

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS  
CÂMPUS DE BOTUCATU

**CARACTERIZAÇÃO ANATÔMICA QUANTITATIVA E  
COMPOSIÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS EM TRÊS ESTÁGIOS  
FOLIARES DE CLONES DE EUCALIPTO E SUA RELAÇÃO COM A  
FERRUGEM**

**RENATA RUIZ SILVA SOUZA**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agronômicas da UNESP - Campus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Agronomia (Proteção de Plantas).

BOTUCATU-SP

Janeiro - 2008

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS  
CÂMPUS DE BOTUCATU

**CARACTERIZAÇÃO ANATÔMICA QUANTITATIVA E  
COMPOSIÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS EM TRÊS ESTÁGIOS  
FOLIARES DE CLONES DE EUCALIPTO E SUA RELAÇÃO COM A  
FERRUGEM**

**RENATA RUIZ SILVA SOUZA**

Engenheira Florestal

Orientador: Prof. Dr. Edson Luiz Furtado

Co-orientador: Prof. Dr. Roberto Antonio Rodella

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agronômicas da UNESP - Campus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Agronomia (Proteção de Plantas).

BOTUCATU-SP

Janeiro - 2008

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO - SERVIÇO TÉCNICO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP - FCA LAGEADO - BOTUCATU (SP)

S731c Souza, Renata Ruiz Silva, 1981-  
Caracterização anatômica quantitativa e composição de óleos essenciais em três estágios foliares de clones de eucalipto e sua relação com a ferrugem / Renata Ruiz Silva Souza. - Botucatu : [s.n.], 2008.  
viii, 104 f. : il. color., gráfs., tabs.

Dissertação (Mestrado) -Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2008  
Orientador: Edson Luiz Furtado  
Co-orientador: Roberto Antonio Rodella  
Inclui bibliografia.

1. Essências e óleos essenciais. 2. Folhas - Anatomia. 3. Eucalipto - Resistência a doenças e pragas. 4. Puccinia psidii. 5. Eucalipto. I. Furtado, Edson Luiz. II. Rodella, Roberto Antonio. III. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Campus de Botucatu). Faculdade de Ciências Agrônômicas. IV. Título.

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS**  
**CAMPUS DE BOTUCATU**

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

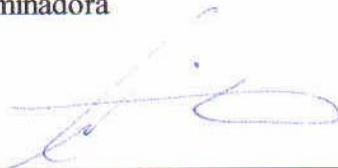
**TÍTULO: “CARACTERIZAÇÃO ANATÔMICA QUANTITATIVA E COMPOSIÇÃO  
DE ÓLEOS ESSENCIAIS EM TRÊS ESTÁGIOS FOLIARES DE CLONES  
DE EUCALIPTO E SUA RELAÇÃO COM A FERRUGEM”**

ALUNA: RENATA RUIZ SILVA SOUZA

ORIENTADOR: PROF. DR. EDSON LUIZ FURTADO

CO-ORIENTADOR: PROF. DR. ROBERTO ANTONIO RODELLA

Aprovado pela Comissão Examinadora



---

PROF. DR. EDSON LUIZ FURTADO



---

PROF<sup>a</sup> DR<sup>a</sup> MARCIA ORTIZ MAYO MARQUES



---

PROF<sup>a</sup> DR<sup>a</sup> MARÍLIA CONTIN VENTRELLA

Data da Realização: 04 de janeiro de 2008.

**AOS MEUS PAIS, SÔNIA E PAULO,**

**AO MEU ESPOSO E MEU AMOR, CLEBERSON**

**AO MEU IRMÃO, GUSTAVO**

**Á MINHA QUERIDA WENDY (SAUDADES),**

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

*À Deus pela presença constante em minha vida.*

*À Faculdade de Ciências Agronômicas de Botucatu-UNESP, pela minha formação profissional, pessoal e pela oportunidade de realizar o mestrado.*

*Ao Prof. Dr. Edson Luiz Furtado por estar presente nos momentos mais importantes da minha vida, sendo responsável por grande parte da minha formação. Agradeço pela amizade, paciência, compreensão, pelos ensinamentos e apoio prestado, bem como pela confiança depositada, fazendo com que eu acreditasse sempre no meu trabalho e me motivando a seguir em frente.*

*Ao Prof. Dr. Roberto Antonio Rodella, do Instituto de Biociências de Botucatu, com quem tive o prazer de conviver desde a graduação, sempre me acolhendo com muito carinho, paciência e boa vontade. Agradeço, pela amizade, por toda a dedicação prestada, pela confiança, incentivo, por auxiliar em todas as fases da dissertação, contribuindo com todo o seu conhecimento, bem como pela co-orientação. Agradeço também pelas boas horas de riso e descontração e por estar sempre presente em todas as fases importantes da minha vida profissional e pessoal.*

*Ao saudoso Prof. Dr. Nilton Luiz de Souza, agradeço pela oportunidade de ter sido sua aluna e de ter conhecido o professor e pesquisador brilhante e a pessoa maravilhosa que era.*

*A todos os professores da graduação e pós-graduação, sem os quais eu não teria chegado até aqui.*

*À Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup>. Marina Aparecida de Moraes Dallaqua, responsável pelo laboratório de anatomia vegetal do Instituto de Biociências de Botucatu, pela utilização do laboratório e ótima recepção. Ao técnico do laboratório Kleber pelo auxílio no preparo das amostras e na*

*utilização dos equipamentos e funcionamento do laboratório. Às pós-graduandas Tati, Clívia, Natália, Letícia, Shelly, Milena, Renata, Inara, por serem tão prestativas em todos os momentos e pela amizade. Em especial à Tatiane, por ter destinado parte de seu tempo, me auxiliando nas fotos de anatomia vegetal e microscopia eletrônica de varredura.*

*Às Professoras Rita de Cassia Sindronia Maimoni-Rodella e Silvia Rodrigues Machado, do Instituto de Biociências de Botucatu, pelo auxílio prestado, amizade e pelo carinho com que me receberam.*

*Á Prof.ª Dr.ª. Márcia Ortiz Mayo Marques, do Instituto Agronômico de Campinas, por possibilitar a realização de parte deste trabalho, pela amizade, disponibilidade e recepção.*

*Aos funcionários do Laboratório de Fitoquímica do IAC, em especial à Maria Aparecida, Roselaine, Lenita e Marcos, que disponibilizaram grande parte do seu tempo para me auxiliar na extração e análise dos óleos essenciais e pela amizade formada.*

*Á empresa Votorantim Celulose e Papel S.A. pelo fornecimento do material vegetal utilizado neste trabalho e por fornecer todos os subsídios necessários à realização do mesmo. Ao Pesquisador Florestal Donizete da Costa Dias e o técnico Elieser de Oliveira Freitas por toda a colaboração; bem como dos funcionários e da estagiária Gabriela que me auxiliaram nas coletas no campo.*

*Às minhas grandes amigas Maria Rita e Heloiza, por me acolherem em sua casa com muito carinho, e à grande amiga Letícia, irmãzinha, que foram minha família em Botucatu e que estarão sempre em meu coração.*

*Às amigas Martha, Caroline, Juliana e Cristina pela amizade e pelos momentos de alegria e dificuldade compartilhados durante o mestrado. Aos amigos, Adimara, Paola, Bryan, Karolina, Kelly, Marcus, Cecília, Tadeu, Djanira, Helenize, Danila, Haroldo e Adriane, pela amizade, convivência, pela força e estímulo que me deram para seguir em frente e não desistir. À amiga Sandra Elizabeth de Souza, pela amizade e auxílio na metodologia utilizada para a inoculação do patógeno.*

*Aos meus pais, Sônia e Paulo e ao meu irmão Gustavo, por serem o exemplo na minha vida, pelo amor, dedicação e apoio constante, e principalmente, por serem os grandes responsáveis por eu ter chegado até aqui e ter vencido todas as dificuldades. Agradeço por serem pessoas tão maravilhosas e por ter a sorte de fazer parte desta família. Amo vocês.*

*Ao meu esposo Cleberson, amor da minha vida, que provou que o amor vence qualquer distância e, que mesmo longe em vários momentos importantes de nossas vidas, sempre compreendeu e me deu forças para seguir em frente. Agradeço pelo amor, dedicação, paciência e pelos momentos maravilhosos que passamos juntos, te amo muito.*

*Aos meus avós, Maria e Eduardo, pelo amor, pelas orações e dedicação sempre, amo vocês.*

*Á minha lindinha Wendy por compreender a falta de tempo para lhe dar atenção e por aliviar minhas tensões nos momentos difíceis, me recebendo sempre com muito carinho. Agradeço por todos esses anos maravilhosos e à felicidade que você trouxe para a minha vida.*

*A todos os funcionários do Departamento de Produção Vegetal – Defesa Fitossanitária, pelo carinho, estímulo e auxílio em vários momentos, em especial, à Maria do Carmo, Domingos, Norberto, Ana Rita, Adriane, Nivaldo, Vera, Fátima e Dinha.*

*Aos funcionários da Biblioteca pela amizade, desde a graduação, carinho e apoio sempre que necessitei.*

*Á Capes pelo apoio e concessão da bolsa de estudos.*



## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
1 RESUMO.....	01
2. ABSTRACT.....	03
3. INTRODUÇÃO.....	05
4. REVISÃO DE LITERATURA.....	09
4.1. Ferrugem do eucalipto.....	09
4.2. Relações entre a anatomia vegetal e a ocorrência de doenças.....	13
4.3. Relações entre óleos essenciais e a resistência de plantas a patógenos.....	16
<b>CAPÍTULO I</b>	
Anatomia foliar quantitativa em três estágios de desenvolvimento de clones de eucalipto e sua relação com a ferrugem.....	22
RESUMO .....	23
SUMMARY.....	24
INTRODUÇÃO.....	25
MATERIAL E MÉTODOS.....	28
<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	
Características anatômicas da região internervural das folhas dos híbridos de <i>Eucalyptus grandis</i> x <i>Eucalyptus urophylla</i> .....	30
Relação dos caracteres anatômicos quantitativos com a ferrugem.....	30
CONCLUSÕES.....	35
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	35
<b>CAPÍTULO II</b>	
Avaliação da patogênese de <i>Puccinia psidii</i> pela micromorfologia da epiderme foliar de clones de eucalipto.....	51
RESUMO.....	52
SUMMARY.....	53
INTRODUÇÃO.....	54
MATERIAL E MÉTODOS.....	55
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	56

CONCLUSÕES.....	60
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60
CAPÍTULO III	
Composição de óleos essenciais em três estágios de desenvolvimento foliar de clones de eucalipto e sua relação com a ferrugem.....	71
RESUMO.....	72
SUMMARY .....	73
INTRODUÇÃO.....	74
MATERIAL E MÉTODOS.....	76
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	77
CONCLUSÕES.....	81
REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS.....	81
5. CONCLUSÕES GERAIS.....	92
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	93

## 1. RESUMO

Na natureza, a maioria das plantas é resistente aos diferentes patógenos, e essa resistência pode estar relacionada à existência de substâncias tóxicas aos microrganismos. As reações bioquímicas, que ocorrem nas células do hospedeiro, produzem substâncias que se mostram tóxicas ao patógeno ou criam condições adversas para o seu crescimento no interior da planta, contribuindo significativamente para a resistência. Além dos fatores bioquímicos existem mecanismos estruturais de defesa que atuam conferindo resistência ao hospedeiro à infecção por patógenos. O presente trabalho procurou quantificar os caracteres anatômicos foliares, em três estágios (E1, E3 e E5) de desenvolvimento; analisar a patogênese de *Puccinia psidii* pela micromorfologia da folha e caracterizar a composição dos óleos essenciais de clones de eucalipto, a fim de relacionar esses fatores com a resistência à ferrugem, causada pelo fungo *Puccinia psidii*. Para o estudo anatômico e dos óleos essenciais, foram selecionados clones com diferentes graus de resistência, sendo o clone A resistente, o clone B suscetível e o clone C altamente suscetível. Para a microscopia eletrônica de varredura foram selecionados os clones A e C. Através da anatomia quantitativa da região internervural da folha, o clone A apresentou diferenças estruturais que podem estar ligadas à resistência desse material, como: maior espessura das cutículas abaxial e adaxial, maior espessura do parênquima paliçádico adaxial, maior % de parênquima paliçádico, maior número e área de cavidades oleíferas, menor espessura da epiderme abaxial e menor espessura e % de parênquima lacunoso. Estes parâmetros podem dificultar a penetração do patógeno e a sua

colonização nos tecidos do hospedeiro. Além disso, o estudo anatômico possibilitou a discriminação do primeiro estágio foliar do clone altamente suscetível em relação aos demais, indicando a relação desses caracteres com a ferrugem, já que esta tem preferência por folhas novas e órgãos em início de desenvolvimento. A análise dos óleos essenciais e a quantificação das substâncias presentes demonstraram, por meio de análise estatística multivariada, a discriminação do primeiro estágio foliar de todos os clones, bem como a diferenciação entre os clones avaliados. O clone altamente suscetível apresentou alta porcentagem de  $\gamma$ -terpineno e o clone resistente diferiu pela maior porcentagem de limoneno, podendo essas substâncias ser consideradas como marcadores bioquímicos de resistência à ferrugem do eucalipto. A micromorfologia revelou, para o clone A (resistente) a manutenção da sua resistência, nos três estágios foliares, em função da ausência de sintomas, provocados pelo patógeno, na superfície foliar e pela menor incidência de apressórios formados. Os resultados demonstram que os caracteres anatômicos quantitativos e bioquímicos podem influenciar na resistência de uma planta a determinada doença. Dessa forma, cutículas mais delgadas facilitam a penetração do patógeno na planta e epidermes mais espessas disponibilizam maior quantidade de nutrientes, necessários ao desenvolvimento do agente causal. Uma vez que alguns metabólitos secundários atuam na defesa da planta contra agentes invasores, a composição e quantificação dos óleos essenciais, bem como a presença de maior área e número de cavidades secretoras dessas substâncias, são importantes na resistência do hospedeiro ao *Puccinia psidii*.

