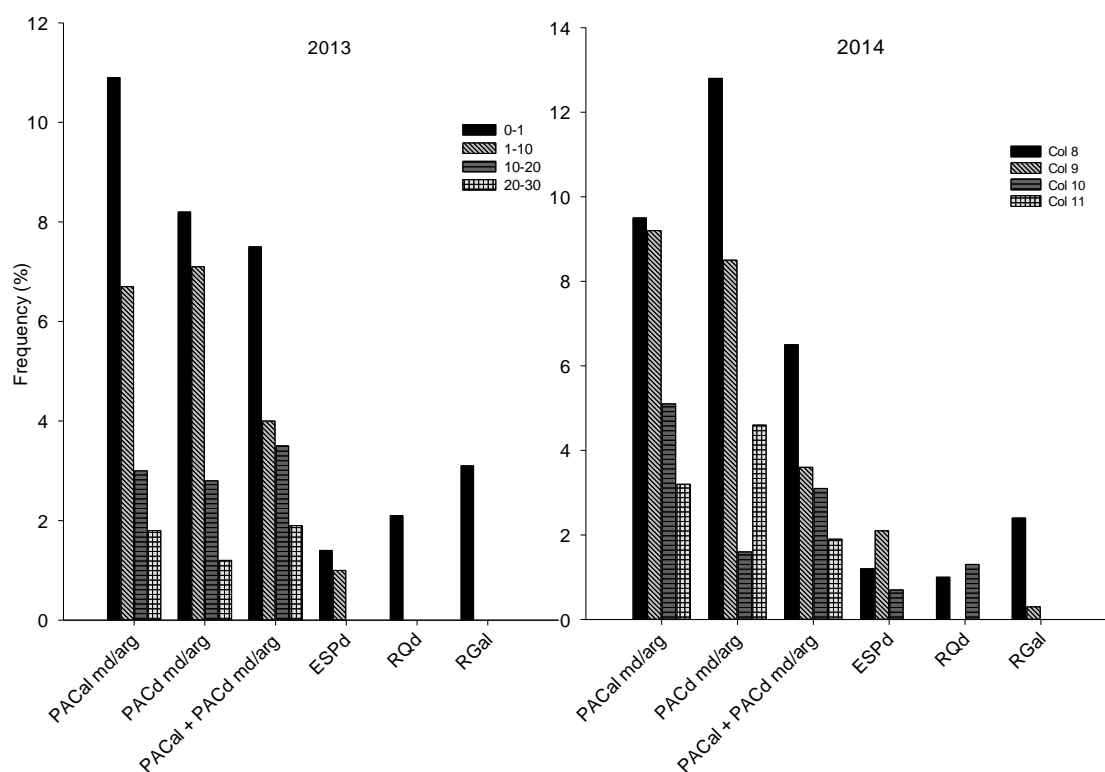


Figure 5 - Plot frequencies in each incidence interval according to the soil class in 2013 and 2014.

Protein profile

A total of 669 proteins were identified in FY and Asy samples, of which 81 presented p -value ≤ 0.05 and $FC \geq 1$ (Dataset Sx1), showing differential abundances. Of these proteins, 47 were upregulated in FY plants, while 34 were downregulated (Figure 6a), presenting higher levels in asymptomatic plants. The PCA of the 81 proteins differentially abundant with significant values showed the separation between root proteomes of plants with and without FY symptoms (Figure 6b). GO analysis in the Biological process category assigned the FY plants proteins to 43 GO terms, while asymptomatic plant proteins were assigned to 57 GO terms (Figure 7a). Distributed

among a total of 62 GO terms, the proteins from the dataset were also included in the terms Primary metabolic process and Response to stress. New GO analyzes categorized the proteins attributed to these two biological processes into GO terms shown in the subgraphs of Figures 7b and 7c.

Primary metabolic process was composed of 25 proteins in plants with FY symptoms and 23 proteins in asymptomatic plants, including proteins involved primarily in the metabolism of carbohydrates, lipids, and metabolism of other proteins (Figure 7b). The GO analysis showed that proteins attributed to the Response to stress are involved in at least 11 processes in plants with FY, and in at least 12 processes in asymptomatic plants, highlighting processes related to the response to temperature, flooding, hypoxia, osmotic stress, oxidative stress, starvation and water deprivation (Figure 7c). Among the proteins attributed to the abiotic stress response in plants with FY are alcohol dehydrogenase 1 (P12886, Q2R8Z5 and P14219) and 2 (P28032), peroxidase 2 (A2YPX3), 1-Cys peroxiredoxin (P52571), calcineurin B-like protein 10 (Q7FRS8), caltractin (P41210), steroid 5-alpha-reductase DET2 (Q2QDF6), nodulin-related protein 1 (Q9ZQ80) and (Q94K66), translationally-controlled tumor (Q9ZSW9) (Figure 7c).

These stress-response proteins were also attributed to Defense response, where proteins involved in the biotic stress response were included. Thus, a GO analysis was applied to verify which defense processes these proteins are involved. Among the GO terms that the Defense response proteins have been assigned are responses to fungus and bacterium (Figure 7d). The highest amount of proteins upregulated in FY plants was attributed to the Defense response to fungus, which included the endochitinase CH25 (Q09023), arginase (O49046) serine/threonine-protein kinase BSK8 (Q9FHD7), phosphatase 2C 59 (Q8RXV3), glucan endo-1_3-beta-glucosidase GI (P34742) and 1-Cys peroxiredoxin (P52571) (Figure 7d). On the other hand, DNA damage-binding protein 1a (Q9M0V3), Transcription factor MYB93 (Q9S9Z2), Wall-Associated receptor kinase-like 20 (Q9LZM4) and peroxidase 22 (P24102) have been attributed to the Defense response to fungus in asymptomatic plants (Figure 7d). Nodulin-related protein 1 (Q9ZQ80) and phosphatase 2C 59 (Q8RXV3) were also upregulated and attributed to the Defense response to bacterium in FY plants (Figure 7d). In Asy plants, Defense response to bacterium was composed of the Transcription factor MYB93 (Q9S9Z2), peroxidase 22 (P24102) and peroxisomal (S)-2-hydroxy-acid oxidase proteins (Q01KC2) (Figure 7d). Proteins from plants with FY symptoms were also attributed to Innate immune response, Systemic acquired resistance and Defense response to symbiont, and

the GO terms Defense response to nematode and Defense response to insect were identified only in asymptomatic plants (Figure 7d).

In general, proteins related to response to abiotic and biotic stimuli were downregulated in plants with FY symptoms, as can be seen in the heatmaps showing separately the proteins assigned to Primary metabolic process (Figure 7b), Response to stress (Figure 7c) and Defense response (Figure 7d). The groups of upregulated proteins with greater consistency in plants with FY compared to asymptomatic plants were attributed to the response to oxidative stress, hypoxia and flooding (Figure 7c). The hierarchical clusters separated the proteins into two well-defined groups in each heatmap (Figures 7b, 7c and 7d), where one group is formed by upregulated proteins in roots of FY plants and the other by proteins downregulated in these plants. Replicates of plants with and without FY symptoms were equally clustered in two groups.

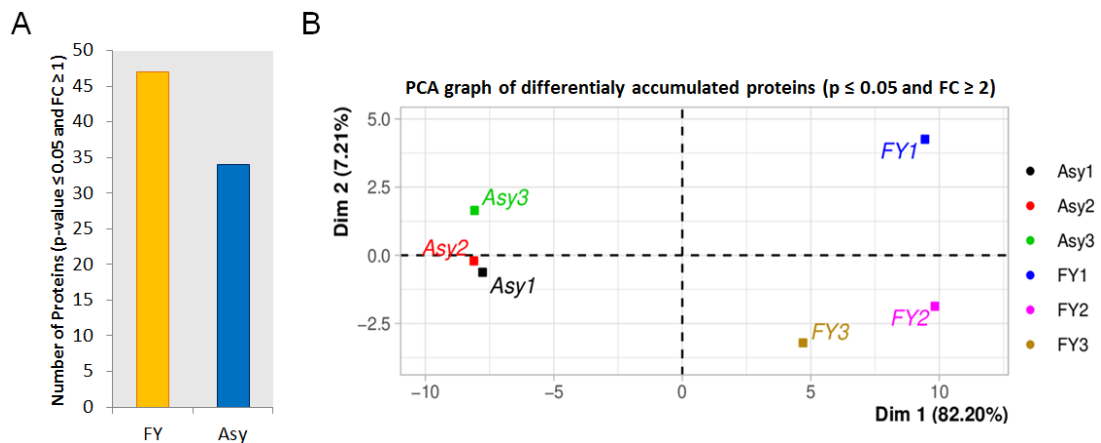


Figure 6 - Differently abundance of proteins and PCA from the proteomes of oil palm roots of FY and Asy plants. A) Proteins most abundant in roots of plants with and FY without symptoms considering $p\text{-value} \leq 0.05$ and Fold Change ≥ 1 . B) PCA of proteins with differential abundance with $p\text{-value} \leq 0.05$ and Fold Change \geq comparing the proteome of plant roots without symptoms (Asy1, Asy2 and Asy3) and with symptoms of FY (FY1, FY2 and FY3). The proteins used for analysis are presented in Dataset Sx.

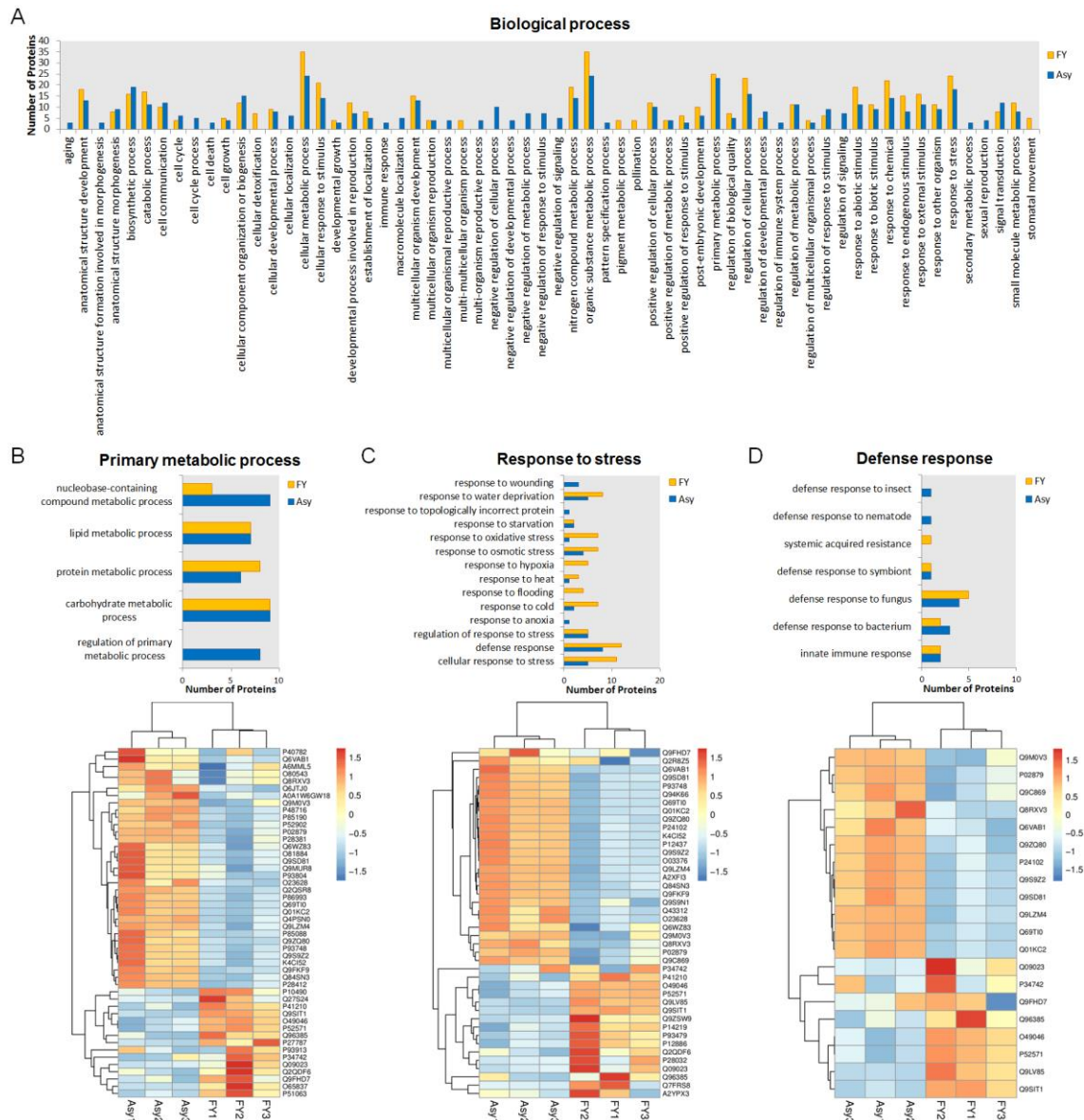


Figure 7 - Gene Ontology (GO) annotation and Hierarchical clustering analysis of proteins with differential abundance identified in oil palm roots of FY and Asy plants. A) GO annotation showing the GO terms in the category of Biological Process of abundant proteins in plants with and without FY. B) Above a subgraph of the term Primary metabolic process and its set of proteins shown in a heatmap below. C) Above a subgraph of the term Response to stress and its set of proteins shown in a heatmap below. D) Above a subgraph of the term Defense response and its set of proteins shown in a heatmap below. The red and blue colors in the heatmaps represent the highest and lowest intensity values, respectively. The proteins used for analysis are presented in Dataset Sx.

DISCUSSION

Relationships of FY in oil palm with environmental variables were verified in this work. The incidence of FY increased over the years evaluated, and its progress was evident in all plots of the two farms, in different percentages depending on the plot. In addition, incidence class intervals above 10% increased in 2014 and 2015 in the analysis of new cases of the disease. This result is similar to those from studies on the progression of the incidence of FY found in the literature. Bergamin Filho et al.¹² analyzed cumulative FY incidence curves constructed with monthly and annual data, noting an increase in the incidences in the proportions of 0.40, 0.15 and 0.016 for plantations of 19, 14 and 9 years, respectively. As in the present study, there were plots with up to 50% accumulated incidence, and the economic viability of planting was impaired, so clarifying the cause of this disease is essential to establish management practices. Therefore, an analysis of environmental variables in Pará State, a region where the occurrence of this disease is common, and the plant's nutrition was performed to determine their correlation with FY.

The northern region of Brazil has the ideal climatic conditions for oil palm cultivation, as it requires some specific edaphoclimatic variables for satisfactory production. The ideal precipitation regime for this crop is an average annual rainfall of 1.800 mm. Another requirement is solar radiation. The necessary insolation to reach the productive potential of the oil palm is approximately 1.800/h/year, with a minimum of 5 h/day. In addition, greater productivity occurs in regions with small variations in temperature and annual averages between 25 and 27 °C⁴⁰. However, these same factors promote several phytosanitary problems. According to the results obtained, higher precipitation intensity results in greater relative humidity of the air (83 to 89%), less evapotranspiration, and greater accumulation of water in the soil; these conditions and lower wind speeds provide a greater probability of FY occurrence. Thus, although oil palm requires 150 mm of precipitation per month, in this region, it can receive to 500 mm/month in the first half of the year. In months of the year with strong wind conditions (2 to 2.5 m/s), which is associated with high insolation values (220 to 250 h/month), i.e., reduced cloud cover and reduced rainfall and temperature (28 °C), there was less progress of the disease. Consequently, with greater insolation and presence of winds, greater evaporation and reduction in the amount of water in the soil occurs. The importance of water balance has also been studied by Venturieri et al.⁹, who showed that it has a negative correlation ($p = 0.0002$) with fatal yellow. In regions with mild water deficiency, no cases of this disease were observed.

