

RODRIGO NEVES GRAÇA

**PENETRAÇÃO E CONDIÇÕES FAVORÁVEIS À INFECÇÃO
DE *Cylindrocladium pteridis* EM EUCALIPTO**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa, como
parte das exigências do programa de pós-
graduação em Fitopatologia, para
obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL

2007

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

G729p
2007

Graça, Rodrigo Neves, 1979-
Penetração e condições favoráveis à infecção de
Cylindrocladium pteridis em eucalipto / Rodrigo Neves
Graça. – Viçosa, MG, 2007.
x, 38f. : il. ; 29cm.

Orientador: Acelino Couto Alfenas.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Viçosa.
Referências bibliográficas: f. 36-38.

1. *Cylindrocladium pteridis*. 2. Mancha-de-folha.
3. Eucalipto - Doenças e pragas. I. Universidade Federal
de Viçosa. II. Título.

CDD 22 ed. 632.46

RODRIGO NEVES GRAÇA

**PENETRAÇÃO E CONDIÇÕES FAVORÁVEIS À INFECÇÃO DE
Cylindrocladium pteridis EM EUCALIPTO**

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

APROVADA: 28 de Fevereiro de 2007.

Prof. Luiz Antônio Maffia
(Co-Orientador)

Prof. Olinto Liparini Pereira

Prof. Francisco Alves Ferreira

Dr. Lúcio Mauro da Silva Guimarães

Prof. Acelino Couto Alfenas
(Orientador)

Agradeço a Deus.

Dedico

Aos meus pais pelo amor, pelo carinho e pelo incentivo durante todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e à minha irmã pelo amor, carinho e pela amizade.

À minha família, pelo constante apoio, incentivo e pela confiança.

Ao Prof. Acelino Couto Alfenas pela orientação, pelos ensinamentos, pelos aconselhamentos, pelo apoio, pela grande amizade e pelas inúmeras oportunidades desde minha graduação, me permitindo aprender no campo profissional e pessoal com ética e respeito pelo próximo.

À Universidade Federal de Viçosa, em especial aos professores do Departamento de Fitopatologia, pelos ensinamentos e pela oportunidade de realização do curso de Mestrado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão de bolsa de estudo.

Aos meus co-orientadores, Prof. Luiz Antônio Maffia e Dr. Douglas Lau, pelos aconselhamentos, colaborações, disponibilidade e amizade.

À Universidade Estadual Norte Fluminense, por disponibilizar equipamentos e laboratórios para execução de parte dos experimentos.

A Suzano Papel e Celulose S/A por disponibilizar o material vegetal utilizado nos experimentos e por permitir estudos em nível de campo.

Ao Prof. Silvaldo pelo apoio e disponibilidade.

Ao Dr. Juan Rocabado e Dr. Edgar Piccoli pela ajuda e colaboração nos trabalhos histopatológicos.

À Miranda Titon pela grande ajuda e incentivo durante a execução dos trabalhos.

À Patrícia pelo amor, pela compreensão e pelo carinho.

À Márcia pela grande amizade e plena disponibilidade em todos os momentos.

Às amigas Adelica e Sandra que muito me ensinaram e motivaram no início.

À todos os amigos do Laboratório de Patologia Florestal pela amizade e agradável convivência durante a realização do trabalho.

Aos amigos Edival, Rafael, Leonardo e Aderlan pela amizade e ajuda nos trabalhos.

Aos amigos da turma de mestrado pela agradável convivência e amizade.

Ao Sr. João e Sr. Mário pela grande ajuda e pronta disponibilidade.

Aos grandes amigos Maurício, Cleiton, Nilo e Paçoca pelos ótimos momentos.

A todos que esqueci de citar, mas que com certeza considero, muito obrigado.

BIOGRAFIA

RODRIGO NEVES GRAÇA, filho de Teodoro Alberto de Castro Graça e Laura Maria Neves Graça, nasceu em 18 de agosto de 1979, em Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

Em 1999, iniciou o curso de Agronomia na Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil. Sendo bolsista de iniciação científica no Laboratório de Patologia Florestal e Genética da Interação Planta Patógeno de janeiro do ano 2000 até sua graduação em 2004, sob orientação do Professor Acelino Couto Alfenas.

Em fevereiro de 2005, iniciou o curso de Mestrado em Fitopatologia, na Universidade Federal de Viçosa, sob a orientação do Professor Acelino Couto Alfenas.

SUMÁRIO

RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	x
1. Introdução	1
2. Material e métodos.....	4
2.1. Material vegetal	4
2.2. Obtenção e armazenamento de isolados de <i>Cylindrocladium pteridis</i>	4
2.3. Produção de inóculo.....	5
2.4. Severidade da mancha foliar e desfolha do eucalipto, sob diferentes concentrações de inóculo de <i>Cylindrocladium pteridis</i>	5
2.5. Severidade da mancha foliar e desfolha causadas por <i>Cylindrocladium pteridis</i> em eucalipto, sob diferentes períodos de molhamento foliar.....	6
2.6. Severidade da mancha foliar e desfolha em plantas de eucalipto com diferentes idades, inoculadas com <i>Cylindrocladium pteridis</i>	7
2.7. Distribuição dos sintomas de mancha foliar e desfolha causados por <i>Cylindrocladium pteridis</i> em plantas de eucalipto.....	7
2.8. Penetração de <i>Cylindrocladium pteridis</i> em eucalipto	8
2.9. Análise estatística	9
3. Resultados.....	10
3.1. Severidade da mancha foliar e desfolha do eucalipto, sob diferentes concentrações de inóculo de <i>Cylindrocladium pteridis</i>	10
3.2. Severidade da mancha foliar e desfolha causadas por <i>Cylindrocladium pteridis</i> em eucalipto, sob diferentes períodos de molhamento foliar.....	14
3.3. Progresso da mancha foliar e desfolha em plantas de eucalipto com diferentes idades, inoculadas com <i>Cylindrocladium pteridis</i>	18

3.4. Distribuição dos sintomas de mancha foliar e desfolha causados por <i>Cylindrocladium pteridis</i> em plantas de eucalipto	22
3.5. Penetração de <i>Cylindrocladium pteridis</i> em eucalipto	28
4. Discussão	32
5. Conclusões	35
6. Referências Bibliográficas	36

RESUMO

GRAÇA, Rodrigo Neves, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2007.
Penetração e condições favoráveis à infecção de *Cylindrocladium pteridis* em eucalipto. Orientador: Acelino Couto Alfenas. Co-orientadores: Luiz Antônio Maffia e Douglas Lau.

Avaliaram-se os efeitos da concentração de inóculo, do tempo de molhamento foliar, da idade da planta e da posição dos ramos na copa sobre a severidade da mancha foliar e desfolha, causados por *Cylindrocladium pteridis* em dois clones híbridos de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*. Os padrões de adesão, germinação e penetração do patógeno em folhas jovens e velhas de eucalipto foram avaliados em microscópio eletrônico de varredura (MEV). Nos experimentos de concentração de inóculo, tempo de molhamento foliar e de idade da planta não se observou desfolha nos terços mediano e apical, sendo utilizados nas análises estatísticas apenas os valores de desfolha, aferidos no terço basal. Nos mesmos experimentos, em folhas jovens ocorreram valores muito baixos de área foliar lesionada, e por isso utilizou-se, nas análises, a média de severidade do segundo par de folhas totalmente expandidas (velhas) contado da base para o ápice do ramo mediano do terço basal das plantas inoculadas. Os valores de área foliar lesionada e de desfolha aumentaram à medida que se variou a concentração de inóculo de 1×10^2 a 1×10^5 conídios/mL, em ambos os clones. Observou-se incremento na severidade da doença (área foliar lesionada e desfolha) com o aumento do tempo de molhamento foliar. A severidade da doença foi significativamente maior em plantas mais velhas. A posição dos ramos na copa afetou significativamente os valores de desfolha e área foliar lesionada. A desfolha foi significativamente maior em ramos

situados próximos da base, tendendo a zero no sentido do ápice, em ambos os clones. Assim como observado para desfolha, os maiores valores de área foliar lesionada ocorreram em folhas de ramos situados no terço basal das plantas, dos dois clones testados. A correlação de Pearson entre desfolha e área foliar lesionada foi significativa em todos os experimentos ($r > 0,8$) indicando alta associação entre estas duas variáveis. Observações em microscópio eletrônico de varredura (MEV) mostraram que a penetração de *C. pteridis* em folhas de eucalipto ocorre tipicamente por estômatos e que não há diferença no número de penetrações entre folhas jovens e velhas, embora a severidade da doença seja mais elevada em folhas mais velhas. Os resultados deste trabalho, permitem concluir que a penetração de *C. pteridis* em folhas de eucalipto ocorre tipicamente por estômatos e que em estudos deste patossistema deve se empregar suspensão de inóculo a 1×10^4 conídios/mL, tempo de câmara de nevoeiro de 48h e aferir a desfolha em ramos do terço basal de plantas com mais de 120 dias de idade.

ABSTRACT

GRAÇA, Rodrigo Neves, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2007.
Penetration and favorable conditions to infection of *Cylindrocladium pteridis* in eucalypt. Adviser: Acelino Couto Alfenas. Co-Advisers: Luiz Antônio Maffia and Douglas Lau.

The effects of inoculum concentration, duration of leaf wetness period, plant age, and stem position on the severity of leaf spot and defoliation caused by *Cylindrocladium pteridis* in eucalypts were assessed in greenhouse studies using two hybrid clones of *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*. The pattern of adhesion, germination, and penetration of the pathogen in eucalypts leaf was evaluated through Scanning Electronic Microscopy (SEM). In the experiments of inoculum concentration, wetness period, and plant age, defoliation was not observed in the median and apical parts of the plants. Therefore only the values of defoliation on the lower part of plants were analyzed. Since young leaves showed low values of affected leaf area, disease severity was assessed on the second completely expanded leaf pair counted from the base to the top of the main twig of the basal third part of the plant. The values of affected leaf area and defoliation increased as inoculum concentration increased from 1×10^2 to 1×10^5 conidia/ml, in both clones. Disease severity also increased as time of leaf wetness duration increased from 6 to 48h. Disease severity was also significantly higher on older plants. Twig position in plants affected significantly the values of affected leaf area and defoliation. Defoliation was significantly higher at stem base tending to zero to the apex, in both clones. As observed for defoliation, the highest values of affected leaf area were observed at stem base, in both clones. The Pearson correlation between defoliation and

affected leaf area was significantly in all experiments ($r > 0,8$) showing high association between this two variables. Scanning Electronic Microscopy (SEM) showed that the penetration of *C. pteridis* in eucalypts leafs occurs through stomata. No differences in the number of penetration between young and old leaves were found. The results of the present study showed that this fungus penetrates eucalyptus leaves typically by stomata and in studies of this patosystem, one should use inoculum suspension at 1×10^4 conidia/ml, 48 of mist chamber, ≥ 120 day old plants, and score defoliation at the third basal part of the plants.

1. INTRODUÇÃO

Espécies de *Cylindrocladium* infectam diversas espécies hospedeiras, e causa perdas significativas, principalmente nas condições tropicais e subtropicais (Alfenas, 1986; Crous e Wingfield, 1994; Cedeño e Carrero, 2000; Poltronieri et al., 2004). As diferentes espécies deste fungo que infectam eucalipto podem causar tombamento de mudas (“damping off”), podridão de raízes, cancrios, queima de brotos, manchas foliares e desfolha (Alfenas, 1986; Ferreira, 1989; Cedeño e Carrero, 2000, Alfenas et al., 2004). A mancha foliar e desfolha causadas por *Cylindrocladium pteridis* F.A.Wolf. (teleomorfo *Calonectria pteridis* Crous, Wingfield e Alfenas) é uma das principais enfermidades foliares da eucaliptocultura no Brasil (Ferreira, 1989; Ferreira e Milani, 2002; Alfenas et al., 2004).

Cylindrocladium pteridis foi descrito em 1926 como agente causal da mancha marrom em samambaia “chapéu de couro”, *Polystichum adiantiforme* (G. Forst.) J.Sm., na Flórida (Wolf, 1926). Os primeiros relatos deste patógeno no Brasil datam de 1975 (Hodges et al., 1975) e 1986 (Dianese, 1986), nos estados da Bahia e do Pará, respectivamente, causando queima de acículas de *Pinus caribaea* var. *hondurensis* (Sénécl.) W.H.G. Barret & Golfari. No Maranhão, em 1981 foi observado causando mancha foliar em coqueiro (Silva e Souza, 1981) e no mesmo ano foi isolado a partir de amostras de solos cultivados com *Crotalaria* sp. no Distrito Federal (Almeida e Bolkan, 1981). O primeiro relato de *C. pteridis* em eucalipto ocorreu no final da década de 60, em plantas de *Eucalyptus cinerea* F. Muell. em Benth. nos Estados Unidos (Sobers, 1968). No Brasil a mancha-de-pteridis em eucalipto foi relatada em 1995, induzindo severa desfolha em plantações clonais de *E. grandis*, com um ano de idade (Ferreira et

al., 1995). Atualmente a doença está amplamente distribuída no país, e incide mais severamente em plantios no estágio fenológico B (Ferreira, 1989), de seis meses até 2-3 anos após o plantio. A doença caracteriza-se por lesões foliares, inicialmente, pequenas e arredondadas de coloração cinza clara, progredindo para manchas coalescidas de coloração marrom clara, podendo ocupar todo o limbo foliar, que resultam em intensa desfolha em genótipos suscetíveis (Ferreira et al., 1995). Acredita-se que a desfolha provocada pelo fungo pode reduzir o incremento volumétrico da planta e facilitar o crescimento de plantas invasoras, devido à entrada de luz no sub-bosque, tornando as plantas sujeitas aos efeitos da mato-competição. A doença é mais severa em condições de altas temperaturas e períodos prolongados de chuva (Alfenas et al., 2004).

