

EDIVAL ÂNGELO VALVERDE ZAUZA

**Epidemiologia da ferrugem do eucalipto e resistência
genética**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2007

EDIVAL ÂNGELO VALVERDE ZAUZA

**Epidemiologia da ferrugem do eucalipto e resistência
genética**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 26 de abril 2007

Prof. Luiz Antônio Maffia
(Co-Orientador)

Prof. Silvaldo Felipe da Silveira

Prof. Sérgio Hermínio Brommonschenkel

Dr. Lúcio Mauro da Silva Guimarães

Prof. Acelino Couto Alfenas
(Orientador)

À Luciana Ramos Santos Zauza, minha esposa e companheira.
Ao meu filho Túlio Ramos Zauza, minha luz.

Dedico

A Maria dos Anjos Valverde Zauza e José Edival Zauza, meus pais.
Aos meus avós.
Ao meu irmão Eduardo.

Ofereço

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realização dos cursos de graduação e pós-graduação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa concedida durante o Doutorado.

À Suzano Papel e Celulose, pelo financiamento parcial e pelo apoio logístico para a execução de parte deste projeto, em nome dos engenheiros João Flávio Silva, Shinitiro Oda e Leandro de Siqueira.

Ao Professor Acelino Couto Alfenas e à sua esposa Rita Ferreira Alfenas, pelo exemplo de família, pela amizade, pela confiança, pelos incentivos e pelas oportunidades.

Aos Professores Luiz Antônio Maffia, Sérgio H. Brommonschenkel e Silvaldo Felipe da Silveira, pelas sugestões e pelos ensinamentos.

Aos Professores Francisco Alves Ferreira e Eduardo S. G. Mizubutti, pelos exemplos de profissionalismo.

Aos meus demais professores, pela convivência, pela amizade e pelos conhecimentos transmitidos.

Aos doutores Douglas Lau e Lúcio Mauro da Silva Guimarães, pelas sugestões e pela amizade.

À Márcia, pela amizade, pelo carinho e pela dedicação aos nossos trabalhos.

Aos meus colegas Rodrigo Graça, Marcelo Coutinho e Rafael Alfenas, pela amizade e por todas as duchas de sexta-feira.

Aos meus colegas de laboratório Carla, Daniela, Eraclides, Leonardo, Michelle, Talyta e Vanessa, pela amizade e pelos incentivos.

Aos funcionários do Departamento de Fitopatologia e do Patomol, em especial aos que sempre comigo colaboraram, Alex, Cíntia, Délio, Eneir, Renildo e Ricardo Martins, cujas dicas e cujos serviços foram importantes para o desenvolvimento dos trabalhos.

A todos os meus familiares e amigos, que compartilham da minha felicidade, por mais esta conquista.

Aos brasileiros que vislumbram um país melhor e por isso “sabem fazer a hora e não esperam acontecer”.

BIOGRAFIA

EDIVAL ÂNGELO VALVERDE ZAUZA, filho de Maria dos Anjos Valverde Zauza e José Edival Zauza, nasceu a 1^o de junho de 1973, em Cataguases, Estado de Minas Gerais.

Cursou o primeiro grau em Cataguases e o segundo na Escola Agrotécnica Federal de Rio Pomba, em Rio Pomba, Estado de Minas Gerais, onde se formou em Técnico Agropecuário no ano de 1991.

Em 1993, ingressou no Curso de Engenharia Florestal da Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa, MG, colando grau em dezembro de 1997.

No período de março de 1995 até o final de 1997, foi bolsista de Iniciação Tecnológica e Científica no Departamento de Fitopatologia, quando teve a oportunidade de realizar estudos sobre a caracterização izoenzimática de isolados heterocarióticos de *R. solani*, além de ajudar estudantes de pós-graduação em seus trabalhos. Nesse mesmo período, sob a orientação do Professor Acelino Couto Alfenas, desenvolveu trabalhos de monitoramento e identificação de fungos associados à propagação clonal de eucalipto, em empresas florestais.

Em março de 1998, iniciou o Curso de Mestrado em Fitopatologia na mesma Universidade, sob a orientação do Professor Acelino Couto Alfenas.

Em fevereiro de 2000, defendeu sua tese de Mestrado intitulada “Influência da cobertura morta na flutuação de inóculo de *Rhizoctonia* spp. e *Cylindrocladium* spp. em jardim clonal de *Eucalyptus*”.

A partir de março de 2000 até julho de 2003, trabalhou como pesquisador assistente no Laboratório de Patologia Florestal, sob a orientação do Professor

Acelino Couto Alfenas. Desde então, desenvolveu e publicou vários trabalhos científicos, destacando-se os livros “Clonagem e doenças do eucalipto” – 2004, 442 p, pela Editora UFV; “Doenças na cultura do eucalipto”– 2007, 158 p, pela SIF; e o trabalho ZAUZA, E. A. V.; ALFENAS, A. C.; HARRINGTON, T. C.; MIZUBUTI, E. S.; SILVA, J. F., intitulado “Resistance of *Eucalyptus* clones to *Ceratocystis fimbriata*. **Plant Disease**, v. 88, p. 758-760, 2004.

Em agosto de 2003, ingressou no Programa de Pós-Graduação, em nível de Doutorado, em Fitopatologia da UFV, sob a orientação do Professor Acelino Couto Alfenas, submetendo-se à defesa da tese em abril de 2007.

SUMÁRIO

RESUMO.....	viii
ABSTRACT	x
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
Artigo 1 - Dispersão vertical de uredinósporos de <i>Puccinia psidii</i> e progresso da ferrugem do eucalipto em diferentes alturas.....	5
Artigo 2 - Dispersão anemófila de uredinósporos de <i>Puccinia psidii</i>	17
Artigo 3 - Resistência de espécies de Myrtaceae à ferrugem causada por <i>Puccinia psidii</i>	40
Artigo 4 - Resistência de progênies oriundas da matriz G26 de <i>Eucalyptus grandis</i> à ferrugem <i>Puccinia psidii</i>	54
CONCLUSÕES GERAIS.....	66

RESUMO

ZAUZA, Edival Ângelo Valverde, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, abril de 2007. **Epidemiologia da ferrugem do eucalipto e resistência genética.** Orientador: Acelino Couto Alfenas. Co-Orientadores: Luiz Antônio Maffia e Douglas Lau.

A ferrugem (*Puccinia psidii*) é uma das mais importantes doenças na cultura do eucalipto no Brasil, Paraguai, Uruguai e na Argentina. Constitui uma séria ameaça se introduzida em outros países, como a Austrália, em cuja flora predominam espécies da família Myrtaceae; e África do Sul, por suas plantações industriais de eucalipto. O conhecimento das condições de ambientes favoráveis à infecção, da herança e dos mecanismos de resistência e das fontes de resistência genética é fundamental para o controle efetivo da doença. Este trabalho teve como objetivos: a) determinar por que plantas de eucalipto com altura acima de 3 m, no estágio fenológico C, tornam-se escapes à ferrugem; b) determinar a relação entre os fatores micrometeorológicos e a incidência da doença; c) estudar a dispersão anemófila de urediniósporos de *P. psidii*; d) avaliar o progresso da doença; e) avaliar a resistência em diferentes materiais genéticos oriundos da Austrália e ilhas vizinhas, e; f) determinar o efeito do “background” genético em progênies derivada do parental feminino, homocigoto para resistência. Ao avaliar o efeito do gradiente de altura sobre a incidência da ferrugem do eucalipto, em relação à duração de molhamento foliar e ao número de urediniósporos em suspensão no ar, verificou-se que a incidência da ferrugem diminuiu com o aumento da altura. Constatou-se correlação positiva ($P < 0,05$) da área abaixo da curva de progresso da doença e porcentagem de folhas com ferrugem com o período de molhamento foliar e o número médio de urediniósporos, bem como a correlação negativa da doença com a altura. Por meio de armadilha Burkard[®], quantificou-se o número de urediniósporos de

P. psidii (ESP, no período de julho 2004 a junho 2005. Esporos foram capturados em 77% dos dias amostrados. Maior ESP médio (3,21 esporo/m³ de ar/2 h) foi observado entre julho e novembro. Nesse período, 58% dos ESP foram capturados no período noturno, e ESP foi negativamente relacionado com as temperaturas mínima, média (TM) e máxima e com a velocidade do vento (VV). Houve correlação positiva entre EPS, duração do molhamento foliar (MF) e umidade relativa (UR). Maior número de urediniósporos foi registrado com a combinação de baixa temperatura média, intensidade luminosa, velocidade do vento e alta umidade relativa e período de molhamento foliar, condições mais frequentes durante o período noturno. A resistência à ferrugem de diferentes espécies de mirtáceas oriundas da Austrália se mostrou independente da procedência. As espécies mais resistentes foram: *Corymbia. calophylla* 'rosea', *Corymbia tessellaris*, *Melaleuca ericifolia*, *Eucalyptus tereticornis*, *E. resinifera*, *E. scias* spp. *scias*, *E. paniculata*, *E. pellita* e *C. intermediata*; e as mais suscetíveis foram: *M. nesophila*, *M. alternifolia*, *M. cajuputi* spp. *cajuputi*, *M. leucadendra*, *M. quinquenervia*, *E. cloeziana*, *E. diversicolor*, *E. regnans*, e *E. grandis*. Verificou-se que a existência de indivíduos suscetíveis, presumivelmente oriundos da matriz G26 de *E. grandis*, homozigota dominante para resistência, não foi referente ao efeito do *background* genético, mas de falhas operacionais, provavelmente durante o beneficiamento das sementes e, ou, de produção das mudas.

ABSTRACT

ZAUZA, Edival Ângelo Valverde, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, April of 2007. **Eucalyptus rust: epidemiology and genetic resistance**. Adviser: Acelino Couto Alfenas. Co-Advisers: Luiz Antônio Maffia and Douglas Lau.

Rust caused by *Puccinia psidii* is one of the most important diseases of eucalyptus in Brazil, Paraguay, Uruguay and Argentina. If this disease is introduced into other countries, such as Australia, it can pose a serious threat to its flora, in which species of the Myrtaceae family predominate, and South Africa, for its industrial eucalyptus plantations. Knowledge on the environmental conditions favorable to infection, inheritance of resistance mechanisms, and sources of genetic resistance is fundamental for an effective control of the disease. The objectives of present work were: a) to understand the reasons for which eucalyptus trees above 3 m high, at phonological stage C, escape the rust; b) determine the relationship among the micrometeorological factors; c) study the wind dispersion of urediniospores and disease progress; d) evaluate the resistance in different genetic materials derived from Australia; and e) study the probable genetic background effect on the resistance of progenies from a female parent that is dominant homozygous for resistance. The evaluation of the effect of height gradient on eucalyptus rust incidence, in relation to leaf wetness duration and number of urediniospores suspended in air, showed that rust incidence was reduced with increase in height. It was found positive correlation ($P < 0.05$) of the area below the curve of disease progress and percentage of leaves with rust with the leaf wetness period and mean number of urediniospores, and negative correlation of disease with height. The number of *P. psidii* urediniospores (SP) was quantified by using a Burkard® trap in the period from July 2004 to June 2005. Spores were captured in 77% of the sampled

days. Larger mean SP (3.21 spore/m³ of air/2h) was found between July and November. In this period, 58% of SP were captured during the night and SP was negatively related to minimum, average (AT) and maximum temperatures, and with wind speed (WS). There was positive correlation among SP, duration of leaf wetness (LW) and relative humidity (RH). A larger number of urediniospores was recorded for the combination of low average temperature, low light intensity, low wind speed, and high relative humidity and long period of leaf wetness, conditions more frequently found during the night period. The resistance to rust of different Myrtaceae originated from of Australia was shown independent of the provenance. The most resistant species were: *Corymbia calophylla* 'rosea', *Corymbia tessellaris*, *Melaleuca ericifolia*, *Eucalyptus tereticornis*, *E. resinifera*, *E. scias* spp. *scias*, *E. paniculata*, *E. pellita* and *C. intermediata*; and the most susceptible were: *M. nesophila*, *M. alternifolia*, *M. cajuputi* spp. *cajuputi*, *M. leucadendra*, *M. quinquenervia*, *E. cloeziana*, *E. diversicolor*, *E. regnans*, and *E. grandis*. The existence of susceptible individuals, most probably derived from the G26 matrix of *E. grandis*, dominant homozygous for resistance, was not related to the genetic background effect, but due to operational flaws, probably during seed processing and/or seedling production.

INTRODUÇÃO GERAL

O grande desafio à introdução e utilização comercial de essências exóticas é a adaptação da espécie às condições edafoclimáticas. Espécies mal-adaptadas, quando sobrevivem, ficam continuamente sob estresse, e não expressam seu potencial genético máximo. A incidência de pragas e doenças também pode ser limitante, uma vez que a espécie introduzida não coevoluiu com grande parte das pragas e dos fitopatógenos locais. São relativamente freqüentes os problemas de doenças em plantios comerciais de eucalipto, e há várias doenças relatadas no país (Alfenas e Zauza, 2007; Alfenas et al. 2004; Ferreira e Milani 2002). Dentre essas, a ferrugem é uma das mais limitantes para o estabelecimento e condução dos plantios de espécies ou clones suscetíveis em regiões favoráveis à doença.

O fungo *Puccinia psidii* Winter, foi originalmente descrito em mudas de *Psidium guajava* L., no Brasil, por Winter (Maclachlam, 1934). Em 1944, a enfermidade foi relatada por Joffily em mudas de *Corymbia citriodora* (Hook.) Hill & Johnson, no município de Itaguaí, Rio de Janeiro (Joffily, 1944). Três décadas se passaram, até que em 1974 cerca de 400.000 mudas de *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden, procedência África do Sul, foram refugadas em decorrência da doença (Ferreira, 1983). Em 1980, constatou-se um surto da doença em mais de 300 hectares de *E. grandis* com seis meses de idade, no Vale do Rio Doce, Minas Gerais (Ferreira e Silva, 1982). Mesmo com os avanços nos estudos de etiologia e epidemiologia (Ruiz et al., 1989a,b), controle químico (Ruiz et al., 1987; Demuner e Alfenas, 1991; Alfenas et al., 1993) e resistência genética (Junghans et al., 2003a), a doença ainda é fator limitante ao estabelecimento de povoamentos de *Eucalyptus* spp. no Brasil. É considerada uma doença quarentenária de alto risco de introdução na Austrália e África do Sul, em vista da ampla gama de hospedeiros na família Myrtaceae: 15 gêneros e 30 espécies até o

presente (Laundon e Waerston 1965; Burnett e Schubert 1985; Ferreira 1989; Glen et al., 2007). Sob condições de inoculação controlada, *Heteropyxis natalensis* Harvey da família Heteropyxadaceae, autóctone na África do Sul, foi altamente suscetível à ferrugem (Alfenas et al. 2005). Recentemente, a doença foi introduzida no Havaí, onde infecta severamente *Meterosideros* spp. (Uchida et al. 2006), predominante no ecossistema havaiano.

No Brasil, a enfermidade incide em jardins e minijardins clonais, em mudas em viveiros e em plantios jovens de eucalipto com até dois anos de idade e, principalmente, brotações no campo após o corte raso. O patógeno infecta órgãos juvenis em desenvolvimento como folhas e ramos e, em outras espécies de mirtáceas, pode infectar botões florais e frutos, e causa deformações, minicancros, perda da dominância apical e, provavelmente redução do crescimento. A presença de pústulas amarelas sobre os órgãos afetados é o sinal marcante da doença (Alfenas e Zauza, 2007; Alfenas et al., 2004; Ferreira, 1989).

O conhecimento das condições de ambiente favoráveis à infecção, da herança e dos mecanismos de resistência é fundamental para controle da doença. Neste trabalho objetivou: a) determinar por que plantas de eucalipto com altura acima de 3 m, no estágio fenológico C, tornam-se escapes à ferrugem; b) determinar a relação entre os fatores micrometeorológicos e a incidência da doença; c) estudar a dispersão anemófila de urediniósporos de *P. psidii*; d) avaliar o progresso da doença; e) avaliar a resistência em diferentes materiais genéticos oriundos da Austrália e ilhas vizinhas, e; f) determinar o efeito do “background” genético em progênies derivada do parental feminino, homocigoto para resistência. O trabalho foi dividido em quatro artigos, os dois primeiros referentes aos estudos de epidemiologia, e os dois últimos aos de resistência genética.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alfenas, A. C., Zauza, E. A. V. **Doenças na cultura do eucalipto**. SIF, Viçosa, 2007. 164p.
- Alfenas, A. C., Zauza, E. A. V., Mafia, R. G., Assis, T. F. **Clonagem e Doenças do Eucalipto**. Editora UFV, Viçosa, 2004. 442p.
- Alfenas, A. C., Zauza, E. A. V., Wingfield, M. J., Glen, M. *Heteropyxis natalensis*, a new host of *Puccinia psidii* rust. **Australasian Plant Pathology** 34: 285-286. 2005.
- Alfenas, A. C.; Maffia, L. A.; Macabeu, A. J.; Sartório, R. C. Eficiência de triadimenol, oxicarboxin e diniconazole para o controle da ferrugem (*Puccinia psidii*) em brotações de *Eucalyptus cloeziana*, em condições de campo. **Revista Árvore** 17: 247-263, 1993.
- Burnett, H. C., Schubert, T. S. *Puccinia psidii* on allspice and related plants. **Plant Pathology Circular No. 271**. Division of Plant Industry, Florida Department of Agriculture and Consumer Services, Tallahassee. 1985.
- Demuner, L. N.; Alfenas, A. C.; Fungicidas sistêmicos para o controle da ferrugem causada por *Puccinia psidii* em *Eucalyptus cloeziana*. **Fitopatologia Brasileira** 16: 174-176, 1991.
- Ferreira, F. A. Ferrugem do eucalipto. **Revista Árvore** 7: 91-109, 1983.
- Ferreira, F. A. **Patologia Florestal: principais doenças florestais no Brasil**. Viçosa, MG, SIF. 1989. 570p.
- Ferreira, F. A., Milani, D. **Diagnose visual e controle das doenças abióticas e bióticas do eucalipto no Brasil**. Mogi Guaçu, SP: International Paper. 2002. 98p.
- Ferreira, F. A.; Silva, A. R. Comportamento de procedências de *Eucalyptus grandis* e de *Eucalyptus saligna* a ferrugem (*Puccinia psidii*). **Fitopatologia Brasileira** 7: 23-8, 1982.

- Glen, M; Alfenas, A. C.; Zauza, E. A. V.; Wingfield, M. J., Mohammed, C. *Puccinia psidii*: a threat to the Australian environment and economy – a review. **Australasian Plant Pathology** 36: 1-16. 2007.
- Joffily J. Ferrugem do eucalipto. **Bragantia** 4: 475-487. 1944.
- Junghans, D.T., Alfenas, A.C., Brommonshenkel, S.H., Oda, S., Mello, E.J., Grattapaglia, D. Resistance to rust (*Puccinia psidii* Winter) in *Eucalyptus*: mode of inheritance and mapping of a major gene with RAPD markers. **Theoretical and Applied Genetics**, 108: 175-180. 2003a.
- Loundon, G. F., Waterston, J. M. *Puccinia psidii*. CMI Descriptions of Plant Pathogenic Fungi and Bacteria No. 56, Commonwealth Mycology Institute, Kew. 1965.
- Maclachlan, J. D. A rust of pimento tree in Jamaica. **Phytopatology** 28: 157-170, 1934.
- Ruiz, R. A. R., Alfenas, A. C., Maffia, L. A. & Barbosa, M. M. Progresso da ferrugem do eucalipto, causada por *Puccinia psidii*, em condições de campo. **Fitopatologia Brasileira** 14:73-81. 1989b.
- Ruiz, R.A.R., Alfenas, A.C., Ferreira, F.A., Vale, F.X.R. Influência da temperatura, do tempo de molhamento foliar, fotoperíodo e da intensidade de luz sobre a infecção de *Puccinia psidii*, em Eucalipto. **Fitopatologia Brasileira** 14: 55-61. 1989a.
- Ruiz, R.A.R.; Alfenas, A.C.; Ferreira, F.A. & Zambolim, L. Fungicidas protetores e sistêmicos para o controle da ferrugem do eucalipto causada por *Puccinia psidii*. **Revista Árvore** 11: 56-65, 1987.
- Uchida, J., Zhong, S. & Killgore, E. First Report of a Rust Disease on Ohia Caused by *Puccinia psidii* in Hawaii. **Plant Disease** 90: 524. 2006.

Artigo 1 - Dispersão vertical de urediniósporos de Puccinia psidii e progresso da ferrugem do eucalipto em diferentes alturas

VERTICAL SPREAD OF *PUCCINIA PSIDII* UREDINIOSPORES AND PROGRESS OF THE EUCALYPTUS RUST AT DIFFERENT HEIGHTS

*Edival A. V. Zauza^A, Michelle M. F. Couto^A, Vanessa M. Lana^A,
Luiz A. Maffia^A and Acelino C. Alfenas^{AB}*

^ADepartment of Plant Pathology, Federal University of Viçosa,
Viçosa - MG, 36570-000, Brazil.

^BCorresponding author: A.C. Alfenas: aalfenas@ufv.br

RESUMO

A ferrugem, causada por *Puccinia psidii* é atualmente uma das mais importantes doenças na cultura do eucalipto no Brasil. Todavia, no campo, plantas acima de 3 a 4 m de altura não são infectadas pelo patógeno. Assim, aventou-se a hipótese de que as condições microclimáticas acima de 3 m de altura são desfavoráveis à infecção. Para testar essa hipótese, avaliou-se o efeito do gradiente de altura sobre a incidência da ferrugem do eucalipto, em relação à duração de molhamento foliar e do número de urediniósporos em suspensão no ar. Verificou-se que a incidência da ferrugem reduziu com o aumento da altura. Constatou-se correlação positiva ($p \leq 0,05$) da área abaixo da curva de progresso da doença e incidência em folhas com o período de molhamento foliar e número médio de urediniósporos, e correlação negativa da incidência de doença ($p \leq 0,05$) e altura.