In this work, the correlation of climatic variables with the incidence of FY was verified. There was a correlation between only actual evapotranspiration and wind speed in 2013 and 2014. However, when the data were lagged by thirty days immediately prior to the assessment of the disease, all climatic variables correlated with FY in 2014, indicating the importance of this approach. The lag in climatic data shows that a time interval is necessary for the plant to develop symptoms. Therefore, the manifestations of physiological imbalance in the field occurred due to intense rain and high relative air humidity thirty days immediately before the evaluations. To verify the morphological changes of water stress in the physiology of oil palm seedlings, Rivera-Mendes et al.⁴¹ conducted experiments with four water conditions for 60 days: moderate deficit, field capacity, and partial and continuous flooding. Seedlings under permanent flooding had a 22% reduction in biomass when compared to that of the control, due to the higher rates of leaf respiration and limitations in the absorption and transport of macronutrients. Plants under partial waterlogging showed growth similar to that observed under optimal soil moisture conditions.

In addition to the relationship with climatic variables, the correlation of fatal yellow with soil fertility and plant nutrition was studied. The disease had a positive correlation with Fe, K and Mn found in the soil. Thus, there was an increased incidence in places with higher levels of these minerals in the soil. This positive relationship may have occurred due to deficiency in the absorption of the roots or the imbalance of these cations when compared to other cations in the soil. The nutrients P, Ca, Mg and B had a significant negative correlation, i.e., the disease decreased with increases in these elements in the soil. Seeking to understand the role of other nutrients in soil with FY (FY?), Silveira et al.⁴² carried out an experiment with the omission of the macronutrients nitrogen, phosphorus, potassium, calcium, magnesium and sulfur and the micronutrients boron, iron, manganese, copper, zinc and molybdenum. These authors observed an increase in symptoms when there was omission of micronutrients other than zinc and less incidence in treatments with omission of macronutrients other than Ca and S. Several studies on nutrition and fertilization have been carried out to verify the relationship between mineral elements and FY. Research has not verified the simultaneous effects of soil class, soil fertility and plant nutrition. When fertilization was studied, foliar analysis of the nutrients was not performed. Therefore, it is not possible to determine if the nutrients were absorbed or if their lack was associated with the disease. In studies analyzing the mineral nutrients in the plant, soil analysis was not carried out to determine

whether deficiencies in a certain nutrient in plants was caused by low concentrations in the soil or due to inadequate absorption, including that possibly due to excess water in the soil, which would cause anaerobic conditions for the roots. Therefore, studying plant nutrition and soil fertility simultaneously is essential to understand the plant's physiological processes.

As for nutrition, palm trees showed deficiency in the nutrients N, P, Ca, Mg, S, Zn and Cu and exhibited excesses of K and B. According to Guzmán³⁷, AUDPC had significant negative correlations with the nutrients N, Ca, Si, B and Fe and a positive correlation with K. The minerals P, Ca and Mg also had low levels in the soil, which is a possible explanation for their deficiency in plants. The N, S, Si, Fe, and Mn were present in adequate quantities in the soil. However, in the sampled plants, they were below the nutritional levels suitable for the crop. Among these elements, N and S are structural constituents of plant cell components, including chlorophyll, amino acids, nucleic acids, coenzyme A, S-adenosylmethionine, biotin, vitamin B₁ and pantothenic acid. Therefore, their deficiencies inhibit plant growth, causing chlorosis and yellowing of the leaves²³. Iron deficiency is common when water saturation occurs in the soil because this causes anaerobiosis in the root system. Its characteristic symptoms are chlorosis between the ribs. The relationship between iron and FY was investigated by Viégas et al.⁴³ with four treatments of different doses of ferrous sulfate. Afterwards, the iron contents in the oil palm leaves were measured, they caused no reduction or increase in symptoms in the analyzed plants.

Silicon, on the other hand, is not an essential nutrient for many plant families. However, some species accumulate substantial amounts of this element in their tissues and exhibit enhanced growth, fertility and stress resistance when supplied with adequate amounts of this element. Thus, plants deficient in silicon are more susceptible to tipping and fungal infection. Freitas et al.²⁶ determined the role of silicon in reducing the severity of yellow Sigatoka (*Mycosphaerella musicola*) in banana trees grown in nutrient solution. The treatments had five concentrations of silicic acid (H₄SiO₄): 0, 0.5, 1.0, 1.8 and 3.6 mmol/L. The AUDPC for plants in the 3.05 mmol/L H₄SiO₄ treatment was 49.27% lower than that for plants without supplementary H₄SiO₄. In contrast, plants grown in a 3.6 mmol/L solution of H₄SiO₄ showed 23.53% more Si content in the leaves than plants grown without H₄SiO₄ supplementation. Thus, Si could be used in disease management.

Approximately 65% of oil palm trees had excess K and Mg deficiency. Potassium is the second most required nutrient in plants, and in the soil solution, it appears as the

ion K^+ , which is absorbed in the roots of plants. In addition, K^+ permeates plasma membranes, making it easily absorbed and transported in xylem and phloem. However, at high concentrations of this nutrient, the absorption of Ca^{2+} and Mg^{2+} is reduced by competitive inhibition²⁵. Mg deficiency induced by excess K in fertilization is common in crops such as banana and coffee, as they require large amounts of K²⁶. Mg is present in the chlorophyll molecule. In addition, it participates in enzymatic activation, acting as a cofactor for phosphorylative enzymes by forming a bridge between ATP or ADP pyrophosphate and the enzyme molecule. Therefore, deficiency in this element is characterized by yellowing of the older leaves²³.

In the soil classes PACal md/arg, PACd md/arg and PACal + PACd md/arg, with the highest amount of clay, there was a higher frequency of plots with FY incidence. The textural class is determined by the particle size distribution and affects other physical properties, such as drainage and water retention, aeration and soil consistency. The texture and structure of the soil define the surface area and porosity, which are the main factors associated with the storage and availability of water in the soil and the drainage of water from the surface to deep layers of the soil profile (Costa et al. 2014). Silveira et al.⁴² analyzed the physical and chemical properties of 19 pedological profiles distributed in different plots of crop plantations. The authors classified the soil as a medium-textured yellow Latosol and showed the presence of compaction (1.365 kg/m^3 to 1619 kg/m^3) at depths of 30 and 60 cm. Thus, saturation of the soil in the superficial layer occurred during the period of greatest rainfall in the year, causing oxygen deficiency in the superficial layer of the soil. These conditions can be harmful to oil palm, causing root rot, due to its root system being dominantly distributed horizontally close to the soil surface. Regarding water in the soil and drainage, Bernardes⁴⁵ measured the water potential in the soil with a tensiometer with low soil aeration with values between 0 bar and 0.075 bar, while 0.075 bar and 0.30 bar are more suitable for the plant. Thus, areas at risk of flooding, which is related to the soil class, can cause anoxia of the oil palm's superficial roots, triggering nutritional deficiency and weakening the plant's resistance, making them more susceptible to infections by pathogens.

The proteomes showed proteins related to both biotic and abiotic stresses, especially in response to hypoxia, flooding and oxidative stress, upregulated in FY plants. Considering the studies and the lack of consensus regarding the origin of this disease, the identification and quantification, as well as understanding the implications of the

differential abundances of these proteins in the metabolism of the plants affected by FY, becomes fundamental to suggest this origin.

Reactive oxygen species (ROS) are related to the regulation of signaling pathways and initial responses that occur to environmental stresses of biotic or abiotic origin^{46, 47}. Antioxidant system-related proteins like peroxidase 2 and 1-Cys peroxiredoxin (Fragment) were upregulated in plants with FY and Asy plants with little difference in their abundance. In this case, oxidative stress can be an indication of stress from soil flooding in the area of plant cultivation.

In the data, primary metabolism-related proteins involved in energy production were also identified as having little difference in abundance between conditions. Despite this, they were overall more accumulated in Asy plants.

Additionally, with regard to energy metabolism-related proteins, alcohol dehydrogenases were identified in the roots of FY and Asy plants. Alcohol dehydrogenases are involved in alcohol fermentation during hypoxia or anoxia. There is a decrease in energy production through oxidative phosphorylation. Fermentative metabolism promotes energy compensation through recycling of NAD⁺ to the glycolytic pathway²⁸. Increases in the glycolytic pathway and alcohol fermentation-related proteins has been identified as a key response of plants to flooded soils^{48, 50}. Adaptive mechanisms to handle oxygen deprivation include synthesis induction of a set of approximately 20 proteins known as anaerobic stress proteins (ANPs), which in addition to alcohol dehydrogenase, also includes carbohydrate metabolism-related proteins, such as those identified in this study²⁸. In this context, the results indicated that the analyzed plants were likely subject to hypoxic conditions, which were probably caused by soil flooding in the crop area before or during the sampling period of the roots analyzed in this study.

It is important to highlight the identification of flooding stress-related proteins, such as polygalacturonase^{30, 51}, that was identified with no significant differential abundance comparing the proteomes of plants with or without FY (Dataset Sx). However it was downregulated in plants with FY. This protein acts on the degradation of the cell wall, which leads to the formation of lysigenous aerenchyma⁴⁹. Aerenchyma channels formation can also occur by ROS-induced programmed cell death⁵⁰, which in the roots can provide flooding tolerance by improving oxygen and nutrient uptake under hypoxic conditions⁵¹. In maize submitted to flooding stress, the increase in polygalacturonase expression and formation of aerenchyma is related to an adaptive response and allows greater tolerance to flooding^{51, 52}. Therefore, the high levels of these proteins in plants

with and without symptoms may be related to the occurrence of flooding in these environments. Although not significant, the higher levels of polygalacturonase in asymptomatic plants may be related to their possible tolerance to flooding.

Among the proteins upregulated in plants with FY are calcineurin B-like protein 10 (Q7FRS8) and steroid 5-alpha-reductase DET2 (Q2QDF6), which have been attributed to the response to starvation. Calcineurin B-like protein 10 acts as a Ca⁺ sensor in cell signaling in response to environmental stimuli such as salinity, osmotic stress and nutrient deprivation, among others, including response to pathogens⁵². This protein is involved in the activation of cellular responses from its binding and activation of serine/threonine-protein kinase⁵². Serine/threonine-protein kinase was also upregulated in plants with FY. Caltractin (P41210) has also been identified in plants with FY, being known as Ca-binding and signaling proteins in response to environmental stimuli⁵³. Regarding steroid 5-alpha-reductase DET2, this protein acts in the biosynthesis of steroids like brassinosteroid, which is involved in the response to many environmental stresses⁵⁴. However, the sequence identified in this dataset was assigned only to starvation. The higher levels of these proteins in plants with FY also suggests the weakness of these plants, including nutritional deficiency and infection by pathogens due to their likely susceptibility.

Under nutrient deficiency conditions, plants need to increase their efficiency in nutrient storage and transport. Although the nodulin-like protein is well known for its characterization in plant roots in symbiotic association with microorganisms, studies have highlighted the importance of this protein in the transport of nutrients and other molecules to favor the growth and development⁵⁵ of even non-nodulating plants⁵⁶. Considering the response to abiotic stimuli, the nodulin-related protein 1 (Q9ZQ80) identified in this dataset was attributed to the osmotic stress and response to cold and heat. However, the possibility that it is also contributing to the increase in nutrient transport efficiency in FY plants cannot be excluded.

The translationally-controlled tumor protein (TCTP, Q9ZSW9) was attributed only to the term water deprivation. On the other hand, in addition to being involved in water transport, studies have shown that the increase in levels of this protein is related to photosynthesis and fatty acid metabolism in response to environmental stresses⁵⁷. TCTPs have also been considered important in the defense response to fungal infections in plants⁵⁸. Therefore, the higher levels of these proteins in plants with FY may include

responses to several environmental stresses, including the increase in infections by pathogens.

Defense response proteins were also identified in plants with and without FY symptoms. In symptomatic plants, five fungal response proteins were upregulated, while four were downregulated. Regarding proteins in response to bacteria, only two were upregulated in plants with FY, while three were downregulated. The little difference between the abundance of fungal or bacterial response proteins observed in the protein profiles of healthy and affected plants does not allow us to deduce that fungal or bacterial infection is the major factor by which plants develop FY symptoms. Furthermore, asymptomatic plants showed higher levels of proteins related to the response to nematodes and insects. In general, asymptomatic plants seem to respond better to different types of environmental stresses, which should be attributed to their healthy state or the difference in genotypes that should be studied in the future.

We cannot yet assure why some genotypes have not yet developed the symptoms of FY. On the other hand, considering the results obtained in the analysis of climate variables, soil classification and fertility, plant nutrition and the protein profiles of plants with FY symptoms, it is possible to suggest the flooding as one of the factors for the deficiency in the nutrients N, P, Ca, Mg, S, Zn and Cu in the observed plants, which may be associated with the greater susceptibility of these plants.

CONCLUSION

Therefore, from all the analyses carried out, the edaphoclimatic conditions related to the accumulation of water in certain soil classes were related to the FY of the oil palm, which was related to the fertility and nutrition of the plant. This hypothesis was also confirmed by proteome analysis, which identified the environmental stress conditions of the roots in plants with symptoms. Under these conditions, several pathogens, both on the ground and in the aerial parts, may be opportunistic and associated with the symptoms observed, but they are not the primary cause of the disease. Therefore, a better understanding of the abiotic factors associated with this disease is essential to understand its etiology and in choosing locations and soils appropriate for the crop and which management strategies should be used. Thus, considering the abiotic origin of the disease caused by temporary flooding in oil palm cultivation sites, it is recommended that before planting that the soil pedology be surveyed, that soils less subject to flooding and good drainage are chosen, and that the soil is unpacked. Planting in ridges is also recommended

to prevent root anoxia. In addition, periodic analyses of plant nutrition should be performed to maintain good soil fertility to avoid nutritional deficiencies and imbalances. In this way, planting can help plants adapt to the biome in the environment, achieving financial and social sustainability for forest populations.

ACKNOWLEDGMENTS

To the Vale Institute in Belém-PA for promoting research and Biopalma for providing the data.

LITERATURE

1. Corley, R. H. V. (2009). How much palm oil do we need?. *Environmental Science & Policy*, 12(2), 134-139.
2. HENKES. J. A.. and LEBID. T. (2015). Óleo de dendê na produção de biodiesel: um estudo de caso das vantagens e desvantagens econômica, ecológica e social da cultura desta oleaginosa para a produção de biodiesel. *Revista Gestão & Sustentabilidade Ambiental*. 4(1). 416-447.
3. OIL WORLD. (2013). *Oil world annual 2013*. Retrieved from <http://www.oilworld.biz/app.php>
4. BARCELOS E. RIOS SD. CUNHA RNV. LOPES R. MOTOIKE SY. BABIYCHUK E. SKIRYCZ A. KUSHNIR S. (2015). Oil palm natural diversity and the potential for yield improvement. *Frontiers in Plant Science* 6:190.
5. FURUMO. P. R. E AIDE. T. M. (2017). Characterizing commercial oil palm expansion in Latin America: land use change and trade. *Environmental Research Letters*. 12(2). 024008.
6. INDEXMUNDI (2017) Palm oil Monthly Price Commod. Prices—Price Charts. Data. News 1–9 (www.indexmundi.com/commodities/?commodity=palm-oil&months=360)
7. PIRKER J. MOSNIER A. KRAXNER F. HAVLÍK P AND OBERSTEINER M (2016) What are the limits to oil palm expansion? *Glob. Environ. Change* 40 73–81
8. IBGE (2017) Agricultural Production by County (<https://sidra.ibge.gov.br/Tabela/1613>)
9. VENTURIERI. A.. FERNANDES. W. R.. BOARI. A. D. J.. e VASCONCELOS. M. A. (2009). Relação entre ocorrência do amarelecimento fatal do dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.) e variáveis ambientais no estado do Pará. In Embrapa Amazônia Oriental-Artigo Em Anais De Congresso (Alice). In: Simpósio Brasileiro De Sensoriamento Remoto. 14. Natal.