Observações em nível de campo de infecções naturais de *C. pteridis* e inoculações em condições de casa de vegetação indicam que, em eucalipto, a resistência pode ser quantitativa e parece haver correlação positiva entre aumento da idade das folhas e suscetibilidade à doença (dados não publicados). Essas características dificultam a separação de materiais genéticos quanto à resistência. Fenômeno similar ocorre em outros patossistemas. Folhas velhas de *Coix lacryma-jobi* L. inoculadas com *Bipolaris coicis* (Y. Nisikado) Shaemaker, apresentam maior severidade da doença (área foliar lesionada) que folhas novas, independentemente do estágio de desenvolvimento da planta e da cultivar inoculada (Chang e Hwang, 2003). No patossistema trigo-*Pyrenophora tritici-repentis* (Diedicke) Drechsler, folhas velhas são mais suscetíveis à doença que folhas jovens (Riaz et al., 1991). Em diversos estudos, a resistência de plantas de batata a *Alternaria solani* Sor. foi também afetada pela idade das folhas, e folhas velhas são mais suscetíveis que jovens (Broggio e Ranucci, 1992; Rotem, 1994; Stevenson, 1994). Ademais, maior período de incubação e menores valores de número de lesões, taxa de expansão de lesão, severidade e área abaixo da curva de progresso da doença ocorreram no terço superior de plantas de batata, o que comprovou a menor suscetibilidade de órgãos jovens a *A. solani* (Rodriguez, 2003). Em plantas de tomate a resistência a *A. solani* é negativamente correlacionada à maturidade fisiológica e produtividade da planta. Folhas velhas e senescentes são mais suscetíveis que as jovens, plantas jovens são mais resistentes que plantas adultas e plantas com pesada carga de frutos são mais suscetíveis à doença que plantas menos produtivas (Maiero, 1990). Na interação *Phytophthora infestans* (Mont.) De Bary - batateira, ocorreu um incremento gradativo na resistência das folhas basais para as folhas do ápice, independentemente da cultivar avaliada. Assim, a posição da folha tem efeito significativo na resistência à

requeima, sendo necessário, portanto, avaliar folhas da mesma posição na avaliação da resistência (Visker et al., 2003).

Apesar de *Cylindrocladium* spp. serem importantes patógenos na eucaliptocultura, não existem estudos visando compreender os aspectos envolvidos na resistência de eucalipto a fungos deste gênero. O conhecimento da patogênese de *C. pteridis* em eucalipto, desde a penetração até a multiplicação, bem como os fatores que influenciam esses processos, são pré-requisitos básicos para subsidiar investigações morfológicas e citoquímicas necessárias ao entendimento dos mecanismos de resistência e de expressão de genes envolvidos na resistência. Além disso, o desenvolvimento de técnicas apropriadas para seleção de genótipos resistentes, incluindo a definição da concentração ideal de inóculo, do tempo de molhamento foliar após a inoculação, do padrão de distribuição da doença na planta e do estágio de desenvolvimento das plantas inoculadas, é essencial para diferenciar a reação de diferentes genótipos de *Eucalyptus* spp. a *C. pteridis*. Diante do exposto, este trabalho objetivou determinar, em híbridos de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*: as condições favoráveis à infecção de *C. pteridis*; o efeito do estágio fenológico de plantas e de seus tecidos sobre a infecção de *C. pteridis*; e o modo de penetração de *C. pteridis*, por meio de estudos histológicos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material vegetal

Mudas com 60 dias de idade de dois clones híbridos de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* (6021e 9882), foram cultivados em vasos com 8 L de capacidade contendo solo misturado com areia e esterco de curral, na proporção de 3:1:1, previamente esterilizado com brometo de metila a 80 cc/m³, suplementado com super simples (1g/L). As plantas foram mantidas em casa de vegetação e adubadas duas vezes por semana com 100 mL de uma solução de Ouro Verde[®] (macro e micronutrientes) a 7,5 g/L, até atingirem o estágio adequado para inoculação, aproximadamente, 120 dias após o transplante. Durante a condução dos experimentos a temperatura mínima na casa de vegetação variou de 17 a 22°C e a máxima de 28 a 36°C. Na câmara de nevoeiro a temperatura variou de 21 a 26°C.

2.2. Obtenção e armazenamento de isolados de *Cylindrocladium pteridis*

Em todos os experimentos utilizou-se um isolado monospórico de *Cylindrocladium pteridis* (PF-1) obtido de plantas doentes de um plantio comercial de eucalipto localizado em Lençóis Paulista, SP. O isolado foi mantido a -80°C em grãos de aveia colonizados. Este isolado vem sendo utilizado em trabalhos e avaliações realizados no Laboratório de Patologia Florestal-Genética da Interação Planta Patógeno

do Departamento de Fitopatologia da UFV, que visam identificar genótipos de *Eucalyptus* spp. resistentes a esta doença.

2.3. Produção de inóculo

Para a multiplicação do inóculo, grãos de aveia colonizados com micélio da cultura monospórica de *C. pteridis* foram repicados para placas de Petri contendo meio de aveia-dextrose-agar (AVDA). Após a repicagem, as placas foram mantidas a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, com fotoperíodo de 12 horas, até que o micélio ocupasse toda a superfície do meio. Após este período, visando estimular a produção de conídios, as culturas do fungo foram submetidas a estresse físico, por meio da deposição de 20 mL de água destilada estéril na superfície da cultura e posterior raspagem da superfície da colônia com o auxílio de um pincel, autoclavado, de modo a remover todo o micélio aéreo presente na porção superior do meio de cultura. A seguir, foram depositados 10 mL de água destilada estéril em cada placa. A cultura permaneceu submersa por dois dias, quando se descartou a água e o excesso de umidade foi removido com o auxílio de gaze esterilizada. A cultura foi mantida em condições de laboratório ($\pm 25^\circ\text{C}$) por aproximadamente dois dias, até a esporulação do patógeno na superfície do meio de cultura. A suspensão de inóculo foi preparada por meio da adição de 20 mL de água destilada + Tween 20 a 0,05% na superfície da cultura e posterior remoção dos conídios mediante a raspagem com um pincel de cerdas macias autoclavado. A suspensão obtida foi filtrada em camada dupla de gaze esterilizada e ajustada para a concentração de conídios desejada, que variou de acordo com o ensaio.

2.4. Severidade da mancha foliar e desfolha do eucalipto, sob diferentes concentrações de inóculo de *Cylindrocladium pteridis*

O efeito da concentração de inóculo no desenvolvimento da doença foi estudado inoculando-se plantas dos clones 6021 e 9882, com suspensão de inóculo contendo 1×10^2 , 1×10^3 , 1×10^4 e 1×10^5 conídios/mL. Plantas com 120 dias de transplântio foram

atomizadas com o auxílio de um pulverizador de 5L de capacidade munido de um bico do tipo leque nº1001 e regulador de pressão, de modo a cobrir homogeneamente as superfícies abaxial e adaxial de todas as folhas da copa. Após a inoculação, as plantas foram mantidas em câmara de nevoeiro por 48h e, posteriormente, transferidas para casa de vegetação. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com cinco repetições por tratamento, sendo cada planta considerada uma repetição. Como testemunha, cinco plantas de cada clone foram mantidas sob as mesmas condições descritas anteriormente excetuando a inoculação do patógeno.

A desfolha foi avaliada em todos os ramos presentes nos terços basal, mediano e apical das plantas aos 0, 10, 20, 30, 40 e 50 dias após a inoculação. Consideraram-se apenas os ramos principais; brotações secundárias ao longo destes não foram avaliadas. A área foliar lesionada foi quantificada 10 dias após a inoculação, por meio da captura de imagens digitais do segundo (folhas velhas) e penúltimo (folhas jovens) par de folhas a partir da base de ramos situados na parte mediana do terço basal. As imagens obtidas foram analisadas no programa Quant (Vale *et al.*, 2003), para estimar o percentual de área foliar lesionada. Com os percentuais de desfolha ao longo do tempo, estimou-se a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD).

2.5. Severidade da mancha foliar e desfolha causadas por *Cylindrocladium pteridis* em eucalipto, sob diferentes períodos de molhamento foliar

Para avaliar o efeito do tempo de molhamento foliar sobre a infecção de *C. pteridis*, plantas do clone 6021 com 120 dias de transplante foram inoculadas com suspensão de inóculo a 1×10^4 conídios/mL. Após a inoculação (idem item 2.4.), as plantas foram mantidas em câmara de nevoeiro por 0, 6, 12, 24 ou 48h, e posteriormente transferidas para casa de vegetação. O delineamento estatístico utilizado foi o inteiramente casualizado, com cinco plantas por tratamento sendo cada planta considerada uma repetição. As plantas foram avaliadas seguindo a metodologia descrita no item 2.4.

2.6. Severidade da mancha foliar e desfolha em plantas de eucalipto com diferentes idades, inoculadas com *Cylindrocladium pteridis*

Visando avaliar o efeito da idade de plantas de *Eucalyptus* spp. sobre a infecção por *C. pteridis*, mudas de 60 dias de idade dos clones 6021 e 9882, foram transplantadas aos 60, 120 ou 180 dias antes da inoculação. As plantas foram inoculadas com suspensão do patógeno a 1×10^4 conídios/mL (idem item 2.4.) e mantidas em câmara de nevoeiro por 48 h, sendo posteriormente transferidas para casa de vegetação. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, utilizando-se cinco plantas por tratamento e cada planta considerada uma repetição. Como controle, cinco plantas de cada clone transplantadas nos intervalos descritos acima, foram mantidas sob as mesmas condições que as plantas inoculadas excetuando a inoculação do patógeno. As plantas foram avaliadas seguindo a metodologia descrita no item 2.4.

2.7. Distribuição dos sintomas de mancha foliar e desfolha causados por *Cylindrocladium pteridis* em plantas de eucalipto

Para caracterizar o padrão de distribuição dos sintomas de mancha foliar e desfolha, induzidos por *C. pteridis* em eucalipto, cinco plantas do clone 6021 e cinco do clone 9882, 90 dias após o transplântio foram inoculadas com suspensão de inóculo a 1×10^4 conídios/mL e mantidas em câmara de nevoeiro por 48 h, sendo posteriormente transferidas para casa de vegetação. O fuste principal das plantas foi dividido em intervalos de 0-20, 20-40, 40- 60, 60-80, 80-100 e acima de 100 cm, sendo a desfolha aferida em todos os ramos compreendidos em cada intervalo, aos 0, 10, 20, 30, 40 e 50 dias após a inoculação. Consideraram-se apenas os ramos principais; brotações secundárias ao longo destes não foram avaliadas. A área foliar lesionada foi quantificada 10 dias após a inoculação, por meio da captura de imagens digitais de todas as folhas de um ramo situado na região mediana de cada terço das plantas (basal, mediano e apical). As imagens obtidas foram analisadas no programa Quant (Vale *et al.*, 2003) para estimar o percentual de área foliar lesionada. Com os percentuais de desfolha estimou-se a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD). O período médio de incubação foi aferido em cada terço das plantas, sendo considerado

como o tempo transcorrido desde a inoculação até o aparecimento dos sintomas em pelo menos uma folha em 50% dos ramos de cada terço. As avaliações foram efetuadas às 6h e 12h após a inoculação e posteriormente a cada 12 horas. O período latente foi aferido em folhas de ramos de cada terço da planta por meio da observação de estruturas vegetativas ou reprodutivas do patógeno, com o auxílio de uma lupa de bolso (20x aumento). O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado com cinco repetições (uma planta = uma unidade experimental).

2.8. Penetração de *Cylindrocladium pteridis* em eucalipto

Para caracterizar o padrão de adesão, germinação e penetração de *C. pteridis* em folhas de eucalipto, foram coletadas aleatoriamente, de três plantas do clone 6021, duas folhas velhas do segundo ramo da copa (sentido base – ápice) e duas folhas jovens do penúltimo ramo de cada planta. Os pecíolos das folhas foram envolvidos em algodão umedecido e estas mantidas em câmara úmida (Gerbox + espuma umedecida + tela de náilon) à 25°C. As folhas foram inoculadas por meio da deposição de gotas de 10 µL de uma suspensão a 1×10^4 conídios/mL, nas faces adaxial ou abaxial. Cinco fragmentos de 4 mm² de cada folha inoculada foram coletados às 6h após a inoculação. Os fragmentos foram pré-fixados em glutaraldeído (3%, tamponado com cacodilato de sódio pH 7, 0,05 M) durante 2h à temperatura ambiente, e lavados por seis vezes, 10 min. cada, em cacodilato de sódio. Posteriormente foi realizada a fixação dos fragmentos em tetróxido de ósmio (OsO₄ 1%) durante 4h, a 4°C. Após fixados, os fragmentos foram lavados por seis vezes, uma lavagem a cada 10 min., com cacodilato de sódio e desidratados em série alcoólica (30, 50, 70, 80, 95 e 100%). Após a desidratação, foram submetidos à secagem em ponto crítico, utilizando o aparelho “Critical Point Dryer” (Balzers, modelo CPD020). Os fragmentos foram montados sobre suporte de metal e, em seguida, cobertos com ouro por meio de pulverização catódica, no “Sputter Coater” acoplado a uma “Freezing Drying Unit” (Balzers, FDU010). O material foi examinado ao microscópio eletrônico de varredura (LEO, modelo 1430VP) operando a 10Kv. Avaliou-se a área central (= 0,09 mm²) de cada um dos cinco fragmentos aferindo-se: o número de estômatos, o número de conídios, o número de tubos germinativos, o número de penetrações por estômatos e o número de penetrações diretas.

2.9. Análise estatística

Nas análises estatísticas empregou-se o programa SAS (The SAS Institute Inc., Version 6.01, Cary, NC, Estados Unidos). Os valores de área foliar lesionada, desfolha e área abaixo da curva de progresso da doença para desfolha (AACPD) foram submetidos à análise de variância (ANOVA).

Efetuiu-se análise de regressão linear dos valores de área foliar lesionada e de desfolha obtidos nos experimentos de posição dos ramos na copa, concentração de inóculo e tempo de molhamento foliar após a inoculação. Os modelos de regressão foram selecionados com base no coeficiente de determinação, e na normalidade e homogeneidade dos resíduos. Nestes ensaios folhas jovens apresentaram valores baixos de área foliar lesionada. Portanto, utilizou-se nas análises estatísticas a média de severidade observada no par de folhas velhas do ramo avaliado. Analogamente, não se observou desfolha nos terços mediano e apical das plantas, considerando-se apenas os valores de desfolha aferidos no terço basal das plantas.