ABSTRACT

Rust, caused by *Puccinia psidii*, is one of the most important diseases in eucalyptus plantations in Brazil. However, in the field, eucalyptus plants taller than 3 to 4 m are not infected by the pathogen. We hypothesized that microclimatic conditions above 3 m do not favor either establishing or developing the pathogen. Therefore we evaluated the effect of height gradient on rust incidence, related to leaf wetness duration and number of airborne urediniospores. Young eucalyptus plants were maintained at heights from

0.5 to 4.0 m, and disease was weekly assessed at all heights in five plant sets. Rust incidence reduced as height increased. Both area under rust progress and rust incidence were negatively correlated ($p \leq 0.05$) with height and positively correlated ($p \leq 0.05$) with number of hours with leaf wetness and number of airborne urediniospores. Thus establishment and progress of eucalyptus rust were affected by leaf wetness duration and concentration of airborne urediniospores, which decreased as height increased.

Additional Keywords: Epidemiology, myrtaceae, spore trap

INTRODUCTION

Eucalyptus (*Eucalyptus* spp.) is the most grown forest tree in Brazil. Increasing demand for forest products and greater awareness of the need to conserve native forests have driven the expansion of cultivated eucalyptus areas, which recently covered about 3.5 million hectares (Valverde *et al.* 2007). Because of its multiple uses, such as cellulose and paper, charcoal and furniture manufacture, eucalyptus is highly important in the worldwide economy (Simões *et al.* 1980). In recent years, eucalyptus plantations have expanded significantly in Brazil. Currently, 1.5% of the agricultural area is planted with eucalyptus (Brun and Pearson 2007), and eucalyptus products account for 4 % of the Gross Domestic Product (GDP), representing 3% of Brazilian exported goods (Valverde *et al.* 2007).

As the eucalyptus crop has expanded, many diseases have threatened plantations in some areas (Alfenas *et al.* 2004). Rust, caused by *Puccinia psidii* Winter, is very severe throughout Brazil in plantations and coppices of up to 2 years old. In eucalyptus the pathogen only infects juvenile leaves and shoots, but in other host species it can also infect young leaves, floral buds, fruits and shoots, causing deformations of the diseased organs, minicankers on shoots, loss of apical dominance, and probably reduction in growth. Conspicuous yellow pustules formed on the infected organs are typical of the disease (Alfenas *et al.* 2004). Very little is known about the effects of rust on plant growth and productivity, despite the report of losses of up to 40% in wood volume in seedling plantations in São Paulo state (Takahashi 2000). *Puccinia psidii* also infects plants of other genera in the Myrtaceae, such as *Angophora*, *Callistemon*, *Corymbia*, *Eugenia*, *Marlierea*, *Melaleuca*, *Myrcia*, *Myrciaria*, *Pimenta*, *Psidium*, and *Syzigium* (Glen *et al.* 2007). Recently, by means of artificial inoculation, it has also severely

infected plants of *Heteropyxis natalensis* Harvey, from the Heteropyxidaceae family (Alfenas *et al.* 2005).

In the field, as trees grow, they escape infection, and generally plants taller than 3-4 m are no longer infected by *P. psidii*. Therefore, we hypothesized that above this height microclimatic conditions, mostly leaf wetness, and inoculum availability do not favor pathogen establishment and development. This work aimed to evaluate the effects of height on the incidence of eucalyptus rust related to leaf wetness and number of airborne spores.

MATERIALS AND METHODS

Five experiments were conducted in Viçosa, Minas Gerais state (altitude 676m, latitude 20° 46' 28.8''S, longitude 42° 52' 37.4''W), Brazil, from April 2003 to August 2005: In experiments 1 and 2 (April to July 2003) we used seedlings of *Eucalyptus cloeziana* F. Muell. and for experiments 3 to 5 (August 2004 to August 2005) cuttings of *E. grandis* Hill ex Maiden, highly susceptible to rust.

For experiments 1 and 2, sets of plants were placed at 0.5, 1.5, 2, and 3 m above soil level, and in experiments 3 to 5 an additional height of 4 m was included. Wind vane spore traps (Figure 2) adapted from Reis and Santos (1985) were placed at different heights. The trap was made out of a white plastic tube, 10 cm in diameter, 38 cm in length on the upper part and 25 cm on the lower part. The anterior end was sectioned at a 45° angle to protect the microscopic slide from rain and sunlight. On the posterior end an acrylic vane was adapted to direct the trap towards wind direction, and the microscopic slide was placed in a hole 19 cm from the anterior end. The slide was treated with silicon grease and the number of urediniospores trapped was assessed weekly under light microscope (200X).

Ten 30-day-old plants, grown in a soil/cow manure mixture (3:1 vol/vol) in 2 L pots were distributed randomly at each height, supported by iron scaffolds.

Disease was assessed weekly in two marked twigs on each plant. Disease incidence (DI) on each twig was calculated as: (number of diseased leaves/total number of leaves)*100. With the values of DI within 8 weeks, values of area under rust progress curve (AURPC) (Campbell and Madden 1990) and disease progress curve per height were estimated.

To evaluate leaf wetness duration, an automatic data logger (Model CR-10X Campbell Scientific Inc., Logan, UT, USA) was placed in the middle of the experimental unit. The number of hours with leaf wetness (HLW) in each specified height was registered every 10 seconds, and output data every 30 min.

Rust incidence was correlated with the number of urediniospores trapped per height and with the average number of hours with leaf wetness lagged with 7 days before disease assessment, considered as the incubation period of eucalyptus rust (Ruiz *et al.* 1989b), using the SAS program v. 9.1 (SAS Inst. Cary, NC, USA).

RESULTS

Rust progress varied according to the heights for both eucalypt species (Figure 2). Ymax (maximum disease) was highest at 0.5 m, mainly in *E. grandis* (Figure 2B). The high variability in disease incidence among plants of *E. cloeziana* (Figure 2A) made it impossible to distinguish between treatments (heights).

At greater heights, a reduction was observed in rust incidence (RI), number of hours with leaf wetness, and number of urediniospores trapped (Figure 3). The multi-factorial analysis of variance (ANOVA) showed no individual effect of experiment on AUDPC ($P > 0.4653$) and Ymax ($P > 0.3474$). Considering the average values of AUDPC and Ymax, significant differences ($p \leq 0.05$) were found in the effect of height gradient in reducing disease intensity (Figure 4). Rust intensity was greatest in plants at 0.5 m. Although there was a trend to reduce disease intensity as height increased, in *E. cloeziana* plants the effect was not statistically significant.

The variables RI and AUDPC were positively correlated with ANU and negatively correlated with height (Table 1). Considering the significant correlation between RI and AUDPC, in future experiments just one of these variables can be used for disease assessment. In experiments 1, 2, 3, and 5, no correlation was found between disease intensity and HLW, probably because HLW was always more than 6 h, favoring spore germination and plant infection at all heights (Ruiz *et al.* 1989a).

DISCUSSION

This is the first report on the effect of height gradient of eucalyptus plants on disease incidence, and it is expected that this report will support other investigations.

The genetic variability among seedlings of *E. cloeziana* resulted in a high variability in disease incidence, making it impossible to distinguish between disease progress curves. However, in *E. grandis* cuttings there was a relatively low variation in disease intensity among plants, allowing the effects of microclimatic changes on the establishment and development of rust to be detected, mainly in plants kept close to soil level.

The reduction in the number of airborne spores trapped and hours with leaf wetness can be explained by the increase in wind speed in air layers farther from soil surface (Van Arsdel 1967). It is also possible that during the day faster wind speed favors spore removal. However, because wind turbulence is also high (Arya 1988), spore clouds as well as other particles suspended in the air are diluted and spread to higher layers in the atmosphere (Gregory 1973; Hirst and Stedman 1967), causing a reduction in the concentration of spores in higher layers. Commonly there is a logarithmic reduction in spore concentration as height increases when air movement is unstable, even in stable air layers, and there are drastic changes in spore concentration (Hirst and Stedman 1967), called “vertical diffusion” (Gregory 1973). At night, turbulence is reduced, and small and light particles, such as *P. psidii* urediniospores, are transported to the layers closer to the soil, allowing them to settle on plants and on spore traps. There have been other attempts to study variation in spore concentration at different altitudes. Significant variation in spore numbers of *Nigrospora sphaerica* (Sacc.) Mason and *Penicillium lapidosum* Raper & Fennell (Tan *et al.* 1992) was found at 80m height. At low altitudes, concentration of bacterial cells (43%) and fungal spores (57%) was similar, whereas at medium and high altitudes, 70 and 90% of the bioaerosol were composed of bacterial cells respectively (Fulton 1966a; Fulton 1966b). Although several studies on vertical dispersion of reproductive structures of microorganisms have been carried out above 100m height (Fulton 1966a; Fulton 1966b; Gregory 1973; Hirst and Stedman 1967), in the present work we found that such differences also occur close to soil level, and the same principles of atmospheric diffusion may probably be applied.

The plants in the present study were grown in pots, were of the same age and potentially had the same ability to absorb and translocate nutrients and photoassimilates. Therefore, we discarded the possibility of differences in rust incidence being related to physiological processes at the apical buds.

Considering that eucalyptus rust progress is highly dependent on leaf wetness (Ruiz *et al.* 1989b), and based on the data of the present work, we concluded that in

commercial plantations, plants taller than 3 m tend to escape *P. psidii* infection because of a lower number of airborne urediniospores and hours with leaf wetness.

LITERATURE CITED

- Alfenas AC, Zauza EAV, Mafia RG, Assis TF (2004) 'Clonagem e doenças do eucalipto'. Editora UFV: Viçosa, 442p.
- Alfenas AC, Zauza EAV, Wingfield MJ, Roux J, Glen M (2005) *Heteropyxis natalensis*, a new host of *Puccinia psidii* rust. *Australasian Plant Pathology* **34**, 285-286.
- Arya S (1988) 'Introduction to Micrometeorology.' (Academic: San Diego)
- Brun LR, Pearson L (2007) Aspectos legais: biossegurança e propriedade intelectual. In 'Biotecnologia Florestal'. (Ed. A Borém) pp. 347-362: Viçosa.
- Campbell CL, Madden LV (1990) 'Introduction to plant disease epidemiology.' (John Willey & Sons: New York)
- Fulton JD (1966a) Microorganisms of the upper atmosphere. 3. Relationship between altitude and micropopulation. *Appl Microbiol* **14**, 237-40.
- Fulton JD (1966b) Microorganisms of the upper atmosphere. V. Relationship between frontal activity and the micropopulation at altitude. *Appl Microbiol* **14**, 245-50.
- Glen M, Alfenas AC, Zauza EAV, Wingfield MJ, Mohammed C (2007) *Puccinia psidii*: a threat to the Australian environment and economy - a review. *Australasian Plant Pathology* **36**, 1-16.
- Gregory P (1973) 'The Microbiology of the Atmosphere.' (John Wiley & Sons: New York - Toronto)
- Hirst JM, Stedman OJ (1967) Long-distance spore transport: methods of measurement, vertical spore profiles and the detection of immigrant spores. *J Gen Microbiol* **48**, 329-55.
- Reis E, Santos H (1985) População de *Helminthosporium sativum* no ar quantificado através de uma armadilha tipo cata-vento. *Fitopatologia Brasileira* **10**, 515-519.
- Ruiz RAR, Alfenas AC, Ferreira FA (1989a) Influência da temperatura, luz e origem do inóculo sobre a produção de uredosporos e teliosporos de *Puccinia Psidii*. *Fitopatologia Brasileira* **14**, 70-73.

- Ruiz RAR, Alfenas AC, Maffia LA, Barbosa MdM (1989b) Progresso da ferrugem do eucalipto, causada por *Puccinia psidii*, em condições de campo. *Fitopatologia Brasileira* **14**, 73-81.
- Simões JW, Coelho AS, Mello HA, Couto HT (1980) Crescimento e produção de madeira de eucalipto. *IPEF* **20**, 77-97.
- Takahashi SS (2000) Avaliação de danos da Ferrugem do Eucalipto. *Simpósio IPEF/Botucatu- S.P*, 12.
- Tan TK, Teo TS, Tan H, Lee BW, Chong A (1992) Variations in Tropical Airspora in Singapore. *Mycological Research* **96**, 221-224.
- Valverde SR, Neiva SA, Soares NS (2007) Biotecnologia e competitividade das plantações florestais. In 'Biotecnologia Florestal'. (Ed. A Borém) pp. 363-374: Viçosa)
- Van Arsdel E (1967) The nocturnal diffusion and transport of spores. *Phytopathology* **57**, 1221-1229.

Table 1. Spearman correlation coefficients (probability levels) between height of plants, area under rust progress curve (AURPC), rust incidence (RI), hours of leaf wetness (HLW), and average number of urediniospores of *Puccinia psidii* (ANU) on *Eucalyptus cloeziana* (experiments 1 and 2) and *E. grandis* (experiments 3 to 5)

Experiment		Height	RI	AURPC
Time of execution				
1 04/21 – 05/19/03	RI	-0.75 (0.0008)	---	0.99 (0.0011)
	AURPC	-0.99 (0.011)	0.99 (0.0011)	---
	HLW	-0.59 (0.017)	0.29 (0.276)	0.92 (0.08)
2 05/26 - 07/23/03	RI	-0.53 (0.0018)	---	0.99 (0.006)
	AURPC	-0.99 (0.007)	0.99 (0.006)	---
	HLW	-0.42 (0.017)	-0.002 (0.99)	0.99 (0.015)
3 08/03 – 09/28/04	RI	-0.18 (0.28)	---	0.96 (0.0001)
	AURPC	-0.30 (0.056)	0.96 (0.0001)	---
	HLW	-0.66 (0.0001)	-0.21 (0.20)	-0.19 (0.25)
	ANU	-0.41 (0.009)	0.51 (0.0008)	0.57 (0.0001)
4 11/13 – 11/30/04	RI	-0.75 (0.0001)	---	0.99 (0.0001)
	AURPC	-0.78 (0.0001)	0.99 (0.0001)	---
	HLW	-0.47 (0.002)	0.29 (0.066)	0.34 (0.03)
	ANU	-0.66 (0.0001)	0.42 (0.006)	0.45 (0.003)
5 07/06 – 08/31/05	RI	-0.42 (0.006)	---	0.99 (0.0001)
	AURPC	-0.46 (0.003)	0.99 (0.0001)	---
	HLW	-0.49 (0.001)	0.008 (0.96)	0.05 (0.77)
	ANU	-0.20 (0.209)	0.74 (0.0001)	0.76 (0.0001)

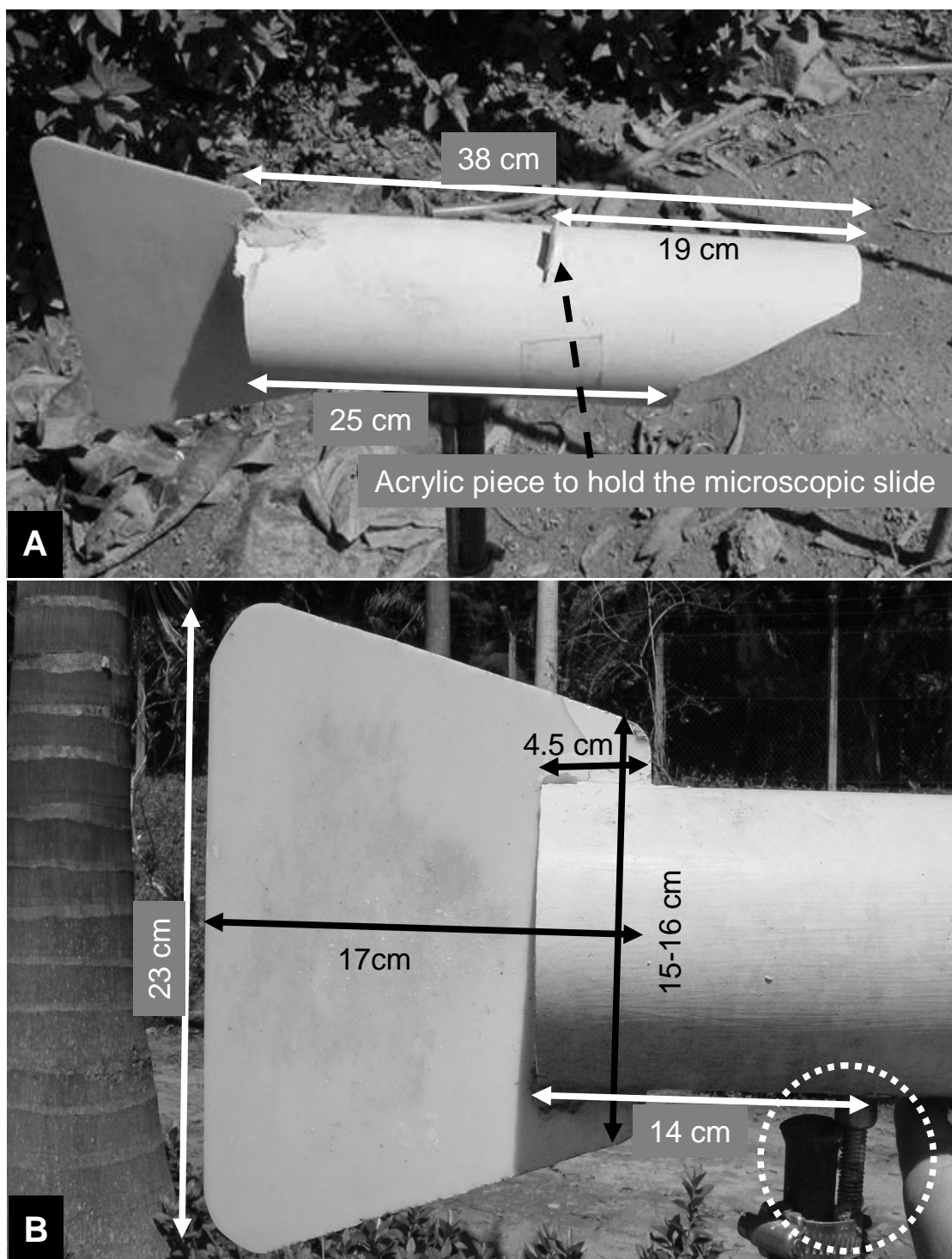


Fig. 1. Wind vane spore trap: A – General view and dimensions; and B – Detail of the dimensions of the vane at the posterior end. The circle indicates the points of support and movement of the trap.

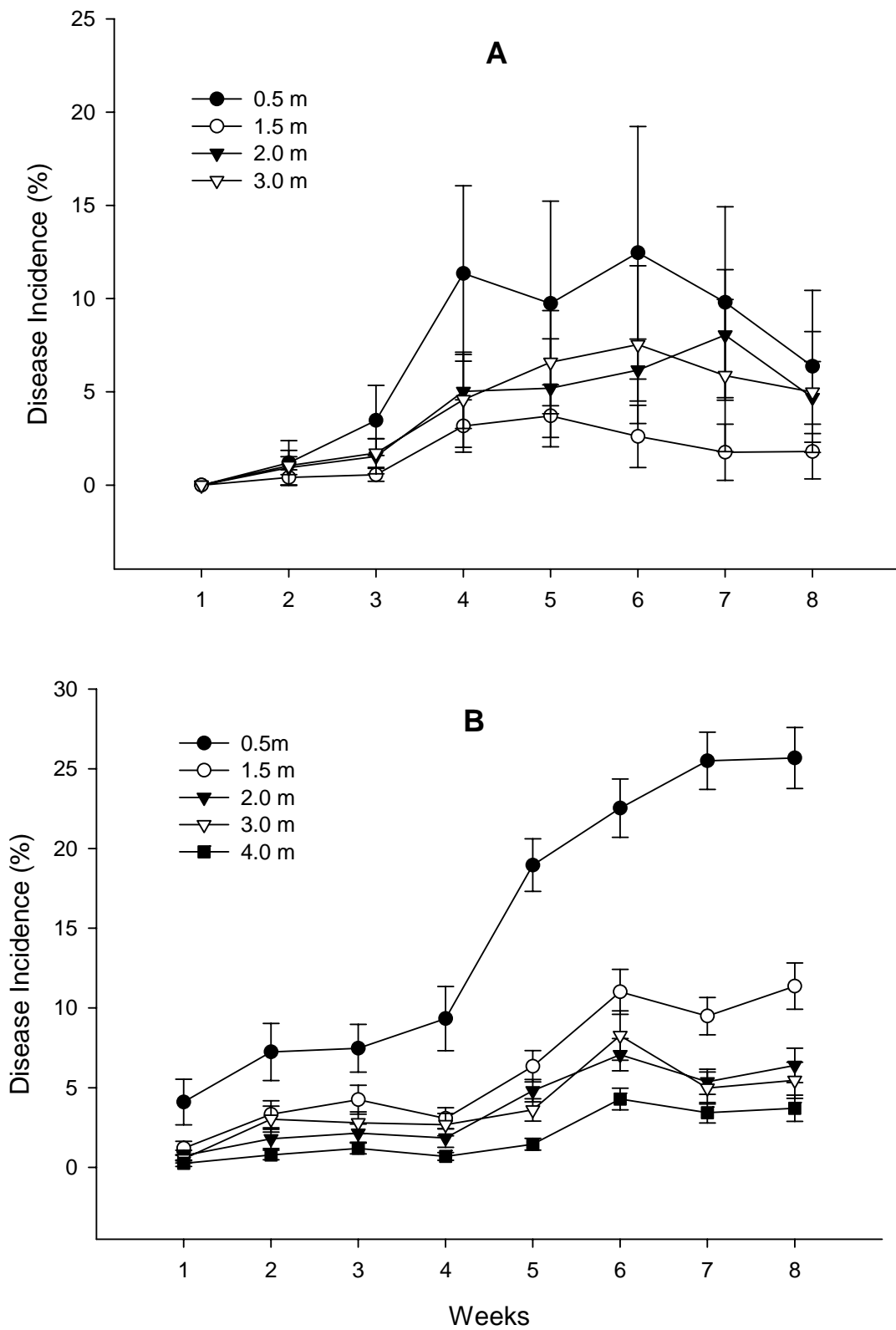


Fig. 2. Rust progress (*Puccinia psidii*) on plants of *Eucalyptus cloeziana* (A) and *E. grandis* (B), maintained at different heights. Bar indicates standard deviation.