10. BOARI. A. DE J. (2008). Estudos realizados sobre o amarelecimento fatal do dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.) no Brasil. Embrapa Amazônia Oriental- Documentos.
11. TRINDADE. D. R.; POLTRONIERI. L. S.; FURLAN JÚNIOR. J. (2005). Abordagem sobre o estado atual das pesquisas para a identificação do agente causal do amarelecimento fatal do dendezeiro. In: POLTRONIERI. L. S.; TRINDADE. D. R.; SANTOS. I. P. (Ed.). Pragas e doenças de cultivos amazônicos. Belém. PA: Embrapa Amazônia Oriental. 2005. p. 439-450.
12. BERGAMIN FILHO. A.. AMORIM. L.. LARANJEIRA. F.F.. BERGER. R.D.. HAU. B. (1998) Análise temporal do Amarelecimento Fatal do dendezeiro como ferramenta para elucidar sua etiologia. Fitopatologia Brasileira. v.23. p. 391-396.
13. LARANJEIRA. F. F.; BERGAMIN FILHO. A.; AMORIM L.; BERGER. R. D.; HAU. B. Análise espacial do amarelecimento fatal do dendezeiro como ferramenta para elucidar sua etiologia. Fitopatologia Brasileira. v. 23. n. 3. p. 397- 403. 1998.
14. VAN DE LANDE. H. L.; ZADOCKS J. C. (1999). Spatial patterns of spear rot in oil palm plantations in Suriname. Plant Pathology. v. 48. n. 2. p. 189-201.
15. ASSIS COSTA. O. Y.. TUPINAMBÁ. D. D.. BERGMANN. J. C.. BARRETO. C. C.. & QUIRINO. B. F. (2018). Fungal diversity in oil palm leaves showing symptoms of Fatal Yellowing disease. PloS one. 13(1).
16. SILVA. H. M. (1989) Relatório de avaliação dos trabalhos com amarelecimento fatal. Belém. PA: [s. n.]. 5 p.
17. HARTLEY. C. W. S. (1977). The Oil Palm: (*Elaeis Guineensis* Jacq.). London: Longman.
18. HUBER. D. M. (1980). The role of mineral nutrition in defense. Plant Pathology. 381-406.
19. HUBER. D. M e WATSON. R. D. (1974). Nitrogen form and plant disease. Annual review of phytopathology. 12(1). 139-165.
20. DATNOFF. L. E.. ELMER. W. H.. & HUBER. D. M. (2007). Mineral nutrition and plant disease. American Phytopathological Society.
21. SILVA. M. G. ; POZZA. E. A. ; Vasco. G. B. ; FREITAS. A. S. ; CHAVES. E. ; PAULA. P. V. A. A. ; DORNELAS. G. A. ; ALVES. M. C. ; SILVA. M. L. O. ; POZZA. A. A. A. (2019). Geostatistical analysis of coffee leaf rust in irrigated crops and its relation to plant nutrition and soil fertility. PHYTOPARASITICA. v. 46. p. 1-18.
22. SOARES. THAISSA DE PAULA FARIAS ; FERREIRA. MARIA ALVES ; POZZA. ADÉLIA AZIZ ALEXANDRE ; Pozza. Edson Ampélio ; MAFIA. REGINALDO GONÇALVES . Distribution and content of calcium and potassium in eucalyptus leaves infected with. JOURNAL OF PHYTOPATHOLOGY JCR. v. 168. p. 1-12. 2020.
23. TAIZ. L.; ZEIGER. E. (2013) Fisiologia vegetal. 5. ed. Porto Alegre: Artmed. 954 p.

24. Belan, L. L., Pozza, E. A., de Oliveira Freitas, M. L., Pozza, A. A. A., de Abreu, M. S., & Alves, E. (2015). Nutrients distribution in diseased coffee leaf tissue. *Australasian Plant Pathology*, 44(1), 105-111.
25. MARSCHNER. H. (2011). Mineral nutrition of higher plants. Academic press.
26. FREITAS. A. S.. POZZA. E. A.. POZZA. A. A. A.. OLIVEIRA. M. G. F.. SILVA. H. R.. ROCHA. H. S.. e GALVÃO. L. R. (2015). Impact of nutritional deficiency on Yellow Sigatoka of banana. *Australasian Plant Pathology*. 44(5). 583-590.
27. POZZA, Edson Ampélio; POZZA, Adélia Aziz Alexandre; BOTELHO, Deila Magna dos Santos. Silicon in plant disease control. *Revista Ceres*, v. 62, n. 3, p. 323-331, 2015.
28. Drew MMC. Oxygen deficiency and root metabolism: Injury and acclimation under hypoxia and anoxia. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* [Internet]. 1997; 48(1):223–50. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.48.1.223> 17.
29. VAN DE LANDE. H. L.; ZADOCKS J. C. (1999). Spatial patterns of spear rot in oil palm plantations in Suriname. *Plant Pathology*. v. 48. n. 2. p. 189-201.
30. Voesenek, L. A., & Bailey-Serres, J. (2015). Flood adaptive traits and processes: an overview. *New Phytologist*, 206(1), 57-73.
31. NASCIMENTO. S. V.. MAGALHÃES. M. M.. CUNHA. R. L.. DE OLIVEIRA COSTA. P. H.. DE OLIVEIRA ALVES. R. C.. DE OLIVEIRA. G. C.. e DA SILVA VALADARES. R. B. (2018). Differential accumulation of proteins in oil palms affected by fatal yellowing disease. *PloS one*. 13(4). e0195538.
32. NASCIMENTO, C.; HOMMA, A. Amazônia: meio ambiente e tecnologia agrícola. Belém: Embrapa-CPATU.,1984. 282p. (Embrapa - CPATU. Documentos, 027).
33. SANTOS. A. R.. PASTORE. E. L.. e AUGUSTO. F. (1985). Estradas vicinais de terra: manual técnico para conservação e recuperação. In *Estradas vicinais de terra: manual técnico para conservação e recuperação*. IPT.
34. CAMPBELL C.L.; MADDEN L.V. (1990) Introduction to Plant Disease Epidemiology. New York. NY. John Wiley. p. 560.
35. SHANER. G.; FINNEY. R. E. (1977) The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-milde wing resistance in Knox wheat. *Phytopathology*. Saint Paul. V. 67. N. 3. P. 1051-1056. Feb.
36. MALAVOLTA E. VITTI GC. OLIVEIRA AS (1997) Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações. Potafos 319 p.
37. Guzmán, H. C. P. (2014). Teores referenciais de nutrientes em folhas de dendê (*Elaeis guineensis*. Jacq) para as condições da Amazônia.
38. Souza RLR, Veiga AS, Ramos EJA. Denpasa: Amarelecimento fatal em dendezeiro: identificação prática. 2000. 27p.

39. Wang W, Vignani R, Scali M, Cresti M. A universal and rapid protocol for protein extraction from recalcitrant plant tissues for proteomic analysis. *Electrophoresis*. 2006;27(13):2782–6. DOI: 10.1002/elps.200500722
40. BARCELOS. E.. PACHECO. A. R.. MÜLLER. A. A.. VIEGAS. I.. e TINOCO. P. B. (1987). Dendê: informações básicas para seu cultivo. Embrapa Amazônia Oriental-Documentos
41. RIVERA-MENDES. Y. D.. CUENCA. J. C.. & ROMERO. H. M. (2016). Physiological responses of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) seedlings under different water soil conditions. *Agronomía Colombiana*. 34(2). 163-171.
42. SILVEIRA, R. I.; VEIGA, A.S.; RAMOS, E.J.A.; PARENTE, J.R. Evolução da sintomatologia do amarelecimento fatal a adubações com omissão de macro e micronutrientes. Belém, PA: Denpasa, 2000, 35p.
43. VIEGAS. I.. FURLAN JUNIOR. J.. FRAZÃO. D.. TRINDADE. D.. & THOMAZ. M. (2000) Concentração de micronutrientes em folhas de dendezeiro sadios e infectados pelo amarelecimento fatal do dendezeiro. In Embrapa Amazônia Oriental-Resumo em anais de congresso (ALICE). Fitopatologia Brasileira. v. 25. p. 347.
44. COSTA. P. A.. MOTA. J. C. A.. ROMERO. R. E.. FREIRE. A. G.. & FERREIRA. T. O. (2014). Changes in soil pore network in response to twenty-three years of irrigation in a tropical semiarid pasture from northeast Brazil. *Soil and Tillage Research*. 137. 23-32.
45. BERNARDES, M. S. Pesquisa sobre amarelecimento fatal em dendezeiro. Denpasa, 2001.
46. Hossain Z, Nouri MZ, Komatsu S. Plant cell organelle proteomics in response to abiotic stress. Vol. 11, *Journal of Proteome Research*. 2012. p. 37–48. <https://doi.org/10.1021/pr200863r>
47. Bertolde FZ, Almeida AAF, Pirovani CP. Analysis of gene expression and proteomic profiles of clonal genotypes from *Theobroma cacao* subjected to soil flooding. *PLoS One*. 2014;9(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108705>
48. Alam I, Lee DG, Kim KH, Park CH, Sharmin SA, Lee H, et al. Proteome analysis of soybean roots under waterlogging stress at an early vegetative stage. *J Biosci*. 2010;35(1):49–62. <https://doi.org/10.1007/s12038-010-0007-5>
49. CAMPOS. A.C.P.C. (2013). Mapeamento de solos explorados com a cultura da palma oleaginosa no estado do Pará. Trabalho de conclusão de curso. ESALQ-USP. 28p.
50. Kamal AHM, Rashid H, Sakata K, Komatsu S. Gel-free quantitative proteomic approach to identify cotyledon proteins in soybean under flooding stress. *J Proteomics*. 2015;112:1–13.
51. Arora, K., Panda, K. K., Mittal, S., Mallikarjuna, M. G., Rao, A. R., Dash, P. K., & Thirunavukkarasu, N. (2017). RNAseq revealed the important gene pathways controlling adaptive mechanisms under waterlogged stress in maize. *Scientific Reports*. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-10561-1>

52. Porto, B. N., Alves, J. D., Magalhães, P. C., Castro, E. M., Campos, N. A., Souza, K. R. D., ... Santos, M. O. (2013). Calcium-Dependent Tolerant Response of Cell Wall in Maize Mesocotyl Under Flooding Stress. *Journal of Agronomy and Crop Science*. <https://doi.org/10.1111/j.1439-037X.2012.00535.x>
53. Sánchez-Barrena MJ, Martínez-Ripoll M, Albert A. Structural Biology of a Major Signaling Network that Regulates Plant Abiotic Stress: The CBL-CIPK Mediated Pathway. *International Journal of Molecular Sciences*. 2013; 14(3):5734-5749.
54. Trevor M. Nolan, Nemanja Vukašinić, Derui Liu, Eugenia Russinova, Yanhai Yin, Brassinosteroids: Multidimensional Regulators of Plant Growth, Development, and Stress Responses, *The Plant Cell*, Volume 32, Issue 2, February 2020, Pages 295–318, <https://doi.org/10.1105/tpc.19.00335>
55. Niño-González, M., Novo-Uzal, E., Richardson, D. N., Barros, P. M., & Duque, P. (2019). More Transporters, More Substrates: The Arabidopsis Major Facilitator Superfamily Revisited. In *Molecular Plant* (Vol. 12, Issue 9). <https://doi.org/10.1016/j.molp.2019.07.003>
56. Denancé, N., Szurek, B., & Noël, L. D. (2014). Emerging Functions of Nodulin-Like Proteins in Non-Nodulating Plant Species. *Plant and Cell Physiology*, 55(3), 469–474. <https://doi.org/10.1093/pcp/pct198>
57. De Carvalho, M., Acencio, M. L., Laitz, A. V. N., de Araújo, L. M., de Lara Campos Arcuri, M., do Nascimento, L. C., & Maia, I. G. (2017). Impacts of the overexpression of a tomato translationally controlled tumor protein (TCTP) in tobacco revealed by phenotypic and transcriptomic analysis. *Plant Cell Reports*, 36(6), 887–900. <https://doi.org/10.1007/s00299-017-2117-0>
58. Meng X, Yu Y, Zhao J, Cui N, Song T, Yang Y and Fan H (2018) The Two Translationally Controlled Tumor Protein Genes, CsTCTP1 and CsTCTP2, Are Negative Modulators in the Cucumis sativus Defense Response to *Sphaerotheca fuliginea*. *Front. Plant Sci.* 9:544. doi: 10.3389/fpls.2018.00544

TERCEIRA PARTE – ARTIGO 2

Artigo preparado de acordo com as normas da revista *Australasian Plant Pathology*

Temporal progression of eucalyptus powdery mildew in a microclonal propagation nursery

Renata Cristina Martins Pereira¹, Edson Ampélio Pozza^{1*}, Juliana Barros Ramos¹, Lucas Amaral de Melo², Adélia Alexandre Azziz Pozza³

¹Department of Plant Pathology, Federal University of Lavras (UFLA), Lavras, Minas Gerais, 3037 37200-900, 11 Brazil

²Department of Forest Science, Federal University of Lavras (UFLA), Lavras, Minas Gerais, 3037 37200-900, Brazil

¹Department of soil science, Federal University of Lavras (UFLA), Lavras, Minas Gerais, 3037 37200-900, 11 Brazil

Correspondence: edsonpozza@gmail.com.

ABSTRACT

Powdery mildew (*Oidium eucalypti*) on eucalyptus (*Eucalyptus* sp.) frequently occurs during microclonal propagation and has become a problem for seedling production due to the difficulties controlling the disease and the resulting considerable losses. Several factors can influence the progression of the disease, including environmental variables. The weather plays a fundamental role in the metabolism of the pathogen and host and can favour or hinder the occurrence of the disease. Thus, quantifying these variables is essential for relating them to the spread of the pathogen and defining disease management strategies. Furthermore, to understand the origin and quantity of an initial inoculum, the mechanism through which a pathogen spreads and the behaviour of the pathosystem, it is necessary to study the temporal progression of a disease. The main objectives of this study were to study disease severity over time and to adjust nonlinear models to the temporal progression of eucalyptus powdery mildew in a microclonal propagation nursery. The experiment was carried out in a nursery located at 21°13'38"S, 44°58'08.2"W. Clones 144 and GG680 were planted and grown in a semiopen greenhouse. Completely randomized blocks were used as the experimental design. Disease severity was evaluated weekly, totalling 26 evaluations. Productivity was evaluated twice in June and July. The assumptions of the analysis of variance were verified with normality (Shapiro Wilk), homogeneity (Bartlett) and independence (Ljung-Box) tests for the severity, area under the disease progression curve and productivity data, respectively, and the F test ($p < 0.05$) was subsequently performed. Disease severity was correlated with the averages of the

climatic variables collected per day and those that lagged by 7 and 30 days before each evaluation, using the Pearson correlation coefficient ($p < 0.05$). Disease progression rates were calculated, and nonlinear models were fit with exponential, monomolecular, logistic and Gompertz models. It was concluded that the use of clones with lower disease intensities can reduce powdery mildew losses in eucalyptus and thus increase cutting production.

Keywords: Temperature, nonlinear models, severity, biotrophic fungi

INTRODUCTION

Brazil has 6.97 million hectares of eucalyptus, leading to its production being globally ranked in 2019, with an average of 35.3 m³/ha per year (Ibá 2020). The increase in the productivity of national forests is due to Brazil's favourable climate and soil, research efforts, the organization of its private sector and good management practices. Among these management practices, planting clones is notable as this approach enables the production of homogeneous forests with higher quality wood and cellulose, fundamental factors for increasing the productivity and competitiveness of forestry companies (Assis et al. 2004). The cloning system is carried out with minicuttings that are taken from preselected matrices in a field and cultivated through microclonal propagation in nurseries. Cuttings of eucalyptus are tender with no lignified stems or branches and are stimulated to produce roots by contact with immersion in a hormone solution. However, this rooting is influenced by intrinsic and extrinsic factors affecting the plant material. One of the causes of the loss of efficiency in producing cuttings is the presence of powdery mildew on the leaves, whose aetiological agent is *Oidium* sp. (Mucci et al. 1980).

In the matrices used to produce minicuttings, signs of this pathogen appear on the leaf surface, where mycelium, conidiophores and white conidia can be observed. The increased severity of this disease causes wrinkling and oversprouting (Ferreira 1997), decreasing productivity, resulting in approximately 50% of seedling losses in the nurseries, and reducing the number of cuttings, the health of the plants and the duration of the growth and development of seedlings in a greenhouse (Mucci et al. 1980).