No experimento de idade compararam-se às médias de área foliar lesionada e desfolha pelo teste Fischer LSD a 95% de probabilidade.

Os valores de área foliar lesionada e de desfolha, de cada um dos experimentos, foram submetidos à análise de correlação de Pearson.

Na análise dos eventos microscópicos efetuou-se a comparação da idade da folha (folhas velha e nova) e da face foliar inoculada (faces abaxial e adaxial), com base na média e no desvio padrão dos eventos de adesão, germinação, penetração e do número de estômatos observados em cada tratamento.

Todos os experimentos foram repetidos por pelo menos duas vezes em épocas distintas.

3. RESULTADOS

3.1. Severidade da mancha foliar e desfolha do eucalipto, sob diferentes concentrações de inóculo de *Cylindrocladium pteridis*

A análise de variância mostrou efeito significativo ($P < 0,01$) do clone, da concentração de inóculo e da interação “clone x concentração” sobre a desfolha e a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), indicando respostas diferenciadas dos genótipos em relação às concentrações de inóculo utilizadas. Já para a área foliar lesionada, efeito significativo foi observado somente para a concentração de inóculo (Tabela 1).

Quando aferida aos 50 dias após a inoculação, a desfolha aumentou à medida que se variou a concentração de inóculo de 1×10^2 a 1×10^5 conídios/mL (Figura 1A e B). Observou-se uma relação linear entre a concentração de inóculo e o percentual de desfolha, para os dois clones avaliados. Entretanto, em todas as concentrações o percentual médio de desfolha no clone 6021 foi menor que no 9882. Plantas dos clones 6021 e 9882, inoculadas com suspensão de inóculo a 1×10^5 conídios/mL apresentaram desfolha média de 35,2 e 53,7%, respectivamente. Os menores percentuais de desfolha foram observados a 1×10^2 conídios/mL, sendo de 4,9% para o clone 6021 e de 12,6% para o 9882.

Não houve efeito do clone sob os valores de área foliar lesionada, sendo as médias dos dois clones submetidas à análise estatística. A área foliar lesionada também aumentou com o aumento da concentração de inóculo (Figura 2). Folhas velhas de

plantas inoculadas com suspensão de inóculo a 1×10^2 e 1×10^3 conídios/mL apresentaram 1,5 e 10% de área foliar lesionada, respectivamente, sendo este percentual aumentado para 29,5 e 56% de área foliar lesionada quando as plantas foram inoculadas com suspensão de inóculo a 1×10^4 e 1×10^5 conídios/mL, respectivamente.

O coeficiente de correlação de Pearson (r) entre os percentuais de área foliar lesionada e de desfolha foi de 0,68 (Figura 3), indicando associação positiva entre as duas variáveis utilizadas na avaliação da severidade da doença.

Para ambos os clones, a AACPD aumentou com o aumento da concentração de inóculo (Figura 4). O clone 6021 apresentou os menores valores de AACPD, independentemente da concentração utilizada.

As plantas testemunha, inoculadas com água destilada e Tween 20, não expressaram sintomas da doença.

Tabela 1. Análise de variância para área abaixo da curva de progresso da doença para desfolha (AACPD), desfolha e área foliar lesionada, em função da concentração de inóculo, em plantas de dois clones híbridos de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* (6021 e 9882), inoculadas com *Cylindrocladium pteridis*

	FV	GL	QM	F	P
<u>AACPD</u>					
Clone		1	1763975,18	30,48	<0,0001
Concentração		4	4696506,15	81,15	<0,0001
Clone*Concentração		4	233745,03	4,04	0,0078
<u>Desfolha</u>					
Clone		1	1447,89	33,11	<0,0001
Concentração		4	3560,74	81,43	<0,0001
Clone*Concentração		4	194,6	4,45	0,0047
<u>Área foliar lesionada</u>					
Clone		1	1,5347	0,02	0,8967
Concentração		4	5565,04	61,91	<0,0001
Clone*Concentração		4	3,69	0,04	0,9967

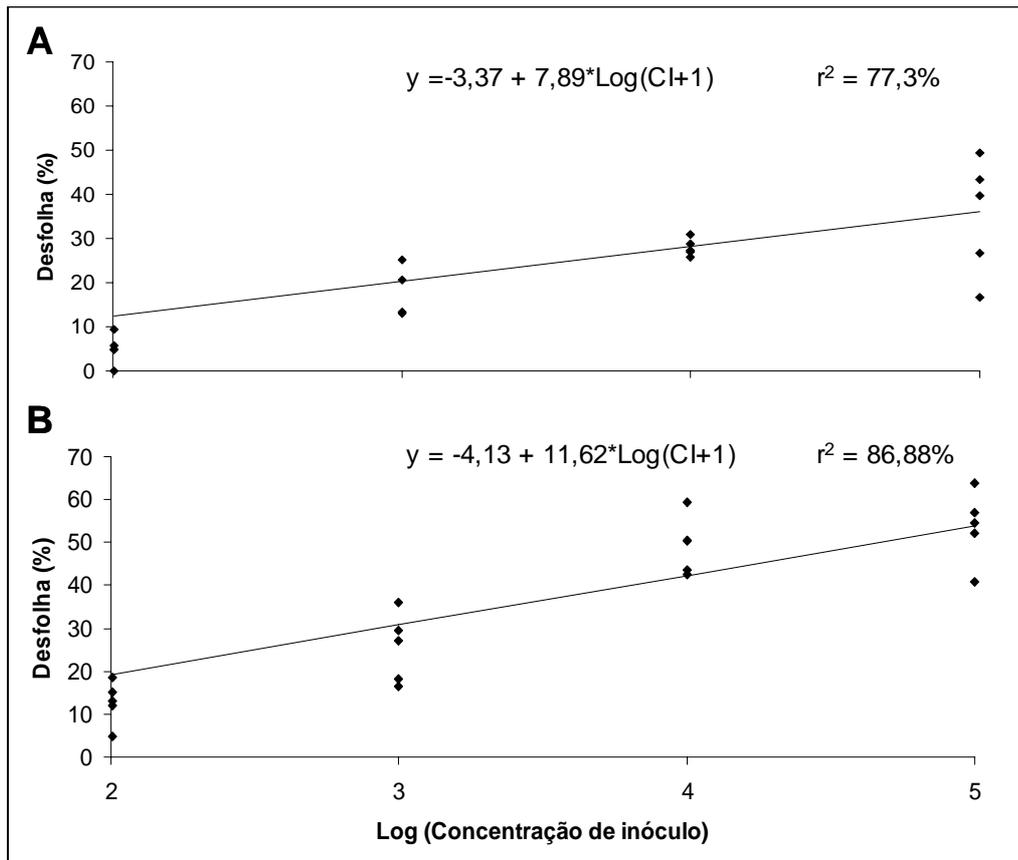


Figura 1. Percentual de desfolha (y) em ramos do terço basal de plantas de dois clones híbridos de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* (6021 - A e 9882 - B) sob diferentes concentrações de inóculo (CI) de *Cylindrocladium pteridis*, aos 50 dias após inoculação.

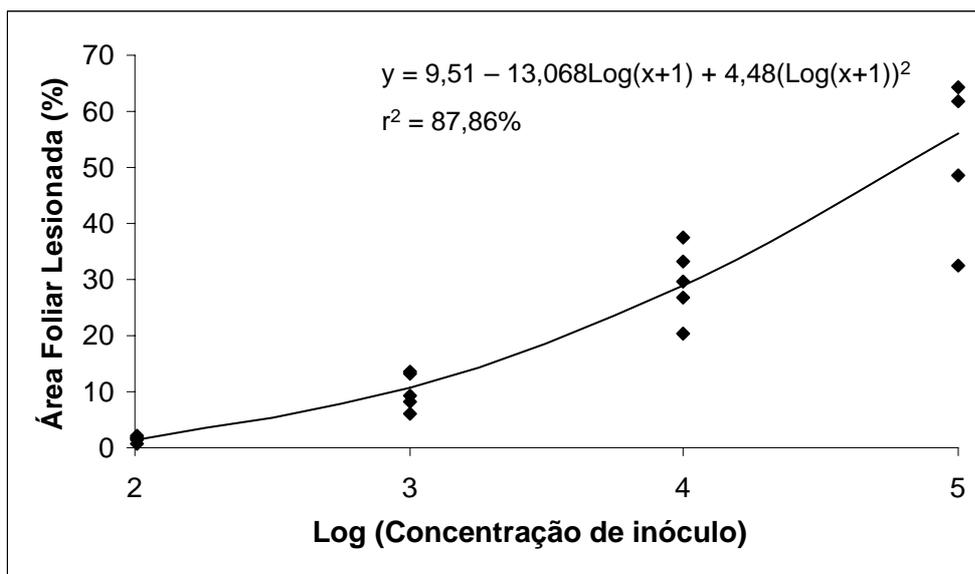


Figura 2. Média de área foliar lesionada, em função da concentração de inóculo, aferida no segundo par de folhas totalmente expandidas (folhas velhas), situadas no ramo mediano do terço basal de plantas de dois clones híbridos de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* (6021 e 9882), aos 7 dias após a inoculação com *Cylindrocladium pteridis*.

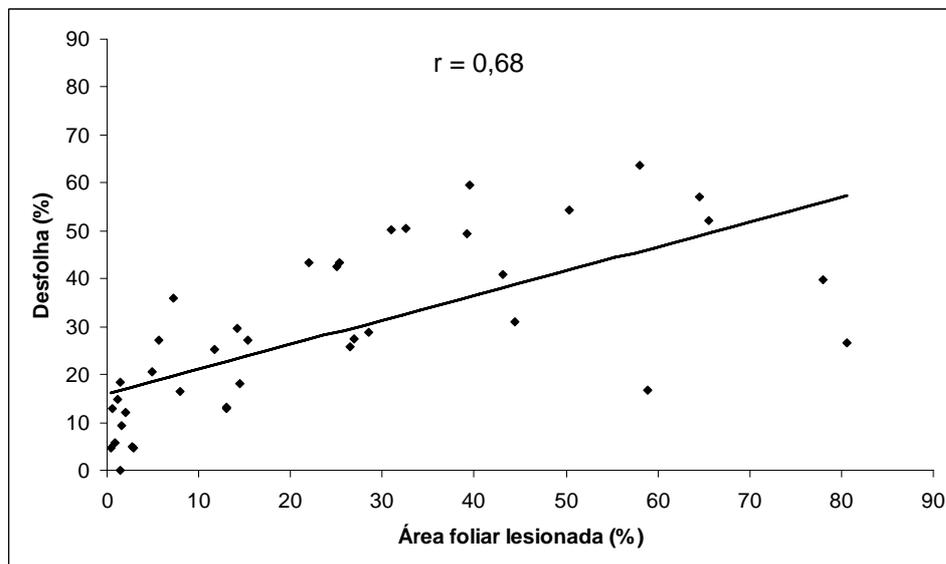


Figura 3. Correlação de Pearson entre percentuais de área foliar lesionada e desfolha, obtidos no experimento de concentração de inóculo, considerando as médias de dois clones híbridos de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* (6021 e 9882).

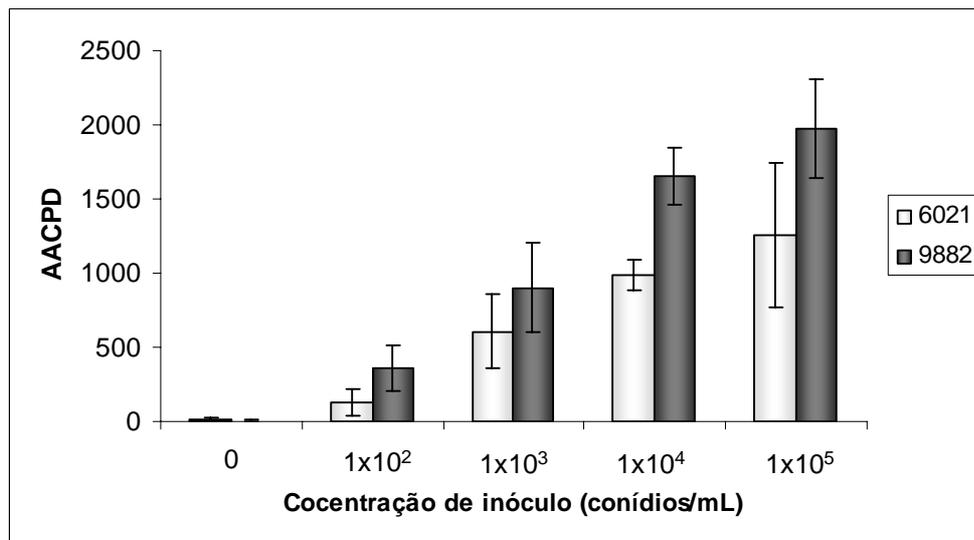


Figura 4. Área abaixo da curva de progresso da desfolha (AACPD), por concentração de inóculo, para os clones 6021 e 9882, híbridos de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*. Linhas verticais correspondem ao desvio padrão da média.

3.2. Severidade da mancha foliar e desfolha causadas por *Cylindrocladium pteridis* em eucalipto, sob diferentes períodos de molhamento foliar

A desfolha, a área foliar lesionada e a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) foram afetadas significativamente ($P < 0,01$) pelo tempo de molhamento foliar após a inoculação (Tabela 2). Não se observou desfolha nos terços mediano e apical em nenhum dos tratamentos, sendo os valores de desfolha e de área foliar lesionada obtidos no terço basal das plantas.

Houve aumento na severidade da doença (desfolha e área foliar lesionada) com o aumento do tempo de molhamento foliar (Figuras 5 e 6). E em plantas mantidas por 24 e 48h em câmara de nevoeiro, aos 50 dias após a inoculação, a desfolha foi de 29,9 e 44,5%, respectivamente. Enquanto que, em plantas mantidas por 6 e 12h em câmara de nevoeiro, a desfolha média foi de 5,1 e 3,7%, respectivamente.