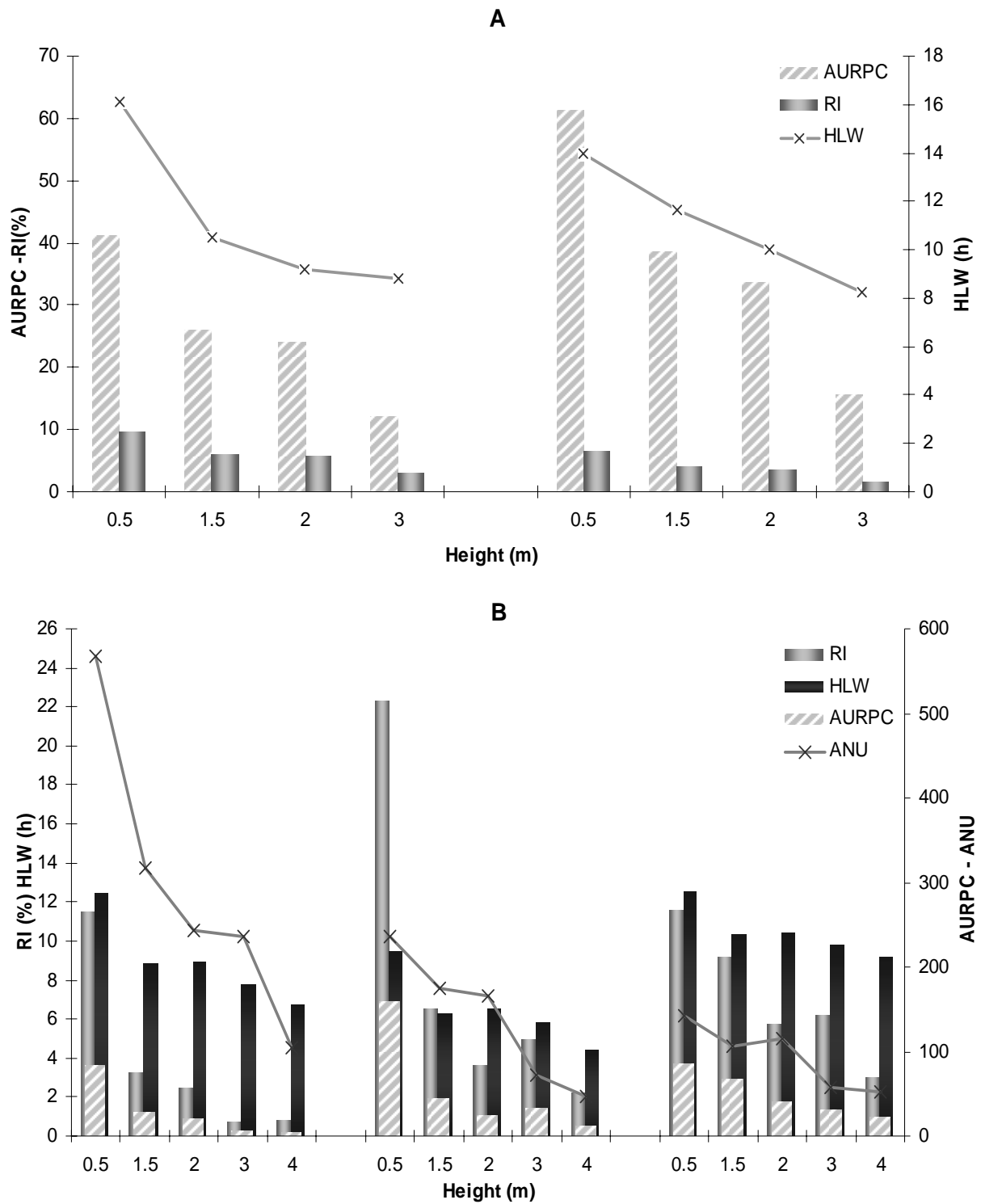


Fig. 3. Hours of leaf wetness (HLW), area under rust progress curve (AURPC), rust incidence (RI) and average number of urediniospores of *Puccinia psidii* (ANU) at different heights on seedlings of *Eucalyptus cloeziana* (A) and cuttings of *E. grandis* (B).

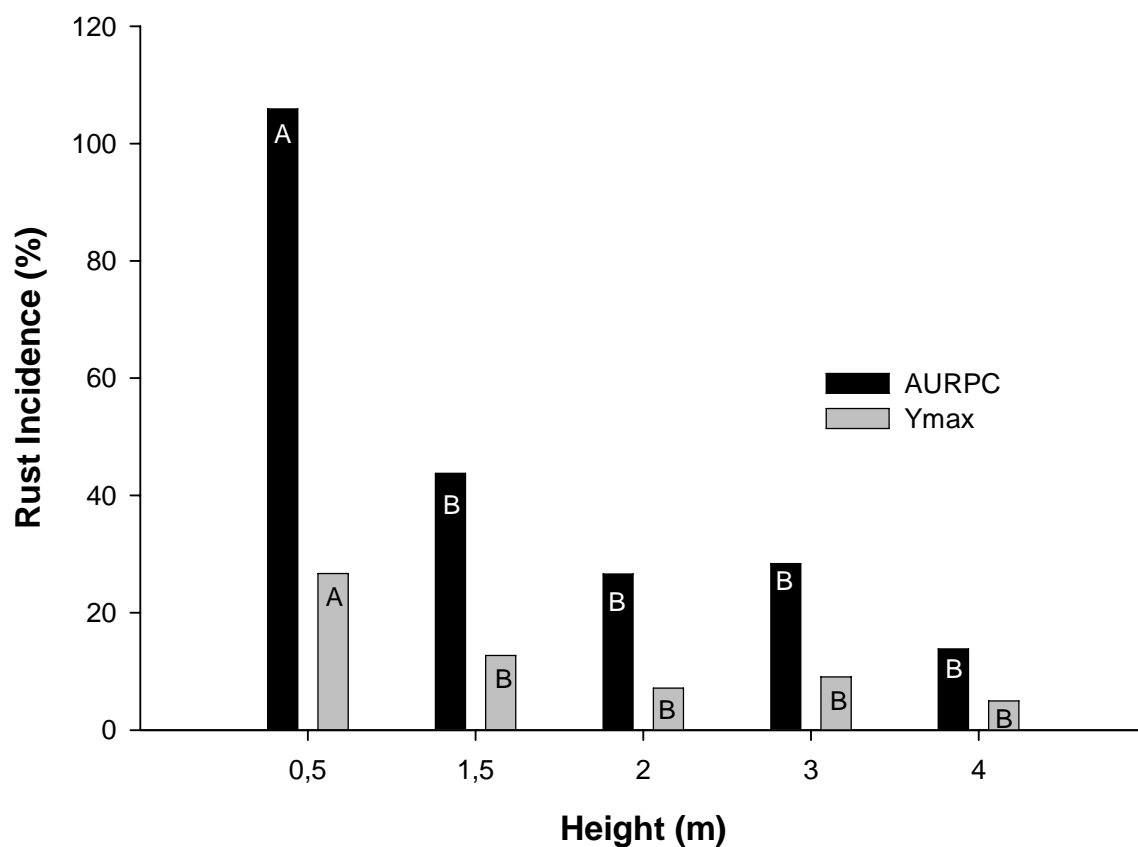


Fig. 4. Relation between height and rust intensity, expressed by the mean values of AURPC and Ymax on *Eucalyptus grandis*. Columns with the same color followed by different letters differ significantly (Fisher's protected LSD test, $p \leq 0.05$).

Artigo 2 - Dispersão anemófila de urediniósporos de Puccinia psidii e progresso da ferrugem do eucalipto

*Edival A. V. Zauza^A, Vanessa M. Lana^A, Luiz A. Maffia^A, Michelle M. F. Couto^A,
Fabiano Cardoso^B e Acelino C. Alfenas^{AC}*

^ADepartamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa,
Viçosa - MG, 36570-000, Brazil.

^BDepartamento de Estatística, Universidade Federal de Viçosa

^CAutor para correspondência: A.C. Alfenas: aalfenas@ufv.br

RESUMO

Quantificou-se, por meio de armadilha Burkard[®], o número de urediniósporos de *Puccinia psidii* (ESP) de julho 2004 a junho 2005. Esporos foram capturados em 77% dos dias amostrados. Maior ESP médio (3,21 esporo/m³ de ar/2h) ocorreu entre julho e novembro. Nesse período, 58% dos ESP foram capturados no período noturno, e ESP foi negativamente relacionado com às temperaturas mínima, média (TM) e máxima e velocidade do vento (VV). Houve correlação positiva entre EPS, duração do molhamento foliar (MF) e umidade relativa (UR). A TM, a umidade relativa média (UR) e o MF no período foi de 19 °C, 80% e 54 min, respectivamente. De dezembro/04 a junho/05, o ESP médio foi de 0,43 esporo/m³ de ar/2h, e não houve correlação entre ESP e as variáveis meteorológicas medidas. Houve correlação positiva entre incidência de doença e ESP capturados aos 12 dias antes da avaliação da doença. A defasagem de 1 a 24 h das variáveis microclimáticas foi realizada para analisar a variação do número de urediniósporos capturados pela armadilha. Correlação negativa ocorreu entre ESP e precipitação pluviométrica medida 10 h antes, umidade relativa 14 h antes, intensidade luminosa 12 h antes e molhamento foliar 14 h antes e a positiva, entre ESP e velocidade do vento 16 h antes. Maior número de urediniósporos foi registrado com a combinação de baixa temperatura média, intensidade luminosa, velocidade do vento e alta umidade relativa e período de molhamento foliar, condições mais frequentes durante o período noturno. Para o progresso da ferrugem do eucalipto, mudas seminais de *Syzigium jambos* e *Eucalyptus grandis* e mudas de um clone de *E. grandis*, comprovadamente suscetível à doença, foram plantadas no esquema de jardim clonal, espaçamento de 1 x

0,5 x 1,0m, com irrigação por gotejamento, em março de 2002. A proporção de ramos (PRF) e folhas (PFF) com ferrugem foi avaliada semanalmente de fevereiro de 2003 a outubro de 2005, determinando-se as curvas de progresso da doença, estimada pelas análises de séries temporais, e os valores de área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD). A alta suscetibilidade e a grande variabilidade na intensidade da doença do material seminal inviabilizaram as análises de séries temporais. Nas plantas do clone de *E.grandis*, comprovou-se um efeito sazonal anual quanto a incidência da doença e que a previsão até três meses após a última observação é viável mediante a utilização do modelo considerado. Como PRF e PFF foram altamente correlacionadas, somente uma dessas variáveis pode ser usada em trabalhos futuros. Entretanto, não se detectaram correlação entre a intensidade de doença e as variáveis micrometeorológicas, em virtude da predominância de condições favoráveis à infecção durante todo o período experimental.

ABSTRACT

Wind dispersal of *Puccinia psidii* urediniospores and eucalyptus rust progress.

We evaluated wind dispersal of *Puccinia psidii* urediniospores in an experimental area with seedlings *Eucalyptus grandis* and cuttings of *E. grandis*. *P. psidii* urediniospores (ESP) were collected in a Burkard[®] spore trap from July 2004 to June 2005. Spores were trapped in 77% of the days sampled. Largest average ESP values were detected from July to November, when most of spores (58%) were trapped at night time. ESP was negatively correlated to minimal, average (TM) and maximal temperatures and to wind speed (VV). It was found positive correlation between ESP, leaf wetness duration (MF) and relative humidity (RH). From December 2004 to June 2005, average ESP was 0.43 spores/m³air/2h. ESP was not correlated to meteorological variables. Disease incidence was positively correlated with spores trapped 12 days before disease assessment. ESP was negatively correlated with rain fall, relative humidity, light intensity, and leaf wetness duration and positively correlated with wind speed, all measured 10 to 16 h before spore trap. Largest ESP values were found associated with the combination of low TM, low light intensity, low VV, high UR and high MF, more frequently found at night time. Disease progress was studied through times series analysis. According to the models gotten through time series, it was found a seasonal yearly effect on rust progress. It was also possible to forecast disease incidence up to 3

months after the last observation. Throughout the experimental period it was found no correlation between disease intensity and the meteorological variables evaluated.

Additional Keywords: Eucalyptus, Myrtaceae, spore trap, Syzigium jambos

INTRODUÇÃO

Até a década de 1970, a área plantada com eucalipto (*Eucalyptus* spp.) no Brasil era relativamente pequena, concentrava-se nos Estados de Minas Gerais, São Paulo e do Rio Grande do Sul, e a cultura era praticamente livre de doenças. Todavia, a crescente demanda por produtos florestais e a conscientização quanto à conservação das florestas nativas motivaram a expansão da eucaliptocultura, que abrange atualmente quase 3,5 milhões de hectares. Com o aumento da área plantada, principalmente em regiões mais quentes e úmidas, favoráveis à infecção, surgiram várias doenças fúngicas e bacterianas que ocasionam perdas significativas (Alfenas *et al.* 2004). Dentre essas, a ferrugem (*Puccinia psidii* Winter) é uma das mais limitantes para o estabelecimento de materiais suscetíveis em regiões favoráveis à doença. Ainda não ocorre na Austrália e África do Sul, onde é considerada uma doença quarentenária de alto risco de danos à flora local ou em plantios comerciais em virtude de sua alta capacidade de disseminação e ampla gama de hospedeiros (Glen *et al.* 2007).

Puccinia psidii foi primeiramente descrito em 1884 em *Psidium guajava* L. (Maclachlan, 1934) e em 1943, em mudas de *Corymbia citriodora* (Hook) Hill & Johnson, no Município de Itaguaí, Rio de Janeiro, Brasil (Joffily 1944). A ferrugem foi registrada até o presente em cerca de 15 gêneros e 30 espécies (Burnett e Schubert, 1985; Laundon e Waterston, 1965; Ferreira, 1989). Sob condições de inoculação controlada, *Heteropyxis natalensis* Harvey, da família Heteropyxaceae, autóctone na África do Sul, foi altamente suscetível à ferrugem (Alfenas *et al.*, 2005). Recentemente, a doença foi introduzida no Havaí, onde infecta severamente *Meterosideros* sp. (Uchida *et al.*, 2006), importante componente do ecossistema havaiano. A doença caracteriza-se pela esporulação urediniospórica amarela em folhas e brotações jovens, botões florais e frutos jovens dependendo do hospedeiro. Em materiais altamente suscetíveis, causa deformações, necrose, hipertrofia, minicancros e morte das porções terminais de crescimento (Alfenas e Zauza, 2007; Coutinho *et al.* 1998; Alfenas *et al.*, 2004). A doença é de fácil disseminação, mesmo a longas distâncias, via material propagativo

infectado e, ou, em pólen com esporos do fungo (Langrell *et al.*, 2003). Em decorrência dessa alta capacidade de disseminação, é necessário estabelecer os fatores microclimáticos favoráveis a essa etapa do ciclo da doença, visando desenvolver estratégias mais eficientes de controle. Para tanto, um dos objetivos deste estudo foi correlacionar os dados de temperatura, umidade relativa, precipitação, número de horas com molhamento foliar, intensidade luminosa e velocidade do vento à época do ano e o período do dia com maior concentração de urediniósporos no ar.

No patossistema eucalipto-*P. psidii*, estudou-se o progresso da doença no estado da Bahia ainda na década de 1980 e 1990 (Ruiz *et al.*, 1989c, Carvalho *et al.*, 1994) e correlacionou-se a intensidade de doença com variáveis meteorológicas (temperatura, umidade relativa do ar e precipitação pluviométrica) obtidas em estação com equipamentos não tão acurados. Nesses estudos, como em vários outros relacionados à epidemiologia de doenças, não se preocupou com o aspecto estocástico do progresso de doença. Nessa perspectiva, alguns autores já usaram modelos de séries temporais em fitopatologia (Yang and Zeng, 1992, Scherm and Yang, 1995, Workneh and Rush, 2002). Com os modelos de séries temporais ou série histórica, podem-se descrever processos estocásticos utilizando apenas valores da variável dependente e um termo relacionado com o erro experimental (Box *et al.*, 1994). Assim, outro objetivo deste trabalho foi reavaliar e validar as informações obtidas por aqueles autores acerca do progresso da ferrugem do eucalipto ao longo do ano, e correlacionar estes dados com temperatura, umidade relativa, precipitação, número de horas com molhamento foliar, intensidade luminosa e velocidade do vento.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta de dados

Os experimentos foram estabelecidos em uma área do Departamento de Engenharia Florestal da Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, MG (altitude de 676 m, latitude 20° 46' 28.8''S e longitude 42° 52' 37.4''W).

Para estudar as variáveis meteorológicas associadas ao desenvolvimento da doença e dispersão dos esporos ao longo do ano, instalou-se na região central da unidade experimental um coletor automático de dados (Model CR-10X Campbell Scientific Inc., Logan, UT, USA), ao qual se acoplaram sensores para registrar o número de horas com molhamento foliar, umidade relativa do ar, precipitação,

intensidade luminosa, velocidade do vento e temperaturas mínima, média e máxima do ar. Programou-se o coletor de dados para realizar leituras a cada 10 seg, com a saída de dados a intervalos de 30 min. Com o auxílio do Programa SAS V. 9.1 (SAS Inst. Cary, NC, USA), correlacionaram-se a incidência de ferrugem com as médias das variáveis meteorológicas avaliadas aos 7, 10 e 12 dias antes da data de avaliar a doença.

Dispersão aérea de urediniósporos de *Puccinia psidii*

Para monitorar a concentração de urediniósporos no ar, utilizou-se a armadilha Burkard (Burkard Manufacturing Co. Ltd., Rickmansworth, UK), que succiona o ar a 7 L/min por um orifício, a 0,8 m da superfície do solo, altura relativa ao dossel das plantas, e a 1 m da fonte de inóculo. A fita plástica de coleta, tratada com graxa de silicone e foi depositada sobre um disco, que girava a 2 mm/h em sentido horário, era trocada semanalmente. Cada segmento de 48 mm, correspondente a 1 dia, era remontado em lâminas de microscopia com solução de lactofenol e azul-de-algodão para facilitar a contagem dos esporos ao microscópio de luz. Para contagem, o segmento de 48 mm foi subdividido em 12 partes iguais de 4 mm, que correspondiam ao intervalo de 2 h de determinado dia. A concentração média de esporos/m³ de ar/2 h (ESP) foi calculada pelo número total de esporos por seção, dividido pelo total de ar capturado pelo orifício (0,84 m³/2 h). Correlacionou-se o número de esporos coletados de julho de 2004 a junho de 2005, à temperatura, velocidade do vento, umidade relativa do ar, precipitação pluviométrica, intensidade luminosa, molhamento foliar e incidência de doença. Com o Programa SAS, calculou-se a defasagem em até 12 dias e 24 horas para ESP, e as variáveis meteorológicas e correlacionaram-nas entre si e com a intensidade de doença. Realizou-se a defasagem de 1 a 24 horas das variáveis microclimáticas para analisar a variação do número de urediniósporos capturados pela armadilha.

Progresso da doença

Mudas seminais de *Syzygium jambos* (L.) Alston (jambeiro) e *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden e clonais de *E. grandis* foram plantadas em março de 2002, no esquema de jardim clonal (Alfenas et al., 2004), em espaçamento de 0,5 m entre plantas, na linha, e 0,5-1,0 m, alternadamente, entre linhas, abrangendo uma área de 100 m². As áreas com plantas de *E. grandis* foram divididas em três parcelas, nas quais se estabeleceu um cronograma de podas, para que, ao se avaliar a doença em uma parcela,

outras duas estavam sendo conduzidas para as próximas avaliações, para haver disponibilidade de brotações novas, suscetíveis à infecção, ao longo do ano. Nas parcelas com jambeiro, não se efetuaram as podas das plantas, e estas mantiveram alta incidência de ferrugem. Para evitar a interferência no período de molhamento foliar, irrigou-se por gotejamento.

As avaliações transcorreram de fevereiro de 2003 a dezembro de 2005. Em cada parcela, marcaram-se 10 plantas, nas quais foram selecionadas duas brotações, em que semanalmente, durante dois meses, se determinaram o número de ramos e folhas totais e o número de ramos e folhas com ferrugem, calculando-se a incidência de ramos e de folhas com ferrugem. Assim, o progresso da doença foi avaliado em várias épocas, cada uma com intervalos de oito semanas.

Com os valores de incidência de doença, estimaram-se a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) e a taxa de progresso da ferrugem (i).

Utilizaram-se os modelos de séries temporais para descrever o progresso da ferrugem. Para análise de tendências, ajustaram-se os modelos auto-regressivos (AR), médias móveis (MA), auto-regressivos com médias móveis (ARMA) e os auto-regressivos integrados de médias móveis (ARIMA) que incorporaram o comportamento de sazonalidade (SARIMA), para determinar o comportamento da série e os fatores que influenciaram esse comportamento. Para verificação da sazonalidade, utilizou-se o teste de Friedman (Morettin; Tolo, 2004), o qual indica se esta ocorre em níveis anual, semestral, trimestral ou mensal. Utilizou-se o Critério de Informação Bayesiano de Schwarz (BIC) (Box et al., 1994), para avaliar o modelo que melhor explica a dinâmica da série temporal. Esse critério é considerado um dos melhores, pois leva em conta o conceito de parcimônia, ou seja, para ele nem sempre o modelo mais complexo (parametrizado) é o melhor.

Verificando os fatores microclimáticos que influenciaram a incidência da ferrugem ao longo do ano, correlacionaram-se os valores de intensidade de doença com as variáveis microclimáticas, temperatura, umidade relativa, precipitação, número de horas com molhamento foliar, intensidade luminosa e velocidade do vento, em defasagem de até 12 dias anteriores à avaliação.

RESULTADOS

Dispersão aérea de urediniósporos de *Puccinia psidii*

Com esporos capturados em 77% dos dias amostrados, registraram-se 6.411 urediniósporos de *P. psidii* entre julho de 2004 e julho de 2005. Desses, 58% foram capturados no período noturno (18-06h), e a maior concentração média (3,21 ESP/m³/2h) ocorreu de julho a novembro de 2004, enquanto 0,43 ESP/m³/2 h aconteceu de dezembro de 2004 a junho de 2005 (Figura 1A), quando os esporos capturados não se relacionaram com as variáveis micrometeorológicas. O máximo de captura (1514 ESP) foi em setembro. Dentre os meses de avaliação, não se obteve correlação entre as médias de esporos capturados e a intensidade da doença (Figura 1B). De julho a novembro, detectou-se correlação negativa entre ESP e temperatura mínima ($r = -0,14$; $P=0,0001$), temperatura média ($r = -0,14$; $P=0,0001$), temperatura máxima ($r = -0,13$; $P=0,0001$) e velocidade do vento ($r = -0,11$; $P=0,0001$), bem como correlação positiva entre ESP, duração do molhamento foliar ($r = 0,10$; $P=0,0001$) e umidade relativa ($r = 0,11$; $P=0,0001$) (Figura 2). Nesse período, a temperatura média, a umidade relativa média e a duração do molhamento foliar média foram de 19 °C, 80% e 54 min, respectivamente.