This fungus often occurs in microclonal propagation nurseries, where environmental conditions are favourable due to the density of plants, constant contact between the leaves and drip irrigation, favouring low relative humidity. These factors, associated with the

low availability of free water in the leaves and susceptible genetic material, provide perfect conditions for the occurrence of powdery mildew epidemics with high rates of progression. In addition, this disease has higher severity values in July, when the production of cuttings for planting in the rainy season starts (Alfenas et al. 2004).

Eucalyptus production has a production cycle of 5 to 7 years, so planting new areas must occur continuously to maintain the harvest throughout the year. However, with the incidence of this disease, the production of seedlings can be interrupted or drastically reduced, causing damage not only in nurseries but also in the entire production process. Due to the high productivity of cultivars susceptible to this disease, it is necessary to use efficient management. Thus, understanding the progression of the disease and the environmental variables that favour eucalyptus powdery mildew can help its management.

Among the environmental variables affecting powdery mildew, temperature and humidity are the most correlated with its culture; thus, these are the most studied variables (Aust and Hoyningen-Huene 1986). However, few studies have been carried out, and there are still no quantitative data on this fungus in eucalyptus. In addition, identifying the time of the outbreak's onset and understanding how the disease behaves over time are essential for determining the correct time for spraying fungicides or biological control agents. Furthermore, a nonlinear regression model can be adjusted to the progression of this disease over time to obtain the rate of progression of the outbreak.

In recent years, new statistical methods have emerged to quantify plant diseases, and these methods can increasingly explain pathogen and host dynamics. However, little is known about the powdery mildew on eucalyptus. Therefore, the main objectives of this study were to evaluate the spatial and temporal progression of powdery mildew (*Oidium* sp.) and to correlate these factors with the environmental variables occurring in eucalyptus (*Eucalyptus* sp.) matrices in a microclonal propagation nursery.

MATERIAL AND METHODS

Delimitation of instalments

The study was carried out in a microclonal propagation nursery in the municipality of Lavras, state of Minas Gerais, Brazil, located at 21°13'38.0"S, 44°58'08.2"W between December 2018 and July 2019. According to the Köppen climate classification, the climate in the city of Lavras is the tropical Cwa type, characterized as having a dry winter

and a warm and humid summer, with an average altitude of 970 m above sea level (Alvares et al. 2014).

To conduct this study, two identical experiments were carried out on in a suspended gutter that was 1.20 m wide by 12 m long and 1.2 m high, containing 600 plants with a spacing of 0.2 m between seedlings, was constructed in a semiopen greenhouse. The greenhouse structure was constructed with plastic on the roof and screens on the sides. Eucalyptus matrices of clones 144 and GG680 of the species *Eucalyptus urophylla* and the hybrid *E. grandis* x *E. urophylla*, respectively, were used in this experiment due to their commercial importance in the state of Minas Gerais and their differences in terms of disease resistance. The clones were cultivated in sand and arranged in rows and columns. The seedlings received drip irrigation and fertilization during the experiment. For fertilization with a nutrient solution, boric acid, calcium chloride, potassium chloride, 100% soluble monoammonium phosphate (MAP), sodium molybdate, calcium nitrate and copper, magnesium, manganese and zinc sulfates were used. Nutrients were supplied by direct drip. The other culture treatments, including phytosanitary management, were carried out according to technical recommendations and the producer's management.

The experimental design used was completely randomized blocks with six replications and two clones as treatments. In each plot or replication, there were 50 matrices, and the border with 12 plants on each side, located around the 26 central plants, was disregarded for the evaluation. Infection of eucalyptus matrices occurred naturally.

Quantification of the severity of eucalyptus powdery mildew and climatic variables

The severity assessments were carried out weekly for seven months on all leaves of the central plants, totalling 26 evaluations of the disease. All leaves in a plot were evaluated, and powdery mildew severity was quantified. To assess disease severity, the diagrammatic scale for powdery mildew in eucalyptus proposed by Valeriano et al. (2015) was used. Data from the severity assessments over the duration of the experiment were integrated into an area under the disease progression curve (AUDPC), according to Shanner and Finney (1977):

$$\text{AUDPC} = \sum_{i=1}^{n-1} \frac{(Y_i + Y_{i+1})}{2} * (T_{i+1} - T_i)$$

where

AUDPC = area under the disease severity progression curve,

y_i : proportion of disease during the i -th observation;

t_i : time, in days, during the i -th observation;

n : total number of observations.

At the beginning of the experiment, a Watchdog[®] Spectrum 1650 meteorological station was installed to monitor the following climatic variables: mean temperature, relative humidity, leaf wetness and dew point. These sensors were located in the crown of the eucalyptus matrix. In addition, at the Campbell Scientific[®] meteorological station, located 200 metres from the experimental area, pitch evaporation, insolation, precipitation, wind speed and maximum and minimum temperatures were collected. The data that were collected weekly were used to plot the disease progression curve over time, in addition to graphs of the climatic variables.

Temporal analysis and fit of nonlinear models to the progression of powdery mildew in eucalyptus

For the two clones, disease progression curves were plotted, and absolute disease progression rates were calculated during the entire period evaluated, using the following equation (Vanderplank, 1963):

$$Rate = \frac{Y_{i+1} - Y_i}{T_{i+1} - T_i}$$

where

Y_i = proportion of disease during the i -th observation;

T_i = time in days during the i -th observation.

In addition, the exponential models: $y = y_0 \exp(r_e t)$, Gompertz model: $y = \exp[\ln(y_0) \exp(-r_e t)]$, linear model $y = y_0 + r * t$, logistic model: $y = 1 / (1 + ((1/\exp(x_0)) - 1) * \exp(-rt))$, and monomolecular model: $y = 1 - ((1 - \exp(x_0)) / (\exp(x_0) * \exp(-rt)))$ were fitted (Campbell and Madden, 1990; Madden, Hughes and Vand Den Bosch, 2007). The best fitted model was selected based on the highest value of the regression determination coefficient (R^2), lowest mean square of residuals (QMR), lowest standard deviation and t test of the intercept and rate, randomness for the distribution, and graphic amplitude of the residuals and higher values of the correlation coefficient between the data (Vanderplank 1963; Campbell and Madden 1990).

Producing and rooting of the cuttings

The collection of shoots for the preparation of the minicuttings was carried out selectively and continuously for two weeks in June and July. The frequency of the collections was approximately two collections per week. Apical cuttings were collected with dimensions varying between 4 and 6 cm, containing two to three pairs of leaves, which were cut in half.

After being collected and prepared, the minicuttings were placed in plastic tubes and arranged in 50 cm² flat trays containing a substrate composed of equal parts carbonized rice husk and coarse-grained vermiculite. This substrate received an addition of 8.0 kg m⁻³ of simple superphosphate, 0.695 kg m⁻³ of ammonium sulfate, 0.208 kg m⁻³ of potassium chloride, 0.014 kg m⁻³ of zinc sulfate, 0.014 kg m⁻³ of copper sulfate, 0.014 kg m⁻³ of manganese sulfate and 0.028 kg m⁻³ of boric acid.

For rooting, the cuttings remained in a growth chamber in suspended trays. The humidity of the air was kept > 80% for a period of 15 to 25 days. The cuttings were transferred to a greenhouse and covered with shading at 50% light interception for seven days. After this period, the cuttings that presented root growth were considered rooted, and the productivity index was calculated based on the following formula:

$$Prod(\%) = \frac{NEE}{NTE} \times 100$$

where

Prod (%) = productivity index in percentage;

NEE = number of rooted cuttings; and

NTE = total number of stakes collected.

Statistical analysis

The average of the two experiments were analysed and the assumptions of the analysis of variance were verified with normality (Shapiro Wilk), homogeneity (Bartlett) and independence (Ljung-Box) tests for the severity data in each evaluation, AUDPC, number of cuttings, rooted cuttings and productivity index. Subsequently, they were submitted to analysis of variance, and significance was verified by the F test ($p < 0.05$). Then, Tukey's test ($p < 0.05$) was used to compare the clones.

The severity was correlated with the averages of the climatic variables collected per day and those that lagged by 7 and 30 days before each evaluation, using the Pearson

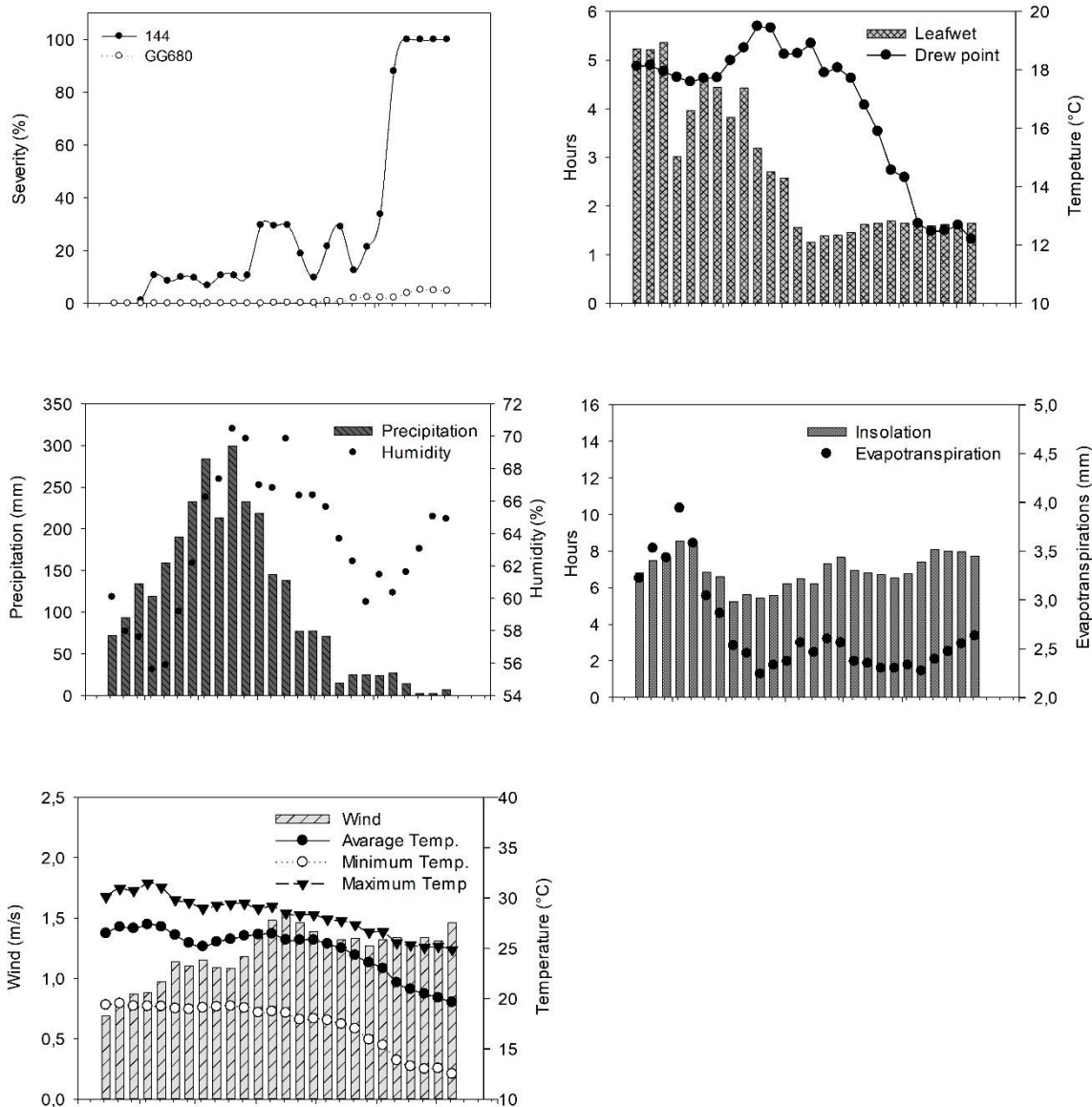
correlation coefficient ($p < 0.05$). Statistical analyses were performed with R software (R Core Team 2017), using the iswR package (Dalgaard 2008) for the Pearson correlation.

RESULTS

Quantification of the severity of eucalyptus powdery mildew and climatic variables

There was an occurrence of powdery mildew in both clones; however, the mean disease severity varied. The first symptoms of the disease in clone 144 started 21 days after the first evaluation (Figure 1A), corresponding to the first week of February, when the average temperature was 26.9 °C, the relative humidity was 69.7%, the wind speed was 0.87 m/s, insolation was 7.6 h/day, there was 134 mm of precipitation, and there were 5 hours of leaf wetness per day (Figures 1B, 1C, 1D and 1E). The mean severity increased in the following weeks until stabilization at the maximum value of the disease, at 100% severity 154 days after beginning the experiment, on June 18th.

Figure 1. Progression curve of mean severity of powdery mildew (*Oidium* sp.) in the leaves of eucalyptus clones 144 and GG680 (*Eucalyptus urophylla* and *E. grandis* x *E. urophylla*, respectively) (A); weekly averages of the climatic variables: leaf wetness and dew point (B); humidity and precipitation (C); the evaporation and insolation (D); and maximum, average, and minimum temperature and speed of the wind (E) from January to July.



For clone GG680, the first symptoms of the disease started 85 days after the first evaluation (Figure 1A), in the beginning of May, when the average temperature was 26.3 °C, the relative humidity was 75.5%, insolation was 6.2 h/day, there was 218 mm of precipitation, the wind speed was 1.4 m/s, and there were 2 hours of leaf wetness per day (Figures 1B, 1C, 1D and 1E).

There was also a significant correlation between mean disease severity and the climatic variables (Table 1). For the variables that lagged by 7 days, there was a significant

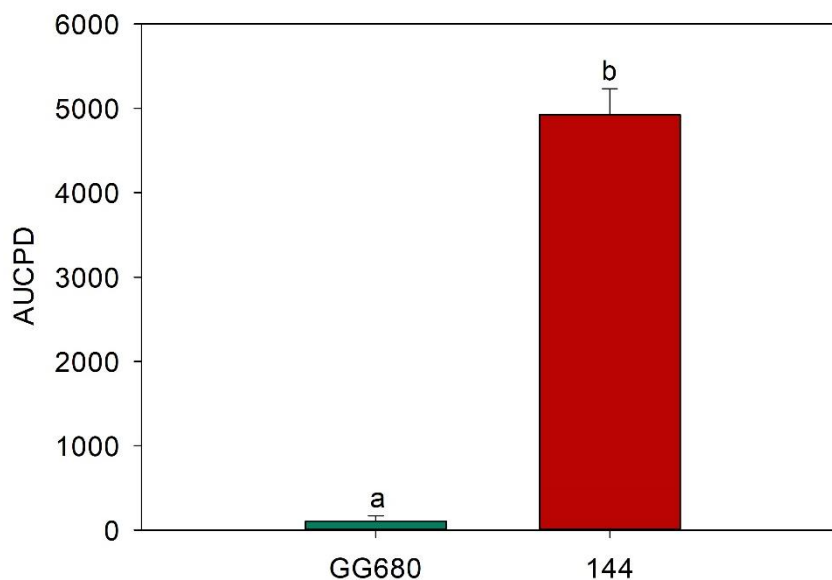
correlation only with temperature, dew point and precipitation, while for the variables that lagged by 30 days, there was a significant correlation between the variables, except for evaporation. For both clones, 144 and GG 680, there was a significant and negative correlation for the variables leaf wetness (-0.56 and -0.52), maximum temperature (-0.86 and -0.88), mean temperature (-0.92 and -0.97), minimum temperature (0.93 and -0.96), precipitation (-0.58 and -0.69), humidity (-0.40 and -0.38) and dew point (-0.87 and -0.93), and there was a positive significant correlation for the variables insolation (0.42 and 0.43) and wind (0.49 and 0.40).

Table 1. Correlation coefficients between the severity of powdery mildew (*Oidium* sp.) in eucalyptus (*Eucalyptus* sp.) and the climatic variables maximum temperature, minimum temperature, average temperature, precipitation, relative humidity, wind speed, leaf wetness, the evaporation and insolation at 7 and 30 days before the evaluation in clones 144 and GG680 in the period between 01/15/2019 and 07/14/2019 in Lavras/MG.
* Significant difference ($p < 0.05$).