Folhas velhas, de ramos do terço basal de plantas mantidas em câmara de nevoeiro por 6 e 12h, apresentaram o mesmo valor de área foliar lesionada, sendo 5,1%, em média. Quando as plantas foram submetidas a 24 e 48h de molhamento, folhas no

mesmo estágio fenológico apresentaram 20 e 26% de área foliar lesionada, respectivamente.

O coeficiente de correlação de Pearson (r) entre a área foliar lesionada e desfolha, foi de 0,8 (Figura 7), indicando alta associação entre as duas variáveis utilizadas na avaliação da severidade da doença.

A AACPD aumentou com o aumento dos tempos de molhamento foliar (Figura 8).

Plantas utilizadas como controle, inoculadas e mantidas em condições de casa de vegetação na ausência de molhamento foliar, não desenvolveram sintomas da doença.

Tabela 2. Análise de variância para área abaixo da curva de progresso da doença para desfolha (AACPD), desfolha e área foliar lesionada, em função do tempo de molhamento foliar, em plantas do clone 6021, híbrido de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*, inoculadas com *Cylindrocladium pteridis*

FV	GL	QM	F	P
<u>AACPD</u>				
Molhamento	4	1939642,45	13,29	<0,0001
<u>Desfolha</u>				
Molhamento	4	1912,24	24,35	<0,0001
<u>Área foliar lesionada</u>				
Molhamento	4	619,95	23,54	<0,0001

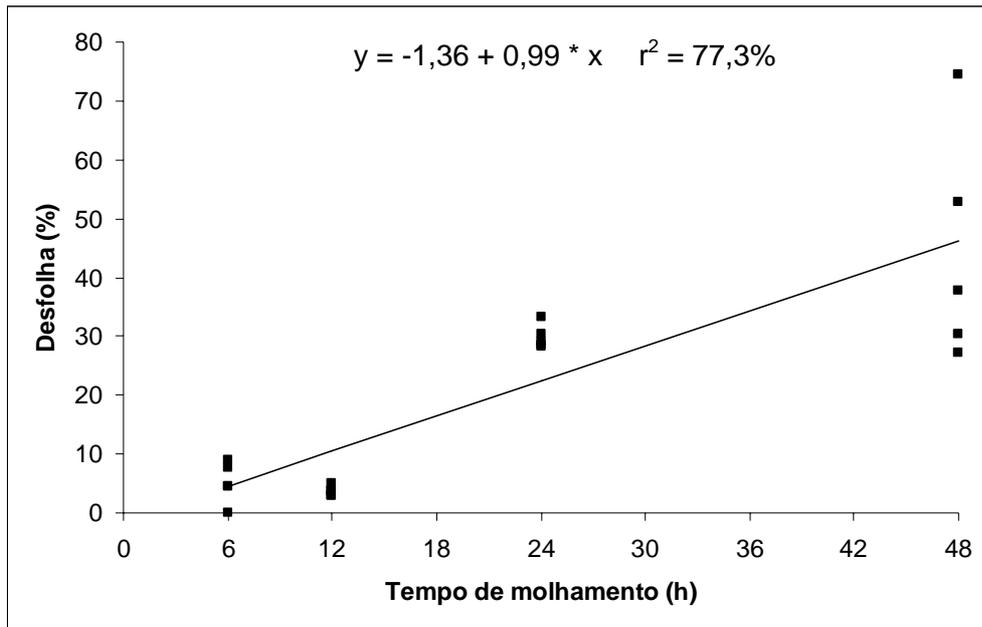


Figura 5. Percentual de desfolha, em ramos do terço basal, de plantas do clone 6021, híbrido de *eucalyptus grandis* x *E. urophylla*, sob diferentes períodos de molhamento foliar, aos 50 dias após inoculação com *Cylindrocladium pteridis*.

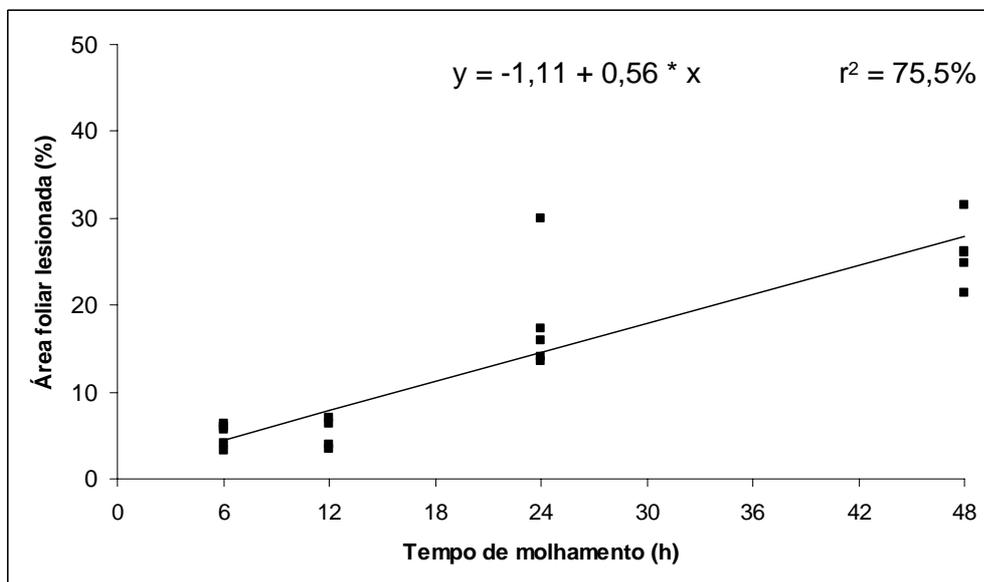


Figura 6. Percentual de área foliar lesionada aferida no segundo par de folhas totalmente expandidas (folhas velhas), situadas no ramo mediano do terço basal de plantas do clone 6021, híbrido de *eucalyptus grandis* x *E. urophylla*, sob diferentes períodos de molhamento foliar, aos 7 dias após inoculação com *Cylindrocladium pteridis*.

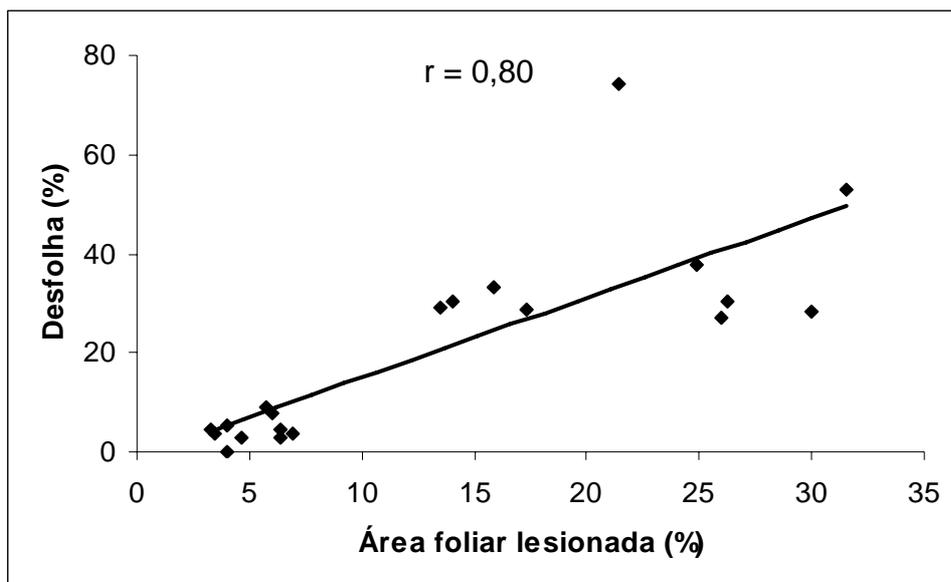


Figura 7. Correlação de Pearson entre percentuais de área foliar lesionada e desfolha, obtidos no experimento de molhamento foliar em plantas do clone 6021, híbrido de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*.

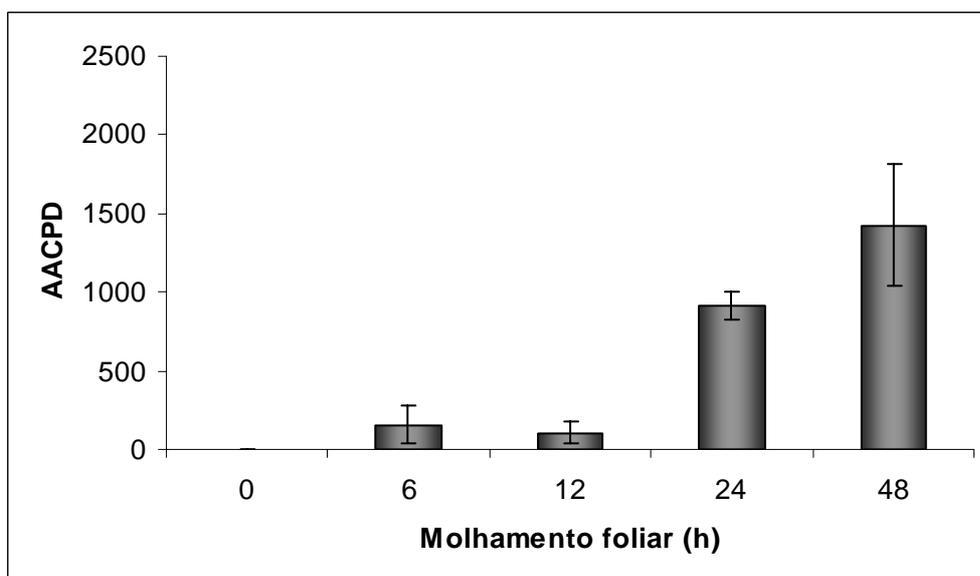


Figura 8. Área abaixo da curva de progresso da doença para desfolha (AACPD), causada por *Cylindrocladium pteridis*, sob diferentes períodos de molhamento foliar, em plantas do clone 6021, híbrido de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*. Linhas verticais correspondem ao desvio padrão da média.

3.3. Progresso da mancha foliar e desfolha em plantas de eucalipto com diferentes idades, inoculadas com *Cylindrocladium pteridis*

A interação “clone x idade” não afetou significativamente os valores de área foliar lesionada, de desfolha e de área abaixo da curva de progresso da doença para desfolha (AACPD). No entanto, todas as variáveis avaliadas foram afetadas significativamente ($P < 0,01$) pelo tempo de transplântio anterior à inoculação (idade). O clone teve efeito significativo sobre os percentuais de área foliar lesionada e de desfolha, mas não sobre os valores de AACPD (Tabela 3). Não se observou desfolha nos terços mediano e apical em nenhum dos tratamentos, sendo os valores de desfolha e de área foliar lesionada avaliados no terço basal das plantas.

Diferenças significativas nos percentuais de desfolha em função da idade foram observadas para os dois clones inoculados (Figura 9). A intensidade de desfolha foi significativamente maior em plantas mais velhas. Plantas dos clones 6021 e 9882, com 180 dias de idade, apresentaram desfolha média de 36,8 e 40,6%, respectivamente. Enquanto que a desfolha média, em plantas dos mesmos clones com 120 dias de transplântio, foi de 18,6 e 26,6%, respectivamente. Plantas com 60 dias de idade não exibiram desfolha aos 50 dias após a inoculação.

Não houve diferença significativa entre os valores de área foliar lesionada em plantas com 120 e 180 dias de idade, para ambos os clones (Figura 10). Folhas velhas de plantas com 180 dias apresentaram 18,5 e 28,3% de área foliar lesionada, para os clones 6021 e 9882, respectivamente. O percentual médio de área foliar lesionada em plantas com 120 dias de idade, nos clones 6021 e 9882, foi de 15,5 e 26,4% respectivamente. Plantas com 60 dias apresentaram os menores valores de área foliar lesionada, sendo de 0,97 e 1,2%, para os clones 6021 e 9882.

O coeficiente de correlação de Pearson (r) entre a área foliar lesionada e desfolha, foi de 0,83 (Figura 11), indicando alta associação entre as duas variáveis utilizadas na avaliação da severidade da doença.

Os maiores valores de AACPD foram observados em plantas com 180 dias idade. Plantas com 60 dias não exibiram desfolha, apresentando, portanto valor nulo de AACPD (Figura 12).

As plantas controle para cada tempo de transplântio, inoculadas com água destilada e Tween 20, não expressaram sintomas da doença.

Tabela 3. Análise de variância para área abaixo da curva de progresso da doença para desfolha (AACPD), desfolha e área foliar lesionada, em função da idade da planta, em plantas de dois clones híbridos de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* (6021 e 9882), inoculadas com *Cylindrocladium pteridis*

FV	GL	QM	Teste F	P
AACPD				
Clone	1	83566,57	2,32	0,1411
Idade	2	4418453,44	122,55	<0,0001
Clone*Idade	2	35,166,82	0,98	0,3915
Desfolha				
Clone	1	115,36	5,67	0,0256
Idade	2	3781,68	185,71	<0,0001
Clone*Idade	2	39,29	1,93	0,1671
Área foliar lesionada				
Clone	1	366,38	10,64	0,0033
Idade	2	1496,99	43,48	<0,0001
Clone*Idade	2	86,51	2,51	0,1021

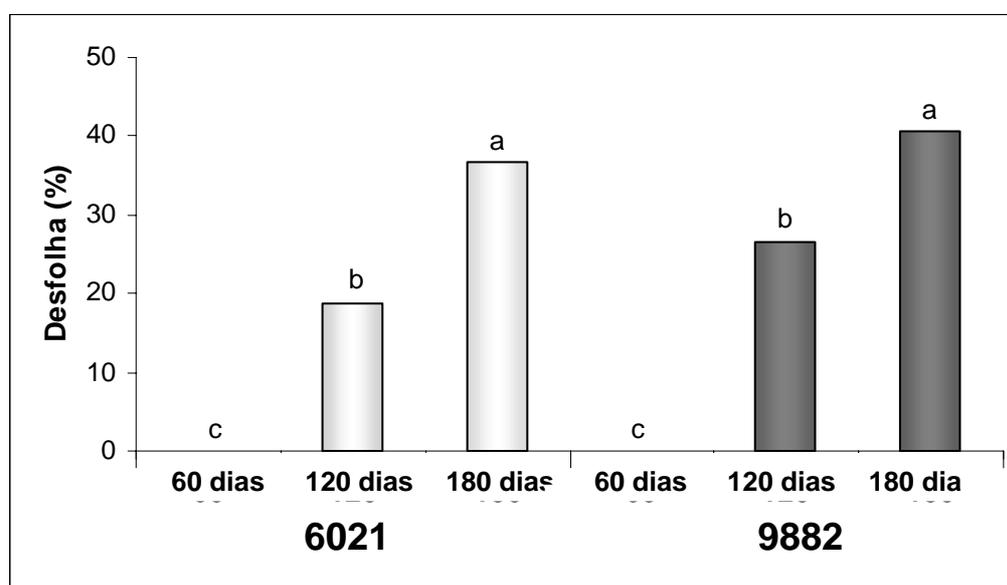


Figura 9. Percentual de desfolha em ramos do terço basal de plantas, com diferentes idades, de dois clones híbridos de *Eucalyptus grandis* com *E. urophylla* (6021 e 9882), aos 50 dias após a inoculação com *Cylindrocladium pteridis*. Médias seguidas pela mesma letra dentro do mesmo clone não diferem pelo teste Fisher (LSD; $P=0,05$).