---

Palavras-chave: óleos essenciais, anatomia foliar, resistência, *Puccinia psidii*, eucalipto.

**Quantitative anatomic characterization and composition of essential oils at three leaf stages of eucalyptus clones and their relationship with rust.** Botucatu, 2008. 104p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Proteção de Plantas) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista.

Author: RENATA RUIZ SILVA SOUZA

Adviser: EDSON LUIZ FURTADO

Co-adviser: ROBERTO ANTONIO RODELLA

## **2. ABSTRACT**

In nature, most plants are resistant to the many existing pathogens, and such resistance could be related to the existence of substances that are toxic to microorganisms. The biochemical reactions that take place in cells of the host produce substances that are toxic to the pathogen or create adverse conditions for their growth inside the plant, significantly contributing toward resistance. In addition to biochemical factors, there are structural defense mechanisms that act by conferring resistance to the host against infection by pathogens. This work's objective was to quantify leaf anatomical characters at three developmental stages (E1, E3, and E5); analyze *Puccinia psidii* pathogenesis via leaf micromorphology; and characterize the essential oils composition of eucalyptus clones, in order to establish a relationship between these factors and resistance to rust caused by the fungus *Puccinia psidii*. In the anatomical and

essential oils study, clones with different degrees of resistance were selected as follows: clone A was considered resistant, clone B susceptible, and clone C highly susceptible. Clones A and C were selected for scanning electron microscopy. By quantitative anatomy of the leaf interveinal region, clone A exhibited structural differences that could be linked to resistance in this material, such as: greater thickness of the abaxial and adaxial cuticles, greater thickness of the adaxial palisade parenchyma, greater palisade parenchyma percentage, higher number and area of oleiferous receptacles, smaller thickness of the abaxial epidermis, and smaller thickness and percentage of spongy parenchyma. These parameters can make it difficult for the pathogen to penetrate and colonize host tissues. In addition, the anatomical study allowed the discrimination of the first leaf stage in the highly susceptible clone in relation to the others, indicating a relationship between these characters and rust, since the disease occurs preferably on young leaves and organs at the initial stages of development. The essential oils analysis and quantification of substances present demonstrated, by means of multivariate statistical analysis, the discrimination of the first leaf stage in all clones, as well as a differentiation between the clones evaluated. The highly susceptible clone showed higher percentage of  $\gamma$ -terpinene and the resistant clone was different because of its higher percentage of limonene, which could be biochemical marks for the rust resistance in *Eucalyptus*. The micromorphology revealed that clone A (resistant) maintained its resistance condition during the three leaf stages, because of a lack of symptoms caused by the pathogen on the leaf surface, and because of a reduced incidence of appressoria formed. The results demonstrate that quantitative anatomical and biochemical characters influence the resistance of a plant to a given disease. Thus, thinner cuticles facilitate the pathogen's penetration into the plant, while thicker epidermides make a greater amount of nutrients available, required for development of the causal agent. Since some secondary metabolites act by defending the plant against invasive agents, the composition and quantification of essential oils, as well as the presence of a larger area and greater number of glands that secrete these substances, are important for host resistance to *Puccinia psidii*.

---

Keywords: essential oils, leaf anatomy, resistance, *Puccinia psidii*, *Eucalyptus*.

### 3. INTRODUÇÃO

O gênero *Eucalyptus* pertence à família Myrtaceae, com cerca de 650 espécies, apresenta uma ampla plasticidade e dispersão mundial, crescendo satisfatoriamente em diferentes situações edafoclimáticas, extrapolando àquelas das regiões de origem (Santos et al., 2001; Schumacher et al., 2005).

O eucalipto (*Eucalyptus* spp.) ocorre naturalmente na Austrália, Indonésia e ilhas próximas, tais como Flores, Alor e Wetar (Santos et al., 2001). De acordo com Sampaio et al. (1961), é difícil determinar, com segurança, a data da introdução do eucalipto no Brasil. Presume-se que os primeiros tenham sido plantados por Frederico de Albuquerque, em 1868 no Rio Grande do Sul (Sampaio et al., 1961).

No entanto, foi o agrônomo Edmundo Navarro de Andrade, que deu início aos primeiros reflorestamentos experimentais no Brasil, em 1904, no Horto de Jundiaí, onde assumiu a direção (Sampaio et al., 1961).

O eucalipto é cultivado para os mais diversos fins, tais como, papel, celulose, lenha, carvão, aglomerado, serraria, óleos para indústrias farmacêuticas, mel, ornamentação e quebra-vento. No mundo, o eucalipto é a árvore mais plantada, com mais de 17,8 milhões de hectares (Alfenas et al., 2004).

A importância da cultura do eucalipto para o Brasil pode ser avaliada pela participação do setor florestal na economia do país. Inicialmente, apoiado por incentivos fiscais ao reflorestamento, e também pelos Programas Nacionais de Siderurgia e Carvão

Vegetal e de Celulose e Papel, o setor responde atualmente por 4,5% do PIB nacional (R\$ 22 bilhões), com geração de 6,5 milhões de empregos (9% da população economicamente ativa brasileira – PEA). Adicionalmente, a contínua expansão do setor florestal brasileiro, baseado em plantações, principalmente com eucaliptos, possibilita a exportação de US\$ 5,5 bilhões por ano, equivalente a 7,5% das exportações brasileiras (Medrado et al., 2005).

A partir de 1965, com a lei dos incentivos fiscais ao reflorestamento, a área de plantio de eucalipto no Brasil aumentou de 500 mil para 3 milhões de hectares (Valverde, 2004). Graças às condições naturais favoráveis de solo e clima, à evolução tecnológica e aos conhecimentos acumulados sobre o seu manejo, a produtividade experimental que era de 10 m<sup>3</sup>/ ha/ano passou a ser de 60 a 70 m<sup>3</sup>/ ha/ano (SBS, 2004). O Brasil possui, atualmente, a segunda maior área reflorestada com espécies de *Eucalyptus* do mundo (Alfenas et al., 2004).

O processo de clonagem do eucalipto, a partir de árvores adultas teve início na década de 70 na região de Coff's Harbour, na Austrália, através da técnica de enraizamento de estacas obtidas de brotações colhidas no campo ou de mudas (Alfenas et al., 2004).

Segundo Alfenas et al. (2004), a técnica de clonagem foi decisiva para o êxito dessa cultura em regiões quentes e úmidas, favoráveis à incidência de doenças. Com isso, possibilitou um grande impulso no setor florestal no Brasil, permitindo a formação de plantios homogêneos, resistentes a doenças e de alta produtividade.

A ferrugem, causada pelo fungo *Puccinia psidii*, é uma das doenças mais comuns em plantios de eucalipto, devido às condições ambientais favoráveis ao seu desenvolvimento e maior suscetibilidade de algumas espécies cultivadas. Plantas altamente suscetíveis podem ter o seu crescimento comprometido pela doença, sofrendo um enfezamento quando severamente atacadas. Estas plantas poderão ser dominadas pelas adjacentes que, menos afetadas ou sadias, continuam crescendo normalmente (Ferreira, 1989).

Além do eucalipto, o patógeno infecta outras espécies de Myrtaceae, como jambo, goiabeira, jabuticabeira, araçazeiro, pitangueira e jamelãozeiro, sendo algumas destas mais atacadas do que as outras (Joffily, 1944; Ferreira, 1983; Alfenas et al., 2004).

O isolado proveniente de um hospedeiro pode ser específico ou atacar outras espécies de mirtáceas. Esta relação pode estar associada a componentes específicos,



situados na superfície do hospedeiro ou mesmo internamente em folhas e ramos, consistindo em um fator de reconhecimento por parte do patógeno ao hospedeiro.

A ferrugem pode ocorrer tanto em viveiros como no campo, porém é neste último que está sua maior importância econômica. Para o controle da doença no campo, muitas vezes não são utilizadas aplicações com fungicidas, visto que os gastos com o produto podem ser superiores às perdas provocadas pela ferrugem, tornando-se economicamente inviável. Além disso, ainda não existem fungicidas registrados para o setor florestal, o que dificulta a utilização dos mesmos, que deve ser apenas como “uso emergencial”. Neste caso dá-se preferência a alternativas de controle, como escape e utilização de variedades resistentes.

A resistência de uma planta pode ser caracterizada como a sua capacidade em atrasar ou evitar a entrada e/ou subsequente invasão pelo patógeno em seus tecidos, limitando a penetração, desenvolvimento e/ou reprodução do agente invasor (Pascholati e Leite, 1995).

No entanto, muitas vezes uma planta considerada resistente a um determinado patógeno pode sofrer influências de fatores ambientais e genéticos, alterando a sua condição frente ao patógeno. Assim, uma planta pode manifestar sua resistência sob determinadas condições e manter ou não esse caráter em outras condições (Silva et al., 2005). Além disso, alguns agentes patogênicos podem variar quanto ao grau de agressividade, através de raças fisiológicas, promovendo a infecção de plantas anteriormente consideradas resistentes.

Os fungos exercem uma grande influência na evolução de seus hospedeiros, adaptando-se, por sua vez, às mudanças do genótipo do hospedeiro para aumentar as situações de íntima coevolução (Pyrozinski e Hawksworth, 1988). Enquanto o hospedeiro utiliza estratégias de defesa para se proteger do agente causal da doença, este procura neutralizar tais reações através do seu arsenal bioquímico, em busca de nutrientes necessários a sua sobrevivência (Pascholati e Leite, 1995).

Dessa forma, um dos importantes mecanismos que atuam conferindo resistência ao hospedeiro à infecção por patógenos é o estrutural, que pode ser dividido em pré-formado ou constitutivo, ou pós-formado, o qual se origina após o contato patógeno-hospedeiro (Pascholati e Leite, 1995; Agrios, 2005).

A resistência estrutural envolve estruturas de defesa física da planta, como cutícula, tricomas, estômatos e fibras que atuam como barreiras, impedindo ou restringindo o desenvolvimento da doença em seus tecidos. Porém, mesmo com a presença dessas estruturas pré-formadas, muitas vezes o patógeno consegue penetrar na planta; no entanto seu progresso pode ser evitado pela formação de novas barreiras estruturais, como papilas, lignificação, periderme de cicatrização e tiloses (Pascholati e Leite, 1995).

Além dos mecanismos estruturais, existem fatores de resistência bioquímicos que, por meio de reações, produzem substâncias tóxicas ao patógeno ou criam condições adversas que dificultam o seu desenvolvimento no interior do hospedeiro. São compostos sintetizados pelo metabolismo secundário das plantas, como os terpenóides que constituem uma ampla classe de produtos secundários, como os óleos essenciais, ativos contra vários fitopatógenos (Pascholati e Leite, 1995; Simões e Spitzer, 2004; Agrios, 2005).

Tendo em vista o envolvimento desses fatores no processo de defesa de uma planta à ação de patógenos, o trabalho teve como objetivos: quantificar as características anatômicas, avaliar a patogênese de *Puccinia psidii* pela micromorfologia da epiderme foliar e caracterizar a composição de óleos essenciais, em três estágios de desenvolvimento foliar, de clones de eucalipto, procurando-se relacionar com a resistência ou suscetibilidade à ferrugem.

A presente dissertação será dividida em três capítulos, sendo o primeiro capítulo intitulado “Anatomia foliar quantitativa em três estágios de desenvolvimento de clones de eucalipto e sua relação com a ferrugem”, o segundo capítulo intitulado “Avaliação da patogênese de *Puccinia psidii* pela micromorfologia da epiderme foliar de clones de eucalipto” e o terceiro capítulo intitulado “Composição de óleos essenciais em três estágios foliares de clones de eucalipto e sua relação com a ferrugem, causada pelo fungo *Puccinia psidii*”, redigidos conforme as normas da revista Pesquisa Agropecuária Brasileira (PAB).

## 4. REVISÃO DE LITERATURA

### 4.1. Ferrugem do eucalipto

O eucalipto é atacado por vários patógenos, principalmente fungos, desde a fase de viveiro até os plantios adultos. Geralmente, os problemas são observados nas plantações, ocorrendo nos mais variados locais, espécies e épocas do ano.

O avanço das áreas reflorestadas para regiões mais quentes e úmidas, o plantio de espécies mais suscetíveis ou de materiais clonais, sem diversidade genética, e a utilização repetitiva de uma mesma área para plantio criaram condições favoráveis à ocorrência de doenças (Alfenas et. al, 2004). Dentre elas, a ferrugem causada por *Puccinia psidii* Winter é uma das mais limitantes no estabelecimento de novos plantios e na condução de brotações de algumas espécies e procedências de *Eucalyptus* (Ruiz et al.,1987; Ferreira, 1989).

A ferrugem é uma doença causada por fungos basidiomicetos, pertencentes à ordem Uredinales, que pode se manifestar em diversos hospedeiros nativos, silvestres ou cultivados, sob a forma de diferentes espécies (Figueiredo, 2001). Por serem parasitas obrigatórios ou biotróficos dependem das células vivas do hospedeiro para sua sobrevivência, assim não podem ser cultivados em meios artificiais (Ferreira, 1989).