Climatic variables	Clone			
	144		GG680	
	7 days	30 days	7 days	30 days
Leaf wetness	-0.369	-0.560*	-0.349	-0.523*
Average Temperature	-0.826*	-0.924*	-0.834*	-0.958*
Humidity	0.154	-0.402*	0.085	-0.390*
Dew point	-0.690*	-0.876*	-0.762*	-0.935*
Tar evaporation	-0.134	-0.367	-0.090	-0.339
Insolation	0.165	0.425*	0.165	0.438*
Precipitation	-0.423*	-0.585*	-0.444*	-0.700*
Maximum temperature	-0.711*	-0.865*	-0.697*	-0.890*
Minimum temperature	-0.822*	-0.939*	-0.857*	-0.963*
Wind speed	0.362	0.496*	0.277	0.401*

Regarding the area under the disease progression curve, there was a significant difference ($p < 0.05$) in the AUDPC of the clones (Figure 2). Clone 144 had a higher mean AUDPC (4923.8) than GG680 (103.4).

Figure 2. Area under the disease progression curve (AUDPC) in clones 144 and GG680 in the period between January and July.

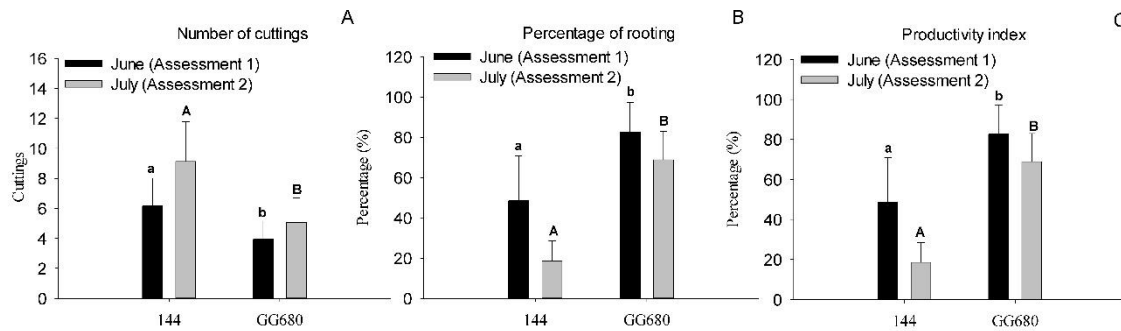


Number of cuttings, cuttings that rooted and productivity index

There was a significant difference in the number of cuttings and the cuttings that rooted and the productivity index between the two assessments ($p < 0.05$). In the first evaluation, in June, the mean total number of cuttings collected was 6.1 and 3.94 for clones 144 and GG680, respectively. In the second evaluation, carried out in July, the number of cuttings collected increased to 9.1 and 5.05 for clones 144 and GG680, respectively.

In comparison to clone 144, clone GG680 had a higher percentage of cuttings that rooted in evaluations 1 and 2 (82.6 and 68.8% versus 50.0 and 17.0%, respectively). For the productivity index, clone GG680 obtained the highest percentage in both evaluations 1 and 2 (82.6 and 68.8%, respectively) (Figure 3).

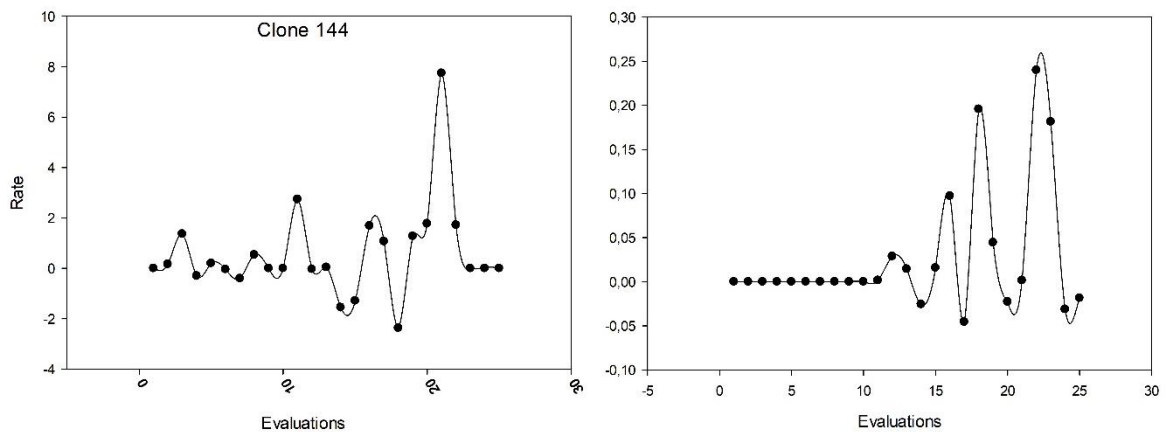
Figure 3. Total number of cuttings produced (A), percentage of cuttings that rooted (B) and productivity index (C) for evaluations 1 and 2, carried out in June and July, in a microclonal propagation nursery.



Temporal analysis and adjustment of nonlinear models to the progression of powdery mildew in eucalyptus.

The rate of disease progression increased 21 and 77 days after the first evaluation of clones 144 and GG680, respectively. The highest progression rate for clone 144 was on June 11 (7.4), and the lowest occurred on May 21 (-2.1). The rates for clone GG680 were lower than those for clone 144, with the highest and lowest rates on June 18th (0.24) and May 14th (-0.04), respectively (Figure 4).

Figure 4 - Disease severity progression rate (%/day) for clones 144 and GG680.



To fit the eucalyptus powdery mildew severity progression curve to nonlinear models, the periods from February to July and May to July were used for clones GG680 and 144, respectively. In comparison to that for clone GG680, the logistic model for clone 144 had a higher R^2 (0.94) and lower error (0.008), and the equation parameters were significant (Table 2); however, the Gompertz model for clone GG680 had a higher R^2 (0.92) and a smaller error ($4.08e^{-05}$), significance of parameters and amplitude of residuals (Figure 5). The progression rate for clone 144 was 0.241%/day, while that for clone GG680 was 0.007%/day.

1

2 Table 2. Powdery mildew progression rate (r), initial inoculum or intercept (y₀),
 3 coefficient of determination (R²) and mean square error (MSE) of the nonlinear models.

Models	144		GG680					
	r ^a	y ₀ ^b	R ^{2c}	MS E ^d	r	y ₀	R ²	MSE
Linear	0.023*	0.155	0.78	0.03	4.9e-	-6.97e-03	0.87	5.91e-
	**	***	7	0	04***	***	2	05
Monomolec ular	0.061*	0.006	0.80	0.02	5.0e-	-7.06e-03	0.86	6.03e-
	**		0	9	04***	***	8	05
Exponential	0.027*	0.337*	0.63	0.05	0.028		0.90	4.81e-
	**	**	8	2	***	0.002***	4	05
Logistic	0.241*	0.025*	0.94	0.00	0.029		0.90	4.73e-
	**	*	1	8	***	0.002***	7	05
Gompertz	Na	Na	Na	Na	0.007		0.92	4.08e-
					***	0.001***	7	05

4

5 ***p<0.001; ** p < 0.01; * p < 0.05.

6 Na: not fitted.

7 ^a r: eucalyptus powdery mildew rate of progression.

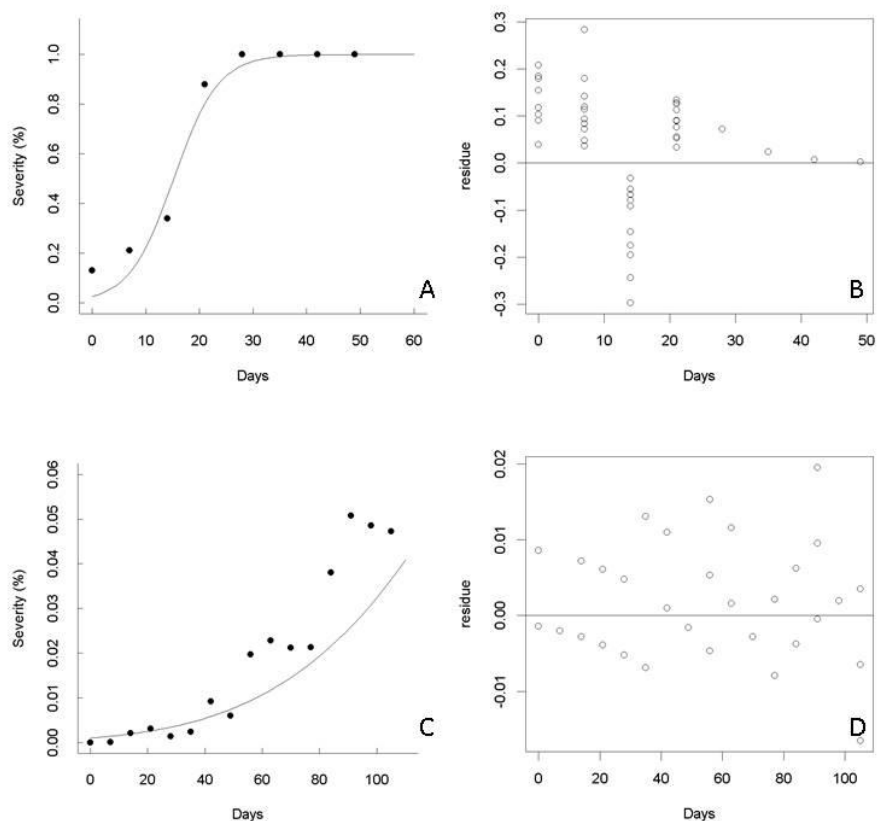
8 ^b y₀: initial severity of eucalyptus powdery mildew.

9 ^c Coefficient of determination adjusted in regression analysis (R²).

10 ^d Mean square of the residual of the linear regression analysis (MSE).

11

12 Figure 5. Disease severity fitted by the logistic and Gompertz models and dispersion plot
 13 of the residuals for clones 144 (**A** and **B**) and GG680 (**C** and **D**).



14

DISCUSSION

Powdery mildew in eucalyptus is considered to occur globally and has been reported in Australia, Germany, the United States, Brazil, Korea and Nigeria, among other countries (Farr and Rossman 2015; Cho et al. 2016; Gege and Ahmad 2015). Brazil has the ideal climate conditions to cultivate eucalyptus, as it requires some specific edaphoclimatic variables for satisfactory production in a short period of time. Thus, clonal propagation became a viable method for this sector, reducing the costs of harvesting and producing seedlings. The relationship of powdery mildew in eucalyptus clonal matrices with climatic variables was verified in this work. The disease severity levels in both clones increased over the evaluation period, and disease progression was evident in all plots, reaching 100% in June for clone 144. Concomitantly, there was a reduction in temperature (18 °C), precipitation (14 mm), humidity (66%), leaf wetness (1.6 hours), dew point (12.5 °C) and sunshine (8 hours). The same result occurred in a study carried out by Kurokawa et al. (2020), where there was greater severity of eucalyptus powdery mildew at temperatures of $T_m = 13$ to 23 °C, $T_{min} = 8$ to 19 °C and $T_{max} = 18$ °C. According to Reis (2004), the climatic conditions that favour the accumulation of water

on the leaf surface reduce the spread of powdery mildew. For example, leaf wetness can prevent conidia germination due to the formation of a water film on the surface of the leaf. When analysing combined climatic factors, such as temperature and humidity, there was a reduction in the severity of the disease from 30% to 12% in May. Despite the reduction in temperature (21 °C) in this period, there was also an increase in humidity (75%), leaf wetness (1.62 hours) and precipitation (77 mm). This behaviour was also observed for powdery mildew in barley; according to Dutzmann (1985), where the conidial concentration of powdery mildew in barley was not related to a single environmental factor.

In this work, there was a significant correlation between mean disease severity and climatic variables that lagged during the 7 and 30 days before the weekly evaluation. However, for those variables that lagged during the 30 days immediately prior to disease assessment, all climatic variables correlated with powdery mildew, except for evaporation, indicating the importance of this approach. The lag in the climatic data demonstrates that a period of time is necessary for a plant to develop symptoms and signs of pathogenesis. Among the variables analysed, temperature had the highest correlation with the disease ($T_m = -0.93$ and -0.96 , $T_{min} = -0.92$ and -0.97 , and $T_{max} = -0.86$ and -0.88 for clones 144 and GG680, respectively). In addition, the presence of water on the leaf surface reduced the severity of disease, as it had a negative correlation with leaf wetness (-0.56 and -0.52), precipitation (-0.58 and -0.69), moisture (-0.40 and -0.38) and dew point (-0.87 and -0.93) for clones 144 and GG680, respectively. Vomero et al. (2018) studied eucalyptus powdery mildew under different production conditions. In a microclonal production nursery, the disease occurred throughout the period evaluated, but it was in the months with lower temperatures, approximately 18 to 22 °C, that the pathogen was more severe. This result agrees with those of Silva et al. (2001), who determined a temperature range of 20 and 25 °C, combined with a 12-hour photoperiod, is ideal for the germination of the conidia of most powdery mildew species (Silva et al. 2001).

For the evaluations of cutting production, clone 144 (9.18 cuttings) produced more cuttings than clone GG680 (5.05). However, clone GG680 had a higher percentage of cuttings that rooted in evaluations 1 and 2 (82.6 and 68.8%, respectively) than clone 144 (50.0 and 17.0%). Thus, when the productivity index was calculated, in comparison to clone GG680 (cuttings at 68.8), clone GG680 had a greater production of healthy cuttings at 82.6. According to Cunha et al. (2009), the production of minicuttings performs better when there is an increase in temperature regardless of the type of minicutting. The authors used the Pearson coefficient to correlate eucalyptus clones with minicutting production and rooting. I (0.47) had a significant

and positive influence on rooting and the production of cuttings, while air humidity (-0.55) had a negative influence. Thus, high temperatures can prevent the increase in powdery mildew, in addition to increasing productivity, in microclonal production nurseries. However, the high cost of heating in greenhouses makes it economically unfeasible to control this environment.

The cutting production rates for clone GG680 were lower than those for clone 144, with the latter having the highest rate on June 18 (0.24). Among the mathematical models tested, the Gompertz and logistic models had the best fit for the progression curve of clones GG680 and 144, respectively. The tested models explained the rate of progression because the disease caused by *Oidium eucalypti* is polycyclic, and the potential to inoculate the pathogen during the crop cycle is one of the main factors that determine the degree of incidence and severity of the disease and is even more important early in plant development (Bergamin, 1995). In the Gompertz model, the growth rate was accelerated at the onset of the disease and changed rapidly to slower growth (Madden et al. 2007), with similar behaviours occurring in the more resistant clone GG680. This same model had a better fit in the work of Chelal and Hau (2015) for tomatoes infected with *Oidium neolycopersici*. The logistic and monomolecular models proposed by Vanderplank (1963) to describe the spread of infectious diseases are based on the assumption that in a population, the absolute rate of disease is proportional to the level of healthy plants. In the case of the logistic model, it is assumed that the increase in disease is also proportional to the level of disease incidence within a plant population, and this model is used to describe polycyclic outbreaks with secondary dissemination. Oliveira et al. (2019) adjusted the logistic model for bacterial spot in clonal eucalyptus plantations. Several other studies on foliar diseases have shown the models mentioned above as the best fits for pathogen incidence data, both in the nurseries and in the field (Neves et al. 2014; Behlau et al. 2007; Fininsa et al. 2002).

CONCLUSION

There were occurrences of powdery mildew on both clones. With the reduction of temperature and relative humidity, the first signs of the pathogen appeared, and it progressed towards increased severity. Conferring genetic resistance through management techniques is an option to reduce spraying with fungicides.

Declarations

Conflicts of interest

The authors declare that they have no competing interests.