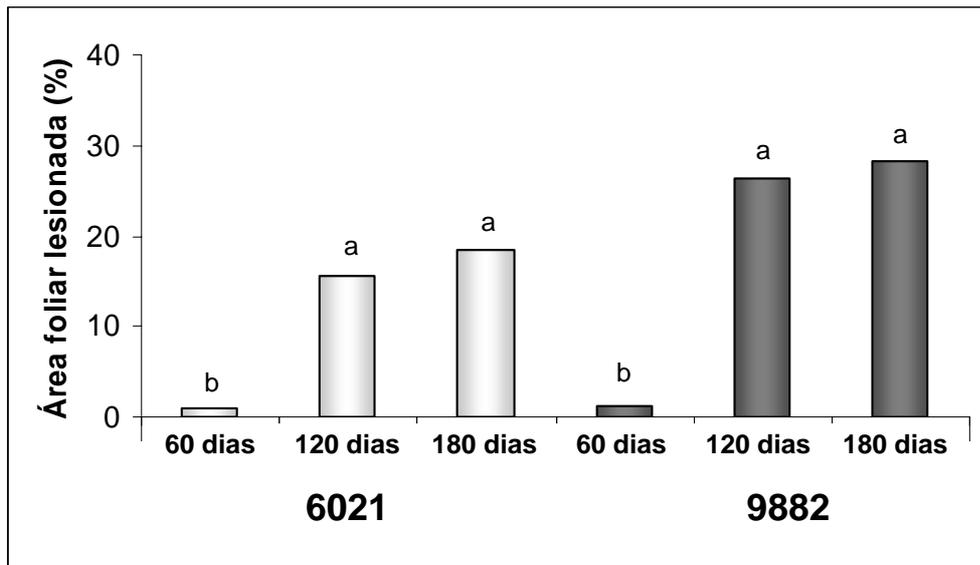


Figura 10. Percentual de área foliar lesionada aferido no segundo par de folhas totalmente expandidas (folhas velhas), situadas no ramo mediano do terço basal de plantas, com diferentes idades, de dois clones híbridos de *Eucalyptus grandis* com *E. urophylla* (6021 e 9882), aos 7 dias após a inoculação com *Cylindrocladium pteridis*. Médias seguidas pela mesma letra dentro do mesmo clone não diferem pelo teste Fisher (LSD; $P=0,05$).

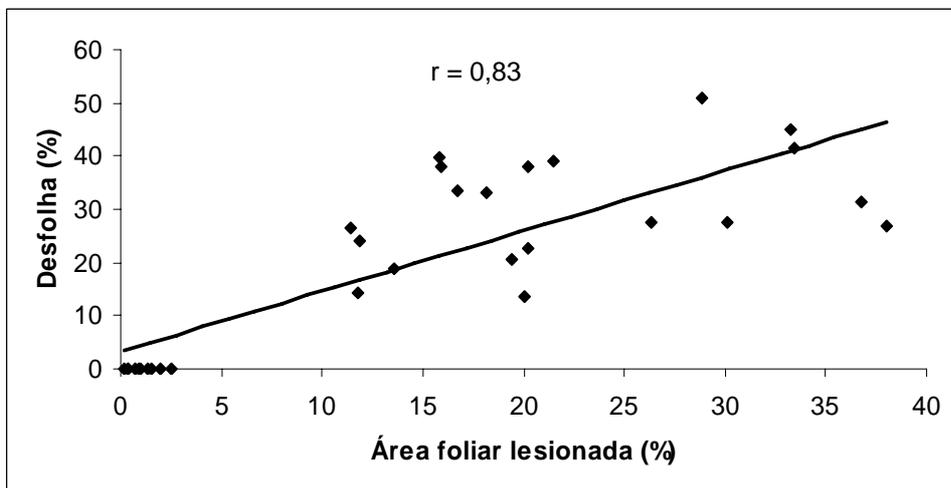


Figura 11. Correlação de Pearson entre percentuais de área foliar lesionada e desfolha, obtidos no experimento de idade de plantas, considerando as médias de dois clones híbridos de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* (6021 e 9882).

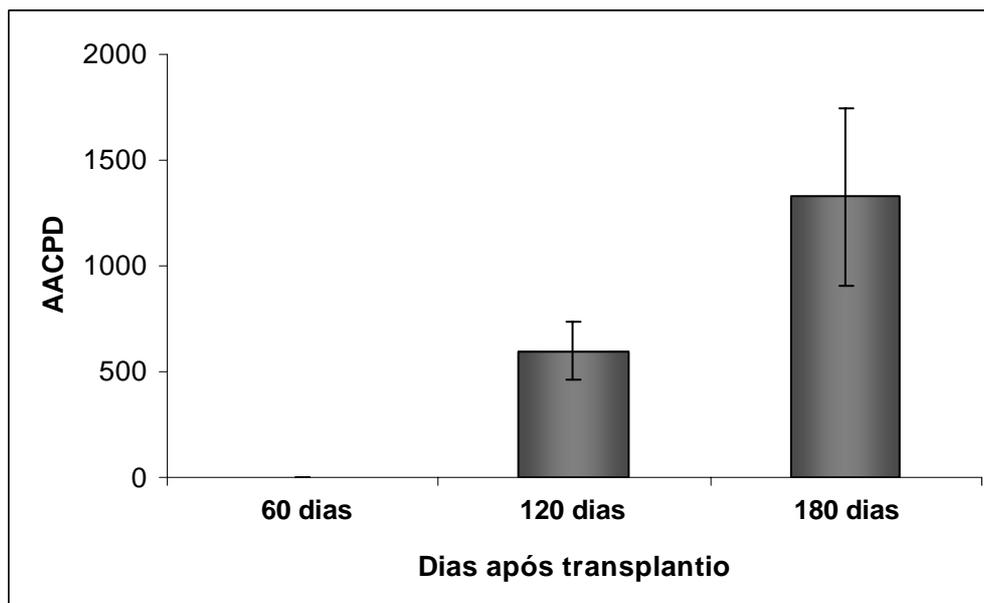


Figura 12. Área abaixo da curva de progresso da doença, por tempo de transplântio anterior a inoculação, com base nas médias de dois clones híbridos de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* (6021 e 9882). Linhas verticais correspondem ao desvio padrão da média.

3.4. Distribuição dos sintomas de mancha foliar e desfolha causados por *Cylindrocladium pteridis* em plantas de eucalipto

A análise de variância mostrou efeito significativo ($P < 0,05$) da interação entre clone e posição dos ramos na copa (“clone x altura”) para a área foliar lesionada, mas não sobre a desfolha e área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD). A posição dos ramos na copa afetou significativamente todas as variáveis avaliadas. Não foi observado efeito do clone sobre a severidade da doença (Tabela 4).

A desfolha foi significativamente maior em ramos situados próximos à base das plantas, tendendo a ser nula no sentido do ápice, independentemente do clone inoculado (Figura 13). Ramos de plantas dos clones 6021 e 9882, compreendidos no intervalo de 0 a 20 cm de altura, apresentaram desfolha média de 20,8 e 25,7%, respectivamente. A partir de 80 cm de altura não se observou desfolha em nenhum dos genótipos avaliados (Figura 13 e 14).

Assim como ocorreu para desfolha, os maiores valores de área foliar lesionada foram observados em folhas de ramos situados no terço basal das plantas, independentemente do clone avaliado. A área foliar lesionada em folhas de ramos da região mediana e apical foi significativamente menor que a observada no terço basal (Figura 15). Folhas de ramos situados no terço basal de plantas dos clones 6021 e 9882 apresentaram em média 12 e 21,8% de área foliar lesionada, respectivamente. Já no terço apical a severidade média foi de 1,8% para o clone 6021 e 1,3% para o 9882.

O coeficiente de correlação de Pearson (r) entre a área foliar lesionada e desfolha foi de 0,91 (Figura 16), indicando alta associação entre as duas variáveis utilizadas na avaliação da severidade da doença.

Os maiores valores de AACPD foram observados em ramos situados próximos da base das plantas. Ramos localizados a partir de 80 cm de altura não exibiram desfolha apresentando, portanto valor nulo de AACPD (Figura 17).

O período médio de incubação foi de 36 h, independentemente do terço da planta e do clone avaliado (Figura 18A e B). Às 48 h após a inoculação, todos os ramos das plantas apresentavam pelo menos uma folha lesionada,

independentemente do clone. Não foram observadas estruturas do patógeno, ao término das avaliações, não sendo possível definir o período latente do patógeno.

Tabela 4. Análise de variância para área abaixo da curva de progresso da desfolha (AACPD), desfolha e área foliar lesionada em função da posição do ramo na copa (altura), em plantas de dois clones híbridos de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* (6021 e 9882), inoculadas com *Cylindrocladium pteridis*

FV	GL	QM	Teste F	P
AACPD				
Clone	1	29779,45	0,93	0,3389
Altura	5	4044636	25,34	<0,0001
Clone*Altura	5	23011,2	0,72	0,6109
Desfolha				
Clone	1	61,83	2,78	0,1023
Altura	5	855,14	38,38	<0,0001
Clone*Altura	5	20,33	0,91	0,4808
Área Foliar Lesionada				
Clone	1	55,08	3,08	0,0922
Altura	2	690,39	38,55	<0,0001
Clone*Altura	2	94,62	5,28	0,0125

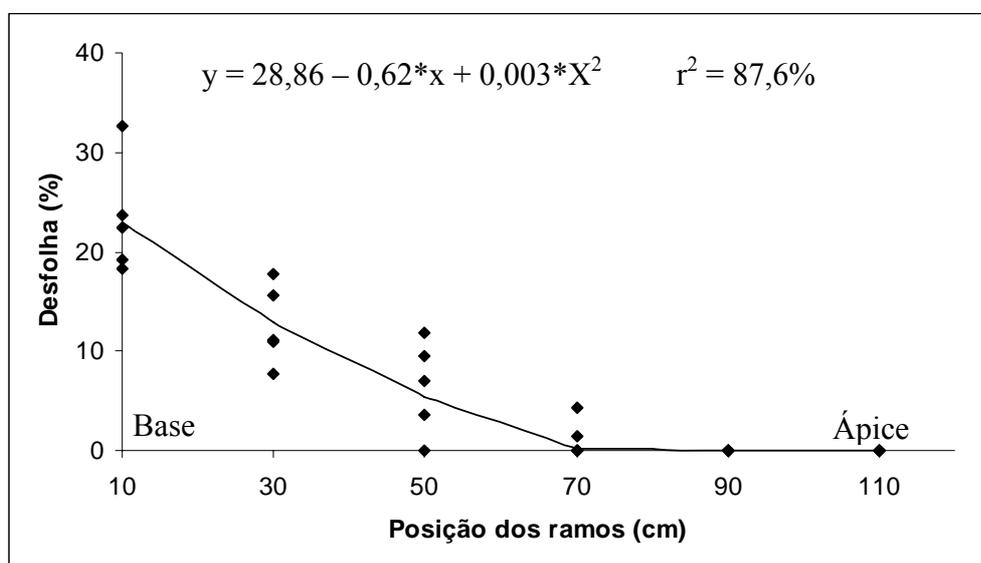


Figura 13. Gradiente de desfolha em função da posição dos ramos na copa, observado em plantas de dois clones híbridos de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* (6021 e 9882), aos 50 dias após inoculação com *Cylindrocladium pteridis*. Posição dos ramos: 10= 0 a 20, 30= 20 a 40, 50= 40 a 60, 70= 60 a 80, 90= 80 a 100 e 110, acima de 100 cm.