*Puccinia psidii* ataca espécies da família Myrtaceae, incluindo o eucalipto, jambeiro, goiabeira, jabuticabeira, araçazeiro, pitangueira e jamelãozeiro,

respondendo de maneira diferente em cada hospedeiro quanto à agressividade (Joffily, 1944; Ferreira, 1983; Alfenas et al., 2004; Tommerup et al., 2004). É um fungo nativo da América do Sul e encontra-se amplamente distribuído nas Américas do Sul (Argentina, Brasil, Colômbia, Equador, Paraguai, Uruguai e Venezuela) e Central e nas ilhas do Caribe, havendo ainda relatos da sua presença na Flórida (Coutinho, 1998; Alfenas et al., 2004). Ainda não existem evidências do *P. psidii* na Austrália, centro de origem do *Eucalyptus* (Coutinho et al., 1998, Grgurinovic et al., 2006).

No Brasil foi observada a presença do *P. psidii* inicialmente no Estado de Santa Catarina, e encontra-se amplamente distribuído pelo país. A ferrugem, causada por este patógeno, é uma das doenças mais severas na cultura do eucalipto no Brasil, com potencial de causar perdas em outras áreas tropicais e subtropicais do mundo que possuam florestas de eucalipto (Coutinho et al., 1998). Foi relatada pela primeira vez no Brasil, em 1929 e formalmente descrita em 1944 (Joffily, 1944).

De acordo com Figueiredo (2001), outro problema notável de *P. psidii* é sua capacidade de se adaptar e infectar plantas mirtáceas exóticas e não originárias da América do Sul. Este é o caso do jambeiro (*Syzygium jambos*), trazido da Índia pelos colonizadores portugueses no início do século XVI, do *Eucalyptus* spp. e da *Melaleuca* spp., plantas de interesse florestal ou de arborização trazidas da Austrália e de outros países orientais. Ainda, estudos com inoculações cruzadas, têm demonstrado uma grande variabilidade quanto à especialização fisiológica e grau de infectividade de diferentes populações de *P. psidii* coletados de diferentes hospedeiros.

Castro et al. (1983) realizaram inoculações cruzadas de *Eucalyptus grandis* e *E. cloeziana*, goiabeira e jambeiro com *P. psidii*. Os autores verificaram que as quatro espécies apresentaram-se como hospedeiras de *P. psidii* proveniente de eucalipto, goiabeira e jambeiro; no entanto, mostraram respostas diferentes quanto à intensidade da infecção. A variabilidade fisiológica de *P. psidii* também foi testada por Coelho et al. (2001) em goiabeira, jambeiro e *Eucalyptus grandis*, utilizando-se 13 isolados do patógeno. Neste trabalho, os autores detectaram três grupos de especialização fisiológica, sendo o grupo 1 compatível com eucalipto e jambeiro, grupo 2 com eucalipto e goiabeira e o 3 apenas com goiabeira.

Furtado et al. (2005) também verificaram a existência de especializações fisiológicas em diferentes populações do patógeno testados em *Eucalyptus grandis* e no híbrido urograndis. Neste trabalho, foi observada virulência de vários isolados para *E. grandis*, sendo que dois isolados induziram reação de hipersensibilidade; já o híbrido mostrou-se mais resistente que o *E. grandis*.

Para os fungos causadores de ferrugens, o fotoperíodo, a temperatura e a umidade são variáveis que desempenham papel fundamental na biologia do patógeno e na ocorrência e severidade da enfermidade, pois influenciam os processos de germinação, penetração e infecção (Nutman e Roberts, 1963).

Para que ocorra o ataque de *P. psidii* são necessárias condições ambientais favoráveis. Em condições de campo, temperatura menor ou igual a 20°C, longos períodos com molhamento foliar (maior que seis horas/dia) e umidade relativa noturna  $\geq 80\%$ , favorecem a ferrugem no jambeiro (Blum e Dianese, 2001) e no eucalipto (Ruiz, 1989; Ferreira, 1989). Suzuki e Silveira (2003) verificaram que a temperatura é o fator que mais afeta a viabilidade de esporos de *P. psidii*, sendo que temperaturas elevadas contribuem para a menor incidência da doença em épocas mais quentes do ano.

Ferreira (1983) relata que períodos de duas a três semanas com dias de temperatura relativamente baixas e alta umidade podem favorecer a ocorrência de surtos da ferrugem. A formação de orvalho é um dos fatores determinantes de novas infecções e produção de novos urediniosporos de *P. psidii* (Blum e Dianese, 2001). Alguns autores informam que a formação de orvalho ocorre apenas quando a umidade relativa é igual ou superior a 90% (Ferreira, 1983; Ruiz, 1989) e a temperatura abaixo de 20° C (Ferreira, 1989).

Uma das características da ferrugem do eucalipto é manifestar-se na forma de surtos esporádicos de curta ou, relativamente, longa duração (um mês até mais de seis meses). Os surtos de longa duração incluem ciclos secundários ou repetidos de infecções urediniospóricas (Ferreira, 1989).

A doença se manifesta, principalmente, nos primeiros pares de folhas e órgãos em início de desenvolvimento, sendo as plantas mais suscetíveis até completarem dois anos de idade (Ferreira, 1989, Demuner e Alfenas, 1991).

A etapa de infecção tem início com a deposição de urediniósporos na superfície foliar, a formação do tubo germinativo e, posteriormente, do apressório, que emitirá uma estrutura especializada para penetrar na planta por via direta (através da cutícula). Em seguida, o fungo coloniza os tecidos da planta e retira seus nutrientes por meio de haustórios formados no interior das células vivas do hospedeiro, promovendo o aparecimento dos sintomas (Ferreira, 1983; Alfenas et al., 2004).

O ataque da doença é facilmente observado e sua identificação é segura devido aos sintomas apresentados nos tecidos das plantas, que se dão, inicialmente, por pontuações cloróticas, que se transformam em pústulas ou soros, onde se expõem, com o rompimento de epiderme, massas pulverulentas de urediniósporos, de coloração amarelo vivo. Estas pústulas podem se coalescer, recobrando a superfície das brotações do eucalipto quando o ataque é intenso. Em conseqüência, os tecidos afetados morrem e secam, adquirindo coloração negra, devido à necrose ocasionada pelo patógeno (Ferreira, 1989; Alfenas et al., 2004; Tommerup et al., 2004).

Como o ataque se dá antes das folhas completarem seu desenvolvimento, estas freqüentemente acabam ficando deformadas. O mesmo tipo de ataque pode ocorrer em frutos jovens, deformando-os. Porém, a ferrugem raramente mata as plantas, exceto quando ataca severamente brotações novas de tocos após o corte raso (Ferreira, 1989).

A ação do patógeno sobre a planta provoca deformações nos órgãos aéreos (hastes, folhas, flores e frutos), afetando assim os diversos processos fitofisiológicos (Alfenas et. al, 1989; Ferreira,1989;).

Os primeiros danos seriamente causados por *P. psidii* em eucalipto ocorreram em 1973 no Estado do Espírito Santo, provocando uma grande perda em viveiros e plantios jovens de *E. grandis*. Demuner e Alfenas (1991) relataram que em 1986 cerca de 122 ha de *E. cloeziana* foram quase que totalmente dizimados pelo patógeno na região de Teixeira de Freitas, BA, resultando numa perda de cerca de US\$ 73.200,00.

Na década de 90, foram registrados os primeiros surtos de ferrugem em áreas florestais no Estado de São Paulo, no município de Santa Branca, sendo que desde 1996 a doença tem se manifestado nessa região de forma generalizada (Camargo et al., 1997).

Ferreira e Silva (1982) e Castro (1983) constataram que as espécies de eucalipto mais susceptíveis a *P. psidii* são *Eucalyptus grandis* W.Hill ex Maiden, *E. pellita* F.

Muell, *E. phaeotricha* Blakely et Mckie e *E. cloeziana* F. Muell. A doença também foi relatada em plantios comerciais de *Eucalyptus globulus* e *E. viminalis* em Guaíba, no Rio Grande do Sul, com ataque severo (Alfenas et al., 2003).

O controle da doença no campo pode ser efetuado pela aplicação de fungicidas, por estratégias de escape, evitando-se áreas propícias à ocorrência da doença ou evitando-se o plantio de materiais suscetíveis nessa região, bem como utilizando-se materiais resistentes. A utilização da resistência genética é a medida de controle mais indicada, por ser de menor custo, facilmente executável e por reduzir o impacto de fungicidas no ambiente (Alfenas et al., 1989).

#### **4.2. Relações entre a anatomia vegetal e a ocorrência de doenças**

A combinação de características estruturais e reações bioquímicas empregadas nos processos de defesa das plantas são essenciais para a sua manutenção no ecossistema, em função das adversidades e invasões a que estão submetidas. Assim, o estudo das estruturas anatômicas pré-formadas da planta é de fundamental importância para uma melhor compreensão desses processos e dos mecanismos envolvidos na resistência aos patógenos.

De acordo com Metcalfe e Chalk (1957), a família Myrtaceae caracteriza-se, principalmente, pela presença de cavidades secretoras de substâncias oleosas; mesofilo isobilateral a dorsiventral; tricomas simples; estômatos ranunculáceos, ocorrendo em ambas as superfícies de folhas adultas, e presença de cristais.

O eucalipto apresenta cavidades secretoras lisígenas (Metcalfe e Chalk, 1957; Esau, 1974; Castro e Machado, 2006) que, na maioria das espécies estão localizadas abaixo da epiderme e distribuídas nos tecidos parenquimáticos; em algumas espécies, como *Corymbia citriodora*, essas cavidades são substituídas por emergências secretoras localizadas em ambas as faces da folha (Accorsi, 1941; Metcalfe e Chalk, 1957). A epiderme é revestida por cutícula, composta de cutina e ceras; o mesofilo é isobilateral quando a folha se encontra em formação, tornando-se dorsiventral posteriormente (Metcalfe e Chalk, 1957).

A primeira linha de defesa de uma planta contra agentes invasores é a sua superfície, onde ocorre a aderência do patógeno, que utiliza seus artifícios para penetrar na mesma e causar a infecção (Agrios, 2005). A forma física da cutícula, o número de estômatos e de tricomas por área de epiderme são fatores importantes na definição do nível de resistência a patógenos por algumas espécies vegetais (Medeiros et. al, 2003; Agrios, 2005).

A cutícula, camada de cutina e cera que recobre a epiderme da folha, é a primeira barreira enfrentada por um patógeno (Pascholati e Leite, 1995). A espessura e o tipo da cutícula, bem como a quantidade e a qualidade da cera presente podem dificultar a ação do patógeno e sua penetração nos tecidos do hospedeiro (Medeiros et. al, 2003).

A composição química, a quantidade e a forma física das ceras epicuticulares de folhas são governadas por muitos fatores, variando entre espécies (Baker e Hunt, 1981). Dessa forma, a consideração da cutícula como estrutura de resistência deve ser analisada com prudência, visto que tal capacidade depende das características desta e do agente de inter-relação (Silva et. al, 2005).

De acordo com Medeiros (2003), o alto nível de pilosidade e cerosidade da cutícula dificultam o acúmulo de água sobre a folha, interferindo na germinação de esporos fúngicos que necessitam de alta umidade para ativar este processo. Este fato foi verificado por Jerba et al. (2002) em folhas de feijão, em que a maior pilosidade presente em cultivares resistentes à antracnose, proporcionaram o envelhecimento de hifas do fungo.

Além da cutícula, o número e distribuição dos estômatos também atuam no desenvolvimento do patógeno. No entanto, para patógenos que penetram nos tecidos do hospedeiro por via direta, como o *Puccinia psidii*, estes fatores não têm influência no desenvolvimento da doença. Para a maioria das ferrugens, a penetração do tubo germinativo dos esporos fúngicos é realizada diretamente, dispensando a existência de aberturas naturais ou ferimentos (Ferreira, 1989). Segundo Furtado (comunicação pessoal), apenas 15% do total de esporos germinados de *Puccinia psidii* podem penetrar via estômato, sendo o restante por via cuticular, ocorrendo entre as paredes anticlinais das células epidérmicas.

A lignificação das paredes celulares também pode contribuir na restrição à colonização das plantas por fitopatógenos. Assim, paredes mais espessadas podem se tornar mais resistentes à ação de enzimas degradadoras e à difusão de toxinas provenientes dos patógenos (Pascholati e Leite, 1995; Agrios, 2005; Silva et al., 2005). Além disso, a



parede celular também pode inibir o crescimento do patógeno através de enzimas degradadoras da parede fúngica e da produção de fitoalexinas, produtos naturais acumulados após a infecção (Pascholati e Leite, 1995; Agrios, 2005).

De acordo com Pascholati e Leite (1995), o xilema e as fibras esclerenquimáticas, presentes na região da nervura central da folha, são ricos em lignina, podendo interromper o avanço de fungos e bactérias nessa região. Este fator pode estar relacionado à preferência de alguns patógenos, como o *P. psidii*, pela região internervural da folha, que apresenta lignina somente nas regiões dos feixes vasculares, sendo o restante do mesofilo destituído de lignificação.

Tecidos parenquimáticos também podem exibir resistência aos patógenos, através da organização e características das células (Silva et al., 2005). Smith et al. (2006) verificaram maior proporção de parênquima paliçádico e menor ocorrência de espaços intercelulares em folhas de *Eucalyptus nitens*, considerado resistente ao *Mycosphaerella* spp. Os autores relataram ainda que camadas de células paliçádicas com menores espaços intercelulares podem atrasar ou impedir a infecção de algumas espécies de *Mycosphaerella* no hospedeiro, devido à compactação dessas células o que dificulta a colonização do patógeno. Este fato também foi observado por Jerba (2003) em folhas de cultivares de feijoeiro, com diferentes graus de resistência à antracnose.