REFERENCES

- Alfenas AC, Zauza EAV, Mafia RG, De Assis TF (2004) Clonagem e doenças do eucalipto.
- Assis TF, Fett-Neto AG, Alfenas AC (2044) Current techniques and prospects for the clonal propagation of hardwoods with emphasis on Eucalyptus. In: WALTER, C.; CARSON, M. (Eds.). Plantation forest biotechnology for the 21th century. Kerala, India: Research Signpots p.303-333.
- Aust HJ, Hoyningen-Huene JV (1986) Microclimate in relation to epidemics of powdery mildew. *Annual Review of Phytopathology* 24: 491-510.
- Behlau F, Belasque Júnior J, Bergamin Filho A, Leite Junior RP (2007) Incidência e severidade de cancro cítrico em laranja Pêra Rio sob condições de controle químico e proteção com quebra-vento. *Fitopatologia Brasileira*, 32, 311-317.
- Bergamin Filho A. (1995) Manual de fitopatologia (Vol. 1, pp. 627-646). H. Kimati, L. E. A. Camargo, & J. A. M. Rezende (Eds.). São Paulo: Agrônômica Ceres.
- Campbell CL, Madden LV (1990) Introduction to plant disease epidemiology.
- Chelal J, Hau B (2015) Modelling the interaction between powdery mildew epidemics and host dynamics of tomato. *European Journal of Plant Pathology*, 142(3), 461-479.
- Cho SE, Park JH, Lee SH, Lee CK, Shin HD (2016) Occurrence of powdery mildew caused by *Podosphaera pannosa* on lemon eucalyptus. *Forest Pathology*, 46(3), 264-266.
- Dalgaard P (2008) The R environment. In *Introductory Statistics with R* (pp. 31-53). Springer, New York, NY.
- de Oliveira MES, Silva Fernandes F, Glória Junior MA, Soares de Oliveira A, Mafia RG, Alves MF (2019) Temporal Analysis of Bacterial Leaf Blight in Clonal Eucalyptus Plantations in Brazil. *Forests*, 10(10), 839.
- Dutzmann S (1985) Zur Analyse der Beziehung zwischen Klimadaten und Sporenproduktion sowie Sporenverbreitung von *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*/Influence of different climatic factors on spore production and spore dispersal of *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz/Journal of Plant Diseases and Protection*, 629-642.
- Farr DF, Rossman AY (2015) *Fungal Databases*, Syst. Mycol. Microbiol. Lab., ARS, USDA.
- Ferreira FA (1997) A cultura do eucalipto II. *Enfermidades do eucalipto no Brasil. Doenças em viveiros de eucalipto. Informe Agropecuário* 18:5-19.
- Fininsa C, Yuen J (2002) Temporal progression of bean common bacterial blight (*Xanthomonas campestris* pv. *Phaseoli*) in sole and intercropping systems. *Eur. J. Plant Pathol.* 108, 485–495.
- Gege AM, Khan AA (2015) First report of powdery mildew infecting Eucalyptus Plants in Katsina State, Nigeria.
- Indústria Brasileira De Árvores (2020) Relatório IBÁ 2020.

- Kurokawa SYS (2020). Caracterização morfo-molecular e epidemiologia comparativa do oídio em clones de eucalipto conduzido em viveiro.
- Madden Lv, Hughes G, Van Den Bosch F (2007) The study of plant disease epidemics. American Phytopathological Society St Paul, MN.
- Mucci Esf, Pitta Gps, Yokomizo Nks (1980) O Oídio em Mudas de Eucalipto. São Paulo. Instituto Florestal/Instituto Biológico.
- Neves DA, Guimarães LMS, Ferraz HGM Alfenas AC (2014) Favorable conditions for *X. axonopodis* infection in *Eucalyptus* spp. *Trop. Plant Pathol.* 39, 428–433.
- Reis A, Boiteux LS, Paz-Lima ML, Silva PP, Lopes CA (2004) Powdery mildew of *Allium* species caused by *Oidiopsis taurica* in Brazil. *Horticultura Brasileira*, 22, 758-760.
- Shaner G, Finney Re (1977) The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildew resistance in Knox wheat. *Phytopathology* 67: 1051-1056.
- Silva Mdd (2001) Etiologia do oídio do eucalipto. *Fitopatol. bras* 26: 2.
- Valeriano R, Pozza Ea, Santos La, Chaves E, Junior Mpb, Ferreira Ma (2015) Escala diagramática e reação diferencial de clones para Oídio do Eucalipto Diagramatic scale and differential reaction of clones for powdery mildew in *Eucalyptus*.
- Vanderplank Jvd (1963) Plant diseases: epidemics and control. Plant diseases: epidemics and control.
- Vomero, PADSZ (2018) Intensidade de doenças fúngicas e bacterianas em diferentes etapas da produção de mudas de eucalipto em um viveiro clonal.

QUARTA PARTE – ARTIGO 3

Artigo preparado de acordo com as normas da Plant disease

NANOPARTÍCULAS NO MANEJO DO OÍDIO DO EUCALIPTO

Renata Cristina Martins Pereira¹, Edson Ampélio Pozza¹, Juliana Barros Ramos¹, Adélia Azziz², Lucas Amaral³

¹Department of Plant Pathology, Federal University of Lavras (UFLA), Lavras, Minas Gerais, 3037 37200-900, 11 Brazil

¹Department of soil science, Federal University of Lavras (UFLA), Lavras, Minas Gerais, 3037 37200-900, 11 Brazil

³Department of Forest Science, Federal University of Lavras (UFLA), Lavras, Minas Gerais, 3037 37200-900, Brazil,

Correspondence: renata.crismp@hotmail.com

Palavras-chave: Manejo de doenças; *Oidium sp.*; *Eucalyptus grandis*; *E. urophylla*

INTRODUÇÃO

Nanopartículas (NPs) são definidas por qualquer tipo de material com tamanho de 1 a 100 nm (SEKHON, 2014). As de ocorrência natural, são irregulares e variam em tamanho, enquanto as projetadas, são geralmente uniformes e podem ter formas únicas, como esféricas, achatadas, nanotubos de carbono e dendrímeros. As nanopartículas projetadas, podem ser fabricadas com dimensões específicas e arquitetadas em inúmeras matrizes compostas, tornando sua função e utilidade aplicáveis em muitas áreas (ELMER; WHITE, 2018).

A nanotecnologia permite desenvolver vários novos métodos para reduzir a intensidade de doenças de plantas em viveiros e no campo e criar novas ferramentas para manipulação molecular de plantas e patógenos. A maioria das nanopartículas estudadas no controle de doenças de plantas envolve o uso de óxidos metálicos de Al, Ce, Cu, Fe, Mg, Mn, Ni, Ti e Zn, e metaloides, de Ag, B e Si. E até o momento, NPs de prata, cobre e zinco compõem a maioria dos trabalhos, principalmente, na supressão de doenças (DATNOFF et al., 2007).

O uso de NPs no controle de doenças trazem diversas vantagens, entre elas, a redução das doses dos produtos quando comparadas aos fungicidas metálicos convencionais, os quais são baseados em componentes inorgânicos, como o enxofre e íons metálicos, tais como o cobre, estanho, cádmio e mercúrio (ELMER; WHITE, 2018). Além disso, as NPs podem ser incorporadas em fertilizantes e agroquímicos convencionais para aumentar a eficiência do produto, em formulações a granel ou como o único agente ativo (PRASAL et al., 2017; VERMA et al., 2018).

Outra vantagem dessa nova tecnologia é o uso de nanofertilizantes com liberação controlada, a fim de sincronizar o fluxo de nutrientes ao longo do tempo com a absorção da cultura em desenvolvimento. Essa abordagem aumentaria a disponibilidade de nutrientes e minimizaria perdas desnecessárias, quando aplicados via solo ou via foliar (SERVIN et al., 2015). Diante desse potencial vários estudos avaliaram a eficiência de NPs no crescimento, produtividade e redução da intensidade de doenças em diferentes culturas. Em tomateiro, Elmer e White (2016) pulverizaram seis NPs (AlO, CuO, FeO, MnO₂, NiO e ZnO) em plantas cultivadas em solos infestados com *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* e observaram a redução da área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) em 31, 28 e 28%, quando utilizaram as NPs de CuO, MnO e ZnO, respectivamente. Já para plantas infectadas por *Verticilium* sp. tratadas com CuO ocorreu aumento de 64% no peso da planta fresca, redução de 69% na AACPD, e concentrou 32% mais Cu nas raízes. Na cultura da soja, Pérez et al. (2019) pulverizaram NPs de Ag, B, CeO₂, CuO, MnO₂, MoO₃, SiO₂, TiO₂ e ZnO em plantas no estágio V3, inoculadas com *Fusarium virguliforme*, agente etiológico da síndrome de morte súbita. Nas testemunhas houve severidade de podridão radicular de até 80%, enquanto as NPs de CuO, B, MoO₃ e ZnO reduziram essa severidade entre 17 e 25%.

Apesar dos avanços e estudos realizados com culturas como café, soja, tomateiro e trigo, ainda não existem estudos do manejo de doenças do eucalipto com nanopartículas. Os estudos utilizando essa tecnologia no eucalipto podem ser promissores devido a sua importância econômica, pois essa cultura é importante 'commoditie' no mercado mundial e no Brasil. Além disso, o setor florestal vem buscando sustentabilidade, reduzindo o uso do controle químico no manejo de doenças. Portanto esse trabalho teve como objetivo selecionar nanopartículas para reduzir a germinação de esporos e controlar o Oídio (*Oidium* sp.) em mudas e matrizes de eucalipto (*Eucalyptus* sp.) em viveiro.

1. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Caracterização experimental

O estudo foi realizado em três etapas para avaliar nove NPs no manejo do oídio do eucalipto. O primeiro, com o objetivo de avaliar, *in vitro*, a germinação de esporos de oídio (*Oidium* sp.) expostos diretamente às NPs. No segundo, foram realizados experimentos em casa de vegetação, para avaliar a eficiência das mesmas NPs da primeira etapa para o manejo do oídio em mudas eucalipto. Na terceira fase as nanopartículas selecionadas na segunda etapa foram testadas em mini jardim clonal, com o objetivo elucidar a influência das NPs no manejo do oídio do eucalipto em matrizes, na produtividade de estacas e compará-las com outros produtos convencionais. Todos os experimentos foram repetidos duas vezes antes de ser realizada a próxima etapa.

Preparo das nanopartículas

Foram utilizadas onze NPs (AlO (20 nm), B (100 nm), CeO₂ (25 nm), CuO (40 nm), S (10-45 nm), MnO₂ (30 nm), Ag (20 nm), SiO₂ (60-70 nm) e ZnO (10-30 nm)), obtidas da US Research Nanomaterials Inc. (Houston, TX). Para todas as NPs, foram preparadas suspensões estoques a 2000 mg L⁻¹ com água destilada esterilizada e mantidas a 4°C até a utilização.

Efeito de nanopartículas na germinação de Oídio (*Oidium* sp.) *in vitro*

O experimento *in vitro* foi realizado em delineamento inteiramente casualizado (DIC) com 4 repetições. Sendo nove NPs na concentração de 500 mg.L⁻¹, o fungicida piraclostrobina (133 g/L) + epoxiconazol (50 g/L) (Opera[®]). As repetições foram formadas por uma placa de petri.

Para avaliar a germinação de Oídio (*Oidium* sp.), cada uma das NPs e o fungicida foram preparados mediante a diluição da solução estoque inicial em meio de cultura ágar, tendo usado como testemunha apenas ágar. Depois da solidificação do meio, 50 µL de suspensão contendo esporos do patógeno, com concentração de 2 x 10⁴ esporos/ µL, foram depositados na superfície e espalhadas com a alça de Drigalski. Em seguida, as placas foram incubadas a 23 °C por 18h em câmaras do tipo BOD no escuro. Após o período de incubação, foram observados no total 100 esporos por repetição e o número de esporos germinados foi quantificado.

Screening de nanopartículas para controle de oídio em mudas de eucalipto

Preparo e inoculação do material vegetal

Mudas do clone 144 com 90 dias foram transplantadas para vasos de 3 litros com substrato constituído de cascas de pinus, carvão, turfa e vermiculita. A adubação utilizada foi NPK 19-6-10, na dose de 1,5 kg m⁻³ de substrato. O experimento *in vivo* foi realizado em duas etapas, em delineamento em blocos casualizados (DBC) com 5 repetições. Na primeira etapa os tratamentos foram nove NPs com doses de 500 mg.L⁻¹, o fungicida piraclostrobina (133 g/L) + epoxiconazol (50 g/L) (Opera[®]) e a testemunha, pulverizado apenas com água e Tween 20. As repetições foram formadas por três mudas. Na segunda etapa os cinco melhores tratamentos foram selecionados e um fatorial contendo 5 nanopartículas em 4 doses (50, 100, 250, 500 mg.L⁻¹) foi realizado.

As plântulas saudáveis foram pulverizadas com suspensões de NPs, utilizando atomizadores de plástico, até o ponto de escorrimento (10 ml por planta). As mudas foram irrigadas por gotejamento para evitar molhar as folhas. A temperatura da casa de vegetação foi mantida em 24 ° C.

O isolado do patógeno do oídio de eucalipto foi coletado em minijardim clonal na Universidade Federal de Lavras e mantido em estacas de eucalipto em câmara de crescimento livre de outras fontes de inóculo. As inoculações foram realizadas uma semana após o tratamento com as NPS, sendo utilizado uma pequena escova macia para inoculação, passando conídios de uma folha de eucalipto infectada em folhas jovens dos clones utilizados no experimento. As plantas inoculadas foram cobertas com saco plástico preto por 24 horas. Após esse período, elas foram descobertas e colocadas intercaladas entre plantas de eucalipto com oídio.

Avaliações de incidência e da severidade da doença

Para as avaliações da severidade foram realizadas 8 avaliações com intervalo de cinco dias entre elas, quando os primeiros sintomas apareceram. Todas as mudas de eucalipto foram avaliadas e foi quantificada a severidade de oídio em todas folhas da planta. Para avaliar a severidade da doença foi utilizada escala diagramática para o oídio em eucalipto proposta por Valeriano et al. (2015). As áreas abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) foram calculadas de acordo com Shaner e Finney (1977):

$$AACPD = \sum_{i=l}^{n-1} \left(\frac{y_i + y_{i+1}}{2} \right) (t_{i+1} - t_i)$$

Onde:

y_i : proporção da doença na i -ésima observação;

t_i : tempo, em dias, na i -ésima observação;

n : número total de observações

Seleção de nanopartículas para controle de oídio em matrizes de eucalipto

Para a terceira etapa, o ensaio foi conduzido no viveiro florestal da Universidade Federal de Lavras, localizado em Lavras, Minas Gerais, Brasil, com altitude média de 889m e clima do tipo Cwb, segundo a classificação de Köppen, com verão úmido e inverno seco. A precipitação anual concentra-se no período de outubro a abril e o total médio está em torno de 1400mm. A temperatura média anual é 19°C.

Foi delimitado um canaletão suspenso, com 1,20 m de largura por 13,5 m de comprimento, contendo 540 plantas com espaçamento de 0,15 m entre matrizes. As matrizes de eucalipto (*Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*), clone 144, foram cultivadas em leito de areia dispostas em linhas e colunas. As mudas receberam irrigação e fertilização durante a condução do experimento. Para a fertilização foi utilizado ácido bórico, cloreto de cálcio, cloreto de potássio, fertilon map 100% solúvel, molbidato de sódio, nitrato de cálcio, sulfato de cobre, sulfato de magnésio, sulfato de manganês, sulfato de zinco. Os nutrientes foram fornecidos por gotejamento direto nas plantas. Os demais tratamentos culturais, incluindo manejos fitossanitários foram realizados conforme recomendações técnicas.

Preparo das nanopartículas e inoculação do patógeno

O experimento foi conduzido com a aplicação de três nanopartículas pré-selecionadas. O experimento *in vivo* foi realizado em delineamento em blocos casualizados (DBC) e esquema fatorial 3x3 + 2 com 5 repetições. Sendo três NPs combinadas com três doses, de 100, 250 e 500 mg.L⁻¹ e dois tratamentos adicionais, o fungicida piraclostrobina (133 g/L) + epoxiconazol (50 g/L) (Opera[®]) e a testemunha, pulverizados com água e Tween 20. As repetições foram formadas por 42 mudas, com 18 mudas na parcela útil.

As matrizes saudáveis foram pulverizadas com suspensões de NPs, utilizando atomizadores de plástico, até o ponto de escorrimento (20 ml por planta) e as testemunhas foram pulverizadas com água destilada. As mudas foram irrigadas por gotejamento para evitar molhar as folhas. A inoculação ocorreu de forma natural. Quando os primeiros sintomas apareceram foi avaliada a severidade.