Houve correlação positiva ($r = 0,42$; $P=0,003$) entre a incidência de doença e a ESP avaliada 12 dias antes. Correlação negativa ocorreu entre ESP e a precipitação pluviométrica 10 h antes ($r = -0,77$; $P=0,0001$), umidade relativa 14 h antes ($r = -0,13$; $P=0,0001$), intensidade luminosa 12 h antes ($r = -0,91$; $P=0,0001$) e molhamento foliar 14 h antes ($r = -0,93$; $P=0,0001$), e positiva entre ESP e velocidade do vento 16 h antes ($r = 0,11$; $P=0,0001$).

Apesar de urediniósporos de ferrugem serem produzidos isoladamente sobre pedicelos, observou-se, com freqüência, que os urediniósporos de *P. psidii* se dispersaram em grupos maiores do que 10 esporos, raramente como esporos solados (dados não publicados). Provavelmente, antes do processo de remoção, eles se desprendem dos pedicelos e estão prontos para a dispersão, como grupos de esporos destacados (Hirst, 1961).

Progresso da doença

A alta suscetibilidade à ferrugem do material seminal e a grande variabilidade intra-específica, quanto à intensidade de doença, inviabilizaram as análises de séries

temporais. No material clonal de *E. grandis*, pelo teste de Friedman houve efeito sazonal anual, estando esse efeito contido no modelo usado para realizar as previsões (Tabela 1).

O valor do BIC (Tabela 2) em modelos considerados neste estudo, de acordo com cada conjunto de dado especificado (conjunto 1: eliminação das observações do último mês; conjunto 2: eliminação das observações dos dois últimos meses; e conjunto 3: eliminação das observações dos últimos três meses), indica que os menores valores do BIC foram observados no modelo auto-regressivo com sazonalidade anual. Este é descrito de acordo com a metodologia de Box e Jenkins, como SARIMA (p,d,q)(P,D,Q)_s, em que p = 1 e q = 0 referem-se, respectivamente, às ordens auto-regressiva e de média móvel; P = 1 e Q = 0 referem-se, respectivamente, às ordem auto-regressiva sazonal (SAR) e de média móvel sazonal, enquanto d = 0 representa a ordem de diferenciação não sazonal, D = 1 a ordem de diferenciação sazonal e S = 12 a sazonalidade. As apresentações algébricas deste modelo, para cada conjunto de dados considerado, são dadas na Tabela 3.

O ajuste dos modelos apresentados é mostrado na Figura 3. Ao considerar a exclusão de observações consideradas nos conjuntos 1, 2 e 3, o objetivo era validar o modelo estatístico considerado. Após essa etapa, são apresentados resultados considerando-se o arquivo de dados completos, cujas previsões realmente representação observações futuras (Figura 4).

Constatou-se alta correlação entre a porcentagem de ramos com ferrugem e a porcentagem de folhas com ferrugem ($r = 0,81$; $P < 0,05$), permitindo que em ensaios futuros poder-se-á optar por avaliar uma ou outra variável. Entretanto, ao longo do período experimental não se detectou correlação entre a intensidade de doença e as variáveis micrometeorológicas avaliadas; em decorrência disso, as variáveis se mantiveram-se ao longo dos anos (Figura 5) dentro da faixa ótima necessária para o estabelecimento e desenvolvimento do patógeno, que é molhamento foliar acima de 6 a 8 h e temperaturas entre 18 a 25 °C (Ruiz et al.; 1989b, Ruiz et al.; 1989c).

DISCUSSÃO

Maior concentração de esporos em suspensão no ar ocorreu com a combinação de temperatura média de 19 °C, intensidade luminosa de 0,03 KW.m⁻², umidade relativa maior que 80% e molhamento foliar superior a 60 min, condições que predominaram

durante a madrugada. Similarmente, Tessmann *et al.* (2001) relataram que a captura de urediniósporos de *P. psidii* em área com plantas de *S. jambos* correlacionou-se positivamente com a ocorrência de dias com pelo menos 6 h de molhamento foliar, ou mínimo de 90% de umidade relativa, combinado com temperaturas variando entre 18 e 20 °C. Analogamente, em jambeiro detectou-se correlação negativa entre a quantidade de urediniósporos de *P. psidii* dispersos no ar com temperatura (às 12 h), e correlação positiva com UR \geq 80% e temperatura \leq 20 °C, apresentando maior carga de esporos de maio a julho, no período diurno, entre as 1.000 e 1.300 h (Blum; Dianese, 2001). A periodicidade noturna de urediniósporos de *P. psidii* em suspensão no ar foi contrária ao relatado para diversos fungos (Rich; Waggoner, 1962; Grove, 1998; Byrne *et al.*, 2000; Casa *et al.*, 2004; Jones; Harrison, 2004) e outras ferrugens cujos picos de captura de esporos ocorreram no início da tarde (Cammack, 1955; Pady *et al.*, 1965; Blum; and Dianese, 2001). Considerando a periodicidade noturna e os resultados de correlação da dispersão aérea dos urediniósporos com as variáveis microclimáticas, pode-se aventar a hipótese de que a liberação dos esporos depende de fatores microclimáticos, como variação na irradiância, temperatura, umidade relativa do ar e molhamento foliar, e é reduzida com o aumento da velocidade do vento e intensidade da turbulência do ar, que são, por sua vez, importantes para transportar os esporos a partir da fonte de inóculo (Gregory, 1973; Aylor, 1990). No entanto, o contrario foi relatado, em túnel de vento, para *P. graminis* Pers., em que a liberação foi alta com ventos acima de 4,5 km/h, e aumentou linearmente com o incremento da velocidade do vento (Smith, 1966). Esse autor sugeriu haver liberação passiva, em que a produção de urediniósporos/soro aumentou com a elevação na velocidade do vento, luz, temperatura e possivelmente, umidade relativa. Velocidades do vento acima de 4,68 km/h e 6,48 km/h, aplicadas por pelo menos 10 seg, foram relatadas como o ponto de partida para a liberação de urediniósporos de *P. recondita* Roberge f. sp. *tritici* e *P. striiformis* West., respectivamente (Geagea *et al.*, 1997). Em *Hevea brasiliensis* Müll. -Arg., a periodicidade diurna prevaleceu para os conídios de *Mycrocyclus ulei* (P. Henn) v. Arx., e a noturna, para os ascósporos, relacionada com a maior umidade relativa e baixa temperatura, que propiciaram maior molhamento dos peritécios, pré-requisito para liberação ativa dos ascósporos (Chee, 1976). Analogamente, maior captura de ascósporos e picnidiósporos de *Leptosphaeria moluccans* (Desmaz.) Ces. & De Not., ocorreu entre as 2100 e 0400 h, quando a temperatura do ar estava entre 13 e 18 °C, e a umidade relativa era 80% (Guo; Fernando, 2005). Para vários fungos é relatada ainda

uma relação de aumento na liberação de esporos quando a umidade relativa está abaixo de 40% (Leach, 1975; Leach *et al.*, 1982; Gottwald, 1982; Adams *et al.*, 1986). Assim, tanto para urediniósporos de ferrugem quanto para ascósporos de *M. ulei* e *L. molucans*, há resposta rápida ao molhamento foliar, o que possibilita aos esporos depositados nas folhas novas exposição a períodos de molhamento suficientes para ocorrer a germinação.

Considerando as informações geradas pelas correlações entre a concentração de esporos de *P. psidii* no ar e os valores das variáveis microclimáticas registrados 12 a 16 h antes, aparentemente, a situação é mais complexa e a periodicidade noturna parece relacionar-se com a combinação de fatores biológicos e físicos, o que leva a aventar outra hipótese para explicar tal periodicidade. Durante o período diurno, com maior velocidade do vento ocorre a remoção dos esporos, porém como a turbulência nesse momento é elevada (Arya, 1988), a nuvem de esporos e outras partículas em suspensão no ar são diluídas e dispersas a maiores alturas na atmosfera (Gregory, 1973). Ao anoitecer, quando a turbulência é reduzida, as partículas menores e mais leves, incluindo os urediniósporos de *P. psidii*, são lentamente levados a camadas mais próximas do solo, o que favorece a deposição dos esporos na superfície do hospedeiro, bem como a captura destes pela armadilha. Os esporos dos fungos liberados à noite, como basidiósporos de *Cronartium ribicola* Fich, são menores que os daqueles liberados durante o dia, e os menores tendem a depositar mais lentamente, em vista da baixa velocidade dos ventos noturnos (Van Arsdel, 1967). Essa hipótese é válida para partículas sólidas em suspensão no ar (Arya, 1988) e pode explicar a disseminação de urediniósporos de *P. psidii*, os quais são tão leves e diminutos como partículas de poeira e esporos de *C. ribicola*. A deposição de inóculo durante o período noturno é de suma importância para manter a viabilidade de urediniósporos de *P. psidii*, que é reduzida pela exposição à luz, e favorecer a germinação e penetração, pois *P. psidii* requer água livre na superfície do hospedeiro e temperatura por volta de 20 °C durante um período mínimo de escuro (Ruiz *et al.*, 1989b). Neste trabalho, essas condições ocorreram à noite e coincidiram com maiores concentrações de urediniósporos em suspensão no ar. Fato similar foi relatado para esporos da ferrugem do pinus, causada por *C. ribicola*, que são liberados do hospedeiro alternativo *Ribes* sp. durante o período úmido noturno (Van Arsdel, 1967). Se essa última possibilidade for real, deve-se considerar que a liberação de urediniósporos de *P. psidii* seja do tipo passiva, em que a liberação ocorre durante o dia, entre 10 e 14 h, com molhamento foliar e umidade relativa baixa e

temperatura, intensidade luminosa e velocidade do vento altas. Todavia, necessita-se de trabalhos adicionais, sob condições de ambiente controlado, para elucidar o papel do vento e da umidade relativa na liberação de urediniósporos de *P. psidii*.

A presença de poucos esporos na armadilha, no período de dezembro a junho, pode estar relacionada à maior precipitação pluviométrica, o que remove os esporos em suspensão no ar (Rich; Waggoner, 1962; Pady *et al.*, 1965; Fulton, 1966b) e, ou, lava-os das pústulas e deposita-os no solo, o que impossibilita a ascensão deles na atmosfera. Períodos com três dias de precipitação acarretaram queda na detecção de urediniósporos de *P. psidii*, o que pode estar relacionada à redução do fluxo aéreo de esporos (Blum; Dianese, 2001). Sob condições de vento forte ou chuva contínua, a concentração de conídios de *Passalora personata* (Berk. & Curtis) Khan & Kamal reduziu exponencialmente ao longo do tempo, enquanto sob ventos mais fracos e curtos períodos de chuva houve aumento na concentração de conídios em suspensão no ar (Wadia *et al.*, 1998). Além da precipitação, no período de dezembro a junho, por vários dias consecutivos, a temperatura média superou os 23 °C e a intensidade luminosa foi cinco vezes superior à do período de julho-novembro, o que reduz, respectivamente, a produção (Ruiz *et al.*, 1989a) e a viabilidade dos urediniósporos (Ruiz *et al.*, 1989), diminuindo o número de sítios de infecção e, conseqüentemente, a concentração de urediniósporos suspensos no ar.

A correlação positiva entre o número de esporos e a incidência de doença 12 dias após é importante para definir sistemas de manejo integrado de doença, uma vez que tal período corresponde ao período latente médio da ferrugem do eucalipto (Ruiz *et al.*, 1989b). Contudo, em um mesmo mês, ao longo do período experimental não houve correlação entre concentração total de urediniósporos no ar e intensidade média de doença, o que permite aventar outras hipóteses sobre a disseminação da doença, como a dispersão de inóculo via insetos, contato entre plantas, o homem durante os tratamentos culturais e mesmo respingo de água de chuva. Porém, a existência de esporos em suspensão no ar, durante todo o ano, não é suficiente para desencadear epidemias. Ademais, as armadilhas medem, usualmente, a dose relativa de esporos no lugar da dose efetiva, a qual é uma estimativa da proporção de esporos com potencial de germinação e infecção (Hirst; Stedman, 1962). Assim, a ocorrência de fatores microclimáticos favoráveis é fundamental ao estabelecimento e desenvolvimento do patógeno nos tecidos do hospedeiro, o que foi confirmado neste trabalho pela inexistência de correlação entre a intensidade de doença e as variáveis microclimáticas, principalmente

temperatura máxima, umidade relativa do ar e horas com molhamento foliar. Essas condições ao longo do ano foram, em média, 20 °C, 84% e 11 h, respectivamente, consideradas ótimas para o desenvolvimento da doença em *E. cloeziana* (Ruiz *et al.*, 1989b; Carvalho *et al.*, 1994) e *S. jambos* (Tessmann *et al.*, 2001). Isso fez que a média da incidência da doença se mantivesse em 75%, 81% e 74% em 2003, 2004 e 2005, respectivamente. Desse modo, a presença constante de inóculo do fungo e as condições micrometeorológicas favoráveis à doença são relevantes para a implantação de plantios comerciais de qualquer mirtácea suscetível, mormente *Eucalyptus* spp., *Psidium guajava* e *Melaleuca* spp.

Apesar da pequena variação da incidência da doença ao longo do período experimental, com a análise dos modelos obtidos pelas séries temporais determinou-se a existência de um efeito sazonal anual, distinto da sazonalidade trimestral obtida em estudos do progresso da ferrugem realizados no Estado da Bahia (Ruiz *et al.*, 1989c), em decorrência da própria diferença na sazonalidade microclimática das distintas regiões estudadas. Assim, comprova-se que na região de Viçosa, MG, a incidência de ferrugem segue um padrão constante durante o ano, não havendo variações mesmo entre as estações climáticas, e sim há diferenças na intensidade de doença entre os anos, decorrentes das próprias variações climáticas. Analogamente, a relação entre a intensidade da ferrugem do trigo e a variação do fenômeno *El Niño*, importante gerador de variações climáticas, foi provavelmente indireta, com sazonalidade anual entre as oscilações das séries temporais dos dois fenômenos (Scherm; Yang, 1995), sendo a intensidade de doença significativamente menor durante os anos de *El Niño*. Pelo fato da sazonalidade, muitas vezes, se diz que a severidade da ferrugem do eucalipto foi mais ou menos intensa em um determinado ano.

Os modelos obtidos pelas séries temporais foram praticamente os mesmos, evidenciando-se que modelos desta natureza podem ser usados para realizar previsões até três meses depois da última observação. Ademais, de forma geral os valores previstos apresentam-se próximos aos verdadeiros valores observados, e nota-se também que os verdadeiros valores se encontram dentro do intervalo de confiança de 95%, em todas as observações dentro de cada conjunto de dados. Como era de se esperar, o Erro Quadrático Médio (EQM) aumentou em relação ao número de observações previstas, mas, de qualquer forma, é importante considerar que as previsões foram efetuadas com sucesso nos três conjuntos de defasagem de avaliações, o que indica que a previsão até três meses após a última observação é viável mediante a

utilização do modelo considerado. Embora uma relação entre causa e efeito não possa ser detectada, as análises das séries temporais proporcionaram uma distinta abordagem para trabalhos futuros envolvendo eventos estocásticos em patologia florestal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams GC, Gottwald TR, Leach CM (1986) Environmental-Factors Initiating Liberation of Conidia of Powdery Mildews. *Phytopathology* **76**, 1239-45.
- Alfenas AC, Zauza EAV (2007) *Doenças na cultura do eucalipto*. Viçosa, MG: SIF. 164 p.
- Alfenas AC, Zauza EAV, Mafia RG, Assis TF (2004) *Clonagem e doenças do eucalipto*. Viçosa: Editora UFV. 442 p.
- Alfenas AC, Zauza EAV, Wingfield MJ, Roux J, Glen M (2005) *Heteropyxis natalensis*, a new host of *Puccinia psidii* rust. *Australasian Plant Pathology* **34**, 285-286.
- Arya S (1988) *Introduction to Micrometeorology*. San Diego: Academic.
- Aylor DE (1990) The role of intermittent wind in the dispersal of fungal pathogens. *Ann. Rev. Phytopathol* **28**, 73-92.
- Blum LEB, Dianese JC (2001) Padrões de liberação de urediniosporos e desenvolvimento da ferrugem do jambeiro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* **36**, 845-50.
- Box GEP, Jenkins GM, Reinsel GC (1994) *Time Series Analysis: Forecasting and Control*. San Francisco, USA:: Holden-Day.
- Burnett HC, Schubert TS (1985) *Puccinia psidii* on allspice and related plants. In: ed^eds. Plant Pathology Circular. Division of Plant Industry, Florida Department of Agriculture and Consumer Services. Tallahasee.
- Byrne J, Hausbeck MK, Shaw B (2000) Factors affecting concentrations of airborne conidia of *Oidium* sp. among poinsettias in a greenhouse. *Plant Disease* **84**, 1089-95.
- Cammack RH (1955) Seasonal changes in three common constituents of the air spora of southern Nigeria. *Nature* **176**, 1270-2.
- Carvalho AO, Alfenas AC, Maffia LA, Carmo MGF (1994) Avaliação do progresso da ferrugem (*Puccinia psidii*) em brotações de *Eucalyptus cloeziana* no sudeste da Bahia de 1987 a 1989. *Revista Árvore* **18**, 265-74.

- Casa RT, Reis E, Zambolim L (2004) Dispersão Vertical e Horizontal de Conídios de *Stenocarpella macrospora* e *Stenocarpella maydis*. *Fitopatologia Brasileira* **29**, 141-7.
- Chee K (1976) South American leaf blight of *Hevea brasiliensis*: spore dispersal of *Microcyclus ulei*. *Ann. appl. Biology* **84**, 147-52.
- Coutinho TA, Wingfield MJ, Alfenas AC, Crous PW (1998) Eucalyptus Rust: A Disease with the Potential for Serious International Implications. *Plant Disease* **82**, 819-25.
- Ferreira F (1989) *Patologia Florestal: principais doenças florestais no Brasil*. Viçosa: SIF.
- Fulton JD (1966b) Microorganisms of the upper atmosphere. V. Relationship between frontal activity and the micropopulation at altitude. *Appl Microbiol* **14**, 245-50.
- Geagea L, Huber L, Sache I (1997) Removal of urediniospores of brown (*Puccinia recondita* f sp. *tritici*) and yellow (*P. striiformis*) rusts of wheat from infected leaves submitted to a mechanical stress. *European Journal of Plant Pathology* **103**, 785-93.
- Glen M, Alfenas AC, Zauza EAV, Wingfield MJ, Mohammed C (2007) *Puccinia psidii*: a threat to the Australian environment and economy - a review. *Australasian Plant Pathology* **36**, 1-16.
- Gottwald TR (1982) Spore Discharge by the Pecan Scab Pathogen, *Cladosporium caryigenum*. *Phytopathology* **72**, 1193-7.
- Gregory P (1973) *The Microbiology of the Atmosphere*. New York - Toronto: John Wiley & Sons.
- Grove G (1998) Meteorological factors affecting airborne conidia concentrations and the latent period of *Podosphaera clandestine* on sweet cherry. *Plant Disease* **82**, 741-6.
- Guo X, Fernando W (2005) Seasonal and diurnal patterns of spore dispersal by *Leptosphaeria molucans* from canola stubble in relation to environmental conditions. *Plant Disease* **89**, 97-104.
- Hirst J, Stedman O (1962) The epidemiology of scab (*Venturia inaequalis* (Cke.) Wint.) II. Observations on the liberation of ascospores. *Ann. appl. Biol* **50**, 525-50.
- Hirst JM (1961) The aerobiology of *Puccinia graminis* uredospores. *Trans. Br. mycol. Soc* **44**, 138-9.
- Joffily J (1944) Ferrugem do Eucalipto. *Bragantias* **4**, 475-87.

- Jones AM, Harrison RM (2004) The effects of meteorological factors on atmospheric bioaerosol concentrations--a review. *Sci Total Environ* **326**, 151-80.
- Langrell S, Tommerup IC, Zauza EAV, Alfenas AC (2003) PCR based detection of *Puccinia psidii* from contaminated Eucalyptus germoplasm-implications for global biosecurity and safeguarding commercial resources. In: ed^eds. *Proceedings of the Proceedings of the 8th International Congress of Plant Pathology*. Christchurch, New Zealand: 57.
- Laundon GF, Waterston JM (1965) *Puccinia psidii*. *CMI Descriptions of Plant Pathogenic Fungi and Bacteria*. In: ed^eds. Commonwealth Mycology Institute. Kew.
- Leach CM (1975) Influence of Relative Humidity and Red-Infrared Radiation on Violent Spore Release by *Drechslera-Turcica* and Other Fungi. *Phytopathology* **65**, 1303-12.
- Leach CM, Hildebrand PD, Sutton JC (1982) Sporangium discharge by *Peronospora destructor*: influence of humidity, infra-red radiation and vibration. *Phytopathology* **72**, 1053-6.
- Maclachlan JD (1934) A rust of pimento tree in Jamaica. *Phytopathology* **28**, 157-70.
- Morettin PA, Toloí CMC, 2004. *Análise de Series Temporais*. São Paulo, Brasil: Edgard Blucher.
- Pady S, Kramer CL, Pathak V, Morgan F, Bhatti M (1965) Periodicity in airborne cereal rust urediniospores. *Phytopathology* **55**, 132-4.
- Rich S, Waggoner E (1962) *Atmospheric concentration of Cladosporium spores*. In: Science. 962-5. (vol. 137.)
- Ruiz RAR, Alfenas AC, Ferreira FA (1989a) Influência da temperatura, tuz e origem do inóculo sobre a produção de uredosporos e teliosporos de *Puccinia Psidii*. *Fitopatologia Brasileira* **14**, 70-3.
- Ruiz RAR, Alfenas AC, Ferreira FA, Vale FXR (1989b) Influência da Temperatura, do Tempo de Molhamento Foliar, Fotoperíodo e da Intensidade de Luz sobre a Infecção de *Puccinia psidii* em Eucalipto. *Fitopatologia Florestal* **14**, 55-61.
- Ruiz RAR, Alfenas AC, Maffia LA, Barbosa MdM (1989c) Progresso da ferrugem do eucalipto, causada por *Puccinia psidii*, em condições de campo. *Fitopatologia Brasileira* **14**, 73-81.