No entanto, a exposição de uma planta a condições de estresse e alterações ambientais, pode modificar a sua estrutura anatômica. As deficiências e desequilíbrios nutricionais provocam mudanças morfológicas e bioquímicas na planta, podendo tornar certos materiais genéticos mais suscetíveis à infecção por *P. psidii*. Dentre os macronutrientes, as deficiências de Potássio e Cálcio são as que provocam as maiores mudanças estruturais e bioquímicas, tornando as plantas mais suscetíveis; além disso, a carência de boro torna as paredes celulares mais finas e desestruturadas, favorecendo a penetração das hifas (Silva et al., 2005). Estudos mostram também que o silício promove o espessamento das células epidérmicas, proporcionando uma resistência física à penetração dos patógenos (Korndörfer e Rodrigues, 2005).

Segundo Medeiros et al. (2003), os mecanismos estruturais explicam alguns casos de resistência, mas a bioquímica é a chave da imunidade. Porém, estes fatores de resistência devem ser avaliados conjuntamente, visto que não é apenas uma característica da

planta a responsável pelo seu processo de defesa, mas sim fatores estruturais, bioquímicos e genéticos que estão interligados.

### **4.3. Relações entre óleos essenciais e a resistência de plantas a patógenos**

Ao contrário dos metabólitos primários, como clorofila, aminoácidos, nucleotídeos, carboidratos simples ou membranas lipídicas, os metabólitos secundários não tem, geralmente, papel reconhecido no processo de fotossíntese, respiração, transporte de solutos, translocação e assimilação de nutrientes ( Santos, 2004) .

No entanto, o metabolismo secundário desempenha um papel importante na interação das plantas com o meio ambiente. Produtos secundários possuem um papel contra a herbivoria, ataque de patógenos, competição entre plantas, atração de organismos benéficos, ação protetora em relação a estresses abióticos, como mudanças de temperatura, conteúdo de água, níveis de luz, exposição à UV e deficiência de nutrientes minerais (Jones et al., 1991; Santos, 2004;). Segundo Bennett e Wallsgrove (1994), muitos produtos secundários são componentes chave para um mecanismo de defesa ativo e eficiente das plantas contra patógenos e insetos.

Gottlieb et al. (1996) caracteriza os metabólitos secundários como especiais, provenientes da matéria-prima e energia fornecidas pelos metabólitos primários. Os metabólitos secundários também diferem dos primários por apresentarem uma distribuição restrita no reino vegetal, ou seja, são frequentemente encontrados somente em algumas espécies de plantas ou grupos taxonômicos (Bennett e Wallsgrove, 1994).

O estudo dos metabólitos secundários teve início no século XIX, devido ao interesse em descobrir sua importância em medicamentos, os efeitos tóxicos, condimentares e em materiais industriais. Até então, estes metabólitos eram pouco conhecidos, por serem considerados sem funcionalidade no metabolismo da planta (Agosta, 1996, citado por Taiz e Zeiger, 1998).

De acordo com os biólogos evolucionários a defesa das plantas pode ter surgido por meio de mutações genéticas, seleção natural e mudanças na evolução. Mutações casuais nos caminhos metabólicos levam ao aparecimento de novos componentes que podem ser tóxicos ou impedir a ação de herbívoros e patógenos.

As rotas dos metabólitos secundários são ativadas durante alguns estádios particulares de crescimento e desenvolvimento da planta ou em períodos de estresse causados por limitações de recursos ou ataque microbiológico (Mann, 1987 citado por Santos, 2004).

As principais classes de metabólitos secundários são compostas por fenilpropanóides, alcalóides, taninos, antraquinonas, flavonóides e terpenóides (Santos, 2004).

Os terpenos ou terpenóides constituem uma ampla classe de produtos secundários, que são ativos contra bactérias, fungos, vírus e protozoários (McGarvey e Croteau, 1995; Cowan, 1999)

Os terpenos são classificados de acordo com o número de unidades de cinco carbonos que contêm. Assim, terpenos com dez carbonos, contendo duas unidades C<sub>5</sub>, são denominadas monoterpenos; com quinze carbonos, sendo três unidades C<sub>5</sub>, sesquiterpenos; com vinte carbonos, sendo quatro unidades C<sub>5</sub>, diterpenos. Acima disso, são chamados triterpenos (30 carbonos), tetraterpenos (40 carbonos) e politerpenos. Os elementos estruturais dos terpenos são, às vezes, chamados unidades isopreno, pois em altas temperaturas, os terpenos podem se decompor e formar isoprenos. Os monoterpenos e os sesquiterpenos são as principais substâncias que compõem os óleos essenciais (Santos, 2004; Simões e Spitzer, 2004). Os sesquiterpenos são menos voláteis e tem menos propriedades organolépticas do que os monoterpenos, no entanto, podem influenciar no odor dos óleos essenciais (Boland et al., 1991).

Os óleos essenciais são definidos pela ISO (International Standard Organization) como produtos obtidos de partes de plantas por meio da destilação por arraste de vapor d'água, bem como os produtos obtidos por prensagem dos pericarpos de frutos cítricos. De forma geral, são misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas (Simões e Spitzer, 2004). São complexos componentes voláteis, produzidos em diferentes partes da planta, sendo conhecidos por apresentarem várias funções na mesma, incluindo resistência conferida a pragas e doenças (Goubran e Holmes 1993, citado por Ranasinghe et al., 2002). Podem ser produzidos em estruturas secretoras especializadas, como pêlos glandulares, células parenquimáticas diferenciadas e cavidades oleíferas (Fahn, 1979; Castro e Machado, 2006; Simões e Spitzer, 2004).

Na família Myrtaceae uma das principais características é a presença de pontos translúcidos nas folhas que correspondem às cavidades secretoras de óleos essenciais, presentes abaixo da epiderme e distribuídas ao longo dos tecidos parenquimáticos (Johnson, 1926; Accorsi, 1941; Castro e Machado, 2006). De acordo com Castro e Machado (2006), o material secretado nessas cavidades em espécies de *Eucalyptus* se constitui em uma mistura de óleos essenciais e compostos fenólicos.

Assim como os óleos essenciais, os fenóis também são importantes na proteção das plantas contra fatores ambientais e bióticos, inibindo a ação de fungos, bactérias, vírus, insetos e apresentando efeito alelopático (Bennett e Wallsgrove, 1994).

Os óleos voláteis, obtidos de diferentes órgãos, de uma mesma planta podem apresentar composição química, caracteres físico-químicos e odores bem distintos. Cabe ainda lembrar que a composição química de um óleo volátil, extraído do mesmo órgão de uma mesma espécie vegetal, pode variar significativamente de acordo com a época de coleta, condições climáticas e de solo.

Romoff et al. (2005) observaram uma flutuação no teor de sesquiterpenos nos meses de fevereiro e março, bem como a predominância de derivados monoterpênicos, nos meses de julho, setembro e novembro, ao analisarem o óleo volátil de folhas de *Syzygium cumini*, confirmando a influência de fatores climáticos e fenológicos.

Maffeis et al. (2000) verificaram que, na omissão dos nutrientes Potássio e Boro, os valores de citronelal encontrados na composição do óleo essencial de *E. citriodora* foram abaixo de 65%, devido ao comprometimento na produção de folhas. Dessa forma, comprovaram a queda na produção deste componente, tendo em vista que tal espécie tem de 65-85% de citronelal em sua composição.

A composição química do óleo volátil de uma planta é determinada geneticamente, sendo geralmente específica para um determinado órgão, e característica para seu estágio de desenvolvimento (Simões e Spitzer, 1999), mas as condições ambientais são capazes de causar variações significativas.

Andrade e Gomes (2000), verificando a influência de fatores não genéticos sobre o teor de óleo essencial, em folhas de *E. citriodora*, observaram melhores resultados na destilação das folhas maduras, quando comparadas às folhas jovens (tenras). Isto ocorreu independentemente do estado físico das folhas e da idade do povoamento florestal que

as originou. Além disso, os rendimentos médios em óleo essencial, obtidos a partir da destilação das folhas previamente trituradas, foram significativamente superiores àqueles apresentados pelas folhas não trituradas.

O ambiente no qual o vegetal se desenvolve e os tipos de cultivo também influem sobre a composição química dos óleos voláteis. A temperatura, a umidade relativa, a duração total de exposição ao sol e o regime de ventos exercem uma influência direta, sobretudo sobre as espécies que possuem estruturas histológicas de estocagem na superfície. Nos vegetais em que a localização de tais estruturas é mais profunda, a qualidade dos óleos voláteis é mais constante (Valmorbida et al., 2006).

Galanti (1987) e Vitti e Brito (1999), citados por Andrade e Gomes (2000), relatam que o rendimento em óleo essencial pode estar relacionado com as condições de solo, clima, época da colheita, idade da planta, teor de umidade da folha, método de destilação, tempo de destilação, pressão de vapor, procedência da planta e com outros fatores.

Em trabalho realizado por Lima et. al. (2005), às 7:30 da manhã a concentração de óleo essencial em folhas de goiabeira (*Psidium guajava*), pertencente à família Myrtaceae, foi de 0,115%, enquanto que às 9:00 horas foi de 0,110% e às 12:00 horas de 0,090%, sendo os rendimentos calculados em peso/peso.

Sob o ponto de vista da sua composição química, qualitativa e quantitativamente, os óleos essenciais de eucalipto são misturas, mais ou menos complexas, e variam com as espécies, genética, tipo e idade da folha, condições ambientais (clima, solo, luz, calor, umidade) e processo de extração. Predominam nesses óleos os hidrocarbonetos terpênicos monocíclicos, derivados do isopreno.

De acordo com Boland et al. (1991), o óleo obtido da destilação a vapor de folhas de *Eucalyptus grandis* é uma complexa mistura de terpenos e  $\beta$ -trietonas. Os principais terpenos encontrados são monoterpenos como  $\alpha$ -pineno (22-36%), limoneno (0,6-2%), 1,8-cineol (0,8-8%), p-cimeno (1,4-17%), aldeído canfônico (0,6-2,9%), fenchona (0,2-0,4%), trans-pinocarveol (0,8-3%) e  $\alpha$ -terpineol (3-5%); e os sesquiterpenos são os álcoois globulol (0,2-1%), espatulenol (0,6-3%) e muitos álcoois não identificados variando de 0,3-2%. Quanto às  $\beta$ -trietonas, que correspondem a 40% do total de óleo, três estão presentes: leptospermona (24%), flavosona (13%) e isoleptospermona (3%).

Segundo Oqunwande et al (2003), investigações anteriores dos constituintes químicos do óleo extraído de folhas de *Eucalyptus grandis* cultivado no Uruguai, Austrália e Turquia mostraram o 1,8-cineol como principal componente. Já, Dethier et al. (1994) verificaram que o óleo de folhas de *E. grandis* crescidos no Burundi apresentou como o  $\alpha$ -pineno como composto majoritário; enquanto que  $\alpha$ -pineno e orto-cimeno foram os principais constituintes no Congo. Dagne et al. (2000) encontraram  $\alpha$ -pineno e  $\beta$ -pineno como mais abundantes na Etiópia.

Oqunwande et al (2003) verificaram ainda que o rendimento dos óleos obtidos da hidrodestilação de folhas de *E. microtheca*, *E. tereticornis* e *E. grandis* foram 2,3%, 3,4% e 4,7% (peso/peso), respectivamente.

O monoterpeno rico em óleos de folhas de *E. grandis* foi caracterizado pela abundância de  $\alpha$ -pineno (30,4%), terpinen-4-ol (10,7%), cis- $\beta$ -ocimeno (9,4%), borneol (8,4%) e cis-terpineol (8,0%). A ausência de 1,8-cineol revelou um desvio acentuado dos resultados de investigações prévias, mas nota-se que a quantidade deste componente relatado na literatura foi relativamente baixo, entre 0,8 a 8% (Oqunwande et al, 2003). Os mesmos autores observaram ainda que os sesquiterpenos estavam presentes em baixa quantidade (0,6-13,3%) nas três espécies de eucalipto, enquanto um aldeído poderia ser identificado somente em óleo de *E. microtheca*.

Segundo Janssen et al. (1987), um composto é considerado biologicamente ativo quando exerce ação específica sobre determinado ser vivo, seja ele animal, vegetal ou microrganismo. Uma vasta gama de compostos orgânicos de origem vegetal é biologicamente ativa, isto é, tem ação tranqüilizante, analgésica, antiinflamatória, citotóxica, anticoncepcional, antimicrobiana, antiviral, fungicida, inseticida, etc. Dentre os fitocompostos, os óleos essenciais encontram maior aplicação biológica como agentes antimicrobianos, o que representa uma extensão do próprio papel que exercem nas plantas, defendendo-as de bactérias e fungos fitopatogênicos.

No caso de óleos de eucalipto, existem alguns relatos do seu uso contra fitopatógenos. Salvatori et al. (2002) reportaram a ação antifúngica do óleo de *Corymbia citriodora*, testados *in vitro* através do crescimento micelial, no controle de alguns fitopatógenos. Zeni et al. (2004) verificaram o efeito inibidor do óleo de *C. citriodora* sobre *Botrytis cinerea*.

Muitos óleos de eucalipto são relatados apresentando propriedades carminativa, inseticida e antimicrobial. As folhas têm sido usadas no armazenamento de grãos devido à habilidade de seus óleos em inibir o crescimento de outros organismos (Oqunwande et al, 2003)

Salgado et al. (2003) observaram acentuada ação fungitóxica do óleo essencial de *Eucalyptus urophylla* sobre *Fusarium oxysporum*, *Bipolaris sorokiniana* e *Botrytis cinerea*, devido à presença do globulol, composto majoritário desse óleo. No entanto, Salgado et al. (2001) não detectaram presença deste componente nos óleos de *Corymbia citriodora* e *Eucalyptus camaldulensis*, diferentemente de Boland et al. (1991), que registraram teor de 3 a 7% de globulol em *E. camaldulensis*.