Produção e enraizamento das estacas

A coleta de brotos para o preparo das miniestacas foi realizada de forma seletiva e contínua durante duas semanas. A frequência das coletas foi de aproximadamente duas coletas por semana. Foram coletadas estacas apicais com dimensões variando entre 4 e 6 cm, contendo de dois a três pares de folhas, sendo cortadas ao meio.

Após coletadas e preparadas, as miniestacas foram colocadas em tubos plásticos e dispostas em bandejas planas de 50 cm² contendo substrato composto por partes iguais de casca de arroz carbonizada e vermiculita de grão grosso. Este substrato recebeu uma adição de 8,0 kg m⁻³ de superfosfato simples, 0,695 kg m⁻³ de sulfato de amônio, 0,208 kg m⁻³ de cloreto de potássio, 0,014 kg m⁻³ de sulfato de zinco, 0,014 kg m⁻³ de sulfato de cobre, 0,014 kg m⁻³ de sulfato de manganês e 0,028 kg m⁻³ de ácido bórico.

Para o enraizamento, as estacas permaneceram em câmara de crescimento em bandejas suspensas. A umidade do ar foi mantida > 80% por um período de 15 a 25 dias. As estacas foram transferidas para casa de vegetação e cobertas com sombreamento a 50% de interceptação de luz por sete dias. Após esse período, as estacas que apresentaram crescimento radicular foram consideradas enraizadas.

Análises estatísticas

A porcentagem de germinação, AACPD da severidade de mudas e matrizes e a produtividade foram submetidos aos testes de Shapiro-Wilk para avaliar a distribuição normal dos resíduos e ao teste de Bartlett para verificar homogeneidade das variâncias. Posteriormente, foi realizado a análise de variância por teste F ($p < 0,05$). Os dados de germinação, AACPD e produtividade foram submetidos ao teste de média de Scott-Knott ($p < 0,05$) e os dados gerados dos experimentos com doses foram submetidos ao ajuste de modelos de regressão lineares. As análises estatísticas foram realizadas usando o software R (R CORE TEAM 2013).

RESULTADOS

Efeito de nanopartículas na germinação de Oídio (*Oidium* sp.) *in vitro*

Ocorreu diferença significativa na análise ($p < 0,05$) conjunta para a repetição dos dois experimentos. Sendo assim, as análises foram realizadas em separado, de cada repetição do experimento ao longo do tempo. Houve diferença significativa ($p < 0,05$) para a germinação de esporos de *Oidium* sp. quando tratadas com NPs nos dois experimentos. Também ocorreu a

formação de agrupamentos no Teste de Scott Knott. A germinação *in vitro* para o fungicida foi menor quando comparadas às NPs e a testemunha. No entanto, a germinação média dos tratamentos utilizando NPs foi de apenas 11 e 21%, enquanto a média para a testemunha foi 23 e 43%, para o experimento 1 e 2, respectivamente (Figura 1). Entre os tratamentos com NPs, o cobre teve a menor média de germinação, 4,5 e 10%, nos dois experimentos, seguido de Ag (5 e 11%), Ce (8,6 e 19%) e Mn (10 e 23%). Em relação à testemunha, o Cu, Ag, Ce e Mn reduziram a germinação em 80 e 76%, 78 e 74%, 62 e 55% e 55 e 46%, respectivamente (Figura 1).

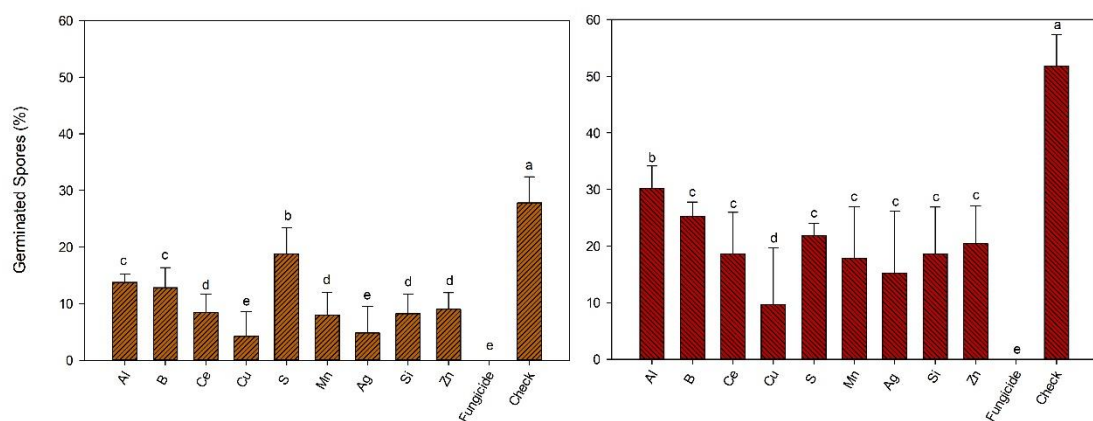


Figura 1 - Germinação (%) de esporos de *Oidium sp.* submetidos a tratamentos com diferentes nanopartículas na dose de 500mg.L⁻¹ realizados em dois experimentos, repetidos ao longo do tempo.

Screening de nanopartículas para controle de oídio em mudas de eucalipto

Os primeiros sinais do patógeno foram observados aos 6 dias após a inoculação. Os sinais do oídio foram observados em todas as mudas durante o período de condução do experimento. Houve diferença significativa ($p < 0,05$) na análise conjunta para a repetição dos dois experimentos. Ocorrendo diferença significativa ($p < 0,05$) para a AACPD no controle de *Oidium sp.* em mudas de eucalipto quando tratadas com NPs nos dois experimentos. No primeiro experimento ocorreram dois agrupamentos no teste de SkottKnott ($p < 0,05$), o primeiro formado por S (681), Zn (531), Al (532) e Ce (552) não teve diferença significativa em relação a testemunha (595). O segundo agrupamento diferiu significativamente da testemunha, sendo composto por Mn (192), B (108), Cu (399), piraclostrobina + epoxiconazol

(317), Si (425) e Prata. (339) (Figura 2). No segundo experimento não houve diferença significativa entre a AACPDS da nanopartícula de S (867) e da testemunha (744,2). O agrupamento formado por Cu (496.6), Al (614.5), Zn (635.1) e Si (532.5) reduziram em 33, 17, 14 e 28%, respectivamente, a AACPDS em relação a testemunha (744.25). O piraclostrobina + epoxiconazol e a prata tiveram estatisticamente o mesmo efeito e reduziram em 47 e 40%, respectivamente, a AACPDS em relação a testemunha. As nanopartículas de Mn e Boro tiveram o maior controle, 67 e 81% da AACPS (Figura 2).

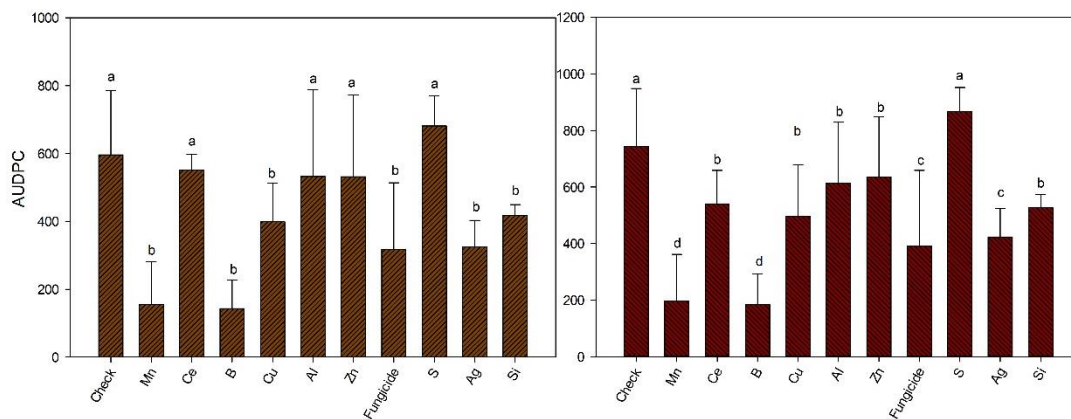


Figura 2 – Área abaixo da curva de progresso da severidade (AACPDS) do oídio do eucalipto (*Oidium* sp.) em mudas tratadas com nove nanopartículas realizados nas duas repetições.

Baseado no screening com todas nanoparticulas foram escolhidas os cinco tratamentos com menor AACPDS, Cu, Mn, B, Si e Ag, além do tratamento com piraclostrobina + epoxiconazol e a testemunha.

Os primeiros sinais do patógeno foram observados aos 12 dias após a inoculação, sendo observado o micélio do patógeno em todas as plantas durante o período de condução do experimento, mesmo nas plantas tratadas com o fungicida piraclostrobina + epoxiconazol. Houve diferença significativa ($p < 0,05$) na análise conjunta para a repetição dos dois experimentos. Ocorreu diferença significativa ($p < 0,05$) para as dosagens e interação entre tratamentos e doses. Na maior dose o controle obtido foi de aproximadamente 41, 29, 81, 67 e 21%, para as NPs de Ag, Si, B, Mn e Cu (Figura 3), respectivamente, enquanto o fungicida piraclostrobina + epoxiconazol teve 36% de controle em relação a testemunha. Além disso, foi ajustado o modelo de regressão linear quadrático para todos os tratamentos com doses.

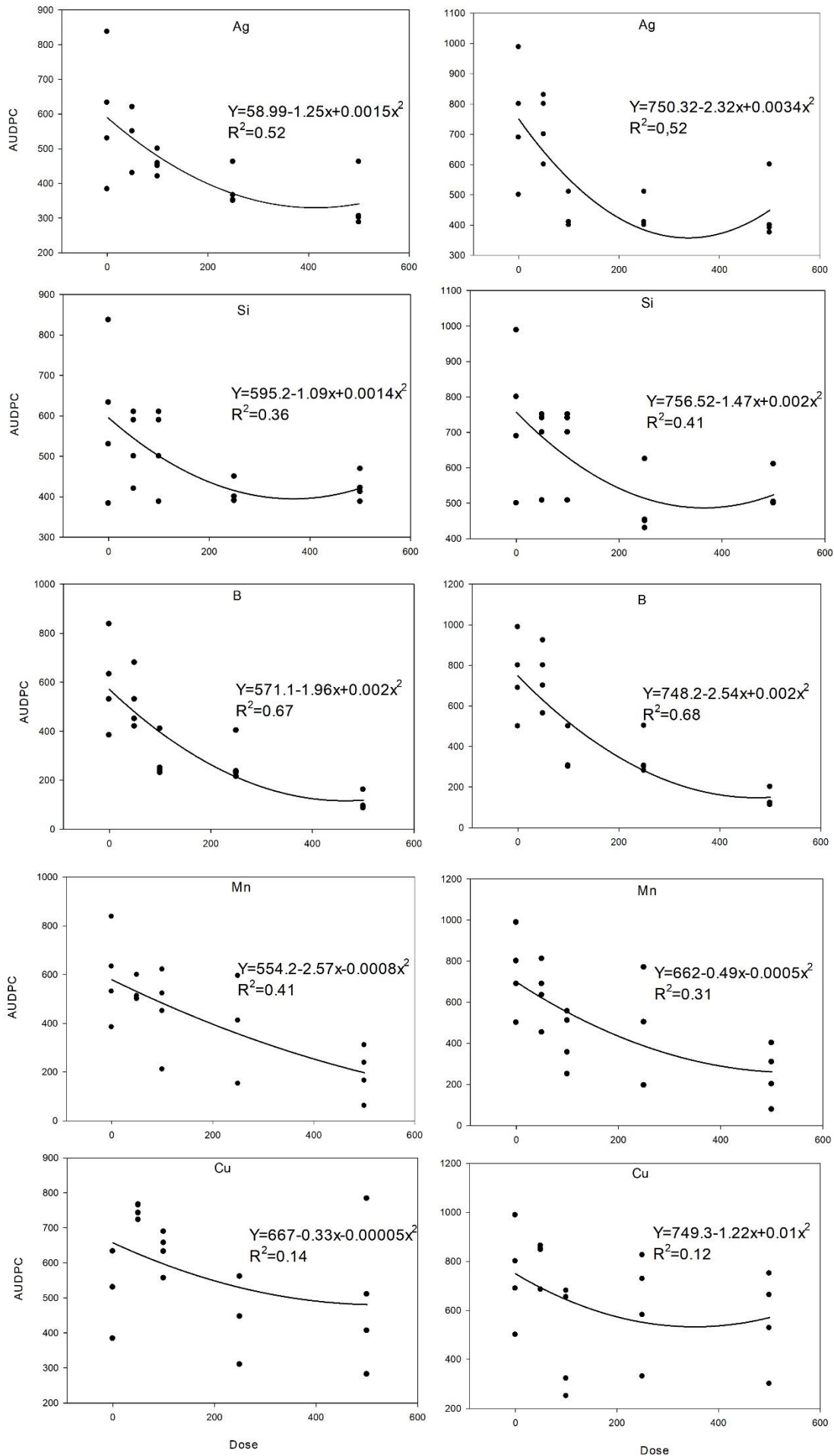


Figura 3 - Área abaixo da curva de progresso da Severidade (AACPDS) do oídio do eucalipto (*Oidium* sp.) em mudas tratadas com doses crescentes de cinco nanopartículas realizados nas duas repetições.

Seleção de nanopartículas para controle de oídio em matrizes de eucalipto

Baseado no screening com as nanopartículas em mudas foram escolhidas três tratamentos, B, Si e Ag, além do tratamento com piraclostrobina + epoxiconazol e a testemunha. Além disso foram testadas quatro doses de cada NP, 0, 100, 250 e 500 mg.L⁻¹.

Os primeiros sinais do patógeno foram observados aos 2 dias após a pulverização dos tratamentos. Houve diferença significativa ($p < 0,05$) na análise conjunta para a repetição dos dois experimentos. Ocorrendo diferença significativa ($p < 0,05$) para os tratamentos e doses, também houve interação entre os dois fatores ($p < 0,05$). Na maior dose o controle obtido foi de aproximadamente 58, 41 e 47%, para as NPs de Ag, Si e B (Figura 4), respectivamente, enquanto o fungicida piraclostrobina + epoxiconazol teve 42,5% de controle em relação a testemunha. o modelo de regressão linear quadrático foi ajustado para todos os tratamentos com doses, tendo R^2 de 0.915, 0.905 e 0.87 para as NPs de Ag, Si e B, respectivamente.