- Scherm H, Yang XB (1995) Interannual variations in wheat rust development in China and United States in Relation to the El Niño/Southern oscillation. *Phytopathology* **85**, 970-6.
- Smith R (1966) The liberation of cereal stem rust uredospores under various environmental conditions in a wind tunnel. *Trans. Br. mycol. Soc* **49**, 33-41.
- Tessmann DJ, Dianese JC, Miranda AC, Castro LHR (2001) Epidemiology of a Neotropical rust (*Puccinia psidii*): periodical analysis of the temporal progress in a perennial host (*Syzygium jambos*). *Plant Pathology* **50**, 725-31.
- Uchida J, Zhong S, Killgore E (2006) First Report of a Rust Disease on Ohia Caused by *Puccinia psidii* in Hawaii. *Plant Disease* **90**, 524.
- Van Arsdel E (1967) The nocturnal diffusion and transport of spores. *Phytopathology* **57**, 1221-9.
- Wadia KDR, McCartney HA, Butler DR (1998) Dispersal of *Passalora personata* conidia from groundnut by wind and rain. *Mycological Research* **102**, 355-60.
- Workneh F, Rush CM (2002) Evaluation of relationships between weather patterns and prevalence of sorghum ergot in the Texas Panhandle. *Phytopathology* **92**, 659-66.
- Yang XB, Zeng SM (1992) Detecting patterns of wheat stripe rust pandemics in time and space. *Phytopathology* **82**, 571-6.

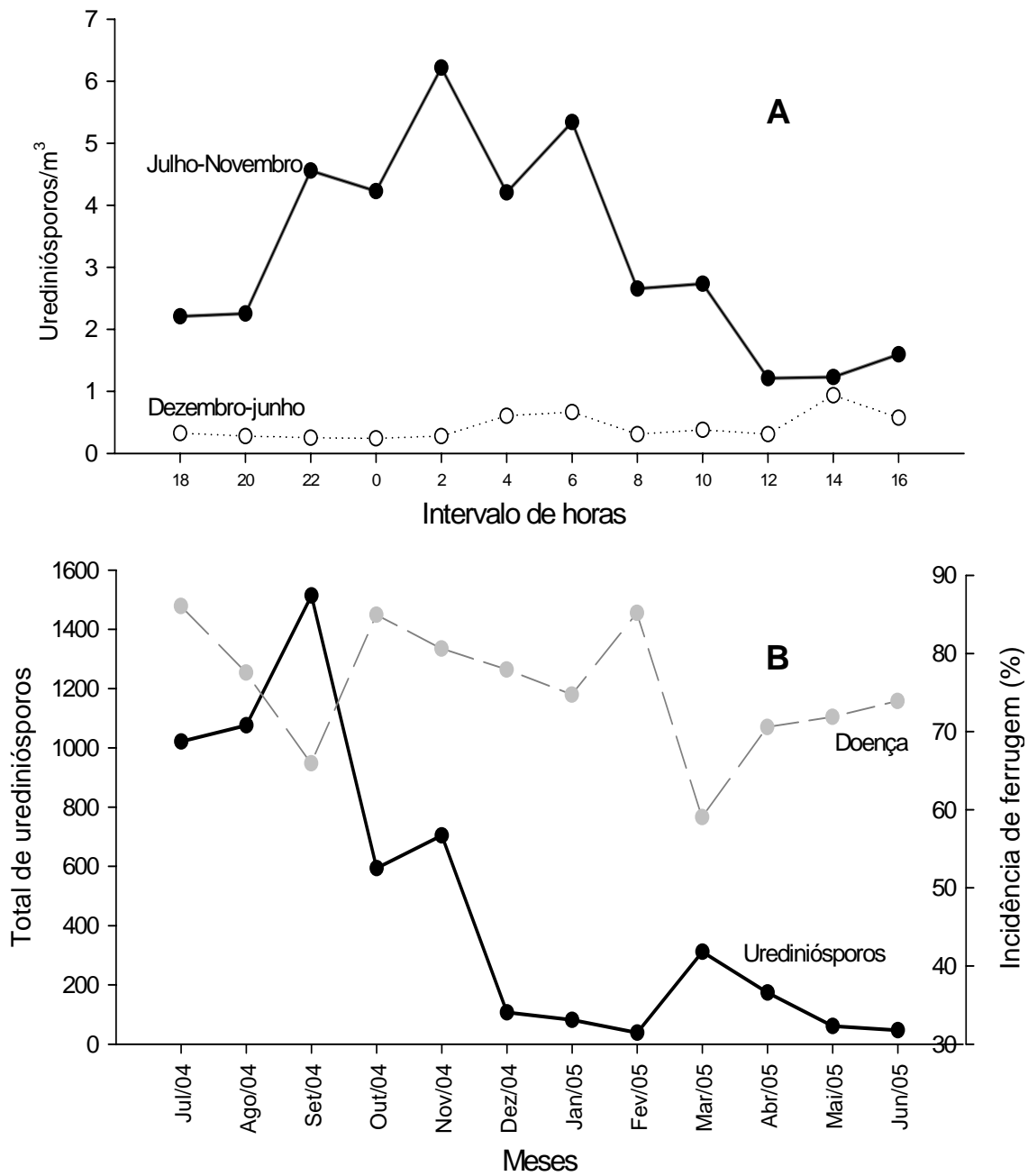


Figura 1 – A- Variação média na quantidade de urediniósporos coletados ao longo do dia de julho a novembro/2004 e de dezembro/2004 a junho/2005; e B- Flutuação do total de urediniósporos e incidência média da ferrugem do eucalipto durante o experimento (julho/2004 a junho/2005).

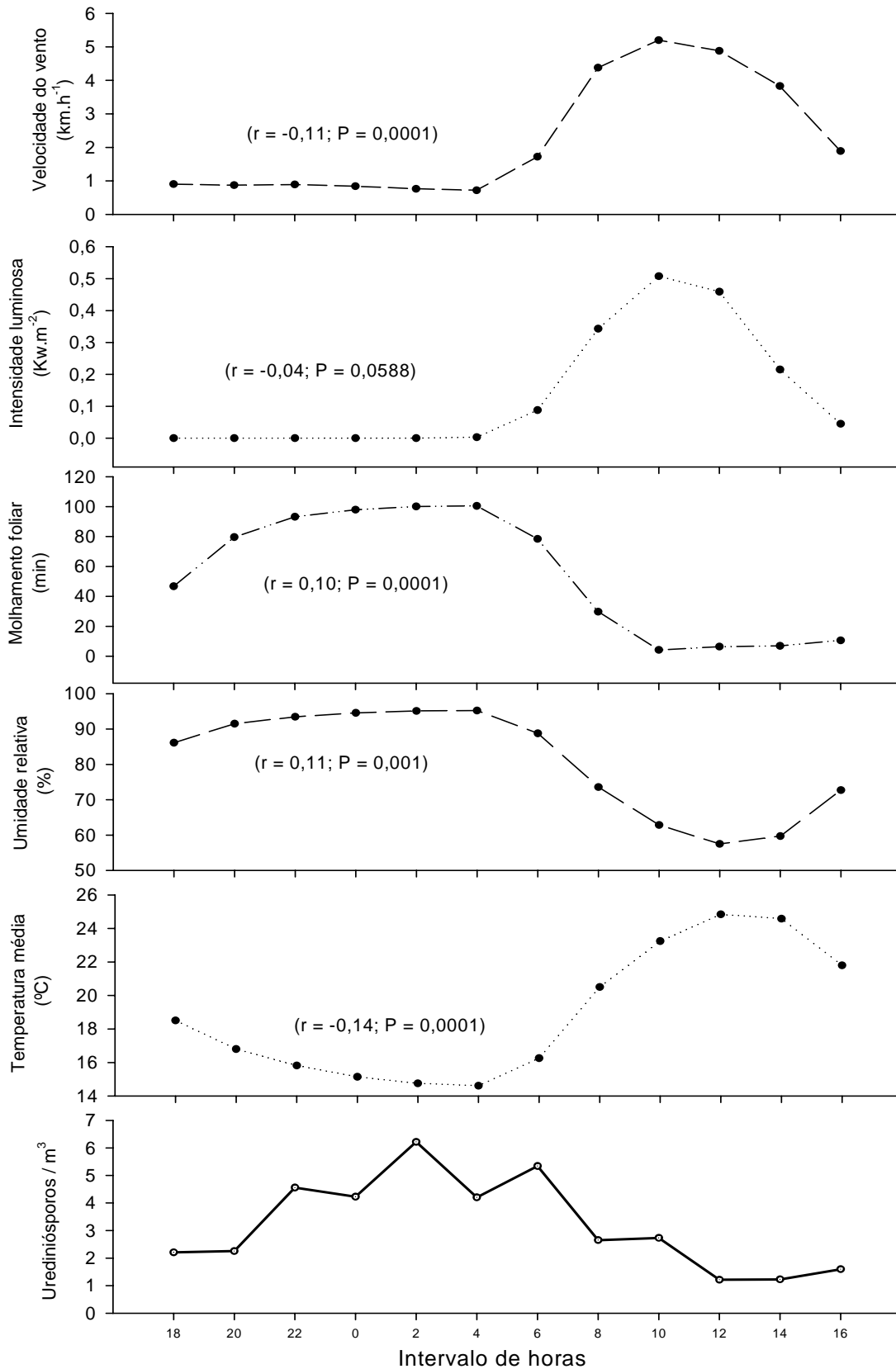


Figura 2 - Concentração de urediniósporos (ESP) e as variáveis meteorológicas de julho a novembro/2004; onde 'r' é o coeficiente de correlação de Spearman entre ESP e cada variável microclimática.

Tabela 1 - Análise de variância (teste não paramétrico de Friedman) para detectar a existência da sazonalidade anual ou semestral

FV	GL	SQ	QM	F	Pr>F
Mês	11	4496,4710	408,7700	3,23	0,0007
Ano	2	264,2234	132,1111	1,04	0,3552
Erro	112	14162,5289	126,4511		
Total	125	18923,2233			
Semestral					
Semestre	1	20,2836	20,2836	0,13	0,7162
Ano	2	156,5600	78,2800	0,51	0,6003
Erro	122	18633,2674	152,7317		
Total	125	18810,1111			

Tabela 2 - Valores para o Critério de Informação Bayesiano de Schwarz (BIC) considerando cada modelo avaliado, para os conjuntos 1 (sem as observações do último mês), 2 (sem as observações dos dois últimos meses) e 3 (sem as observações dos últimos três meses)

Conjunto	Modelo				
	Nível	AR(p)	MA(q)	ARMA(1,q)	ARMA(p,1)
1	1	929,31	985,48	933,88	933,88
	2	995,41	1019,96	933,09	933,97
	3	1020,23	1031,38	933,79	977,29
	4	1033,3	1041,04	933,79	967,98
2	1	913,1	955,9	917,34	917,34
	2	976,75	993,05	917,19	917,82
	3	1000,61	1002,74	917,61	954,94
	4	1012,42	1016,32	917,59	949,20
3	1	898,49	906,82	900,42	900,42
	2	946,67	946,96	901,72	901,58
	3	955,5	955,6	903,33	911,55
	4	957,47	957,58	903,15	911,4

Obs.: Quanto menor o valor do BIC, melhor é o modelo (pg. 201 Box, Jenkins e Reinsel, 1994).

Tabela 3 - Modelo SARIMA(1,0,0)(1,1,0)₁₂ em termos do operador de defasagem (B) e das observações (Y_t)

Conjunto	Em termos de B	Em termos de Y_t
1	$(1-0,625B)(1+0,125B^{12})Y_t = e_t$	$Y_t = 76,38+0,62Y_{t-1}-0,12 Y_{t-12} + 0,07 Y_{t-13} + e_t$
2	$(1-0,633B)(1+0,121B^{12})Y_t = e_t$	$Y_t = 76,17+0,63Y_{t-1}-0,12 Y_{t-12} + 0,07 Y_{t-13} + e_t$
3	$(1-0,637B)(1+0,138B^{12})Y_t = e_t$	$Y_t = 75,95+0,63Y_{t-1}-0,13 Y_{t-12} + 0,08 Y_{t-13} + e_t$

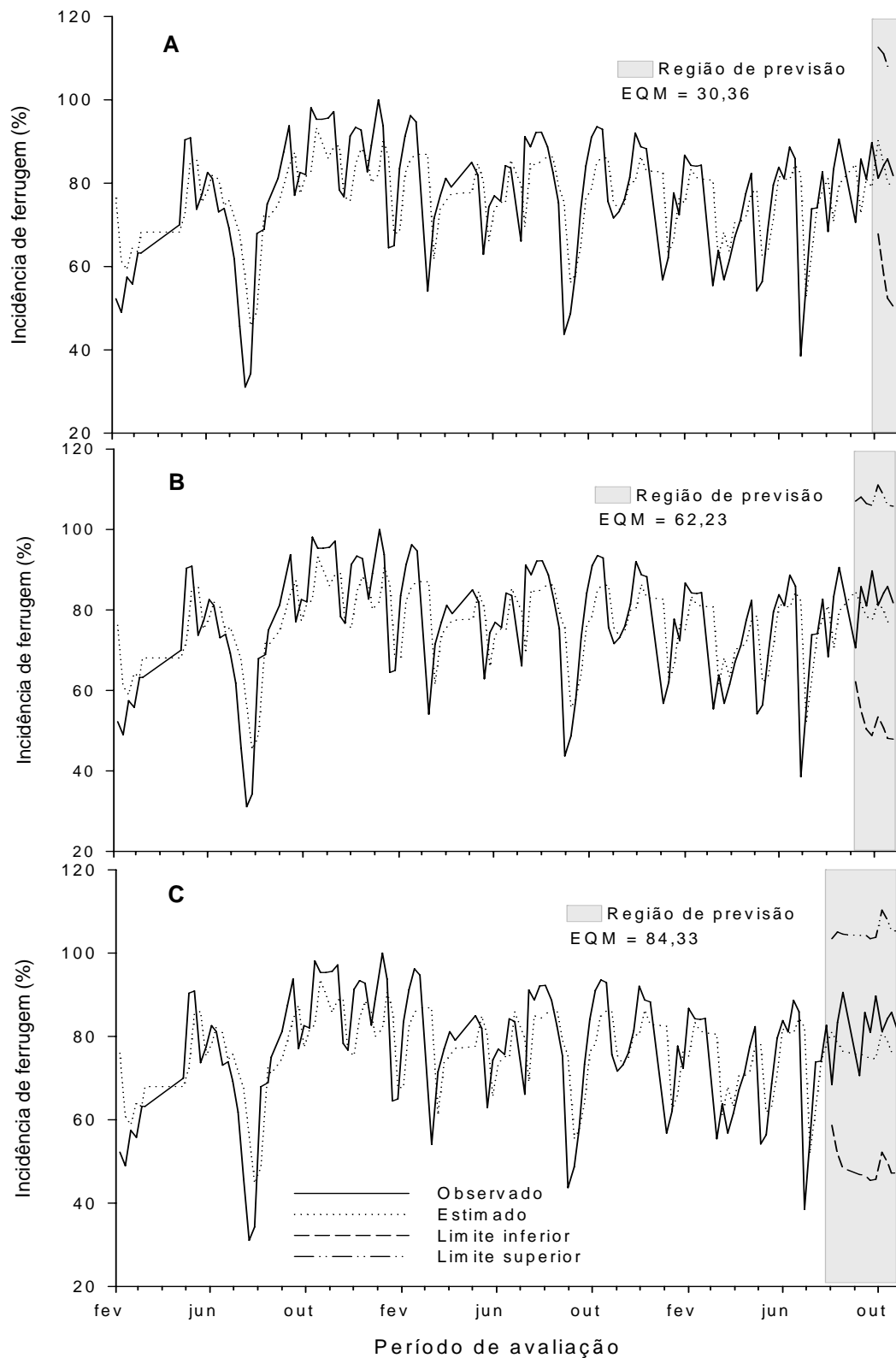


Figura 3 - Valores reais excluídos da análise, valores previstos, limites inferiores e superiores do intervalo de confiança a 95% para os conjuntos 1 (sem as observações do último mês) (A); 2 (sem as observações dos dois últimos meses) (B); e 3 (sem as observações dos últimos três meses) (C). EQM = erro quadrático médio.

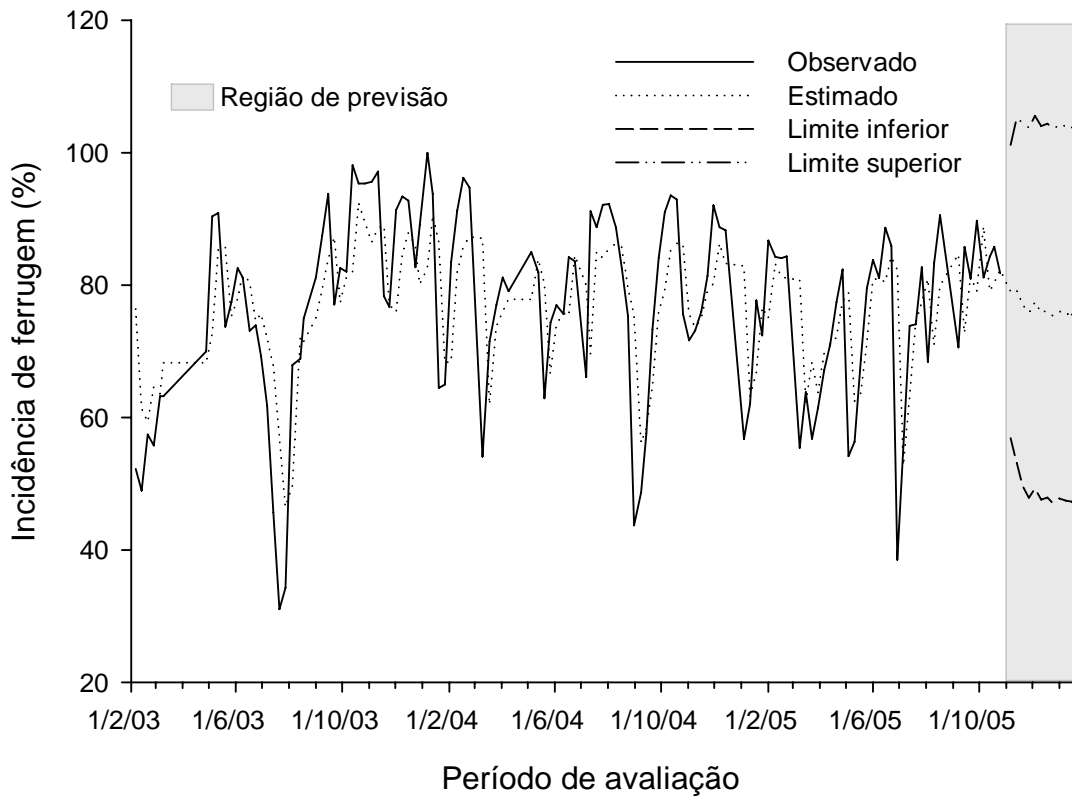


Figura 4 - Valores observados, estimados e preditos para três meses após a última observação.

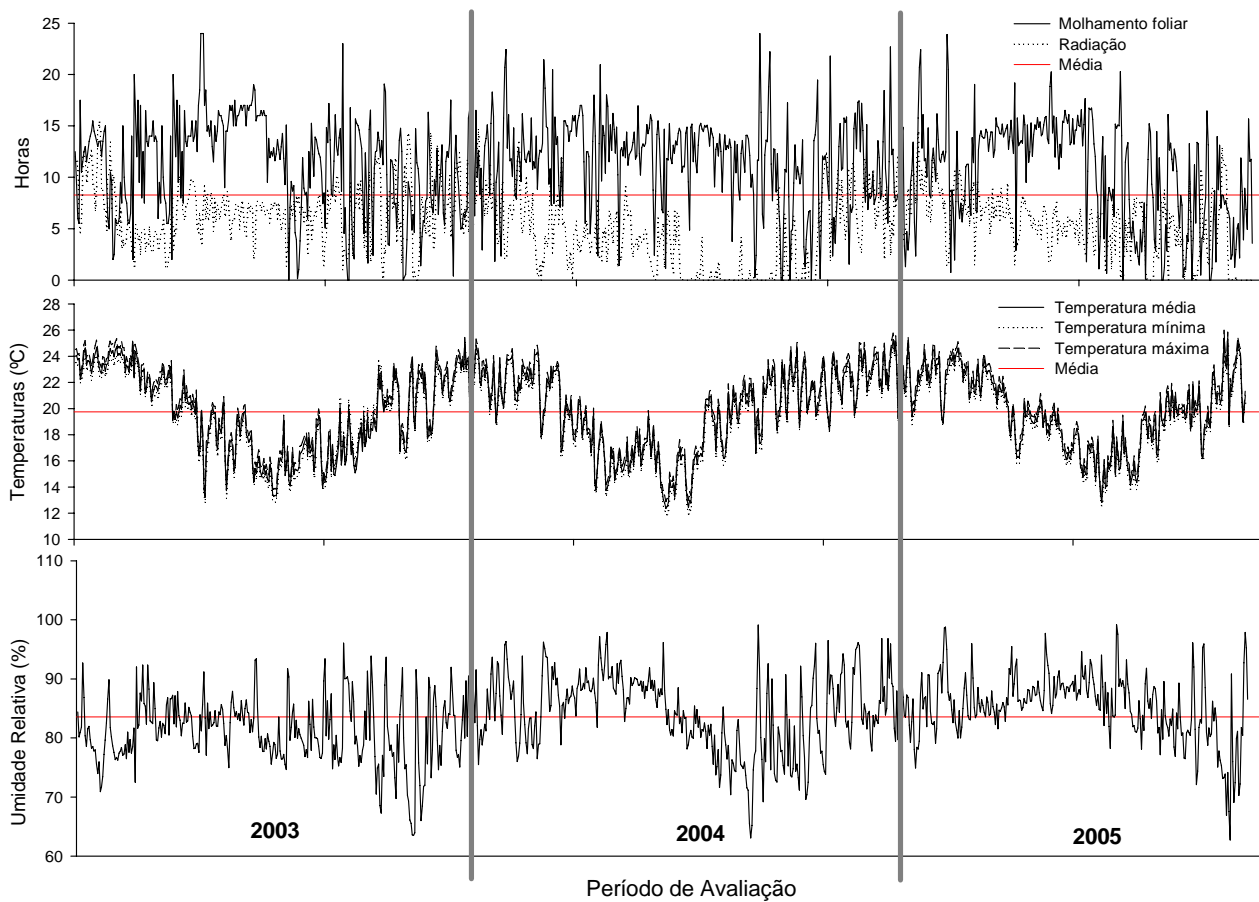


Figura 5 – Flutuação das variáveis, molhamento foliar, intensidade luminosa, temperatura e umidade relativa, ao longo do período experimental.