Abreu et al. (2005), detectaram ausência completa de folhas e folíolos doentes de tomateiro, cultivado em ambiente protegido, devido à ação do óleo de *Corymbia citriodora* na concentração 5000  $\mu\text{L.L}^{-1}$  sobre o fungo *Alternaria solani*.

Em estudo desenvolvido por Bartynska e Budzikur Ramza (2001), os óleos essenciais de eucalipto, lavanda, alecrim e tomilho foram efetivos na inibição do crescimento de fungos pertencentes ao gênero *Fusarium*.

Apesar dos produtos secundários serem importantes na proteção das plantas contra uma ampla variedade de microrganismos e herbívoros, em algumas situações patógenos especializados podem se tornar resistentes às barreiras químicas impostas pelas plantas, podendo ser atraídos por toxinas produzidas pelas mesmas (Wink, 1987).

A estimulação da germinação de urediniósporos da ferrugem do trigo foi verificada por French (1961), o qual demonstrou que muitos terpenóides e compostos relacionados foram capazes de acelerar a taxa de germinação desses esporos. Bizi (2006) ao testar “in vivo” o efeito dos óleos essenciais de *Eucalyptus globulus*, *Pinus* spp. e *Corymbia citriodora* verificou a ausência total de controle de *Botrytis cinerea* e *Oidium* sp. em *Eucalyptus dunnii* e *E. benthamii*, respectivamente, sugerindo a presença de algum composto capaz de atrair ou estimular o processo infeccioso do patógeno no hospedeiro.

## **Capítulo I**

### **Anatomia foliar quantitativa em três estágios de desenvolvimento de clones de eucalipto e sua relação com a ferrugem**



## **Anatomia foliar quantitativa em três estágios de desenvolvimento de clones de eucalipto e sua relação com a ferrugem\***

Renata Ruiz Silva-Souza<sup>(1)</sup>, Roberto Antonio Rodella<sup>(2)</sup>, Edson Luiz Furtado<sup>(1\*\*)</sup>.

<sup>(1)</sup> Departamento de Produção Vegetal, Setor de Defesa Fitossanitária, Faculdade de Ciências Agronômicas – UNESP, CEP 18.610-307, Botucatu-SP. E-mail: rrsilva@fca.unesp.br; elifurtado@fca.unesp.br.

<sup>(2)</sup> Departamento de Botânica, Instituto de Biociências de Botucatu – UNESP, CEP 18618-000, Botucatu – SP. E-mail: rodella@ibb.unesp.br.

\*Parte da Dissertação de Mestrado do primeiro autor: Bolsista da Capes

\*\* Bolsista CNPq

Aceito para publicação em: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

---

### **Resumo**

Silva-Souza, R.R.; Rodella, R.A; Furtado, E.L. **Anatomia foliar quantitativa, em três estágios de desenvolvimento, de clones de eucalipto e sua relação com a ferrugem.** *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 2008.

A ferrugem, causada pelo fungo *Puccinia psidii*, é uma das principais doenças que ocorrem na cultura do eucalipto, podendo provocar grandes perdas de produtividade no campo. O controle é efetuado, principalmente, pelo uso de variedades resistentes. Assim, estudos anatômicos são importantes para caracterizar as estruturas que estão envolvidas no mecanismo de defesa da planta. O objetivo foi quantificar a estrutura anatômica da região internervural da lâmina foliar, em três estágios de desenvolvimento (E1, E3 e E5), de três clones (Clone A-resistente; Clone B-suscetível e Clone C-altamente suscetível), provenientes do cruzamento entre *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis*, procurando-se relacionar com a resistência à ferrugem. Foram realizados cortes histológicos e a

mensuração dos tecidos presentes na região internervural das folhas. Através da quantificação dos tecidos, cujos dados foram submetidos a análises estatísticas multivariadas, foi possível discriminar os três estágios foliares e os clones estudados quanto ao grau de resistência ou suscetibilidade à ferrugem, causada por *P. psidii*. O clone A confirmou a sua resistência pela maior espessura das cutículas abaxial e adaxial, maior espessura do parênquima paliçádico adaxial, maior % de parênquima paliçádico, maior número e área de cavidades oleíferas, menor espessura da epiderme abaxial e menor espessura e % de parênquima lacunoso. Estes parâmetros podem dificultar a penetração do patógeno e a sua colonização nos tecidos do hospedeiro.

Termos para indexação: *Puccinia psidii*, anatomia foliar, eucalipto, resistência.

---

### Summary

Silva-Souza, R.R; Rodella, R.A; Furtado, E.L. **Quantitative leaf anatomy at three developmental stages of eucalyptus clones and their relationship with eucalyptus rust.** *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 2007.

The rust caused by the fungus *Puccinia psidii* is one of the main diseases that occur in eucalyptus, and may cause substantial yield losses in the field. Control is primarily achieved with the use of resistant varieties. Therefore, anatomical studies are important to characterize structures involved in the plant's defense mechanism. The objective of the study was to quantify the anatomic structure of the leaf blade's interveinal region at three developmental stages (E1, E3, and E5) of three clones (Clone A-resistant; Clone B-susceptible, and Clone C-highly susceptible) obtained from a cross between *Eucalyptus urophylla* × *Eucalyptus grandis*, attempting to relate it to rust resistance. Histological cuts were made and the tissues present in the leaves' interveinal region were measured. Using tissue quantification, whose data were submitted to multivariate statistical analyses, the three leaf stages and the clones studied could be discriminated as to their degree of resistance or susceptibility to rust caused by *P. psidii*. Clone A confirmed to be resistant, in view of the

greater thickness of its abaxial and adaxial cuticles, greater thickness of its adaxial palisade parenchyma, greater palisade parenchyma percentage, higher number and area of oleiferous receptacles, smaller thickness of the abaxial epidermis, and smaller thickness and percentage of spongy parenchyma. These parameters may make it difficult for the pathogen to penetrate and colonize host tissues.

Keywords: *Puccinia psidii*, leaf anatomy, eucalyptus, resistance.

---

### Introdução

Ao longo da evolução, as plantas desenvolveram estratégias de defesa contra patógenos e agentes invasores, que poderiam colocar em risco a sua sobrevivência. Através de mecanismos de resistência estruturais ou bioquímicos, as plantas são capazes de estabelecer barreiras físicas, impedindo a entrada do patógeno e a colonização dos tecidos, bem como de produzir substâncias que podem ser tóxicas ao patógeno ou interferir no seu processo de colonização (Pascholati e Leite, 1995; Agrios, 2005).

Muitos trabalhos já demonstraram que os fatores estruturais de resistência apresentam íntima relação com a defesa do hospedeiro ao ataque por patógenos, através de mecanismos pré-formados, como a cutícula, tricomas, estômatos e fibras, ou pós-formados como as papilas, halos, lignificação, periderme de cicatrização e tiloses.

A superfície das plantas constitui-se na primeira linha de defesa contra fitopatógenos, que devem ultrapassá-la para causar a infecção (Pascholati e Leite, 1995). Dessa forma, a espessura cuticular pode contribuir para a resistência da planta, reduzindo a penetração de fungos, como o *Puccinia psidii*, que penetra diretamente nos tecidos do hospedeiro. Nesse caso, o número de estômatos na folha não interfere muito no processo inicial do patógeno, visto que apenas 15% dos esporos germinados de *P. psidii* penetram por esta via.

A interferência da espessura cuticular e do parênquima paliçádico de folhas jovens de *Eucalyptus nitens* ao ataque de *Mycosphaerella* sp. foi relatada por Smith et al. (2006). Os

autores verificaram que a maior espessura da cutícula e a alta proporção de parênquima paliádico estão associadas com a resistência da planta. Esses fatores, juntamente com a maior compactação de células e maiores espessuras de paredes celulares também comprovaram a resistência de feijão à antracnose (Jerba, 2003).

Os tricomas interferem na continuidade do filme d'água sobre a superfície foliar, dificultando a germinação de esporos fúngicos ou expondo o patógeno a substâncias tóxicas presentes naqueles que apresentam glândulas secretoras (Pascholati e Leite, 1995, Jerba, 2003, Agrios, 2005).

Apesar da grande maioria das plantas ser resistente à maior parte dos patógenos, por possuírem um amplo arranjo de componentes constitutivos de defesa e/ou de bloqueio físico da entrada de microorganismos, muitas plantas cultivadas são suscetíveis a um determinado número de patógenos capazes de causar enormes perdas de produtividade (Barbieri e Carvalho, 2001). Além disso, a falta de diversidade genética em monoculturas favorece o estabelecimento e epidemia de doenças, quando as condições são favoráveis às mesmas, como ocorre com o patossistema eucalipto-ferrugem.

Com o grande avanço de áreas reflorestadas, principalmente de plantios clonais, a ferrugem, juntamente com outras doenças, vem ganhando cada vez mais importância em função da ausência de materiais geneticamente diferentes. Dessa forma, a utilização de variedades resistentes e o escape são importantes estratégias de controle da doença.

No entanto, a seleção de variedades resistentes depende não só da resposta da planta à inoculação com o patógeno, em condições controladas e de campo, ou de fatores genéticos e bioquímicos, mas também do maior conhecimento da estrutura anatômica da planta.

O estudo da anatomia foliar é bastante importante, pois permite uma análise comparativa entre os diferentes hospedeiros em diferentes estágios foliares, possibilitando relacionar o nível de resistência com a quantidade de tecidos presentes que possam constituir em barreiras à infecção pelo patógeno.

De acordo com Metcalf e Chalk (1957), a família Myrtaceae caracteriza-se, principalmente, pela presença de cavidades lisígenas secretoras de substâncias oleosas; mesofilo isobilateral a dorsiventral; tricomas simples; estômatos ocorrendo em ambas as superfícies de folhas e presença de cristais.

O eucalipto apresenta cavidades secretoras que, na maioria das espécies são localizadas abaixo da epiderme e distribuídas nos tecidos parenquimáticos, sendo substituídas, em algumas espécies, como a *Corymbia citriodora*, por emergências secretoras distribuídas em ambas as faces da folha (Accorsi, 1941; Metcalfe e Chalk, 1957). A epiderme é revestida por cutina e cera em algumas espécies de *Eucalyptus*; o mesofilo é isobilateral quando em formação, tornando-se dorsiventral posteriormente (Johnson, 1926; Metcalfe e Chalk, 1957).

A associação entre a anatomia vegetal e a fitopatologia, é de fundamental importância para o melhor entendimento da patogênese e das reações apresentadas pelo hospedeiro, quando exposto à ação dos patógenos, bem como para verificar diferenças estruturais capazes de conferir resistência à planta (Jerba, 2003).

Jerba (2003) diferenciou cultivares de feijoeiro quanto ao grau de resistência à antracnose através de estudo anatômico foliar e histopatológico. A autora demonstrou que o cultivar resistente apresentou menor área de nervura central, maior número de tricomas, baixo nível de infecção pelo patógeno e ocorrência precoce de compostos fenólicos quando infectado pelo patógeno.

Sambugaro (2003) relata que foi possível a diferenciação de estágios foliares da seringueira através de estudos anatômicos, bem como do grau de resistência de clones ao *Microcyclus ulei*. Assim, clones resistentes à doença apresentaram epiderme abaxial mais espessa e a ausência da fase sexuada do patógeno, sem a formação de tecidos estromáticos e esporulação ascógena.

Em eucalipto, a relação entre a anatomia foliar e a fitopatologia foi verificada por Smith et al. (2006). Os autores observaram que folhas jovens de *Eucalyptus nitens* resistente a espécies de *Mycosphaerella* eram mais espessas, com alta proporção de parênquima paliádico e menores espaços intercelulares. Nos estudos histopatológicos verificaram aumento na divisão celular nas folhas resistentes, bem como a formação de uma periderme necrótica mais organizada, contínua e lignificada do que nas procedências suscetíveis.

Tendo em vista a importância das estruturas anatômicas da planta na sua proteção contra patógenos, este trabalho tem como objetivo quantificar a estrutura anatômica da região internervural da lâmina foliar, em três estágios de desenvolvimento, de três clones de eucalipto, provenientes do cruzamento entre *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis*, procurando-se relacionar com a resistência à ferrugem.

## Material e Métodos

O material utilizado na condução do ensaio foi obtido de área de plantio clonal de *Eucalyptus urograndis*, híbrido proveniente do cruzamento entre *Eucalyptus urophylla* e *Eucalyptus grandis*, com aproximadamente 12 meses de idade, pertencente à empresa Votorantim Celulose e Papel S. A. Foi selecionado um clone resistente à ferrugem (clone A), causada pelo fungo *Puccinia psidii*, um clone suscetível (clone B) e um altamente suscetível (clone C), de acordo com testes de inoculação realizados no Departamento de Produção Vegetal, setor de Defesa Fitossanitária, da Faculdade de Ciências Agronômicas, em Botucatu-SP, e de índices de incidência e severidade da doença provenientes de levantamentos realizados pela empresa.

De acordo com Ferreira (1989), a doença se manifesta, principalmente, nos primeiros pares de folhas e órgãos em início de desenvolvimento. Dessa forma foram selecionados três estágios foliares para o estudo anatômico, de acordo com a disposição dos pares de folhas nos ramos, sendo o primeiro estágio (E1) considerado susceptível, o terceiro (E3) moderadamente resistente e o quinto (E5) resistente à ferrugem, estabelecidos por Silva et al. (2003).