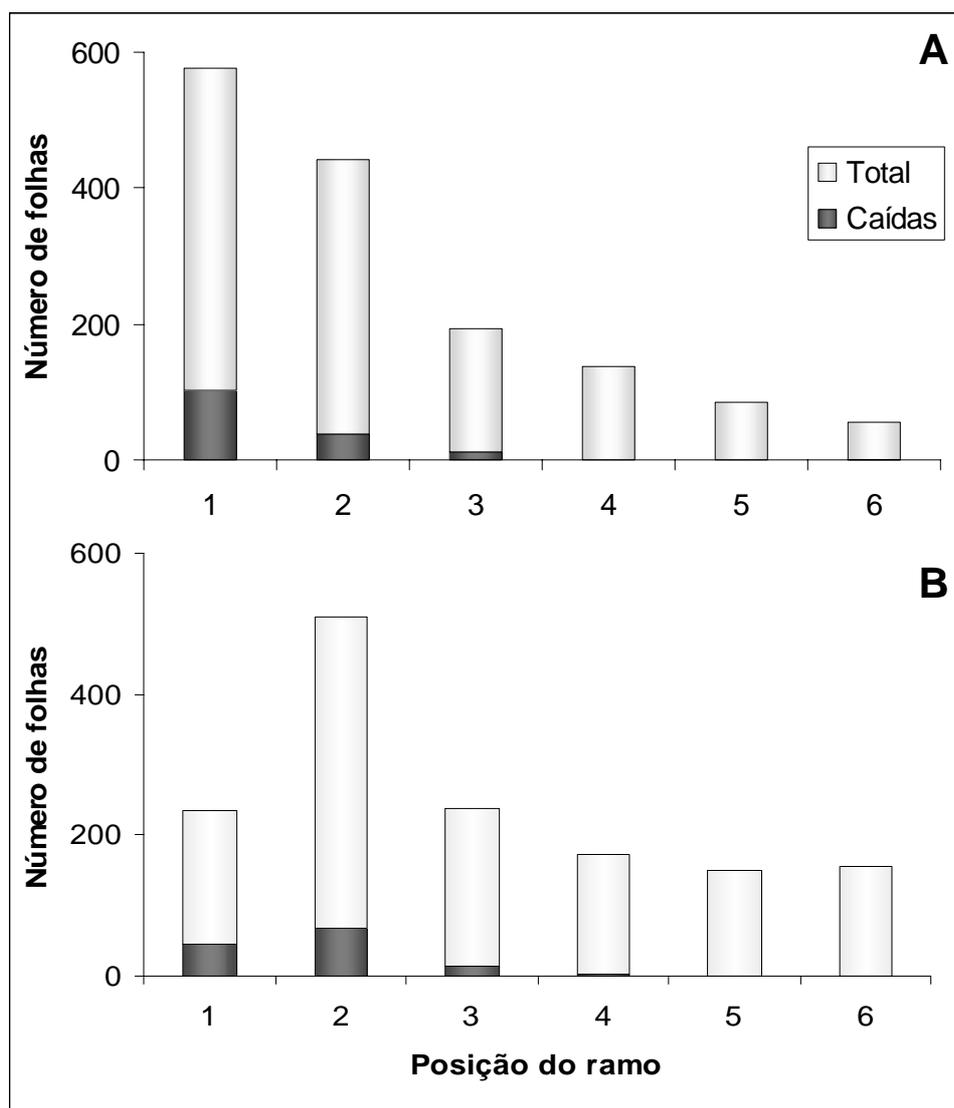


Figura 14. Desfolha causada por *Cylindrocladium pteridis* em plantas de dois clones híbridos de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* (6021 e 9882), aos 50 dias após a inoculação. Posição dos ramos: 1= 0 a 20, 2= 20 a 40, 3= 40 a 60, 4= 60 a 80, 5= 80 a 100 e 6 acima de 100 cm. Barras correspondentes ao desvio padrão das médias não são visualizados devido aos elevados valores da escala.

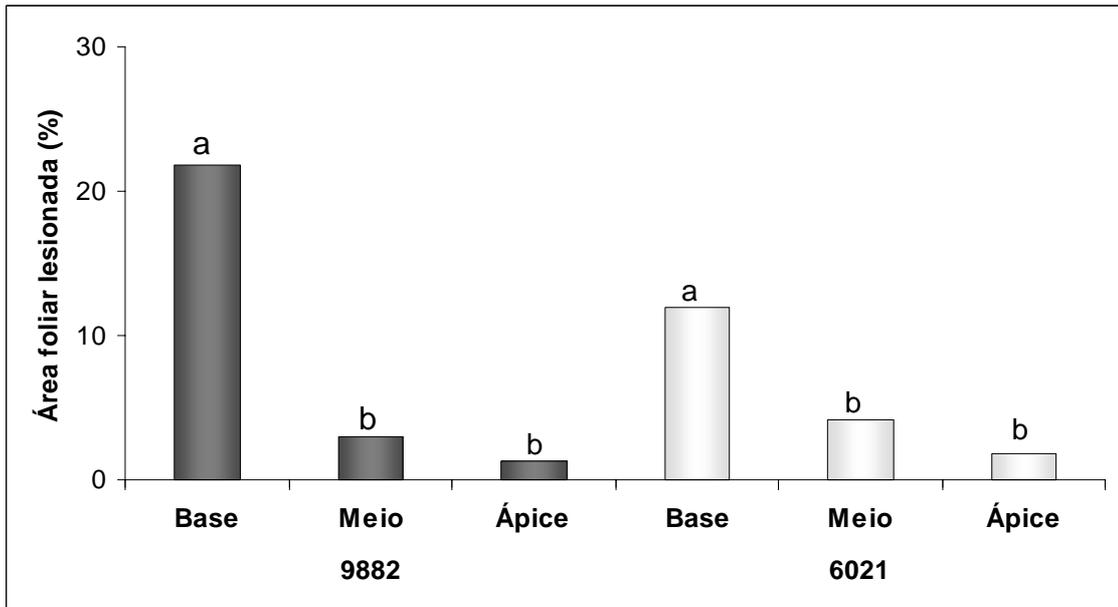


Figura 15. Área foliar lesionada aferida em todas as folhas de ramos situados nos diferentes terços de plantas (base, meio e ápice) de dois clones híbridos de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*, aos 7 dias após inoculação com *Cylindrocladium pteridis*. Médias seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste Fisher (LSD; P=0,05).

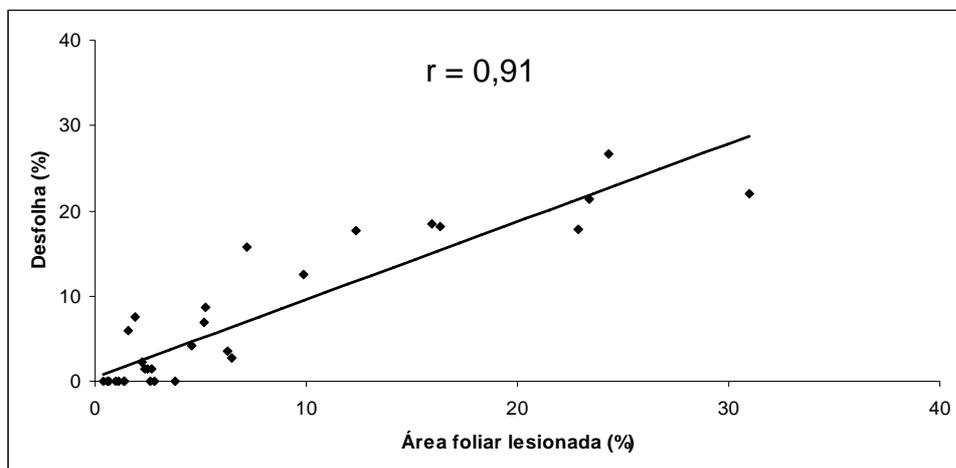


Figura 16. Correlação linear de Pearson entre percentuais de área foliar lesionada e desfolha, obtidos no experimento de distribuição da doença na planta, considerando as médias de dois clones híbridos de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* (6021 e 9882).

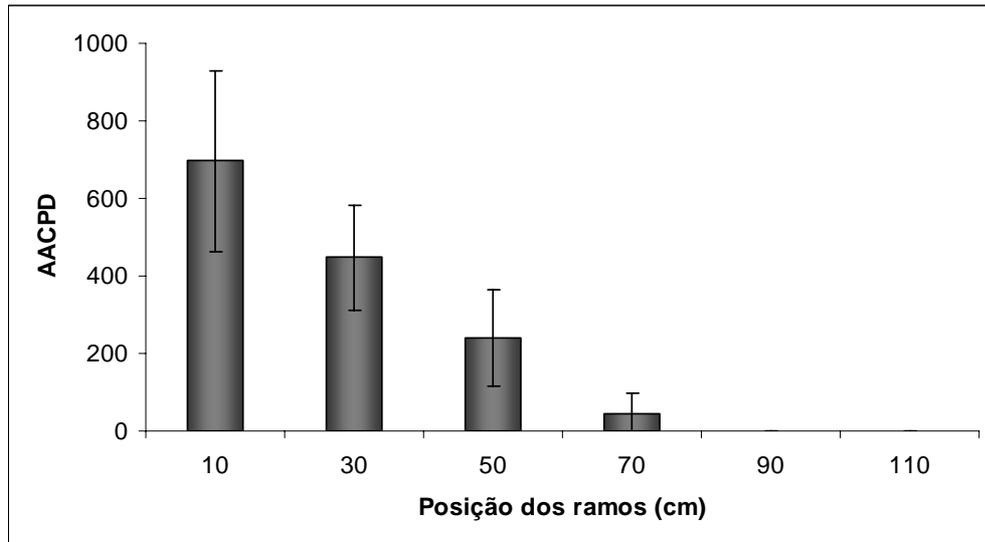


Figura 17. Área abaixo da curva de progresso da desfolha, por posição dos ramos na copa das plantas, com base as médias considerando as médias de dois clones híbridos de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* (6021 e 9882). Linhas verticais correspondem ao desvio padrão da média.

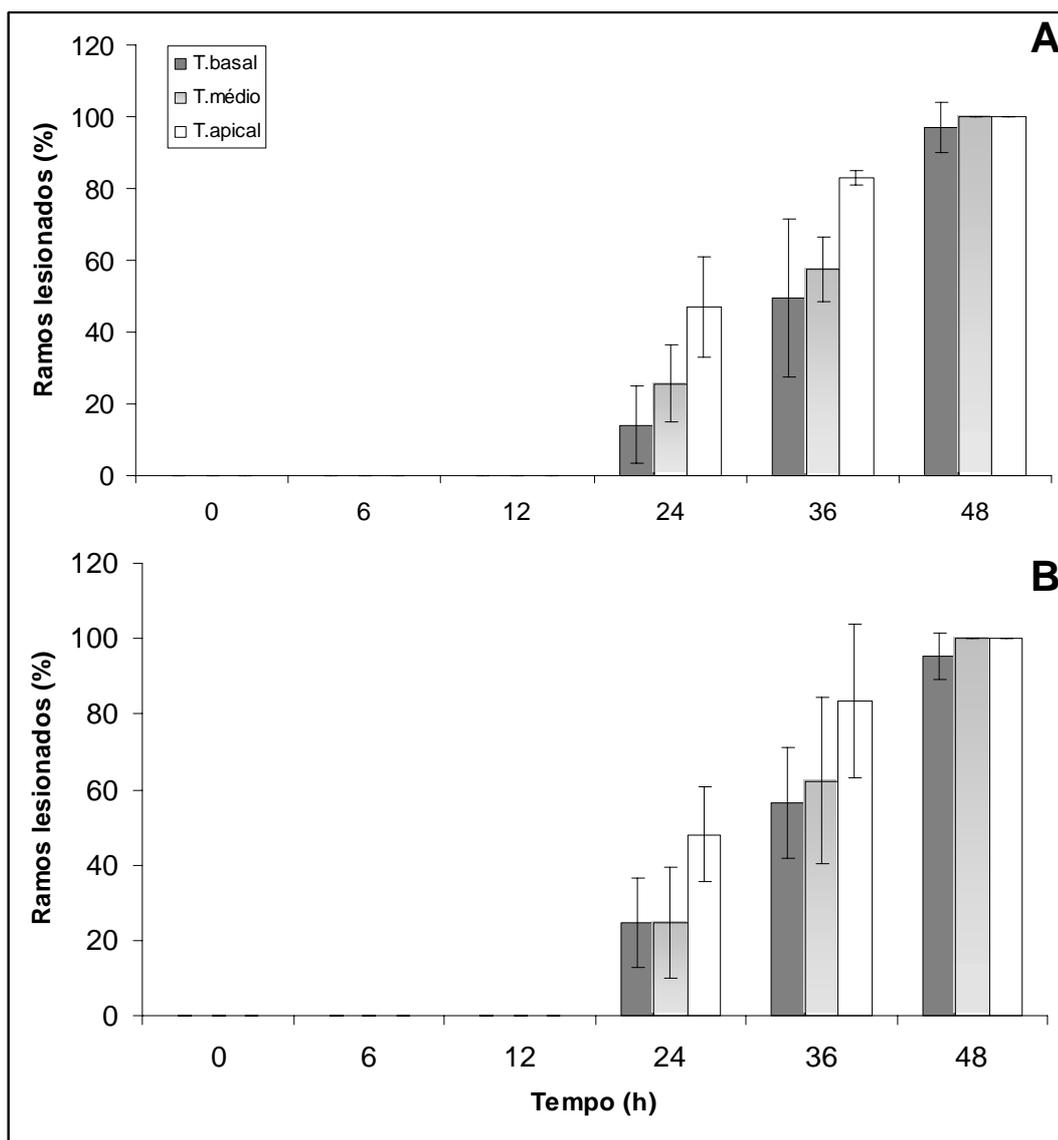


Figura 18. Período médio de incubação (horas) de *Cylindrocladium pteridis* nos terços basal, médio e apical de plantas de dois clones híbridos de *eucalyptus grandis* x *E. urophylla* (A- 6021 e B- 9882). Linhas verticais correspondem ao desvio padrão da média.

3.5. Penetração de *Cylindrocladium pteridis* em eucalipto

Após 6 h da inoculação, todos os conídios observados possuíam pelo menos um tubo germinativo, independentemente do tratamento. Cada conídio produziu em média dois tubos germinativos. Frequentemente, esses se ramificavam e se desenvolviam ao longo da epiderme sem orientação visivelmente definida até encontrar um estômato e penetrar (Figura 19). Na face abaxial de folhas jovens inoculadas com *C. pteridis* foram observados, em média, 10 conídios aderidos, todos germinados, e três eventos de penetração estomática. Por outro lado, na face adaxial de amostras de folhas da mesma idade foram observados, aproximadamente, cinco conídios aderidos, todos germinados, porém sem eventos de penetração. O mesmo padrão ocorreu em folhas velhas, em cuja face abaxial observaram-se, em média, 15 conídios aderidos e três eventos de penetração estomática, por fragmento. Na face adaxial, foram observados, aproximadamente, quatro conídios aderidos, todos germinados, mas sem eventos de penetração. Todas as penetrações observadas ocorreram por estômatos. Não foram constatados apressórios e eventos de penetração direta no tecido do hospedeiro. Estômatos foram observados apenas na face abaxial do limbo foliar, independentemente da idade da folha (Figura 20). Observou-se o intumescimento do tubo germinativo e formação de estruturas semelhantes à apressórios sob estômatos que estavam fechados no momento da penetração (Figura 21a). Em estômatos abertos a penetração ocorreu sem alterações na morfologia do tubo germinativo (Figura 21b).