Artigo 3 - Resistência de espécies de Myrtaceae à ferrugem causada por Puccinia psidii

*Edival A. V. Zauza^A, Acelino C. Alfenas^{AC}, Morag Glen^B, Michelle M.F. Couto^A,
Rodrigo N. Graça^A e Luiz Antônio Maffia^A*

^ADepartamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa,
Viçosa - MG, 36570-000, Brazil.

^BCSIRO Forestry and Forest Products, Wembley, WA, Australia

^CAutor para correspondência: A.C. Alfenas: aalfenas@ufv.br

RESUMO

A avaliação da resistência à ferrugem de diferentes espécies de mirtáceas possibilitou mapear áreas de risco à introdução e do estabelecimento da doença no continente australiano. Para tal, diferentes lotes de sementes oriundas da Austrália foram semeados em tubetes de 55 cc de capacidade, e após 90 dias as mudas foram inoculadas com uma suspensão de inóculo a 2×10^4 urediósporos/mL. Após a inoculação, as plantas foram incubadas em câmara de nevoeiro por 24 h no escuro e, em seguida, mantidas a 22 °C sob fotoperíodo de 12 h e a 40 μmol de fótons $\text{s}^{-1}.\text{m}^{-2}$. Aos 12 dias da inoculação, avaliou-se a intensidade da doença mediante o uso de uma escala de notas de severidade. As procedências oriundas de “Northern Territory” e “Queensland” na Austrália, Vietnam e Tailândia apresentaram menor frequência de plantas resistentes por lote de sementes. Independentemente da procedência, as espécies com maior frequência de indivíduos resistentes foram: *Corymbia. calophylla 'rosea'*, *Corymbia tessellaris*, *Melaleuca ericifolia*, *Eucalyptus tereticornis*, *E. resinifera*, *E. scias* spp. *scias*, *E. paniculata*, *E. pellita* e *C. intermediata*. As espécies com maior número de plantas suscetíveis foram: *M. nesophila*, *M. alternifolia*, *M. cajuputi* spp. *cajuputi*, *M. leucadendra*, *M. quinquenervia*, *E. cloeziana*, *E. diversicolor*, *E. regnans* e *E. grandis*.

ABSTRACT

Based on seeds from different species and provenances collected by CSIRO on trees belonging in eucalypt and melaleuca groups, were screening for resistance against rust, *Puccini psidii*, to mapped threaded areas capable to disease establish and development. Seedlings were inoculated with inoculum suspension at 2.0×10^4 urediospores/mL and incubated in a mist irrigation chamber on the dark for 24h. Subsequently, the plants were transferred to a growth chamber at 23 °C, 12h of photoperiod and 40 $\mu\text{mol de photons s}^{-1}.\text{m}^{-2}$ for 12 days, when the disease was evaluated by the use of a rate scale. Inter and intraspecific variability was observed among and within the myrtaceae species. Although susceptible plants were found in all Australia regions as well as in Thailand and Vietnam in the Northern Territory is concentrated the most susceptible species and may be the area more subtle for rust establishment in case of an accidental introduction of the pathogen. Independently on the provenance, most resistant species were: *C. calophylla* 'rosea', *C. tessellaris*, *M. ericifolia*, *E. tereticornis*, *E. resinifera*, *E. scias* spp. *scias*, *E. paniculata*, *E. pellita* and *C. intermediate*. In contrast, *M. nesophila*, *M. alternifolia*, *M. cajuputi* spp. *cajuputi*, *M. leucadendra*, *M. quinquenervia*, *E. cloeziana*, *E. diversicolor*, *E. regnans*, and *E. grandis* displayed the highest number of susceptible plants.

Additional keywords: Corymbia, Eucalyptus, Melaleuca, rust, screening

INTRODUÇÃO

A família Myrtaceae é composta de aproximadamente 155 gêneros e 3600 espécies. Dessas, 1.646 espécies incluídas em 70 gêneros são nativas ou endêmicas no continente australiano (ANBG, 2003). As espécies pertencem a dois grandes grupos economicamente importantes: 'eucalypt group' e melaleuca group' (Ladiges *et al.*, 2003). O grupo do eucalipto inclui sete gêneros, *Arilastrum* Pancher ex Baill., *Allosyncarpia* S.T. Blake, *Eucalyptopsis* C.T. White, *Stockwellia* Carr, Carr & Hyland, *Angophora* Cav., *Corymbia* Hill & Johnson e *Eucalyptus* L'Hér. *sensu strito*, respectivamente com cerca de 1, 1, 2, 1, 13, 113 e 850 espécies (Beadle, 1981; Ladiges *et al.*, 2003). O grupo da melaleuca inclui nove gêneros, *Beaufortia* R.Br. (22 espécies), *Callistemon* R.Br. (30), *Calothamnus* Labill. (38), *Conothamnus* Lindl. (3), *Eremaea*

Lindl. (15), *Lamarchea* Gaudich (2), *Phymatocarpus* F. Muell. (2), *Regelia* Schauer (5) e *Melaleuca* L. (250) (Ladiges *et al.*, 2003).

Várias doenças ocorrem em espécies de *Eucalyptus*, *Corymbia* (Keane *et al.*, 2000) e *Melaleuca*, na Austrália. No entanto, a ferrugem causada por *Puccinia psidii* Winter ainda não foi relatada e é considerada uma doença quarentenária de alto risco para o país, em virtude de sua ampla gama de hospedeiros, fácil disseminação via material propagativo infectado e, ou, em pólen contendo esporos do fungo (Langrell *et al.*, 2003), e por apresentar regiões com condições microclimáticas altamente favoráveis ao desenvolvimento da doença (Booth *et al.* 2004). Até o momento, a doença foi relatada em cerca de 15 gêneros e 30 espécies (Alfenas *et al.*, 2005; Burnett and Schubert 1985; Glen *et al.*, 2007; Laundon; Waerston, 1965, Ferreira, 1989). Neste trabalho, avaliaram-se a resistência de espécies de mirtáceas e as regiões com maiores riscos de estabelecimento da doença no continente australiano.

MATERIAL E MÉTODOS

Avaliou-se a resistência de 102 lotes de sementes de espécies de *Corymbia*, *Eucalyptus* e *Melaleuca*, provenientes de diferentes regiões da Austrália e ilhas vizinhas. As espécies foram selecionadas com base na sua ampla distribuição geográfica em áreas semelhantes àquelas de ocorrência da ferrugem no Brasil (Booth *et al.*, 2000). As sementes foram pré-geminadas em caixas do tipo Gerbox[®], contendo uma camada de papel-filtro esterilizado e umedecido com água destilada autoclavada. As plântulas emergentes foram transplantadas para tubetes de 50 cc de capacidade contendo substrato à base de composto de casca de pinus (MecPlant[®]) e vermiculita, na proporção de 1:1 (v/v), e a seguir mantidas em condições de viveiro, a 20-27 °C. As mudas foram irrigadas por aspersão de acordo com as exigências hídricas das plantas e adubadas semanalmente na dose de 57 g de Ouroverde[®]/10 L de água, sendo depositado 5 mL/tubete.

Atomizaram-se uma suspensão de inóculo a $2,0 \times 10^4$ urediniósporos do isolado UFV-02 de *P. psidii*/mL em mudas com 90 –120 dias de idade contendo, no mínimo, dois pares de folhas jovens. Após 24 h de incubação no escuro em câmara de nevoeiro, foram transferidas para câmara de crescimento a 22 ± 1 °C sob fotoperíodo de 12 h e 40 μmol de fótons $\text{s}^{-1}.\text{m}^{-2}$. Empregou-se o delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições, cada uma contendo de 5-20 plantas, dependendo da capacidade de

germinação e desenvolvimento da espécie. Aos 12 dias de incubação, avaliou-se o número de plantas resistentes (notas S0 e S1) e suscetíveis (notas S2 e S3), com base na escala de notas de Junghans *et al.* (2003a). Efetuou-se a análise de variância dos dados e as médias foram comparadas pelo teste de Scott Knott, por meio do Programa SAEG versão 8.0.

Para melhor visualizar a distribuição geográfica das espécies e procedências quanto à resistência, os dados de frequência de plantas resistentes foram agrupados em quatro classes, sendo a classe 1 $\leq 10\%$ materiais resistentes, a classe 2 > 10 e $< 50\%$, a classe 3 ≥ 50 e $< 90\%$, e a classe 4 $\geq 90\%$ plantas resistentes e plotados no mapa australiano via Programa MapInfo v.6.5.

RESULTADOS

Verificaram-se diferenças quanto ao número de espécies e procedências resistentes entre os locais de coleta das sementes, independentemente do número de lotes avaliados em cada região. As procedências de “Western Austrália”, “New South Wales”, “Tasmânia” e “Queensland” apresentaram maior porcentagem de plantas resistentes à ferrugem, respectivamente com 80,4; 74,65; 74,06; e 73,34, enquanto as regiões de “Northern Territory”, Vietnam e Tailândia com menor porcentagem de plantas resistentes, 24,75; 15,75; e 10,75, respectivamente (Figura 1). Há, contudo, diferença significativa ($P < 0,05$) entre lotes de uma mesma região (Tabela 1).

Todas as regiões possuem lotes nas classes 1 ou 2 e, portanto, apresentam potencial risco de estabelecimento da doença, na presença de inóculo e de condições favoráveis à infecção. Analisando isoladamente cada espécie (Tabela 2), independentemente da procedência, verificou-se que aquelas altamente resistentes foram: *C. calophylla* 'rosea', *C. tessellaris*, *M. ericifolia*, *E. tereticornis*, *E. resinifera*, *E. scias* spp. *scias*, *E. paniculata*, *E. pellita* e *C. intermediata*; e as mais suscetíveis: *M. nesophila*, *M. alternifolia*, *M. cajuput* spp. *cajuputi*, *M. leucadendra*, *M. quinquenervia*, *E. cloeziana*, *E. diversicolor*, *E. regnans* e *E. grandis*.

DISCUSSÃO

Analogamente, aos resultados deste trabalho, outros autores (Dianese *et al.*, 1984, 1986; Carvalho *et al.*, 1998; Ferreira, 1983) detectaram variabilidade inter e intra-específica quanto à resistência à ferrugem. Neste estudo, foram incluídas várias outras

espécies, além daquelas pertencentes ao gênero *Eucalyptus* oriundas de diferentes regiões australianas e do Sudeste Asiático, o que permitiu identificar áreas com maior potencial de estabelecimento da ferrugem em caso de uma introdução acidental do patógeno.

Baseado em um programa de mapeamento climático e em informações sobre condições favoráveis à infecção de *Puccinia psidii* (Booth *et al.*, 2000), concluiu-se que as regiões australianas de “Northern Territory”, “New South Wales” e “Queensland” são as de maior potencial para o estabelecimento da doença. Dentre essas, na de Northern Territory são encontradas espécies/procedências altamente suscetíveis ao patógeno. Nas regiões de “New South Wales” e “Queensland”, concentra-se a maior diversidade de espécies da flora australianas, podendo ali existir outras procedências suscetíveis não contempladas neste estudo. Contudo, num programa de melhoramento genético para resistência à ferrugem as regiões de “Western Austrália”, “New South Wales”, “Queensland” e Papúa Nova Guiné apresentam maior potencial para obtenção de fontes de resistência à ferrugem, em que, por coincidência, se origina a maioria das espécies de eucalipto comercialmente plantadas no mundo.

A existência de raças fisiológicas, ou biotipos, na população de fitopatógenos pode alterar a natureza dos resultados, de maneira que materiais resistentes a dado isolado seja, na verdade, suscetível quando se amplia o número de isolados utilizados na inoculação para seleção de genótipos, podendo até mesmo não encontrar níveis satisfatórios de resistência na espécie vegetal estudada (Norman *et al.*, 2003; Kraft *et al.*, 1998). Apesar das evidências da existência de pelo menos três (Coelho *et al.*, 2001; Xavier, 2002) ou quatro (Aparecido *et al.*, 2003) grupos de variabilidade fisiológica entre isolados de *P. psidii* no Brasil, trabalhou-se neste estudo com o patótipo UFV-2, por se tratar de um isolado capaz de infectar uma variada gama de hospedeiros, ou seja, de menor especificidade (Xavier, 2002). Estudos de diversidade genética na população de *P. psidii* estão sendo conduzidos, a fim de complementar as informações sobre a existência de raças do fungo no Brasil, de modo a embasar a seleção de genótipos resistentes.

A introgressão de genes de resistência a doenças é fundamental em um programa de melhoramento genético, a fim de obter material resistente. Em eucalipto, em que a hibridação e a propagação clonal são relativamente fáceis, cruzamentos visando resistência a doenças são viáveis e adotados no controle da ferrugem – *P. psidii*. Junghans *et al.* (2003b) identificaram e mapearam o primeiro gene de resistência *Ppr1*

em *Eucalyptus grandis*. Este estudo contribuiu, também, para a identificação de novas fontes de resistência à ferrugem para serem utilizadas em programas de melhoramento genético e, ou, em novos estudos de mapeamento.

AGRADECIMENTO

Os autores agradecem o CSIRO pelo fornecimento das sementes, a EMBRAPA-Cenargem pela atenção e dedicação durante o processo de introdução das sementes no Brasil e, o Departamento de Engenharia Florestal pelo apoio logístico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alfenas, AC., Zauza, EAV., Wingfield, MJ., Glen, M. (2005). *Heteropyxis natalensis*, a new host of *Puccinia psidii* rust. *Australasian Plant Pathology* **34**, 285-286.
- Alfenas, AC, Zauza, EAV, Mafia, RG, Assis, TF (2004) *Clonagem e Doenças do Eucalipto*. Editora UFV, Viçosa, 442p.
- ANBG. Australian National Botanic Gardens 2003 – Australian Flora and Vegetation Statistics. www.anbg.gov.au/anbg/australian-flora-statistics.html. Accessed in: January 2004.
- Aparecido, CC, Figueiredo, MB, Furtado, EL (2003) Grupos de variabilidade fisiológica em populações de *Puccinia psidii*. *Summa Phytopathologica* **29**, 234-238.
- Beadle, NCW (1981) *The Vegetation of Australia*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Booth, TH, Old, KM, Jovanovic, T (2000) A preliminary assessment of high risk areas for *Puccinia psidii* (Eucalyptus rust) in the Neotropics and Australia. *Agriculture, Ecosystems and Environment* **82**, 295-301.
- Burnett, HC, Schubert, TS (1985) *Puccinia psidii* on allspice and related plants. *Plant Pathology Circular No. 271*. Division of Plant Industry, Florida Department of Agriculture and Consumer Services, Tallahassee.
- Carvalho, AO, Alfenas, AC, Maffia, LA, Carmo, MGF (1998) Resistência de espécies, progênies e procedências de *Eucalyptus* à ferrugem, causada por – *Puccinia psidii* Winter. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* **33**, 139-147.
- Coelho, L, Alfenas, AC, Ferreira, FA (2001) Variabilidade fisiológica de *Puccinia psidii* – ferrugem do eucalipto. *Summa Phytopathologica* **27**, 295-300.

- Dianese, JC, Haridasan, M, Moraes, TSA (1986) Screening *Eucalyptus* species for rust resistance in Bahia, Brazil. *Tropical Pest Management* **32**, 292-295.
- Dianese, JC, Moraes, TSA, Silva, AR (1984) Response of *Eucalyptus* species to field infection by *Puccinia psidii*. *Plant Disease* **68**, 314-316.
- Ferreira, FA (1983) Ferrugem do eucalipto. *Revista Árvore* **7**, 91-109.
- Ferreira, FA (1989) *Patologia Florestal: principais doenças florestais no Brasil*. Viçosa, MG, SIF. 570p.
- Glen M, Alfenas AC, Zauza EAV, Wingfield MJ, Mohammed C (2007). *Puccinia psidii*: a threat to the Australian environment and economy - a review. *Australasian Plant Pathology* **36**, 1-16.
- Junghans, DT, Alfenas, AC, Maffia, LA (2003a) Escala de notas para quantificação da ferrugem em *Eucalyptus*. *Fitopatologia Brasileira* **28**, 184-188.
- Junghans, DT, Alfenas, AC, Brommonschenkel, SH, Oda, S, Mello, EJ, Grattapaglia, D (2003b) Resistance to rust (*Puccinia psidii* Winter) in *Eucalyptus*: mode of inheritance and mapping of a major gene with RAPD markers. *Theor Appl Genet* **108**, 175-180.
- Keane, PJ, Kile, GA, Podger, FD, Brown, BN (2000) *Disease and pathogens of eucalypts*. Melbourne, CSIRO. 565p.
- Kraft, JM, Dunne, B, Goulden, D, Armsrtrong, S (1998) A search for resistance in Peas to *Mycosphaerella pinodes*. *Plant Disease* **82**, 251-253.
- Ladgies, PY, Udovicic, F, Nelson, G (2003) Australian biogeographic connections and the phylogeny of large genera in the plant family Myrtaceae. *Journal of Biogeography*, **30**. 989-998.
- Langrell, SRH, Tommerup, IC, Zauza, EAV, Alfenas, AC (2003) PCR based detection of *Puccinia psidii* from contaminated *Eucalyptus* germoplasm-implications for global biosecurity and safeguarding commercial resources. P. 57 in Proceedings of the 8th International Congress of Plant Pathology, Christchurch, New Zealand, February 2003. Vol. 2.
- Loundon, GF, Waterston, JM (1965) *Puccinia psidii*. CMI Descriptions of Plant Pathogenic Fungi and Bacteria No. 56, Commonwealth Mycology Institute, Kew.
- Norman, DJ, Henny, RJ, Yuen, JMF, Mellich, TA (2003) Screening for resistance to Myrothecium leaf spot among *Syngonium* species and cultivars. *Hort Science* **38**, 75-76.

- Ruiz, RAR, Alfenas, AC, Maffia, LA, Barbosa, MB (1989) Progresso da ferrugem do eucalipto, causada por *Puccinia psidii*, em condições de campo. *Revista Árvore* **14**, 73-81.
- Xavier, AA (2002) Histopatologia da interação *Puccinia psidii* e virulência de isolados do patógeno em espécies de Mirtaceae. Viçosa-MG, UFV. 71p. (Dissertação de Doutorado).

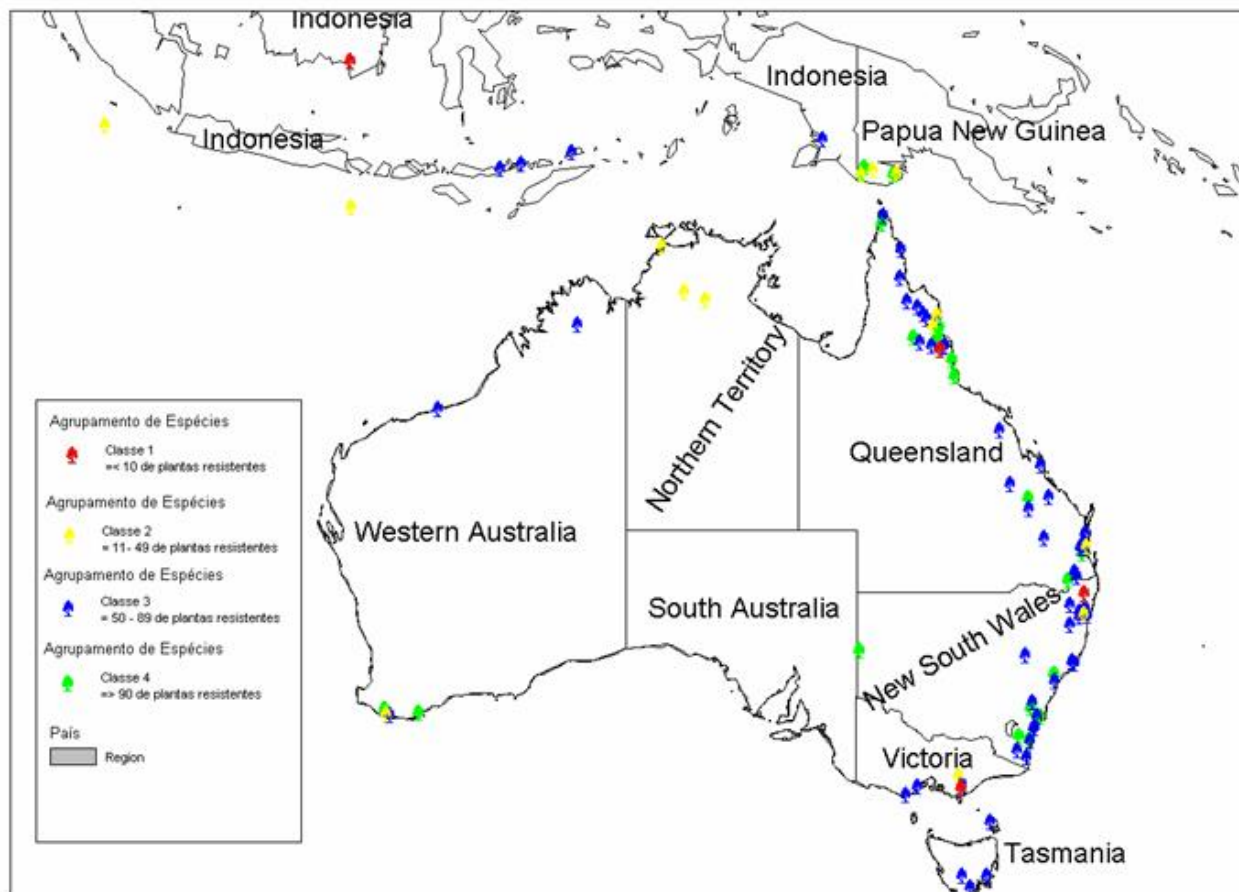


Figura 1. Variação quanto à resistência entre as regiões de coleta de sementes. Em vermelho está a classe 1 = $\leq 10\%$ de plantas resistentes, laranja a classe 2 = 11-49% de plantas resistentes, amarelo a classe 3 = 50-89% de plantas resistentes, e em verde a classe 4 = $\geq 90\%$ das plantas resistentes.