Para se proceder ao estudo anatômico coletaram-se folhas sadias, nos estágios descritos acima, e destas foram retiradas amostras do terço médio da lâmina foliar, que foram imediatamente fixadas em FAA 50 (formaldeído + ácido acético glacial + álcool 50 %), durante 48 horas, sendo posteriormente conservadas em álcool 70 % e desidratadas em série etílica ascendente (Johansen, 1940).

As amostras foliares da região internervural foram infiltradas em resina glicol-metacrilato, seguindo-se a técnica de Gerrits (1991), e posteriormente, cortadas transversalmente em micrótomo rotatório, com 8 µm de espessura, coradas com azul de toluidina 0,05% pH 4,7 e montadas em resina sintética (O'Brien et al., 1964). Para cada estágio foliar e para cada clone foram utilizadas três repetições, a fim de se obter resultados mais consistentes.

As estruturas foliares foram desenhadas com auxílio de microscópio de projeção, sendo, em seguida, efetuadas as mensurações dos caracteres estruturais, através de uma mesa digitalizadora acoplada a programa computacional específico.

Foram quantificadas as seguintes características anatômicas da região internervural da lâmina foliar: espessura da cutícula das faces adaxial e abaxial, espessura da epiderme das faces adaxial e abaxial, espessura do parênquima paliçádico adaxial e abaxial e % de parênquima paliçádico em relação à espessura foliar, espessura e % do parênquima lacunoso em relação à espessura foliar, bem como espessura da folha, área e número de cavidades oleíferas por  $\text{mm}^2$  de superfície foliar.

Para a mensuração da espessura da cutícula adaxial e abaxial, os cortes anatômicos, provenientes de material incluído em historresina, foram corados com Sudan IV (Johansen, 1940), o qual facilita a observação da cutícula, uma vez que esta estrutura apresenta coloração hialina, dificultando a sua visualização ao microscópio.

A contagem do número de cavidades oleíferas foi realizada em folhas frescas com o auxílio de estereomicroscópio acoplado a uma câmara clara, onde foi possível a visualização dos pontos translúcidos das folhas correspondentes às estruturas. Foram utilizadas oito repetições para cada tratamento, correspondente aos estágios foliares e aos clones estudados.

A área das cavidades oleíferas por  $\text{mm}^2$  de superfície foliar foi calculada multiplicando-se o número de cavidades pela média da área mensurada de trinta cavidades oleíferas.

Os dados obtidos foram submetidos aos testes estatísticos multivariados de análise de agrupamento e análise de componentes principais (Sneath e Sokal, 1973), procurando-se estabelecer diferenças anatômicas quantitativas entre os clones estudados e os estágios foliares, bem como relacionar com a resistência à ferrugem.

## Resultados e Discussão

### Características anatômicas da região internervural das folhas dos híbridos de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*

O estágio inicial de desenvolvimento foliar (E1) caracteriza-se pela presença de parênquima paliçádico isobilateral, com poucos espaços intercelulares, paredes celulares delgadas e menor espessura da folha (Figuras 1-3). O parênquima isobilateral é constituído por camadas de células paliçádicas em ambas as faces da folha, diferentemente do dorsiventral, que apresenta parênquima paliçádico na face adaxial e lacunoso na face abaxial (Esau, 1974; Scatena e Scremin-Dias, 2006), como mostram as Figuras 1 a 3.

Observa-se nas Figuras 4 a 6 que, à medida que a planta se desenvolve, no terceiro estágio foliar o parênquima apresenta aspecto dorsiventral, como verificado também por Metcalfe e Chalk (1957) em algumas espécies de *Eucalyptus* e por Silva et. al (2003), em *Eucalyptus grandis*. No quinto estágio foliar, os tecidos já estão mais diferenciados, mantendo a condição do parênquima dorsiventral (Figuras 7-9).

A epiderme é constituída por células estreitamente unidas entre si, sem espaços intercelulares e dispostas em uma única camada. A cutícula é bem espessa em todos os clones, entretanto, no primeiro estágio foliar encontra-se mais delgada quando comparada aos outros estágios. Uma das características do eucalipto é a presença de cavidades secretoras de óleos essenciais, que estão distribuídas no mesofilo, em contato direto com a epiderme.

### Relação dos caracteres anatômicos quantitativos com a ferrugem

Os valores médios referentes aos 12 caracteres anatômicos quantitativos para os três clones de eucalipto, em três estágios do desenvolvimento foliar, estão relacionados na Tabela 1.

Os valores da Tabela 2 referem-se aos coeficientes de correlação entre os 12 caracteres anatômicos quantitativos avaliados e os dois primeiros componentes principais ( $Y_1$



e  $Y_2$ ). Estes componentes foram responsáveis por 91,95% da informação acumulada pelos caracteres avaliados, sendo 83,05% de informação retida para  $Y_1$  e 8,90% para  $Y_2$ . Assim, apenas  $Y_1$  revelou-se como indicador de dissimilaridade entre as espécies estudadas e seus correspondentes estágios foliares. A intensidade da contribuição destes caracteres quantitativos, para a diferenciação das espécies, está relacionada à ocorrência de maiores valores absolutos em  $Y_1$ , os quais se caracterizam por apresentar maior poder discriminatório.

Verifica-se na Tabela 2 que, para os componentes principais  $Y_1$ , os caracteres mais relevantes para a discriminação dos estágios foliares foram: % de parênquima lacunoso, espessura do parênquima lacunoso, % de parênquima paliçádico, espessura do parênquima paliçádico abaxial, espessura da folha, número de cavidades oleíferas e espessura da epiderme adaxial, correspondentes à região internervural da folha.

O dendrograma resultante da Análise de Agrupamento (Figura 10) e a dispersão gráfica referente à Análise dos Componentes Principais (Figura 11) mostraram que os caracteres anatômicos quantitativos com maior poder discriminatório foram os responsáveis pelos agrupamentos formados entre os três clones estudados e os três estágios de desenvolvimento foliar, constituindo dois grupos principais a 0,24 na escala de distância de similaridade (Figura 10). O primeiro grupo correspondeu aos primeiros estágios foliares dos clones A (resistente), B (suscetível) e C (altamente suscetível) e o segundo grupo foi formado pelos terceiros e quintos estágios dos três clones avaliados (Figuras 10 e 11).

O dendrograma (Figura 10) e a dispersão gráfica (Figura 11) demonstram também que a partir de uma distância euclidiana de, aproximadamente, 0,17 na escala, são formados três grupos, sendo o grupo um constituído pelo primeiro estágio foliar dos clones A e B, o grupo dois pelo primeiro estágio foliar do clone C e o grupo três pelos terceiros e quintos estágios foliares dos três clones.

A discriminação do primeiro estágio foliar em relação aos outros dois estágios demonstra a existência de diferenças anatômicas presentes nas folhas de eucalipto, que podem ser relacionadas à maior suscetibilidade dos órgãos, em início de desenvolvimento, à ferrugem, causada pelo fungo *Puccinia psidii*. Estas diferenças estão relacionadas com a maior espessura da epiderme adaxial e do parênquima paliçádico abaxial, maior proporção de

parênquima paliçádico, maior número de cavidades oleíferas, menor espessura e proporção de parênquima lacunoso e menor espessura da folha (Tabelas 1 e 2).

Os estágios iniciais de desenvolvimento das folhas são caracterizados pela maior suscetibilidade ao ataque por *P. psidii*, visto que o patógeno tem preferência por órgãos mais tenros. No entanto, a resistência da planta a este patógeno pode se manifestar até mesmo nesses estágios iniciais, impedindo a ação do mesmo em seus tecidos. Dessa forma, para analisar melhor os fatores envolvidos na resistência da planta ao *P. psidii*, os estágios foliares mais extremos (E1 e E5) foram submetidos, separadamente, aos testes estatísticos multivariados.

A Tabela 3 apresenta os valores médios referentes aos 12 caracteres anatômicos quantitativos para os três clones de eucalipto, no primeiro estágio foliar (E1).

Os coeficientes de correlação entre os 12 caracteres anatômicos quantitativos avaliados e os dois primeiros componentes principais ( $Y_1$  e  $Y_2$ ) estão expostos na Tabela 4. A informação retida foi de 68,53% para o componente principal  $Y_1$  e de 31,47% para o componente  $Y_2$ , sendo o primeiro considerado mais satisfatório para a diferenciação.

As análises estatísticas multivariadas permitiram a discriminação do clone resistente (clone A) em relação aos outros clones, no mesmo estágio foliar (E1), como está apresentado no dendrograma (Figura 12), a uma distância de 0,20 na escala de similaridade, e na dispersão gráfica (Figura 13).

Verifica-se na Tabela 4 que, para o componente principal  $Y_1$ , as variáveis que mais contribuíram para a discriminação dos clones no primeiro estágio foliar foram: área de cavidades oleíferas, espessura do parênquima lacunoso, espessura das cutículas adaxial e abaxial, número de cavidades oleíferas, % de parênquima lacunoso, espessura da epiderme abaxial, espessura do parênquima paliçádico adaxial e % de parênquima paliçádico,

De acordo com o componente principal  $Y_1$ , o clone A, resistente à ferrugem, diferenciou-se dos demais pela ocorrência de maior espessura das cutículas abaxial e adaxial, maior espessura do parênquima paliçádico adaxial, maior % de parênquima paliçádico, maior número e área de cavidades oleíferas, menor espessura da epiderme abaxial e menor espessura e % de parênquima lacunoso.

Resultados semelhantes também foram encontrados por Edwards et al. (1999), que verificaram maiores frações de parênquima paliçádico e cavidades oleíferas em folhas de genótipos resistentes de aipo à *Septoria apiicola*.

Cutículas mais espessas dificultam o processo de penetração de patógenos que atuam por via direta, como o *Puccinia psidii*, contribuindo para a defesa da planta e para sua resistência (Pascholati e Leite, 1995; Agrios, 2005; Silva et al., 2005). A maior proporção de parênquima paliçádico e menor de parênquima lacunoso, bem como a menor espessura da epiderme abaxial da folha também conferem resistência à planta contra fitopatógenos como relatado por Smith et al. (2006) em *Eucalyptus nitens* resistente à *Mycosphaerella* spp.

A maior proporção de parênquima paliçádico, a compactação das células parenquimáticas e menores espaços intercelulares conferem resistência à planta contra fitopatógenos, devido à maior dificuldade de colonização dos patógenos (Jerba, 2003; Silva et al., 2005; Smith et al., 2006). De acordo com Smith et al. (2006), o *Eucalyptus globulus* é mais suscetível à infecção por *Mycosphaerella* spp. do que o *Eucalyptus nitens*, por apresentar mesofilo dorsiventral em folhas jovens, enquanto que o último apresenta mesofilo isobilateral.

No entanto, no presente trabalho, o primeiro estágio foliar, considerado o mais suscetível à ferrugem, apresentou mesofilo isobilateral nos três clones. Isto pode ser explicado pelo fato de que nesta fase o mesofilo da folha encontra-se em processo de diferenciação, com tecidos meristemáticos primários que darão origem ao parênquima paliçádico e lacunoso, que ficam mais evidentes nos estágios de desenvolvimento mais avançados da folha. Além disso, em folhas mais novas, as paredes celulares são mais delgadas, facilitando a entrada do patógeno em seus tecidos, e as folhas são mais tenras, condição necessária ao *Puccinia psidii* (Ferreira, 1989).

O número e área das cavidades oleíferas também são muito importantes na resistência de uma planta, visto que estas estruturas são responsáveis pelo acúmulo de óleos essenciais, cujas substâncias e quantidades presentes interferem na % de germinação de esporos e no crescimento micelial de alguns fungos. Dessa forma, o maior número e a maior área de cavidades oleíferas irão proporcionar a maior produção desses compostos, contribuindo para a proteção da planta contra agentes invasores e fitopatógenos.

O quinto estágio foliar (E5), considerado mais resistente à ferrugem em relação ao primeiro (E1) e terceiro (E3), também foi analisado separadamente a fim de verificar a importância ou implicação na resistência à doença.

Os valores médios referentes aos 11 caracteres anatômicos quantitativos para os três clones, no quinto estágio de desenvolvimento foliar, estão expostos na Tabela 5.

Na tabela 6, estão representados os coeficientes de correlação entre os caracteres quantitativos e os dois componentes principais ( $Y_1$  e  $Y_2$ ) para o quinto estágio foliar. Neste, os componentes foram responsáveis por 89,32% de informação retida para  $Y_1$  e por 10,68% para  $Y_2$ , sendo o primeiro componente considerado mais satisfatório para a discriminação.

Verifica-se na Tabela 6 que, para o componente principal  $Y_1$ , as variáveis que mais contribuíram para a discriminação dos clones no quinto estágio foliar foram: área de cavidades oleíferas, espessura da cutícula abaxial, número de cavidades oleíferas, espessura da folha, espessura da cutícula adaxial, espessura do parênquima lacunoso, espessura das epidermes adaxial e abaxial e espessura do parênquima paliçádico.

O dendrograma (Figura 14), resultante da análise de agrupamento, e o gráfico de dispersão (Figura 15), resultante da análise dos componentes principais, revelam a formação de dois grupos a 0,15 na escala de distância de similaridade, sendo um grupo formado pelos clones A (resistente) e B (suscetível) e o outro grupo formado pelo clone C, confirmando a diferenciação deste último em relação aos demais, quanto ao grau de resistência à doença. Assim, para o componente principal  $Y_1$ , no quinto estágio foliar, o clone C apresentou menor espessura das cutículas adaxial e abaxial, menor número e área de cavidades oleíferas, maior espessura das epidermes adaxial e abaxial, maior espessura de parênquimas paliçádico e lacunoso e maior espessura da folha.