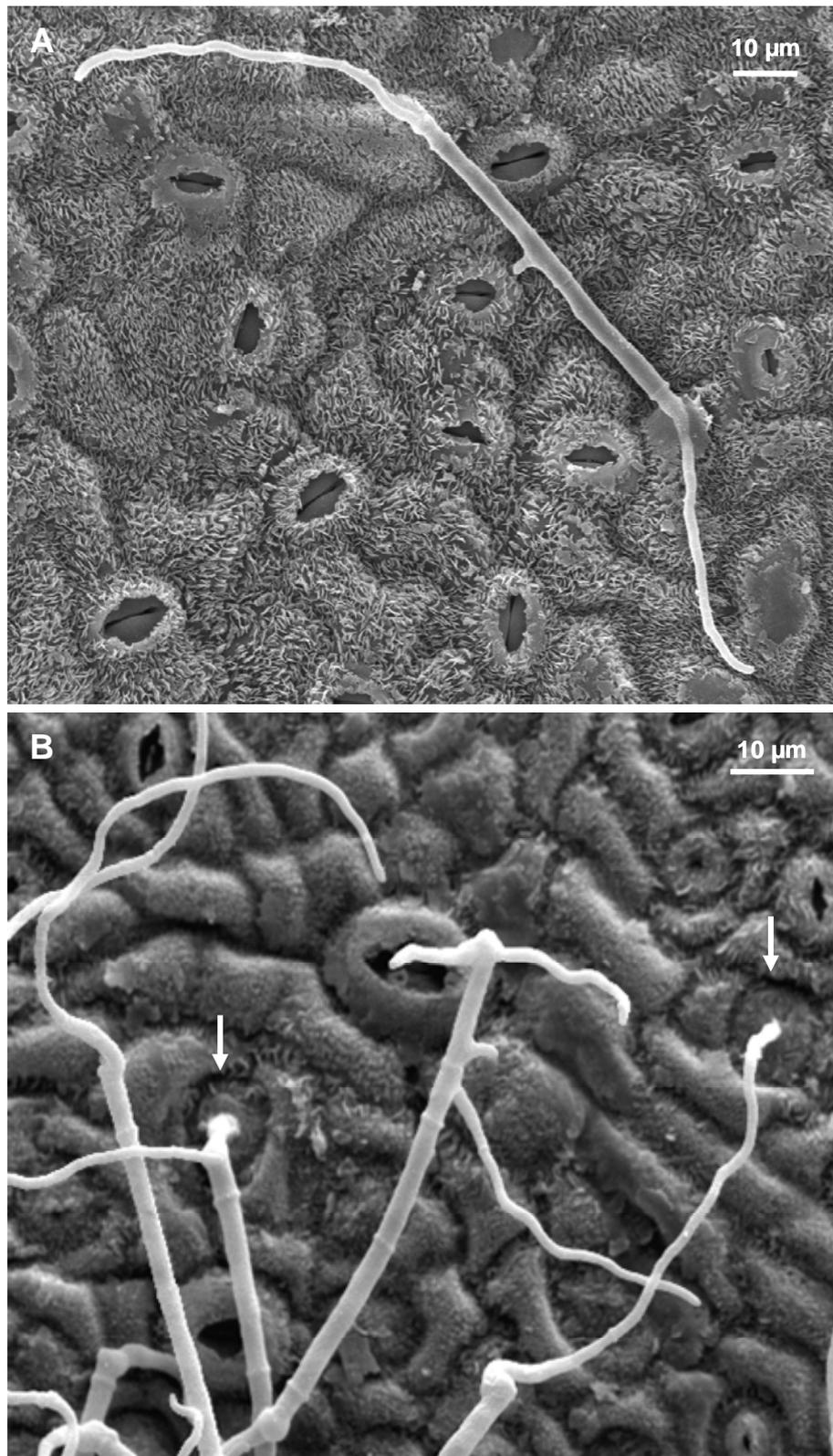


Figura 19. Superfície abaxial de folhas de eucalipto (clone 6021) visualizadas ao microscópio eletrônico de varredura, às 6h após inoculação com *Cylindrocladium pteridis*: A- Germinação de conídio em folha joven; B- Germinação de conídios e penetrações por estômatos (setas brancas) em folhas jovens;

Continua...

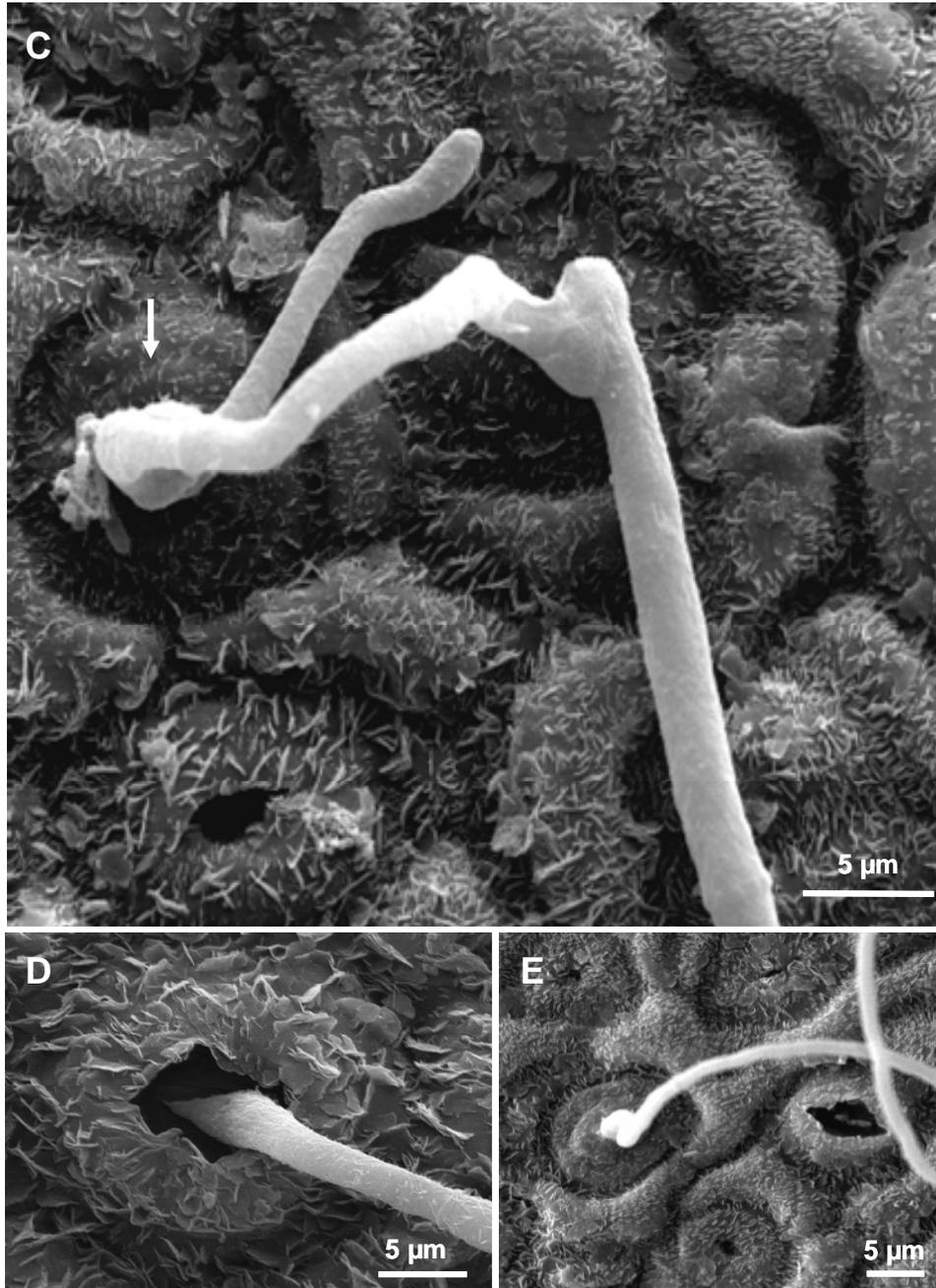


Figura 19 (cont.). C- Extremidade de conídio germinado e penetração estomática (seta branca) com emissão de novo tubo germinativo em folha jovem; D- Penetração estomática em folha velha e E- Penetração estomática em folha jovem.

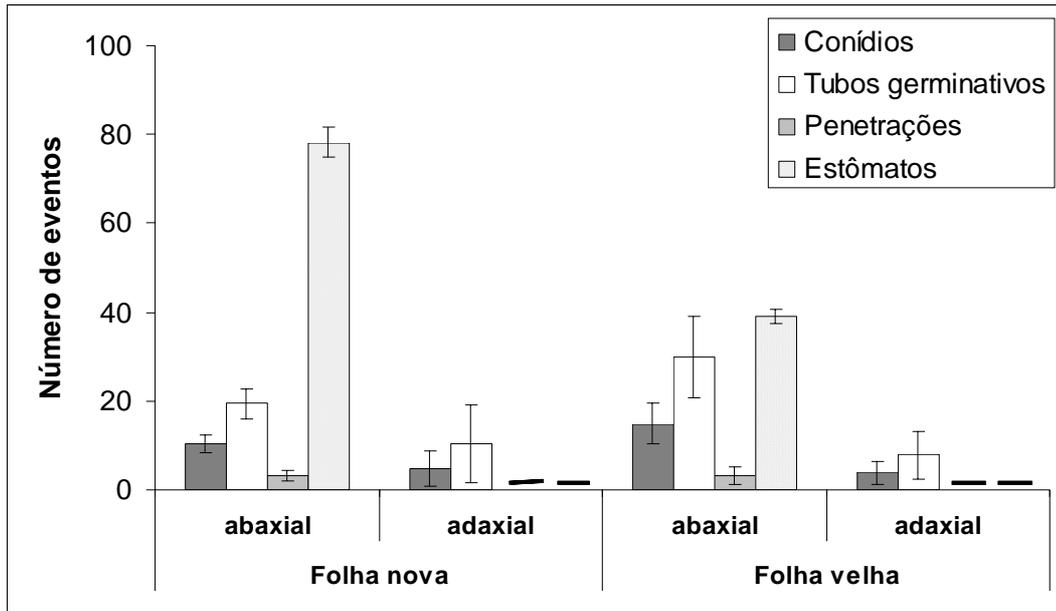


Figura 20. Número de conídios, tubos germinativos e penetrações por estômatos de *Cylindrocladium pteridis* e número de estômatos nas faces abaxial e adaxial de folhas novas e velhas do clone 6021, híbrido de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* 6 h após a inoculação, visualizados ao microscópio eletrônico de varredura. Os valores correspondem à média de cinco repetições. Linhas verticais correspondem ao desvio padrão da média.

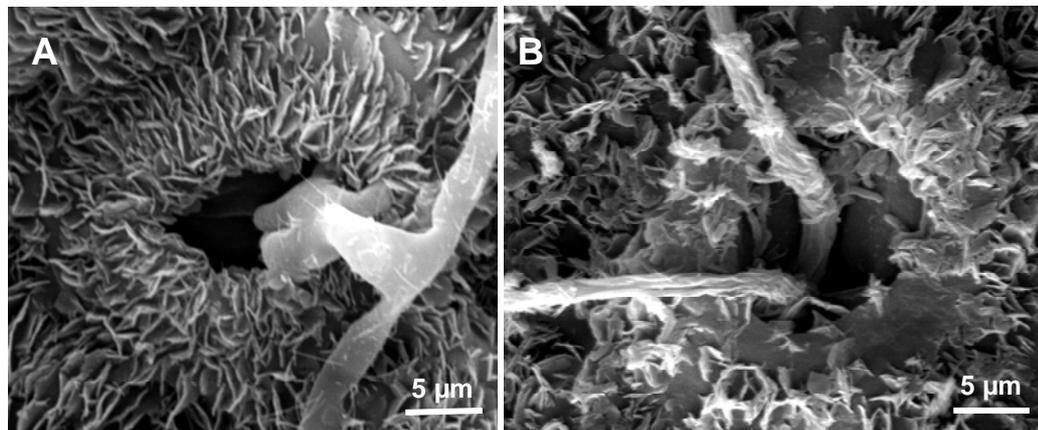


Figura 21. Penetração de *Cylindrocladium pteridis* em estômatos de folhas velhas de eucalipto: A- Estrutura semelhante a apressório sob estômato fechado e B- Penetrações em estômato aberto sem alterações na morfologia dos tubos germinativos.

4. DISCUSSÃO

O desenvolvimento da mancha foliar e desfolha causados por *Cylindrocladium pteridis* em eucalipto pode ser influenciado pelo genótipo do hospedeiro, pela concentração de inóculo, pelo tempo de molhamento foliar após a inoculação, pela idade das plantas e pelo estágio fenológico de seus órgãos. Este trabalho demonstrou que todas estas variáveis afetaram significativamente a severidade da doença.

O aumento da concentração de inóculo aumentou linearmente os valores de desfolha nos dois clones híbridos de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* (6021 e 9882). Entretanto, o percentual médio de desfolha no clone 6021 foi menor em todas as concentrações. A área foliar lesionada também aumentou com o aumento da concentração de inóculo. No entanto, não se observaram diferenças significativas entre os clones. Acredita-se que sob concentrações elevadas de inóculo ocorra um maior número de penetrações, o que resulta em maior severidade da doença. Resultados similares aos deste trabalho foram observados em outros patossistemas (Dillard, 1989; Chakraborty, 1990; Chang e Hwang, 2003).