Tabela 1. Agrupamento das espécies e suas respectivas procedências em quatro classes de resistência. Classe 1 = < 10% de plantas resistentes, classe 2 = 11-49% de plantas resistentes, classe 3 = 50-89% de plantas resistentes, e classe 4 = > 90% das plantas resistentes. Médias seguidas pelas mesmas letras, na mesma coluna, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Scott Knott ($P < 0.05$)

Lote	Espécie	Estado ^z	Latitude			Longitude			Altitude (m)	Frequência de plantas resistentes (%)	Classe
			Deg	Min	Seg	Deg	Min	Seg			
19438	<i>Corymbia calophylla</i> 'rosea'	WA	34	41	00	116	28	00	160	100 a	4
18166	<i>Corymbia tessellaris</i>	QLD	24	30	00	150	00	00	350	100 a	4
15280	<i>Eucalyptus amplifolia</i> var. <i>amplifolia</i>	NSW	34	39	00	150	08	00	600	100 a	4
16119	<i>Eucalyptus brassiana</i>	PNG	08	49	00	141	20	00	20	100 a	4
16617	<i>Eucalyptus brassiana</i>	PNG	08	55	00	142	59	00	15	100 a	4
17683	<i>Eucalyptus diversicolor</i>	WA	34	52	00	118	15	00	60	100 a	4
18314	<i>Eucalyptus pellita</i>	QLD	17	50	00	146	03	00	50	100 a	4
13953	<i>Eucalyptus resinifera</i>	NSW	35	02	00	150	36	00	40	100 a	4
17763	<i>Eucalyptus tereticornis</i>	NSW	28	29	00	152	05	00	750	100 a	4
18811	<i>Melaleuca ericifolia</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	100 a	4
12966	<i>Eucalyptus alba</i>	QLD	16	58	00	145	15	00	450	90 b	4
13414	<i>Eucalyptus brassiana</i>	QLD	11	18	00	142	24	00	60	91.25 b	4
15195	<i>Eucalyptus camaldulensis</i> var. <i>obtusa</i>	NSW	31	53	00	141	13	00	210	91.25 b	4
13981	<i>Eucalyptus resinifera</i>	QLD	26	56	00	152	50	00	40	91.75 a	4
18750	<i>Eucalyptus pellita</i>	QLD	16	16	00	145	22	00	15	92 a	4
19101	<i>Eucalyptus paniculata</i>	NSW	36	10	00	150	06	00	124	93.25 a	4
17007	<i>Corymbia intermedia</i>	QLD	27	10	00	152	48	00	100	94.25 a	4
18164	<i>Eucalyptus nitens</i>	NSW	35	59	00	149	30	00	1100	95 a	4
18955	<i>Eucalyptus pellita</i>	PNG	08	33	00	141	26	00	45	95 a	4
14914	<i>Eucalyptus scias</i> ssp. <i>Scias</i>	NSW	32	58	00	151	21	00	250	95.5 a	4
18305	<i>Eucalyptus camaldulensis</i> var. <i>obtusa</i>	QLD	16	46	00	144	01	00	170	96.25 a	4
18148	<i>Eucalyptus pellita</i>	QLD	18	36	00	146	08	00	15	96.25 a	4
19095	<i>Eucalyptus tereticornis</i>	QLD	16	40	00	145	19	00	420	97.5 a	4

19300	<i>Eucalyptus paniculata</i>	NSW	35	35	00	150	15	00	120	89.5 b	3
17832	<i>Eucalyptus urophylla</i>	INDO	07	49	00	126	10	00	315	89.25 b	3
18658	<i>Eucalyptus camaldulensis var. obtusa</i>	WA	20	12	00	119	12	00	70	89 b	3
20116	<i>Eucalyptus grandis</i>	NSW	30	15	00	15	30	00	150	88 b	3
16551	<i>Eucalyptus camaldulensis var. simulata</i>	QLD	16	59	00	144	18	00	240	87.5 b	3
15876	<i>Corymbia intermedia</i>	QLD	17	10	00	145	37	00	750	85.75 b	3
15190	<i>Eucalyptus regnans</i>	TAS	42	42	00	147	49	00	370	85.5 b	3
20109	<i>Angophora costata</i>	NSW	34	21	00	150	13	00	700	85 b	3
18912	<i>Eucalyptus camaldulensis var. obtusa</i>	WA	16	08	00	126	30	00	430	85 b	3
15877	<i>Eucalyptus moluccana ssp. moluccana</i>	QLD	26	27	00	150	49	00	325	85 b	3
16926	<i>Eucalyptus melanophloia</i>	QLD	25	00	00	150	00	00	150	84.75 b	3
17899	<i>Eucalyptus brassiana</i>	QLD	13	53	00	143	16	00	550	83.5 b	3
18276	<i>Eucalyptus camaldulensis ssp. simulata</i>	QLD	15	39	00	144	31	00	100	83.5 b	3
19453	<i>Eucalyptus saligna</i>	NSW	30	37	00	152	10	00	975	83.5 b	3
13169	<i>Eucalyptus amplifolia var. amplifolia</i>	NSW	32	25	00	152	15	00	6	82.75 b	3
17998	<i>Eucalyptus guilfoylei</i>	WA	34	59	00	116	41	00	100	82 b	3
19010	<i>Eucalyptus camaldulensis ssp. simulata</i>	QLD	15	02	00	143	40	00	60	80.5 b	3
19422	<i>Corymbia maculata</i>	NSW	36	11	00	150	06	00	60	80 b	3
20017	<i>Corymbia citriodora</i>	QLD	24	26	00	151	03	00	800	79 c	3
17187	<i>Eucalyptus obliqua</i>	VIC	38	24	00	144	12	00	80	79 c	3
13402	<i>Eucalyptus brassiana</i>	QLD	15	45	00	145	14	00	140	77.75 c	3
20231	<i>Eucalyptus camaldulensis var. obtusa</i>	QLD	15	19	00	144	11	00	100	76.25 c	3
18723	<i>Eucalyptus globulus ssp. globulus</i>	TAS	43	15	00	146	59	00	110	75.25 c	3
15607	<i>Eucalyptus microcorys</i>	QLD	26	56	00	152	52	00	120	75 c	3
15933	<i>Eucalyptus robusta</i>	NSW	32	27	00	152	23	00	4	75 c	3
17898	<i>Eucalyptus brassiana</i>	QLD	12	30	00	143	22	00	40	74.25 c	3
15046	<i>Eucalyptus elata</i>	NSW	36	38	00	149	24	00	1100	74 c	3
19313	<i>Eucalyptus grandis</i>	NSW	32	20	18	152	15	11	20	73.75 c	3
15910	<i>Eucalyptus obliqua</i>	NSW	29	38	00	152	08	00	1000	73.75 c	3
15993	<i>Eucalyptus pilularis</i>	NSW	36	59	00	149	54	00	80	73.75 c	3
17515	<i>Eucalyptus acmenoides</i>	QLD	23	49	00	149	02	00	800	73 c	3
20397	<i>Corymbia maculata</i>	NSW	32	04	00	149	50	00	650	72.75 c	3
18786	<i>Eucalyptus camaldulensis var. obtusa</i>	QLD	17	11	00	144	55	00	470	72.75 c	3

17833	<i>Eucalyptus alba</i>	INDO	07	49	00	126	10	00	245	72 c	3
17865	<i>Eucalyptus dunnii</i>	QLD	28	04	00	152	22	00	650	72 c	3
15904	<i>Eucalyptus obliqua</i>	TAS	42	43	00	146	32	00	610	70 c	3
15142	<i>Eucalyptus pilularis</i>	NSW	33	19	00	151	21	00	180	70 c	3
19672	<i>Eucalyptus pellita</i>	QLD	17	13	00	145	33	00	0	68 d	3
20010	<i>Eucalyptus moluccana ssp. moluccana</i>	QLD	21	15	00	148	29	00	650	67.75 d	3
18731	<i>Eucalyptus amplifolia var. amplifolia</i>	NSW	30	00	00	152	38	00	400	67.5 d	3
18255	<i>Eucalyptus brassiana</i>	QLD	10	54	00	142	26	00	40	67 d	3
14531	<i>Eucalyptus urophylla</i>	INDO	08	38	00	122	27	00	515	67 d	3
19161	<i>Eucalyptus globulus ssp. globulus</i>	TAS	40	07	00	148	01	00	90	65.5 d	3
15940	<i>Eucalyptus robusta</i>	QLD	26	11	00	152	58	00	30	65.5 d	3
20014	<i>Corymbia citriodora</i>	QLD	15	53	00	144	42	00	700	65.25 d	3
16319	<i>Eucalyptus globulus ssp. globulus</i>	VIC	38	19	00	146	33	00	220	65 d	3
20042	<i>Corymbia gummifera</i>	NSW	35	01	00	150	28	00	100	63 d	3
19318	<i>Eucalyptus pilularis</i>	QLD	26	36	05	152	51	42	350	62.5 d	3
18881	<i>Eucalyptus globulus ssp. globulus</i>	VIC	38	48	00	143	37	00	150	62.5	3
18096	<i>Eucalyptus urophylla</i>	INDO	08	23	00	123	32	00	500	60.75 d	3
15528	<i>Eucalyptus pilularis</i>	NSW	30	10	00	153	03	00	160	60.5 d	3
18162	<i>Eucalyptus saligna</i>	QLD	26	52	00	152	42	00	400	60.5 d	3
18729	<i>Eucalyptus microcorys</i>	NSW	30	13	00	152	39	00	700	60 d	3
12972	<i>Eucalyptus robusta</i>	NSW	29	50	00	152	58	00	18	59.5 d	3
15945	<i>Eucalyptus robusta</i>	QLD	22	55	00	150	38	00	30	59 d	3
15219	<i>Eucalyptus grandis</i>	QLD	26	42	00	152	53	00	200	57.75 d	3
20011	<i>Eucalyptus saligna</i>	QLD	24	26	00	151	04	00	500	55.75 d	3
19492	<i>Eucalyptus deglupta</i>	PNG	07	11	00	139	14	00	700	51 e	3
19285	<i>Eucalyptus saligna</i>	NSW	35	35	00	150	19	00	90	50.75 e	3
17917	<i>Eucalyptus dunnii</i>	NSW	28	18	00	152	30	00	575	50 e	3
17683	<i>Eucalyptus diversicolor</i>	WA	34	53	00	116	31	00	100	45.75 e	2
18987	<i>Eucalyptus camaldulensis var. obtusa</i>	NT	14	33	00	132	04	00	95	45 e	2
18675	<i>Eucalyptus nitens</i>	VIC	37	54	00	146	20	00	950	45 e	2
17922	<i>Eucalyptus dunnii</i>	NSW	30	05	00	152	54	00	420	41.5 f	2
19157	<i>Eucalyptus cloeziana</i>	QLD	15	41	00	145	16	00	250	40.75 f	2
15565	<i>Melaleuca quinquenervia</i>	QLD	26	48	00	152	59	00	90	35.75 f	2

19225	<i>Melaleuca quinquenervia</i>	PNG	08	41	00	141	51	22	20	30 f	2
18958	<i>Melaleuca cajuputi ssp. platyphylla</i>	PNG	08	53	00	141	17	00	25	22 g	2
20178	<i>Melaleuca leucadendra</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	22 g	2
20179	<i>Melaleuca leucadendra</i>	NT	12	20	00	130	54	00	3	19.5 g	2
18138	<i>Eucalyptus grandis</i>	QLD	16	11	00	144	59	00	1100	19 g	2
19654	<i>Melaleuca cajuputi ssp. cajuputi</i>	VIET	10	30	00	114	42	00	2	15.75 g	2
18897	<i>Melaleuca cajuputi ssp. cajuputi</i>	THAI	14	56	00	133	08	00	100	12.5 h	2
18960	<i>Melaleuca leucadendra</i>	PNG	08	52	00	143	05	00	30	11 h	2
19874	<i>Melaleuca cajuputi ssp. cajuputi</i>	THAI	06	30	00	101	50	00	1	10.75 h	2
18139	<i>Eucalyptus grandis</i>	QLD	17	20	00	145	24	00	960	7.5 h	1
15275	<i>Eucalyptus regnans</i>	VIC	38	27	00	146	30	00	500	7 h	1
17747	<i>Melaleuca alternifolia</i>	NSW	29	05	00	152	58	00	50	5.25 h	1
19617	<i>Melaleuca cajuputi ssp. cajuputi</i>	INDO	03	25	00	114	42	00	5	5.25 h	1
8965	<i>Melaleuca nesophila</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	0 h	1

⁴INDO: Indonesia; NSW: New South Wales; NT: Northern Territory; PNG: Papua New Guinea; QLD: Queensland; SA: South Australia; TAS: Tasmania; THAI: Thailand; VIC: Victoria; VIET: Vietnam; WA: Western Australia

Tabela 2 – Agrupamento das espécies quanto à resistência, independentemente de suas procedências

Espécies	Resistência Média (%)	Classe
<i>Corymbia calophylla</i> 'rosea'	100,00	4
<i>Corymbia tessellaris</i>	100,00	4
<i>Melaleuca ericifolia</i>	100,00	4
<i>Eucalyptus tereticornis</i>	98,75	4
<i>Eucalyptus resinifera</i>	95,88	4
<i>Eucalyptus scias</i> ssp. <i>Scias</i>	95,50	4
<i>Eucalyptus paniculata</i>	91,38	4
<i>Eucalyptus pellita</i>	90,25	4
<i>Corymbia intermedia</i>	90,00	4
<i>Angophora costata</i>	85,00	3
<i>Eucalyptus brassiana</i>	84,82	3
<i>Eucalyptus camaldulensis</i> var. <i>simulata</i>	84,75	3
<i>Eucalyptus melanophloia</i>	84,75	3
<i>Eucalyptus amplifolia</i> var. <i>amplifolia</i>	82,75	3
<i>Eucalyptus guilfoylei</i>	82,00	3
<i>Eucalyptus alba</i>	72,00	3
<i>Eucalyptus camaldulenseis</i> var. <i>obtusa</i>	77,89	3
<i>Corymbia maculata</i>	76,38	3
<i>Eucalyptus moluccana</i> ssp. <i>moluccana</i>	76,38	3
<i>Eucalyptus elata</i>	74,00	3
<i>Eucalyptus acmenoides</i>	73,00	3
<i>Eucalyptus urophylla</i>	72,33	3
<i>Corymbia citriodora</i>	72,13	3
<i>Eucalyptus obliqua</i>	71,88	3
<i>Eucalyptus nitens</i>	70,00	3
<i>Eucalyptus microcorys</i>	67,50	3
<i>Eucalyptus globulus</i>	67,06	3
<i>Eucalyptus pilularis</i>	65,99	3
<i>Corymbia gummifera</i>	63,00	3
<i>Eucalyptus saligna</i>	62,63	3
<i>Eucalyptus robusta</i>	60,88	3
<i>Eucalyptus dunnii</i>	54,50	3
<i>Eucalyptus deglupta</i>	51,00	3
<i>Eucalyptus grandis</i>	49,20	2
<i>Eucalyptus regnans</i>	46,25	2
<i>Eucalyptus diversicolor</i>	45,75	2
<i>Eucalyptus cloeziana</i>	40,75	2
<i>Melaleuca quinquenervia</i>	32,88	2
<i>Melaleuca leucadendra</i>	17,50	2
<i>Melaleuca cajuputi</i> ssp. <i>cajuputi</i>	13,25	2
<i>Melaleuca alternifolia</i>	5,25	1
<i>Melaleuca nesophila</i>	0,00	1

Artigo 4 – Resistência de progênies oriundas da matriz G26 de *Eucalyptus grandis* à ferrugem - *Puccinia psidii*

Edival A. V. Zauza^A, Acelino C. Alfenas^{AC}, Lucio M. Guimarães^A e João F. Silva^B

^ADepartamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa,
Viçosa - MG, 36570-000, Brazil.

^BSuzano Papel e Celulose, Gerência de Tecnologia Florestal, Mucuri – BA

^CAutor para correspondência: A.C. Alfenas: aalfenas@ufv.br

RESUMO

Neste trabalho, estudaram-se os efeitos do “background” genético sobre a resistência à ferrugem (*Puccinia psidii*) em progênies derivadas da matriz G26 de *Eucalyptus grandis*, homozigota para resistência. Empregaram-se 170 plantas de cada uma das 22 progênies oriundas de cruzamentos controlados entre genitores-elite suscetíveis com a matriz G26. Mudas com 90 dias de idade foram inoculadas com uma suspensão de inóculo 2×10^4 urediniósporos/mL, e, após 20 dias da inoculação, determinou-se o número de plantas resistentes e suscetíveis à ferrugem. Os indivíduos suscetíveis das progênies foram genotipados por meio de marcadores microssatélites (SSR), para comprovar a fidelidade dos cruzamentos. Os resultados permitiram concluir que a existência de indivíduos suscetíveis, presumivelmente oriundos da matriz G26, é decorrente de falhas operacionais, provavelmente durante o beneficiamento das sementes e, ou, da produção de mudas.

INTRODUÇÃO

Os plantios de eucalipto ocupam cerca de 1,5% da área agrícola do Brasil (Brun; Pearson, 2007) e contribuem com 4% do PIB e 3% nas exportações de produtos florestais (Valverde et al., 2007). Os avanços em tecnologia e pesquisa nas áreas de silvicultura e melhoramento genético permitiram atingir produtividade de até 70 m³/ha.ano, média de 35 a 45 m³/ha.ano. Contudo, com a expansão da cultura para áreas mais quentes e úmidas, tem sido freqüente surtos de novas doenças (Alfenas; Zauza, 2007; Alfenas et al., 2004). Dentre essas, a ferrugem do eucalipto, causada pelo fungo *Puccinia psidii*, é uma das mais relevantes para a eucaliptocultura, em virtude do seu alto impacto nos plantios seminais e clonais.

A fim de reduzir as perdas causadas pela ferrugem, esforços têm sido empenhados visando à seleção de indivíduos resistentes e aos estudos do modelo de herança da resistência, buscando conhecer o número de genes que controlam este caráter e o seu efeito de dominância. Além disso, para estimar a eficiência com que este caráter pode ser transmitido e incorporado em programas de melhoramento foram conduzidos estudos do modelo de herança da resistência, determinando-se o número de genes que controlam esse caráter e seu efeito de dominância. Nesse sentido, Junghans et al. (2003a), ao estudarem o padrão da herança da resistência à ferrugem em progênies de irmãos-completos oriundas de cruzamentos entre genitores suscetíveis e resistentes de *E. grandis*, observaram que o padrão de segregação da resistência indicava um controle baseado em um gene dominante de efeito principal, denominado *Ppr1* (gene 1 de resistência a *P. psidii*), sendo esse o primeiro gene de resistência à doença descrito em *Eucalyptus* spp.

Variações na morfologia da pústula de plantas contendo *Ppr1*, assim como diferentes padrões de segregação dependendo dos genitores envolvidos no cruzamento, indicam que, além de *Ppr1*, outros genes determinam a eficiência da resposta de defesa (Junghans et al., 2003a). Nesse mesmo trabalho, os citados autores identificaram uma matriz de *E. grandis*, G26, homozigota dominante para resistência à ferrugem. Contudo, em determinadas famílias derivadas desse genitor, têm-se observado evidências de penetrância variável do gene de resistência, pois indivíduos suscetíveis foram identificados em condições de campo. Assim, neste trabalho, estudaram-se os efeitos do “background” genético em progênies derivadas da matriz G26, homozigota dominante para resistência à ferrugem.

MATERIAL E MÉTODOS

A matriz G26, homozigota dominante para resistência à ferrugem (Junghans, 2000), foi selecionada num teste de progênie com sementes oriundas das regiões de Atherton (Austrália) e Zimbábue (África do Sul), implantado em 1987 na região de Itapetininga, SP. Para análise do efeito do “background” genético, 22 progênies oriundas de cruzamentos controlados, efetuados pelo método de protogenia artificialmente induzida (PAI) (Assis et al., 2005), entre genitores-elite com essa matriz, 170 plantas, com 90 dias de idade, de cada cruzamento e mantidas em tubetes de 55 cm³ de capacidade, foram inoculadas por atomização com uma suspensão de inóculo a 2,0 x 10⁴ urediniósporos/mL do isolado UFV-02. A suspensão foi atomizada

homogeneamente nas superfícies abaxial e adaxial das folhas das mudas, com o auxílio de um pulverizador costal (Brudden[®]) de 5 L de capacidade, com bico do tipo leque com diâmetro de gotas de 158 μm , munido de uma válvula de pressão constante de 2 kgf/cm^2 na barra de pulverização. Após 24 h de incubação no escuro em câmara de nevoeiro, as plantas foram transferidas para câmara de crescimento a 22 ± 1 °C, sob fotoperíodo de 12 h e intensidade luminosa de $40 \mu\text{mol.s}^{-1}.\text{m}^{-2}$. Depois de 20 dias da inoculação, determinou-se o número de plantas resistentes e suscetíveis de acordo com a escala de notas de severidade da ferrugem proposta por Junghans et al. (2003b).

Genotipagem dos indivíduos das progênes

A fim de verificar o parentesco dos descendentes, estes e os seus respectivos genitores foram genotipados com um conjunto informativo de marcadores microssatélites. A análise de paternidade e maternidade consistiu em verificar o compartilhamento de pelo menos um alelo inicialmente entre o suposto genitor materno e o descendente e, em seguida, avaliar o compartilhamento do segundo alelo entre o descendente e o genitor paterno. Exclusões de maternidade e, ou, paternidade foram declaradas quando não se observou compartilhamento de alelos em pelo menos dois marcadores microssatélites, considerando-se, portanto, a possibilidade de ocorrência de mutação, o que resultaria em uma exclusão isolada.

Extração de DNA

Amostras de 50 mg de folhas de cada indivíduo foram submetidas à extração de DNA genômico total, conforme protocolo de Doyle e Doyle (1990), com as seguintes modificações: 2% PVP e 0,4% β -mercaptoetanol.

A concentração de DNA de cada amostra foi quantificada, utilizando-se um espectrofotômetro (SmartspecTM3000 - BioRad) com leitura da absorbância em 260 nm, sendo cada unidade de absorbância correspondente a 50 $\mu\text{g/mL}$ de DNA fita dupla (Sambrook et al., 1989).