Apesar do estágio foliar mais desenvolvido de eucalipto, como o E5, ser considerado resistente à ferrugem, não desenvolvendo a doença mesmo em espécies ou clones suscetíveis à mesma, os resultados obtidos no presente trabalho demonstram que, ao analisar e quantificar a estrutura anatômica das folhas, um clone altamente suscetível pode manter sua predisposição à ferrugem, podendo sua resistência ser conferida por outros fatores não anatômicos.

Assim, o presente trabalho permitiu a diferenciação anatômica entre três estágios foliares e entre três clones de eucalipto, demonstrando o envolvimento dos caracteres estruturais da folha na resistência à ferrugem.

### Conclusões

- Foi possível discriminar os três estágios foliares e os clones estudados quanto ao grau de resistência ou suscetibilidade à ferrugem, causada por *P. psidii*;
- O clone A confirmou a sua resistência pela maior espessura das cutículas abaxial e adaxial, maior espessura do parênquima paliçádico adaxial, maior % de parênquima paliçádico, maior número e área de cavidades oleíferas e menor espessura e % de parênquima lacunoso;
- Estas características podem dificultar a penetração do patógeno e a sua colonização nos tecidos do hospedeiro.

### Referências Bibliográficas

ACCORSI, W. R. **Contribuição para o estudo anatômico comparativo das espécies *Eucalyptus tereticornis* Smith e *Eucalyptus citriodora* Hooker.** 1941. 104 p. Tese (functional) – Universidade de São Paulo- ESALQ, Piracicaba.

AGRIOS, G.N. How plants defend themselves against pathogens. In: **Plant Pathology.** San Diego: Academic Press, 2005, p. 208-248.

BARBIERI, R.L.; CARVALHO, F. I F. de. Coevolução de plantas e fungos patogênicos. **Rev. Bras. de Agrociência**, v.7, n. 2, p. 79-83 mai-ago, 2001.

EDWARDS, S.J; ISAAC, S.; COLLIN, H.A.; CLIPSON, N. J. Stereological analysis of celery leaves infected by *Septoria apiicola*. **Mycological Research.** 1999, 103: 750-756 Cambridge University Press.

ESAU, K. **Anatomia das plantas com sementes; tradução:** Berta Lange de Morretes. São Paulo, Editora: Edgard Blucher, 1974, 293 p.

FERREIRA, F.A. **Patologia Florestal – Principais Doenças Florestais do Brasil.** Viçosa: Sociedade de Investigações Florestais, 1989. 570p.

GERRITS, P.O. **The application of glycol metacrylate in histotechnology; some fundamental principles.** Germany : Leica GmbH, 1991. 80p.

JERBA, V. F. **Anatomia e ultra-estrutura foliar de cultivares de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) e sua relação com a resistência à antracnose.** 2003. 108p. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

JOHANSEN, D.A. **Plant microtechnique.** New York :McGraw-Hill, 1940. 523p.

JOHNSON, E.D. A comparison of the juvenile and adult leaves of *Eucalyptus globulus*. **New Phytologist**, v. 25, n. 3, p. 202-212, 1926.

METCALFE, C.R.; CHALK, L. Myrtaceae. In: **Anatomy of the Dicotyledons.** v.1. Oxford: Clarendon Press, 1957. p.620-631.

O'BRIEN, T.P.; FEDER, N. e McCULLY, M.E. 1964. Polychromatic staining of plant cell walls by Toluidine Blue O. **Protoplasma**, 59: 367-373.

PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B. Hospedeiro: Mecanismos de Resistência. In: Bergamin Filho, A.; Kimati, H. e Amorim, L. **Manual de Fitopatologia: Princípios e Conceitos.** 3º ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v.1.,p. 417-453.

SAMBUGARO, R. **Caracterização anatômica foliar de clones de seringueira (*Hevea* spp.) visando resistência ao *Microcyclus ulei*.** 2003. 61p. Dissertação (mestrado)- Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

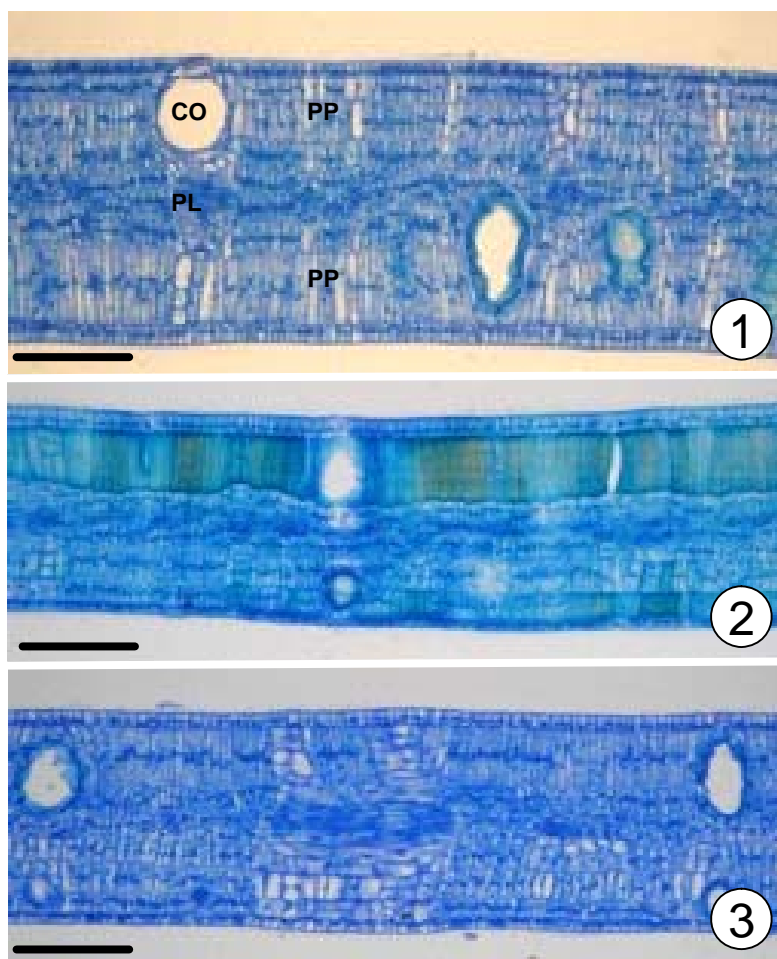
SCATENA, V.L.; SCREMIN-DIAS, E. Parênquima, colênquima e esclerênquima. In: APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; CARMELLO-GUERREIRO, S. M. **Anatomia vegetal**. Viçosa: Ed. UFV, 2 ed. 2006. p. 179-204.

SILVA, E. A. R.; FURTADO, E.L. e RODELLA, R. A. Influências da Maturação Foliar do Eucalipto na Suscetibilidade à Ferrugem. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 2003, Marília. **Anais**, Marília, 2003. CD-ROM.

SILVA, L.M.; ALQUINI, Y. e CAVALLET, V.J. Inter-relações entre a anatomia vegetal e a produção vegetal. **Acta bot. bras.** 19(1): 183-194. 2005.

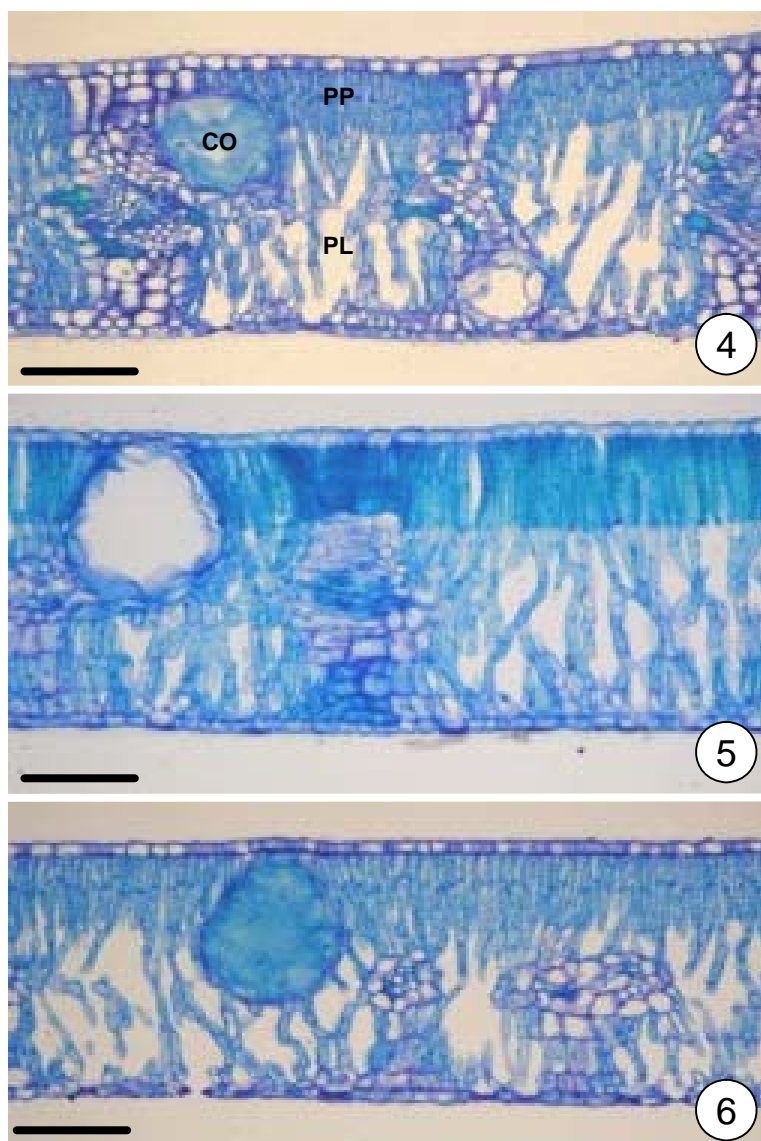
SMITH, A.H.; PINKARD, E.A.; HUNTER, G.C.; WINGFIELD, M.J.; MOHAMMED, C.L. Anatomical variation and defence responses of juvenile *Eucalyptus nitens* leaves to *Mycosphaerella* leaf disease. **Australasian Plant Pathology**, v.35, p. 725-731, 2006.

SNEATH, P.H.A. e SOKAL, R.R. **Numerical Taxonomy**. San Francisco: W.h. Freeman, 1973. 573p.

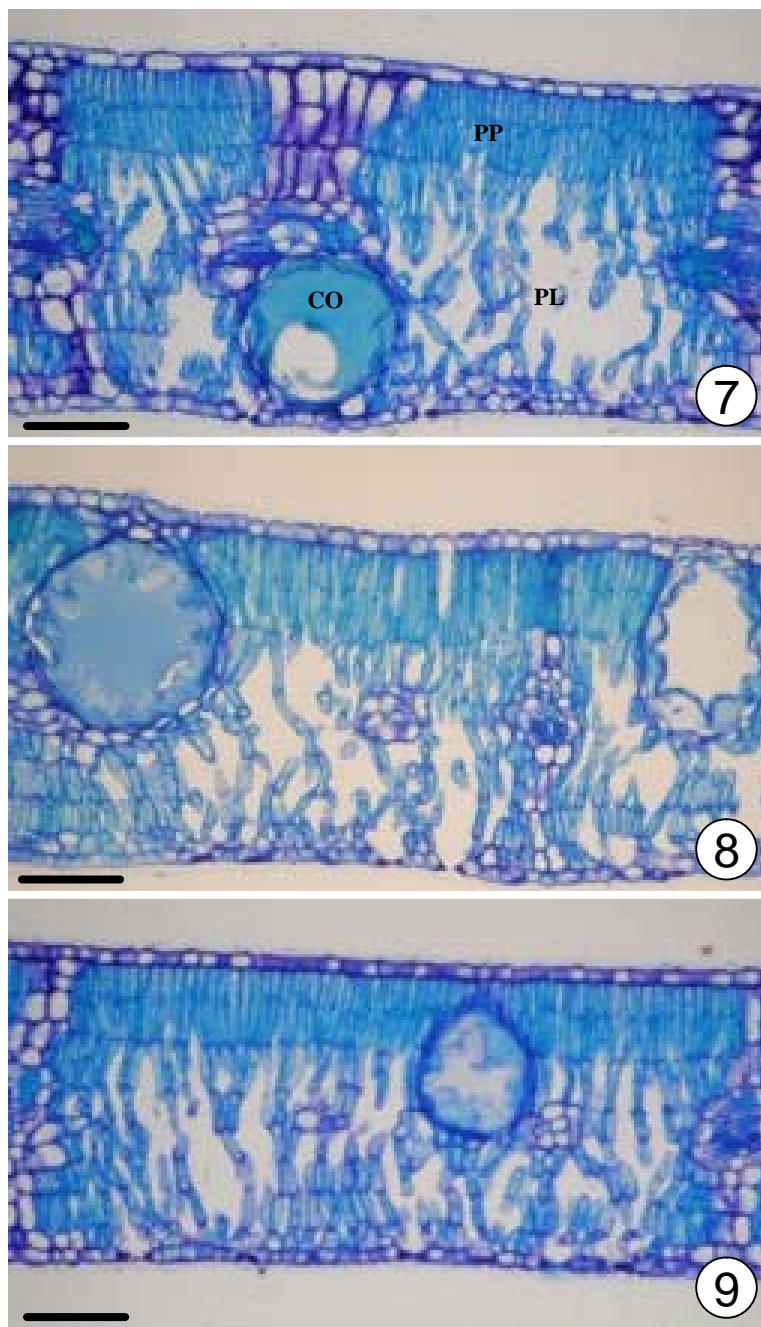


Figuras 1-3. Secções transversais da lâmina foliar, no primeiro estágio, de três clones de eucalipto. 1. Clone A (resistente); 2. Clone B (suscetível); 3. Clone C (altamente suscetível). . PP: parênquima paliçádico. PL: parênquima lacunoso. CO: cavidade oleífera. Barra: 100 µm.