Plantas de ambos os clones inoculadas com suspensão de inóculo superior a 1×10^4 conídios/mL apresentaram sintomas similares aos observados em condições de campo. No entanto, nas maiores concentrações de inóculo foram observadas muitas lesões na haste dos ramos, o que não é tão comum em infecções naturais. Na maior concentração de inóculo estudada, estas lesões progrediram formando mini-cancros que culminaram na quebra de ramos.

A severidade da mancha foliar e desfolha causadas por *C. pteridis* em eucalipto, foi diretamente proporcional ao tempo de molhamento foliar. Plantas inoculadas e mantidas por 6 e 12h em câmara de nevoeiro apresentaram valores muito baixos de área foliar lesionada e desfolha, sendo necessário pelo menos 24h de molhamento foliar para reproduzir satisfatoriamente os sintomas da doença. O molhamento foliar afeta principalmente o evento de germinação. Nesta fase, ocorre a absorção de água e a ativação de enzimas hidrolíticas responsáveis pela quebra de reservas nutricionais, e posterior formação do tubo germinativo (Mizubuti e Maffia, 2006).

Em eucalipto o maior nível de infecção de *Puccinia psidii*, expressa em número de soros, foi observado em plantas submetidas a 24h de molhamento foliar após a inoculação (Ruiz, 1988). Plantas da mesma espécie inoculadas com *Quambalaria eucalypti* apresentaram um aumento exponencial na severidade da doença, atingindo 40% de área foliar lesionada no maior tempo de molhamento foliar testado (Andrade, 2004). Resultados similares têm sido observados em outros patossistemas (Dillard, 1989; Johnson e Miliczky, 1993; Chang e Hwang, 2003).

Na interação *C. pteridis* x eucalipto, o tempo de 48 h de molhamento foliar foi o que melhor reproduziu os sintomas da doença. Conforme constatado no presente trabalho, após a germinação, o tubo germinativo de *C. pteridis* desenvolve na superfície foliar até sua penetração pelos estômatos. Assim, provavelmente, nos maiores períodos de molhamento um maior número de tubos germinativos alcançam o sítio de penetração, o que resulta no aumento da severidade da doença.

No presente estudo a idade das plantas afetou significativamente a infecção de *C. pteridis* em ambos os clones. Plantas mais velhas foram mais suscetíveis que plantas jovens, sendo as de 180 dias as que apresentaram os maiores níveis de desfolha, independentemente do clone. Enquanto, que plantas com 60 dias de idade, de ambos os clones, não exibiram desfolha e a área foliar lesionada também foi menor. Plantas do clone 6021 apresentaram menor severidade da doença, independentemente da idade.

O efeito da idade de plantas no progresso de doenças tem sido objeto de muitos estudos (Pfender, 2004; Whalen, 2005). Em batata, plantas muito jovens são suscetíveis a *Phytophthora infestans*, plantas com idade intermediária são resistentes e plantas velhas, com mais de 70 dias de plantio, tornam-se suscetíveis novamente (Mooi, 1965; Fry e Apple, 1986; Stewart, 1990). Plantas jovens de *C. lacryma* inoculadas com *B. coicis* apresentaram menor severidade da doença em relação a plantas velhas (Chang e Hwang, 2003). Embora não haja até o momento explicações conclusivas sobre a

influência da idade na infecção de *C. pteridis* em eucalipto, acredita-se que plantas relativamente mais velhas, por possuírem maior número de folhas velhas, estariam mais predispostas à infecção. Portanto, a idade da planta no momento da inoculação deve ser considerada em estudos deste patossistema.

A posição dos ramos na copa das plantas de eucalipto afetou significativamente os valores de área foliar lesionada e desfolha, que foram significativamente maiores em folhas dos ramos basais de ambos os clones. A área foliar lesionada, também foi maior em folhas do terço basal, independentemente do clone avaliado. A partir de 80 cm de altura não se observou desfolha em nenhum dos dois clones.

Analogamente ao encontrado neste trabalho, em outros patossistemas órgãos fisiologicamente mais velhos, são mais suscetíveis que órgãos jovens. Em condições de campo, acreditava-se que folhas basais de plantas de batata seriam mais severamente infectadas por *P. infestans* devido às condições microclimáticas nas porções inferiores da planta (Harrinson, 1992). No entanto, inoculações deste oomiceto em folhas destacadas de batata mostraram que folhas velhas são mais suscetíveis à requeima que folhas jovens, independentemente da arquitetura da planta ou das condições de ambiente (Visker et al., 2003). Em plantas de batata, folhas jovens são mais resistentes a *A. solani*, por possuírem um maior número de células por unidade de área e, provavelmente, uma maior quantidade de transcritos relacionados à resposta de defesa da planta (Rodriguez, 2003). No patossistema *A. solani* – tomateiro, o maior nível de expressão dos genes de defesa associado a uma maior velocidade de resposta, pode ser um dos fatores responsáveis pela menor severidade da doença observada na parte apical das plantas de tomate (Scheuermann, 2006). É provável que o mesmo ocorra na interação *C. pteridis* – eucalipto.

A análise de microscopia eletrônica de varredura realizada não mostrou diferenças quanto ao número de penetrações entre folhas jovens e velhas, o que indica que a resistência de folhas jovens está provavelmente relacionada com mecanismos que atuam após a penetração do patógeno. A diferença observada entre o número de penetrações nas faces abaxial e adaxial, de folhas jovens e velhas, pode ser devido ao fato da penetração de *C. pteridis* ocorrer exclusivamente por estômatos, e estes ocorrerem somente na face abaxial, independentemente da idade da folha.

Os percentuais de área foliar lesionada e de desfolha foram significativamente maiores no terço basal das plantas, independentemente do ensaio e do clone avaliado. Nos terços mediano e apical não se observou desfolha e os percentuais de área foliar

lesionada foram muito baixos. Com base nestas observações, em estudos do patossistema *C. pteridis* - *Eucalyptus* spp., devem se avaliar folhas de ramos de posições correspondentes e plantas da mesma idade.

Em todos os ensaios a área foliar lesionada foi correlacionada a desfolha. Portanto, a avaliação de qualquer uma destas variáveis fornece resultados similares e consistentes. No entanto, a desfolha por ser de mensuração mais fácil e mais rápida, é a variável ideal para estimar a severidade da doença em plantas de eucalipto.

5. CONCLUSÕES

1. A penetração de *C. pteridis* em folhas de eucalipto ocorre tipicamente por estômatos;
2. Não há diferença no número de penetrações entre folhas jovens e velhas;
3. Deve-se aferir a desfolha em ramos do terço basal de plantas com 120 dias de idade inoculadas com suspensão de inóculo a 1×10^4 conídios/mL e mantidas em câmara de nevoeiro por 48 h, sob 40% da luminosidade ambiente.

6. Referências Bibliográficas

- AGRIOS, G.N. (1997) **Plant Pathology**. 4 ed. 635p.
- ALFENAS, A.C. (1986) Fungos do gênero *Cylindrocladium* como patógenos florestais no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, v.11, 275-277.
- ALFENAS, A.C.; ZAUZA, E.A.; MAFIA, R.G. e ASSIS, T.F. (2004) **Clonagem e doenças do eucalipto**. Viçosa, MG. Editora UFV.
- ALMEIDA, O.C. e BOLKAN, H.A. (1981) Ocorrência e distribuição do gênero *Cylindrocladium* no Distrito Federal. **Fitopatologia Brasileira**, v.6, nº2, 2233-228.
- ANDRADE, G.C.G. (2004). *Quambalaria eucalypti*: Características culturais, infectividade e quantificação da intensidade da doença em eucalipto. Viçosa, MG: UFV, Tese (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Viçosa. 47p.
- BROGGIO, M; RANUCCI, A. (1992) *In vitro* infection for potato early blight *Alternaria solani*. **Rivista di Agricola, Subtropicale e tropicale**, 355-366.
- CEDEÑO, L. e CARRERO, C. (2000) *Cylindrocladium pteridis* causando manchas foliares em eucaliptos de Portuguesa-Venezuela. **Revista Florestal Venezolana**. v.44, 101-106.
- CHANG, S.W. e HWANG, B.K. (2003) Effects of plant age, leaf position, inoculum density, and wetness period on *Bipolaris coicis* infection in Adlays of Differing Resistance. **Plant Disease**, v.84 nº 7: 821-826.
- CHAKRABORTY, S. (1990) Expression of resistance to *Colletotrichum gloeosporioides* em *Stylosanthes scabra* at different inoculum concentrations and day-night temperatures. **Australasian Journal of Agricultural Research**. 41: 89-100.
- CROUS, P.W. e WINGFIELD, M.J. (1994) A monograph of *Cylindrocladium*, including anamorph of *Calonectria*. **Mycotaxon**, 51: 341-435.
- DIANESE, J.C. (1986) Problemas patológicos das florestas plantadas do Vale do Rio Jarí. **Fitopatologia Brasileira**, v.11, nº2, 274-275.
- DILLARD, H.R. (1989) Effect os temperature, wetness duration, and inoculum density on infection and lesion development of *Colletotrichum coccodes* on tomato fruit. **Phytopathology**. 79: 1063-1066.
- FERREIRA, F.A. (1989) **Patologia florestal: principais doenças florestais no Brasil**. Viçosa: Sociedade de Investigações Florestais – SIF, 570p.

- FERREIRA, F.A.; ALFENAS, A.C.; MOREIRA, A.M. e DEMUNER, N.L. (1995) Mancha-de-pteridis doença foliar de eucalipto em áreas tropicais brasileiras. **Fitopatologia Brasileira**. v.20 n°1: 107-110.
- FERREIRA, F.A. e MILANI, D. (2002) **Diagnose visual e controle das doenças abióticas e bióticas do eucalipto no Brasil**. Mogi Guaçu, SP: International Paper. 98p.
- FRY, W.E. and APPLE, A.E. (1986) Disease management implications of age-related changes in susceptibility of potato foliage to *Phytophthora infestans*. **American Potato**. 63: 47-56.
- GLAZEBROOK, J. (2005) Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. **Annual Review of Phytopathology**. 43: 205-227.
- HARRINSON, J.G. (1992) Effects of the aerial environment on late blight of potato foliage, a review. **Plant Pathology**. 41: 384-416.
- HODGES, C.S.; REIS, M.S. e FERREIRA, F.A. (1975) Uma nova enfermidade de acículas de pinus no Brasil causada por *Cylindrocladium pteridis*. **Brasil Florestal**, v.6, n°21, 8-11.
- JOHNSON, D.A. and MILICZKY, E.R. (1993) Effects of wounding and wetting duration on infection of potato foliage by *Colletotrichum coccodes*. **Plant disease**. 77: 13-17.
- MAIERO, M. (1990) Inheritance of collar rot resistance in the tomato breeding lines c1943 and NC EBR-2. **Phytopathology**, v.80, 1365-1368.
- MIZUBUTI, E.S.G. e MAFFIA, L. A. (2006) Introdução à fitopatologia. Viçosa: Ed. UFV. (Caderno didático), 190p.
- MOOI, J.C. (1965) Experiments on testing field resistance to *Phytophthora infestans* by inoculation cut leaves of potato varieties. **European Potato Journal**. 8: 182-183.
- PFENDER, W.F. (2004) Role of phenology in host susceptibility and within-plant spread of stem rust during reproductive development of perennial ryegrass. **Phytopathology**, v.94, n°3, 308-316.
- POLTRONIERE, L.S.; ALFENAS, A.C.; ZAUZA, E.A.; TRINDADE, D.R.; POLTRONIERE, M.C. (2004) *Cylindrocladium pteridis* leaf spot of Apricot tree in the state of Para, Brazil, **Fitopatologia Brasileira**, jan-fev. 2004, v.29, n°.1, p.104.
- RIAZ, M.; BOCKUS, W.W.; DAVIS, A. (1991) Effects of wheat genotype, time after inoculation, and leaf age on conidia production by *Drechslera tritici-repentis*. **Phytopathology**, v.81 n° 10. 1298- 1301.

- RODRIGUEZ, M.A.D. (2003) Componentes da resistência de batata a *Alternaria solani*. Viçosa, MG: UFV, Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Viçosa. 59p.
- ROTEM, J. (1994) The genus *Alternaria*: biology, epidemiology and pathogenicity. St. Paul: **APS Press**. 326p.
- RUIZ, R.A.R. (1989) Epidemiologia e controle químico da ferrugem (*Puccinia psidii* Winter) do eucalipto. Viçosa, MG: UFV, Tese (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Viçosa. 108p.
- SCHEUERMANN, K. K. (2006) Identificação de genes diferencialmente expressos na interação tomateiro – *Alternaria solani*. Viçosa, MG. UFV. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Viçosa. 86p.
- SILVA, G.S. e SOUZA, E.A.P. (1981) Mancha foliar do coqueiro causada por *Cylindrocladium pteridis* Wolf. **Fitopatologia Brasileira**. v.6 n°3: 515-517.
- SOBERS, E.K. (1968) Morphology and host range of *Cylindrocladium pteridis*. **Phytopathology**, v.58, n°9, 1265-70.
- STEVENSON, W.R. (1994) The potential impact of field resistance to early blight on fungicide inputs. **American Potato Journal**, v.71, 317-324.
- STEWART, H.E. (1990) Effect of plant age and inoculum concentration on expression of major gene resistance to *Phytophthora infestans* in detached potato leaflets. **Mycological research**. 94: 823-826.
- VALE, F.X.R., FERNANDES FILHO, E.I. e LIBERATO, J.R. (2003) QUANT. A software plant disease severity assessment. 8th International Congress of Plant Pathology, Christchurch New Zealand, p.105.
- VISKER, M.H.P.W.; KEIZER, L.C.P.; BUDDING, D.J.; VAN LOON, L.C.; COLON, L.T.; STRUIK, P.C. (2003) Leaf position prevails over plant age and leaf age in reflecting resistance to late blight in potato. **Phytopathology**, v. 93, n° 6. 666-674.
- WHALEN, M.C. (2005) Host defence in a developmental context. **Molecular Plant Pathology**. v.6 n°3: 347-360.
- WOLF, F.A. (1926) Brown leaf spot of leather leaf fern. J. Elisha Mitchell Sci. Soc. 42:55-62.