Análise de microssatélite

Realizaram-se as reações de amplificação dos microssatélites em placas de PCR, sendo o volume total da reação de 25 μL , contendo: 2,5 μL de tampão 10X IB (Phoneutria), 1,2 μL dNTPs (2,5 mM de cada desoxirribonucleotídeo), 3,6 μL de cada

“primer” (forward e reverse) (10 uM), 0,25 unidades de Taq polimerase (Phonetría) e 40 ng de DNA molde.

As amplificações foram realizadas em termocicladores PTC – 100 TM (MJ. Research, INC.), de modo que cada ciclo apresentava as seguintes etapas: desnaturação a 94 °C durante 3 min, anelamento a 58 °C por 1 min e extensão a 72 °C por 1 min, repetido 30 vezes, e finalmente efetuada uma extensão a 72 °C por 7 min.

Foram testados até 15 marcadores microssatélites de eucalipto desenvolvidos por Brondani et al. (1998, 2006) (EMBRA-01, EMBRA-02, EMBRA-05, EMBRA-08, EMBRA-09, EMBRA-10, EMBRA-11, EMBRA-12, EMBRA-16, EMBRA-17, EMBRA-19, EMBRA-20, EMBRA-122, EMBRA-138 e EMBRA-227. Os “primers” foram sintetizados pela Invitrogen.

Deteção dos fragmentos amplificados

Os fragmentos amplificados foram separados em gel de poliacrilamida 10% (p/v), com acrilamida/bis-acrilamida na proporção de 29:1.

Utilizaram-se cubas verticais (BioRad – Protean N°II) com capacidade para 30 amostras em gel de 0,5 mm de espessura. Às amostras foram adicionados 5 uL de corante tipo IV (0,25% azul-de-bromofenol e 40% de sacarose). Aplicaram-se 10 uL de cada amostra em cada canaleta do gel, e, posteriormente, essas amostras foram submetidas a um campo elétrico com voltagem constante de 100 V. Após 5 h de corrida, os géis foram imersos em solução de brometo-de-etídio a 1 µg/mL por 30 min. Os géis foram fotodocumentados sob luz ultravioleta pelo sistema Eagle Eye II[®] (Stratagene).

Para determinar o tamanho dos fragmentos, utilizou-se o padrão de peso molecular de 10 pb DNA ladder (Invitrogen), contendo 33 fragmentos de DNA de fita dupla variando de 10 a 330 pb, em múltiplos de 10 pb.

Teste de proporções genéticas

Para testar a hipótese genética da segregação (resistente : suscetível), utilizou-se o teste qui-quadrado, por meio do Programa Computacional Genes (versão 2005.6.1).

RESULTADOS

Em 15 das 22 famílias avaliadas, não foi observado a segregação para resistência, sendo todos os indivíduos resistentes. Sete famílias apresentaram

segregação quanto à resistência à ferrugem, sendo observado elevado número de indivíduos suscetíveis (Tabela 1) em cinco famílias (1, 2, 3, 10 e 12).

A genotipagem dos indivíduos desses cruzamentos (Tabela 2 e Figura 1) mostrou que, dos 115 descendentes suscetíveis, apenas 14 não apresentaram alelos ausentes nos genitores, não podendo, portanto, ser considerados oriundos de contaminação. Outros 20 descendentes tiveram alelos ausentes nos genitores para um loco microssátelite, e os demais 81 descendentes foram classificados como contaminantes, por apresentarem alelos ausentes nos genitores para mais de dois locos analisados. Ademais, 57 indivíduos não apresentaram nenhum dos dois alelos do genitor materno G26, homocigoto para resistência à ferrugem, indicando uma provável mistura de sementes e, ou, mudas. Ao genotipar todos os descendentes da família 3, observou-se que 19% não eram filhos da matriz G26.

DISCUSSÃO

A existência de indivíduos suscetíveis, presumivelmente oriundos da matriz G26 de *E. grandis*, não tem origem de efeito do “background” genético, mas de falhas operacionais ocorridas, provavelmente, durante o processamento das sementes e, ou, de produção de mudas. Todavia, a fim de confirmar essas hipóteses é necessário repetir pelo menos três cruzamentos envolvendo a matriz G26, sob condições de controle total dos processos de hibridação, beneficiamento de sementes e produção de mudas. Esses cuidados são fundamentais em estudos de herança genética para qualquer caráter de interesse.

Os índices de contaminação intraprogênes por indivíduos paternos extra-cruzamento indicam um valor muito elevado para os padrões atuais da técnica de polinização controlada (PAI) adotada neste trabalho. A técnica de protogenia artificialmente induzida (PAI) (Assis et al., 2005) é prática, rápida e eficiente. O número de sementes obtidas por botão floral ou por operador/h é superior ao da técnica *One-Stop Pollination* (OSP) e apresenta um nível de contaminação menor que 10% (Assis et al., 2005), muito inferior à de outros métodos de polinização controlada, os quais podem atingir até 100% de contaminação, dependendo do método e da espécie a ser cruzada (Assis et al., 1997), como visto em pomares de produção de sementes de *E. grandis*, em que a taxa de fecundação cruzada, com pólen de origem externa ao pomar, foi estimada entre 30 e 40% (Chaix et al., 2003; Grattapaglia et al., 2004). Contudo, variações na

técnica de PAI, como a polinização em ambientes não protegidos, reduz em sua eficiência quanto à fidelidade dos cruzamentos propostos, sendo possível obter elevada taxa de indivíduos contaminantes, indesejáveis, sobretudo, em estudos de herança genética. Tais contaminações podem ocorrer nas etapas de coleta e beneficiamento do pólen - mistura de pólen – em decorrência da não proteção do botão floral após a polinização, o qual pode ser visitado por insetos polinizadores, mormente abelhas (*Apis mellifera*) e formigas, e durante o beneficiamento das sementes, as quais podem ser retidas na tela da peneira e se misturar-se a outro lote, em um beneficiamento posterior. Futuramente, dever-se-á determinar os níveis de contaminação, com e sem a proteção do botão floral.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alfenas, A.C, Zauza, E. A. V, Mafía, R. G, Assis, T. F. **Clonagem e Doenças do Eucalipto**. Editora UFV, Viçosa, 2004. 442p.
- Alfenas, A. C. & Zauza, E. A. V. **Doenças na cultura do eucalipto**. SIF – Viçosa, 2007. 164p.
- Assis, T., Jardim, N.S., Bauer, J.F.S. Métodos alternativos de cruzamentos controlados em *Eucalyptus*. In: Conferencia IUFRO sobre silvicultura e melhoramento de eucaliptos, Salvador-BA, 1997. **Proceedings...**Colombo, PR, EMBRAPA/CNPF, 1997. p. 265-269.
- Assis, T., Warburton, P., Harwood C. Artificially induced protogyny: an advance in the controlled pollination of *Eucalyptus*. **Australian Forestry** 68: 26-32, 2005.
- Brondani, R.P.V.; Brondani, C.; Tarchini, R. & Grattapaglia, D. Development, characterization and mapping of microsatellite markers in *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla*. **Theoretical and Applied Genetics** 97: 816-827, 1998.
- Brondani, R.P.V.; Williams, E.R; Brondani, C.; Grattapaglia, D. A microsatellite-based consensus linkage map for *Eucalyptus* species and a novel set of 230 microsatellite markers for te genus. **BMC Plant Biology**. (In press).
- Brun, L.R., & Pearson, L. Aspectos legais: biossegurança e propriedade intelectual. In: Borém, A. (ed.). **Biotecnologia Florestal** Viçosa. 2007. p. 347-362.
- Chaix, G., Gerber, S., Razafimaharo, V., et al., Gene flor estimation with microsatellites in a Malasy seed orchard of *Eucalyptus grandis*. **Theoretical and Applied Genetics** 107: 705-712, 2003.

- Doyle, J.J.; Doyle, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus** 12:13-15, 1990.
- Grattapaglia, D. Ribeiro, V.J. Rezende, G.D.S.P. Retrospective selection of elite parent trees using paternity testing with microsatellite markers: an alternative short term breeding tactic for Eucalyptus. **Theoretical and Applied Genetics**. 109: 192-199. 2004.
- Junghans, D.T., Alfenas, A.C., Brommonshenkel, S.H., Oda, S., Mello, E.J., Grattapaglia, D. Resistance to rust (*Puccinia psidii* Winter) in Eucalyptus: mode of inheritance and mapping of a major gene with RAPD markers. **Theoretical and Applied Genetics** 108: 175-180, 2003a.
- Junghans, D. T., Alfenas, A. C., Maffia, L. A. Escala de notas para quantificação da ferrugem em *Eucalyptus*. **Fitopatologia Brasileira** 28: 184-188, 2003b.
- Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T. **Molecular cloning and laboratory manual**. 2. Ed. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, v.3. 1989.
- Valverde, S.R., Neiva, S.A., Soares, N.S. Biotecnologia e competitividade das plantações florestais. In: Borém, A. (ed.). **Biotecnologia Florestal** Viçosa. 2007. p. 363-374.

Tabela 1 - Resistência à ferrugem do eucalipto em progênies oriundas da matriz G26 de *Eucalyptus grandis*, homocigota dominante para resistência à ferrugem

Cruzamentos	Severidade ^a (S0:S1:S2:S3)	R:S ^b	% de indivíduos suscetíveis
1-G26 x M04	132:14:10:20	146:30	17
2-G26 x M05	111:27:10:20	138:30	17,86
3-G26 x M06	134:11:11:20	145:31	21,38
4-G26 x M07	176:0:0:0	176:0	0
5-G26 x M16	176:0:0:0	176:0	0
6-G26 x G21	176:0:0:0	176:0	0
7-G26 x M28	176:0:0:0	176:0	0
8-G26 x M33	176:0:0:0	176:0	0
9-G26 x M43	176:0:0:0	176:0	0
10-G26 x M45	151:11:8:3	151:12	7,36
11-G26 x M16	176:0:0:0	176:0	0
12-G26 x M22	84:10:9:3	95:12	11,22
13-G26 x M25	176:0:0:0	176:0	0
14-G26 x G26	40:0:0:0	40:0	0
15-G26 x M28	176:0:0:0	176:0	0
16-G26 x M33	176:0:0:0	176:0	0
17-G26 x M35	88:0:0:0	88:0	0
18-G26 x M37	9:2:1:0	11:1	8,33
19-G26 x M43	176:0:0:0	176:0	0
20-G26 x M38	176:0:0:0	176:0	0
21-M38 x G26	167:4:3:2	171:5	2,84
22-M38ss x G26	176:0:0:0	176:0	0

^aResultado das avaliações dos ensaios aos 20 dias da inoculação.

^bIndivíduos S0 e S1 foram considerados resistentes, enquanto aqueles S2 e S3, suscetíveis.

Tabela 2 – Perfil genético multiloco do parental feminino (G26), do polinizador (M) e seus descendentes para 5 locos microssatélites

Cruzamento	Indivíduo	Embra 122	Embra227	Embra138	Embra02	Embra08
	G26	227/227 ^a	300/314	202/208	109/129	158/158
	M04	234/246	311/319	202/202	109/125	131/131
1-G26 X M04	1	227/246	311/323	N	?	?
	2	227/246	300/311	N	?	?
	3	227/234	300/318	N	?	?
	4	227/234	300/318	N	?	?
	5	227/246	311/323	N	?	?
	6	227/246	311/318	N	?	?
	7	227/246	300/318	N	?	?
	8	227/246	311/323	N	?	?
	9	227/246	311/323	N	?	?
	10	227/234	318/323	202/208	?	?
	11	227/246	300/311	202/208	?	?
	12	227/246	311/323	202/208	?	?
	13	227/246	311/323	189/202	?	?
	14	227/246	318/323	202/208	?	?
	15	227/246	311/323	202/208	?	?
	16	227/246	318/323	202/208	?	?
	17	227/246	F	202/208	?	?
	18	227/234	300/318	202/208	?	?
	19	227/234	300/300	202/208	?	?
	20	234/246	300/311	202/208	?	?
	21	?	311/323	189/202	?	?
	22	?	311/323	189/202	?	?
	23	227/246	318/323	189/202	?	?
	24	227/246	311/318	202/208	?	?
	25	227/246	300/318	202/208	?	?
	26	227/246	300/311	202/208	?	?

^a tamanho do fragmento amplificado em pb

? indeterminado (bandas muito próximas)

F falha

N não amostrado

Continua...

Tabela 2 Cont.

Cruzamento	Indivíduo	Embra 122	Embra227	Embra138	Embra02	Embra08
2-G26 x M05	G26	227/227	300/314	202/208	109/129	158/158
	M05	220/241	311/319	156/202	120/125	131/131
	1	227/246	300/318	202/208	109/125	131/158
	2	227/246	318/323	189/202	120/120	131/158
	3	227/246	318/323	189/202	105/129	131/158
	4	227/246	300/311	156/208	120/120	131/158
	5	227/246	300/311	189/202	109/120	131/158
	6	221/227	300/323	202/208	105/129	131/158
	7	227/246	311/318	156/208	105/129	131/158
	8	221/227	300/311	189/202	120/120	131/149
	9	221/234	300/323	189/202	F	131/149
	10	221/227	300/323	156/208	120/120	131/149
	11	227/246	311/323	202/208	120/120	131/158
	12	221/227	300/318	189/202	120/125	131/149
	13	221/227	300/323	202/208	120/120	131/158
	14	227/246	318/323	202/208	109/120	131/158
	15	?	311/318	189/202	109/125	131/158
16	221/227	300/311	156/208	109/120	131/149	
10-G26 x M45	G26	227/227	300/314	202/208	109/129	158/158
	M45	227/234	319/319	166/166	126/133	133/158
	1	227/227	300/318	F	138/120	133/143
	2	227/227	318/323	189/202	109/138	133/143
	3	227/227	318/323	202/208	129/129	133/143
	4	227/227	300/318	189/202	109/138	133/143
	5	227/227	318/323	189/202	138/120	133/143
	6	234/234	300/318	189/202	109/129	133/143
	7	227/227	300/318	166/208	109/129	133/143
	8	227/227	300/318	202/208	120/120	133/158
	9	227/227	300/318	202/208	109/138	158/158
	10	227/227	318/323	189/202	120/120	133/158
	11	227/227	318/323	202/208	109/129	158/158
12	227/227	300/318	202/208	109/129	158/158	

Continua...

Tabela 2 Cont.

Cruzamento	Indivíduo	Embri 122	Embri227	Embri138	Embri02	Embri08
3-G26 x M06	G26	227/227	300/314	202/208	109/129	158/158
	M06	221/221	300/314	185/185	129/133	135/148
	1	221/227	300/323	189/202	109/133	148/158
	2	221/234	300/311	166/208	109/120	148/158
	3	221/227	300/318	F	109/120	148/158
	4	221/227	311/318	166/208	109/120	148/158
	5	221/227	300/300	166/202	109/120	148/158
	6	221/227	300/323	166/202	109/109	148/158
	7	221/227	311/323	166/202	109/109	148/158
	8	221/227	300/300	166/202	109/133	148/158
	9	221/227	311/318	189/202/	109/120	158/168
	10	221/234	300/300	189/202	109/133	F
	11	221/227	300/300	189/202/	?109/109	158/168
	12	221/227	300/300	166/202	109/109	?/148
	13	221/227	300/300	166/202	109/123	148/158
	14	221/227	300/300	166/202	109/120	?/148
	15	221/227	300/300	166/202	109/120	148/158
	16	221/234	300/311	189/202/	109/120	148/158
	17	221/227	311/323	189/202	F	?/148
	18	221/227	300/300	189/202	F	?/148
	19	221/227	300/311	166/202	109/109	158/168
	20	221/227	300/318	189/202	109/109	148/158
	21	221/227	300/300	166/202	109/120	158/168
	22	221/227	300/311	166/208	109/120	158/168
	23	221/227	300/318	166/208	N	N
24	216/240	F	193/202	N	N	
25	221/227	300/318	189/202	N	N	
12-G26 X M22	G26	227/227	300/314	202/208	109/129	158/158
	M22	216/234	311/319	181/214	123/123	133/150
	1	216/227	311/320	F	109/125	150/158
	2	216/227	311/320	181/208	125/125	140/150
	3	216/227	311/320	156/208	125/125	150/158
	4	216/227	300/311	181/208	109/125	133/158
	5	227/234	300/318	181/202	109/125	150/158
	6	216/227	311/318	181/202	109/125	150/158
	7	216/227	311/320	181/208	125/125	140/150
	8	227/234	311/320	F	125/125	140/150
	9	227/234	320/320	189/202	109/125	140/150
	10	227/234	311/320	F	125/125	140/150
	11	216/227	311/320	181/202	125/125	140/150
12	216/227	311/320	189/202	N	N	

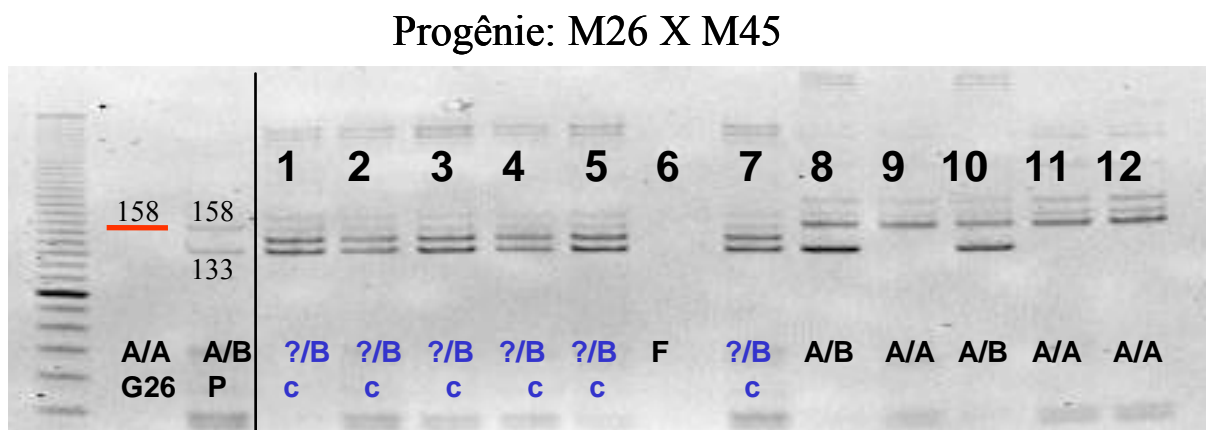
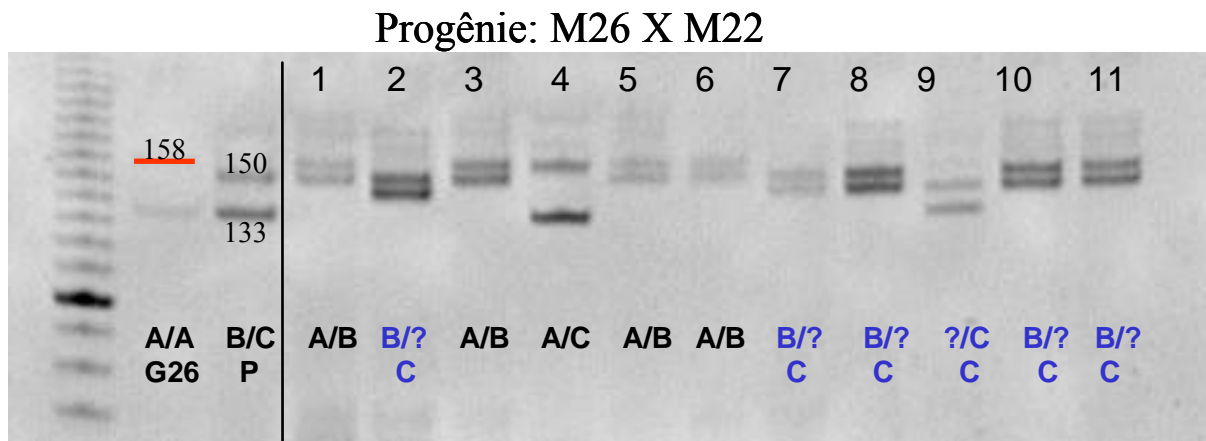


Figura 1 – Exemplo do perfil genético multiloco do parental feminino (G26), dos polinizadores (M22 e M45) e de seus descendentes para o loco microssatélite Embra-08, em que F = falha e C = contaminante. O gel foi de poliácridamida 10%, imerso em solução de brometo-de-etídio a 1 µg/mL, por 30 min, fotodocumentado, sob luz ultravioleta, pelo sistema Eagle Eye II[®] (Stratagene).

CONCLUSÕES GERAIS

Com este trabalho, geraram-se novas informações acerca das condições micrometeorológicas favoráveis ao progresso da ferrugem do eucalipto em diferentes alturas e da presença de urediniósporos em suspensão no ar, bem como do potencial de introgressão de novos genes de resistência à ferrugem do eucalipto. Assim, conclui-se que:

1. Houve tendência na redução da intensidade de doença, no número de horas de molhamento foliar e no número médio de urediniósporos em suspensão no ar em maiores alturas.
2. Em virtude da redução no número de urediniósporos em suspensão no ar e no número de horas de molhamento foliar em plantas acima de 3 m de altura, houve decréscimo na infecção por *P. psidii*.
3. Maior concentração de urediniósporos em suspensão no ar ocorreu no período de julho a novembro.
4. Maior concentração de urediniósporos em suspensão no ar foi registrada com a combinação de baixa temperatura, intensidade luminosa e alta umidade relativa do ar e molhamento foliar.
5. A ocorrência de precipitação pluvial, umidade relativa e molhamento foliar baixos, e temperaturas, intensidade luminosa e velocidade do vento altas durante o período diurno, por volta das 10 e 14 h, é um indicativo de que ocorrerá alta carga de urediniósporos em suspensão no ar durante o período noturno.
6. Na região de Viçosa, a presença constante de inóculo do fungo e as condições micrometeorológicas favoráveis à doença durante todo o ano são fatores

relevantes a serem considerados na implantação de plantios comerciais de qualquer espécie pertencente à família mirtaceae.

7. Na Austrália existem variadas fontes de resistência a *P. psidii* passíveis de serem utilizadas em programas de melhoramento genético e, ou, em novos estudos de herança da resistência.
8. Mesmo em lotes de espécies consideradas altamente suscetíveis, observaram-se plantas resistentes.
9. A existência de indivíduos suscetíveis, presumivelmente oriundos da matriz G26 de *E. grandis*, não é de origem genética, mas, provavelmente, de falhas operacionais, em geral durante o processamento das sementes e, ou, de produção de mudas.