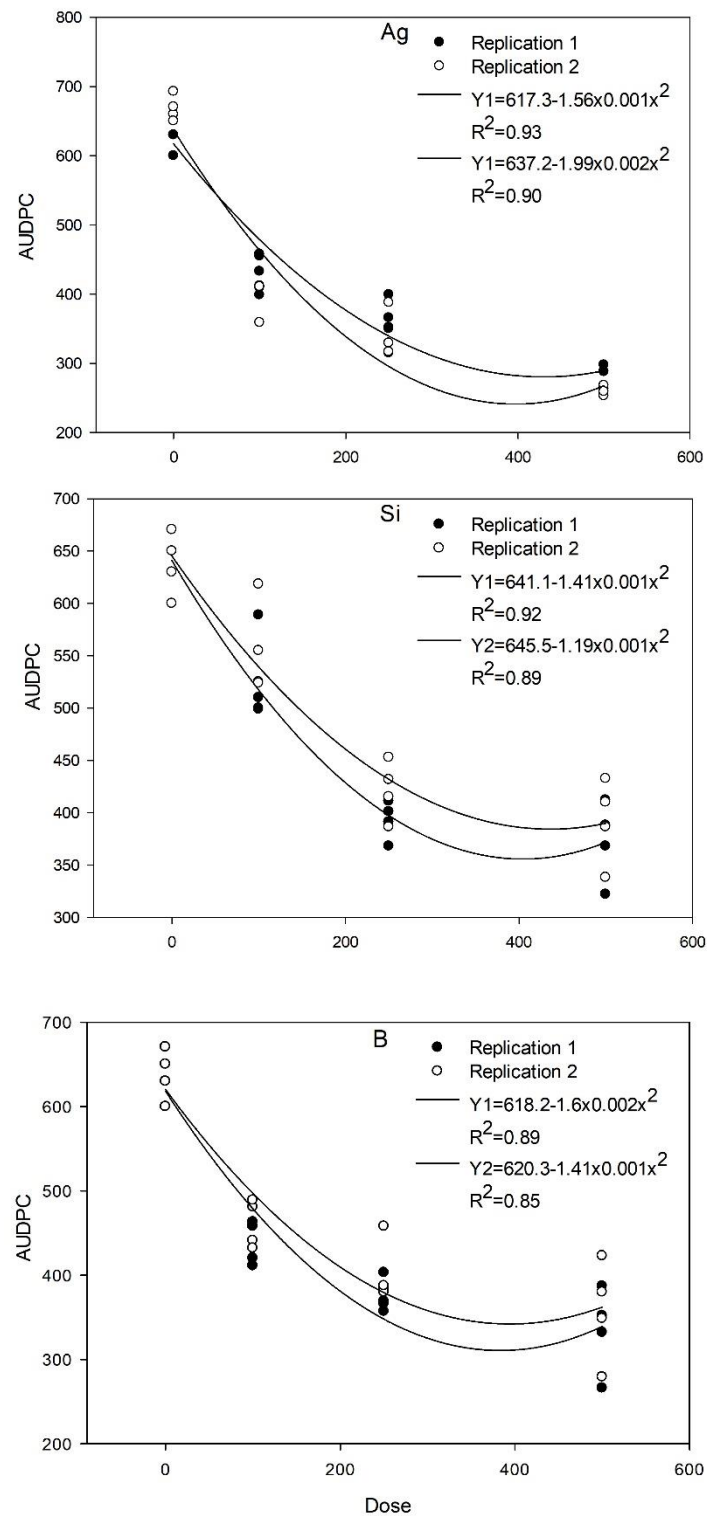


Figura 4 - Área abaixo da curva de progresso da Severidade (AACPDS) do oídio do eucalipto (*Oidium* sp.) em mudas tratadas com doses crescentes de três nanopartículas realizados (Boro, Silício e Prata) nas duas repetições.

Produção e enraizamento das estacas

Não houve diferença significativa entre os experimentos repetidos no tempo para as variáveis analisadas ($p < 0,05$). Portanto, utilizou-se a média dos valores desses experimentos. Houve diferença significativa ($p < 0,05$) para a produtividade de miniestacas de eucalipto quando tratadas com NPs e fungicida em relação a testemunha. A NPs de Ag, Si e B e o fungicida tiveram média de 5.12, 5.06, 5.18 e 5.71 número de estacas enraizadas em relação a testemunha (4.14).

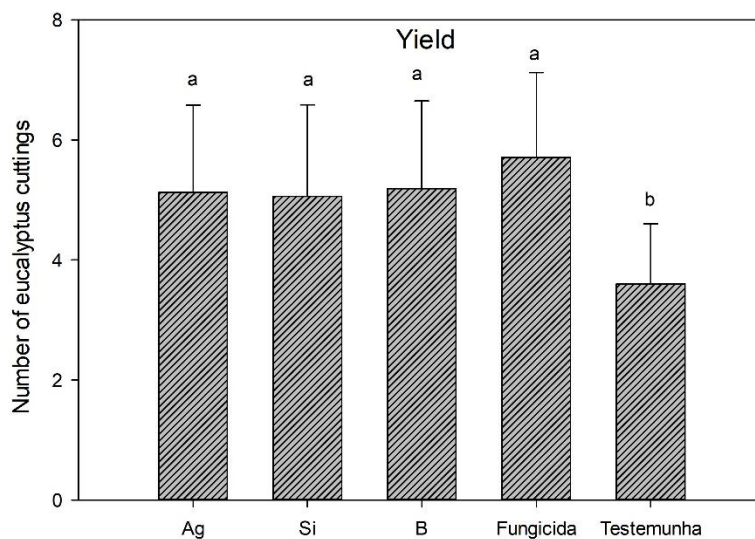


Figura 5. Número de estacas enraizadas para os tratamentos pulverizados com nanopartículas, fungicida e testemunha, realizada em mini jardim clonal de eucalipto.

DISCUSSÃO

O fornecimento de nutrientes é essencial para expressão da resistência da planta. A biossíntese de compostos relacionados à defesa, constituintes de barreiras físicas e químicas, é mediada por micronutrientes. Neste estudo, o efeito das nanopartículas na redução da severidade do oídio do eucalipto in vitro e em mudas e foi avaliada. No experimento in vitro ocorreu diferença significativa na análise conjunta para a repetição dos dois experimentos. Isso se deve a diferença da porcentagem de germinação dos esporos coletados, com maior germinação na segunda repetição devido a época de coleta dos esporos. Também ocorreu diferença significativa ($p < 0,05$) para a germinação de esporos de *Oidium* sp. quando tratadas com NPs, sendo o cobre o melhor tratamento (4,5 e 10%), seguido de Ag (5 e 11%), Ce (8,6 e 19%) e Mn (10 e 23%). Produtos químicos à base de cobre são efetivamente usados como

antimicrobianos na agricultura há alguns anos. No entanto, com relação à sua forma nanoparticulada, há um número limitado de estudos. Banik (2017) avaliou em testes *in vitro* o efeito de nanopartículas de cobre (CuNPs) contra fungos fitopatogênicos, oomicetos, bactérias, micróbios benéficos *Trichoderma harzianum* e *Rhizobium* spp. Constatando a integração de CuNPs com oxicloreto de cobre (CoC). A autora constatou na concentração de 50 mg/L da nanopartícula 76% de inibição de crescimento do oomiceto *Phytophthora cinnamomi* *in vitro* em comparação com o controle. CuNPs também mostraram efeito inibitório sinérgico com CoC no crescimento micelial e esporulação de *A. alternata*. Já *Pseudomonas syringae* foi inibida a 200 mg/L de CuNPs. Entretanto as CuNPs não tiveram diferença estatística na germinação de *Rhizobium* spp. e *Trichoderma harzianum* em comparação com CoC. Além da atividade antibacteriana da NP CuO contra muitos organismos fitopatogênicos, essa nanopartícula pode operar por um mecanismo nutricional portanto é importante testar essa nanopartícula aplicada diretamente na planta.

Após os experimentos *in vitro* foram testadas as mesmas nanopartículas *in vivo*, ocorrendo diferença significativa ($p < 0,05$) para a AACPD no controle de *Oidium* sp. em mudas. As NPs de S (681), Zn (531), Al (532) e Ce (552) não tiveram diferença significativa em relação a testemunha (595), enquanto as NPs de Cu, Mn, B, Si e Ag obtiveram os melhores resultados (Figura 2). Posteriormente um experimento com diferentes doses para as melhores nanopartículas foi realizado. Na maior dose o controle obtido foi de aproximadamente 41, 29, 81, 67 e 21%, para as NPs de Ag, Si, B, Mn e Cu (Figura 3). Porém, os níveis de controle variaram conforme a concentração utilizada. Nesse sentido, desempenhos semelhantes já foram obtidos em trabalhos anteriores nessa mesma faixa de dose para outros patossistemas. Em comparação ao fungicida cúprico registrado para a requeima da batata (*Phytophthora infestans*), nanopartículas de CuO, Cu₂O e Cu/Cu₂O foram eficientes no controle da doença quando aplicadas em doses entre 150 e 340 mg.L⁻¹ (GIANNOUSI et al., 2013). Em roseiras avaliou-se o controle de oídio (*Podosphaera pannosa*), 19 dias após a aplicação de nanopartículas de cobre nas doses de 50 e 200 mg.L⁻¹, observou-se a redução de 72,9 e 99,4%, respectivamente, quando comparado à testemunha (HAO et al., 2019). Em melancia, nanopartículas de Cuna dose de 10 mg.L⁻¹ suprimiram significativamente a murcha de fusarium (*Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*), com decréscimo de 58% no progresso da doença. No entanto, quando foi utilizada a nanopartícula de CuO, os efeitos na redução da doença foram significativos apenas a 1000 mg.L⁻¹ (BORGATTA et al., 2018). Embora essa dose seja maior, o controle do oídio do eucalipto foi obtido a 100 mg.L⁻¹ da NP CuO, ou seja, uma dose 10 vezes

menor. A dose de 100 mg.L^{-1} da NP CuO reduziu a AACPDS do oídio em 43%, sendo esse mesmo padrão observado para as cinco nanopartículas.

As NPs de Ag, Si e B foram escolhidas para o experimento de manejo do oídio em minijardim clonal. Na maior dose o controle obtido foi de aproximadamente 58, 41 e 47%, para as NPs de Ag, Si e B, respectivamente (Figura 4). Portanto a nanopartícula de prata foi efetiva na redução de germinação de esporos, redução da severidade de oídio em mudas e matrizes. Esses resultados evidenciam a efetividade da nanopartícula de Ag em baixas concentrações e vão de encontro a resultados obtidos por outros autores. Em um trabalho realizado por Mendes et al. (2014), foi avaliado in vitro 0% de inibição de crescimento na dose de 180 mg.L^{-1} e inibição absoluta (100%) nas doses de 270 e 540 mg.L^{-1} . Os altos valores de controle obtidos com a nanopartícula de Ag são justificáveis, pois essas são extremamente reativas devido a sua alta capacidade de gerar íons Ag^+ e possuem alta afinidade com as cargas negativas das membranas dos microrganismos ou qualquer outro radical com carga negativa ou elétron livre no citoplasma. Além disso, as nanopartículas são eficientes em penetrar nas células do patógeno. Esses fatos justificam o seu uso em baixas concentrações, pois o controle microbiano é realizado também por meio de interrupções nos sistemas de transporte de elétrons na fosforilação oxidativa, incluindo o efluxo de íons (MORONES et al., 2005; KIM et al., 2009; KRISHNARAJ et al., 2012). A interrupção do efluxo iônico pode causar rápido acúmulo de íons de Ag e interromper o metabolismo e a respiração dos patógenos (LAMSAL et al. 2011). Outro ponto importante diz respeito às espécies reativas de oxigênio (EROs), pois os íons de Ag estimulam a sua produção. As EROs são prejudiciais às células do patógeno e causam danos às suas proteínas, lipídios e ácidos nucleicos (MORONES et al., 2005).

Assim pode se concluir que a nanopartícula de Ag é um promissor agente antimicrobiano e seu uso no manejo de doenças de plantas possui grande potencial. Em viveiros de eucalipto pode ser empregada em pequenas quantidades em áreas pequenas, oferecendo pouco risco de impacto ambiental, ainda com a possibilidade de tratamento de efluentes e estudos localizados de impacto ambiental. Os resultados positivos das nanopartículas fortalecem a busca por aplicações de fungicidas cúpricos na dimensão nano, em menores concentrações para controlar as doenças de plantas. A partir da realização desse trabalho, foi possível confirmar o potencial das nanopartículas para controlar o oídio do eucalipto em doses inferiores a 500 mg.L^{-1} . Os resultados são promissores para a eucalipticultura, principalmente no que se refere à sustentabilidade e ao manejo da resistência ou seleção de patógenos resistentes.

REFERÊNCIAS

- BANIK, S., & PÉREZ-DE-LUQUE, A. (2017). In vitro effects of copper nanoparticles on plant pathogens, beneficial microbes and crop plants. *Spanish journal of agricultural research*, 15(2), e1005-e1005.
- DATNOFF, L. E., ELMER, W. H.; HUBER, D. M, eds. *Mineral Nutrition and Plant Disease*. St. Paul, MN:APS Press, 2007.
- ELMER, W. H.; WHITE, J. C. The future of nanotechnology in plant pathology. *Annual Review Phytopathology*, v. 56, p. 111-133, 2018.
- ELMER, W. H.; WHITE, J. C. The use of metallic oxide nanoparticles to enhance growth of tomatoes and eggplants in disease infested soil or soilless medium. *Environmental Science: Nano*, v. 3, p. 1072-1079, 2016.
- GIANNOUSI, K., PANTAZAKI, A., & DENDRINOUSAMARA, C. (2017). Copper-based nanoparticles as antimicrobials. In *Nanostructures for Antimicrobial Therapy* (pp. 515-529). Elsevier.
- HAO, C., WU, X., SUN, M., ZHANG, H., YUAN, A., XU, L., ... & KUANG, H. (2019). Chiral core-shell upconversion nanoparticle@ MOF nanoassemblies for quantification and bioimaging of reactive oxygen species in vivo. *Journal of the American Chemical Society*, 141(49), 19373-19378.
- KIM, J. H., KIM, J. H., KIM, K. W., KIM, M. H., & YU, Y. S. (2009). Intravenously administered gold nanoparticles pass through the blood-retinal barrier depending on the particle size, and induce no retinal toxicity. *Nanotechnology*, 20(50), 505101.
- KRISHNARAJ, C., JAGAN, E. G., RAMACHANDRAN, R., ABIRAMI, S. M., MOHAN, N., & KALAICHELVAN, P. T. (2012). Effect of biologically synthesized silver nanoparticles on *Bacopa monnieri* (Linn.) Wettst. plant growth metabolism. *Process biochemistry*, 47(4), 651-658.
- LAMSAL, K., KIM, S. W., JUNG, J. H., KIM, Y. S., KIM, K. S., & LEE, Y. S. (2011). Application of silver nanoparticles for the control of *Colletotrichum* species in vitro and pepper anthracnose disease in field. *Mycobiology*, 39(3), 194-199.
- MELBY, E. S., CUI, Y., BORGATTA, J., MENSCH, A. C., HANG, M. N., CHRISLER, W. B., ... & ORR, G. (2018). Impact of lithiated cobalt oxide and phosphate nanoparticles on rainbow trout gill epithelial cells. *Nanotoxicology*, 12(10), 1166-1181.
- MENDES, L. P., DELGADO, J. M. F., COSTA, A. D. A., VIEIRA, M. S., BENFICA, P. L., LIMA, E. M., & VALADARES, M. C. (2015). Biodegradable nanoparticles designed for drug delivery: the number of nanoparticles impacts on cytotoxicity. *Toxicology in vitro*, 29(6), 1268-1274.
- MORONES, J. R., ELECHIGUERRA, J. L., CAMACHO, A., HOLT, K., KOURI, J. B., RAMÍREZ, J. T., & YACAMAN, M. J. (2005). The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology*, 16(10), 2346.

PÉREZ, C. D P.; ROCHE, R. D. L. T.; ZUVERZA-MENA, N.; MA, C.; SHEN, Y.; WHITE, J. C.; POZZA, E. A.; POZZA, A. A. A.; WADE H. E. Metalloid and Metal Oxide Nanoparticles Suppress Sudden Death Syndrome of Soybean. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 68, p. 77–87, 2020.

PRASAD, R.; BHATTACHARYYA, A.; NGUYEN, Q. D. Nanotechnology in sustainable agriculture: recent developments, challenges, and perspectives. *Frontiers in Microbiology*, v. 8, p. 1014, 2017.

R_CORE_TEAM. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Disponível em: <<http://www.R-project.org.br>>. 2018.

SEKHON, B. S. Nanotechnology in agri-food production: an overview. *Nanotechnology, Science and Applications*. v. 7, p. 31-53, 2014.

SERVIN, A.; ELMER, W.; MUKHERJEE, A.; DE LA TORRE-ROCHE, R.; HAMDI, H.; WHITE, J. C.; DIMKPA, C. A review of the use of engineered nanomaterials to suppress plant disease and enhance crop yield. *Journal of Nanoparticle Research*, v.17, p. 92, 2015.

SHANER, G.; FINNEY, R. E. The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in knox wheat. *Phytopathology*, v. 70, p. 1183-1186, 1977.

VALERIANO, R., POZZA, E. A., SANTOS, L. A., CHAVES, E., JUNIOR, M. P. B., & FERREIRA, M. A. (2015). Escala diagramática e reação diferencial de clones para Oídio do Eucalipto Diagramatic scale and differential reaction of clones for powdery mildew in Eucalyptus.

VERMA, S. K.; DAS, A. K.; PATEL, M. K.; SHAH, A.; KUMAR, V.; GANTAIT, S. Engineered nanomaterials for plant growth and development: A perspective analysis. *Science of the Total Environment*, v. 630, p. 1413-1435, 201