Figuras 4-6. Secções transversais da lâmina foliar, no terceiro estágio, de três clones de eucalipto. 4. Clone A (resistente); 5. Clone B (suscetível); 6. Clone C (altamente suscetível). . PP: parênquima paliçádico. PL: parênquima lacunoso. CO: cavidade oleífera. Barra: 100  $\mu$ m.



Figuras 7-9. Secções transversais da lâmina foliar, no quinto estágio, de três clones de eucalipto. 7. Clone A (resistente); 8. Clone B (suscetível); 9. Clone C (altamente suscetível). PP: parênquima paliçádico. PL: parênquima lacunoso. CO: cavidade oleífera. Barra: 100  $\mu$ m.

Tabela 1. Valores médios dos 12 caracteres anatômicos quantitativos da região internervural da folha, em três estágios de desenvolvimento (E1, E3, E5), dos três clones de eucalipto. Clone A: resistente à ferrugem, clone B: suscetível e clone C: altamente suscetível.

CARACTERES	Clone A			Clone B			Clone C		
	E1	E3	E5	E1	E3	E5	E1	E3	E5
Espessura cutícula face adaxial ( $\mu\text{m}$ )	7,92	7,62	9,51	7,14	7,24	8,63	6,18	6,59	7,02
Espessura cutícula face abaxial ( $\mu\text{m}$ )	6,15	5,52	7,36	5,67	5,41	7,24	4,19	5,52	5,97
Espessura epiderme face adaxial ( $\mu\text{m}$ )	16,51	14,06	13,88	19,71	16,59	14,47	16,98	16,40	15,10
Espessura epiderme face abaxial ( $\mu\text{m}$ )	12,20	13,00	11,20	12,25	13,59	12,35	13,69	14,24	13,30
Espessura do parênquima paliçádico adaxial ( $\mu\text{m}$ )	76,23	78,92	65,52	52,79	80,64	75,78	59,58	78,64	80,44
Espessura do parênquima paliçádico abaxial ( $\mu\text{m}$ )	73,10	0,00	0,00	53,23	0,00	0,00	78,40	0,00	0,00
Espessura do parênquima lacunoso ( $\mu\text{m}$ )	43,80	193,08	170,00	57,82	172,86	163,81	64,21	177,73	176,26
Espessura da folha ( $\mu\text{m}$ )	221,84	299,06	260,42	195,80	283,68	266,41	232,86	287,01	285,10
% de parênquima paliçádico	67,31	26,39	25,16	54,15	28,43	28,44	59,25	27,40	28,21
% de parênquima lacunoso	19,74	64,56	65,28	29,53	60,93	61,49	27,57	61,92	61,82
Área de cavidades oleíferas/ $\text{mm}^2$ de superfície foliar	82,39	73,12	70,58	62,19	106,64	77,79	48,13	58,16	42,14
Número de cavidades oleíferas/ $\text{mm}^2$ de superfície folia	15,09	6,25	5,19	14,28	8,72	5,97	9,31	4,19	2,97

Tabela 2. Coeficientes de correlação entre os 12 caracteres anatômicos quantitativos da região internervural da folha, em três estágios de desenvolvimento, dos três clones de eucalipto, e os dois componentes principais ( $Y_1$  e  $Y_2$ ). Ord.: ordenação dos caracteres quanto ao poder discriminatório.

CARACTERES	Y1	ord.	Y2	ord.
Espessura cutícula face adaxial ( $\mu\text{m}$ )	-0,3083	10	0,5968	2
Espessura cutícula face abaxial ( $\mu\text{m}$ )	-0,4094	9	0,4915	4
Espessura epiderme face adaxial ( $\mu\text{m}$ )	0,6990	7	-0,0156	10
Espessura epiderme face abaxial ( $\mu\text{m}$ )	-0,1031	12	-0,5031	3
Espessura do parênquima paliçádico adaxial ( $\mu\text{m}$ )	-0,6122	8	0,1495	6
Espessura do parênquima paliçádico abaxial ( $\mu\text{m}$ )	0,9863	4	-0,1160	8
Espessura do parênquima lacunoso ( $\mu\text{m}$ )	-0,9925	2	-0,0187	9
Espessura da folha ( $\mu\text{m}$ )	-0,8928	5	-0,1192	7
% de parênquima paliçádico	0,9924	3	-0,0114	11
% de parênquima lacunoso	-0,9968	1	-0,0100	12
Área de cavidades oleíferas/ $\text{mm}^2$ de superfície foliar	-0,1088	11	0,9122	1
Número de cavidades oleíferas/ $\text{mm}^2$ de superfície folia	0,8798	6	0,4368	5
Informação retida (%)	83,05		8,90	
Informação acumulada (%)	83,05		91,95	

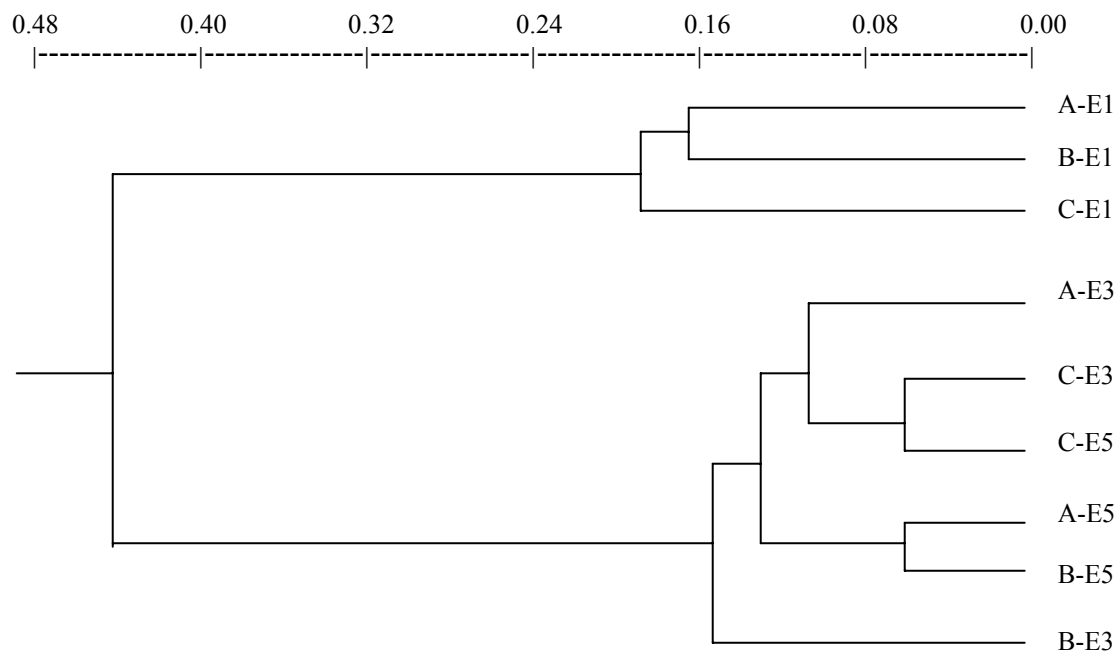


Figura 10. Dendrograma resultante da Análise de Agrupamento de 12 caracteres anatômicos da região internervural da folha, utilizando-se a Distância Euclidiana Média, entre os três clones de eucalipto e os três estágios do desenvolvimento foliar. A: clone resistente. B: clone suscetível. C: clone altamente suscetível. E1, E3, E5: estágios do desenvolvimento foliar.

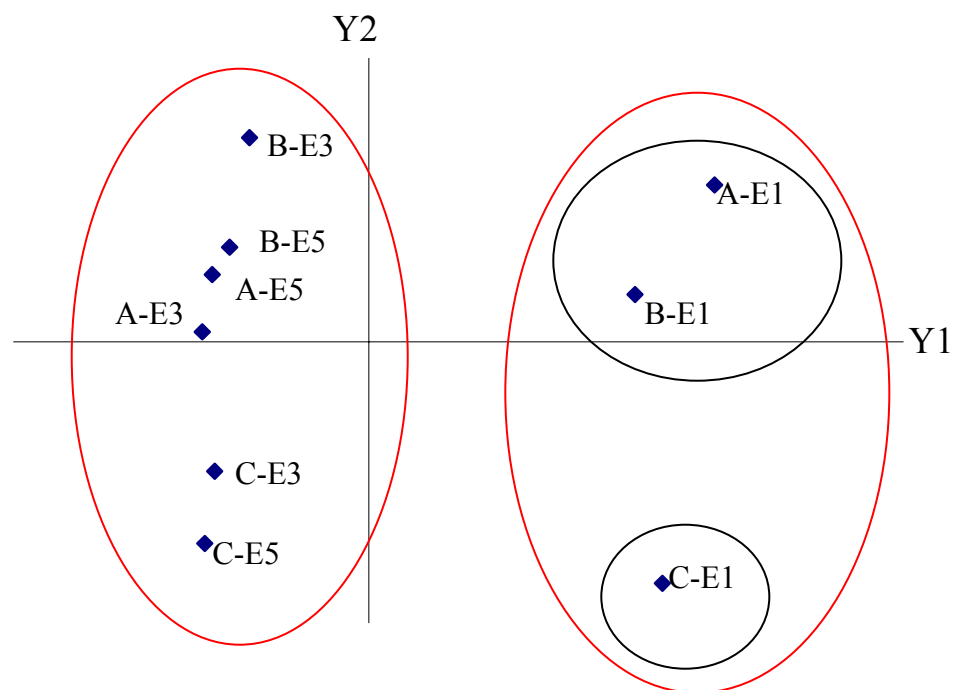


Figura 11. Dispersão gráfica dos três clones de eucalipto em três estágios de desenvolvimento foliar, utilizando-se os dois primeiros componentes principais ( $Y_1$  e  $Y_2$ ) para o conjunto das 12 caracteres estruturais quantitativos da lâmina foliar. A: clone Resistente. B: clone suscetível. C: clone altamente suscetível. E1, E3 e E5: estágios do desenvolvimento foliar.

Tabela 3. Valores médios dos 12 caracteres anatômicos quantitativos da região internervural da folha, no primeiro estágio de desenvolvimento (E1) dos três clones de eucalipto. A: clone resistente à ferrugem; B: clone suscetível; C: clone altamente suscetível.

CARACTERES	Clones		
	A	B	C
Espessura cutícula face adaxial ( $\mu\text{m}$ )	7,92	7,14	6,18
Espessura cutícula face abaxial ( $\mu\text{m}$ )	6,15	5,67	4,19
Espessura epiderme face adaxial ( $\mu\text{m}$ )	16,51	19,71	16,98
Espessura epiderme face abaxial ( $\mu\text{m}$ )	12,20	12,25	13,69
Espessura do parênquima paliçádico adaxial ( $\mu\text{m}$ )	76,23	52,79	59,58
Espessura do parênquima paliçádico abaxial ( $\mu\text{m}$ )	73,10	53,23	78,40
Espessura do parênquima lacunoso ( $\mu\text{m}$ )	43,80	57,82	64,21
Espessura da folha ( $\mu\text{m}$ )	221,84	195,80	232,86
% de parênquima paliçádico	67,31	54,15	59,25
% de parênquima lacunoso	19,74	29,53	27,57
Área de cavidades oleíferas/ $\text{mm}^2$ de superfície foliar	82,39	62,19	48,13
Número de cavidades oleíferas/ $\text{mm}^2$ de superfície foliar	15,09	14,28	9,31

Tabela 4. Coeficientes de correlação entre os 12 caracteres anatômicos quantitativos da região internervural da folha, no primeiro estágio de desenvolvimento, dos três clones de eucalipto, e os dois componentes principais ( $Y_1$  e  $Y_2$ ). Ord.: ordenação dos caracteres quanto ao poder discriminatório.

CARACTERES	Y1	ord.	Y2	ord.
Espessura cutícula face adaxial ( $\mu\text{m}$ )	0,9853	3	-0,1705	10
Espessura cutícula face abaxial ( $\mu\text{m}$ )	0,9218	4	-0,3877	9
Espessura epiderme face adaxial ( $\mu\text{m}$ )	-0,2455	10	-0,9694	3
Espessura epiderme face abaxial ( $\mu\text{m}$ )	-0,8221	7	0,5693	6
Espessura do parênquima paliçádico adaxial ( $\mu\text{m}$ )	0,7666	8	0,6421	5
Espessura do parênquima paliçádico abaxial ( $\mu\text{m}$ )	-0,0892	12	0,9960	1
Espessura do parênquima lacunoso ( $\mu\text{m}$ )	-0,9949	2	-0,1007	11
Espessura da folha ( $\mu\text{m}$ )	-0,1810	11	0,9835	2
% de parênquima paliçádico	0,6921	9	0,7218	4
% de parênquima lacunoso	-0,8240	6	-0,5665	7
Área de cavidades oleíferas/ $\text{mm}^2$ de superfície foliar	0,9999	1	-0,0086	12
Número de cavidades oleíferas/ $\text{mm}^2$ de superfície foliar	0,8749	5	-0,4842	8
Informação retida (%)	68,53		31,47	
Informação acumulada (%)	68,53		100,00	



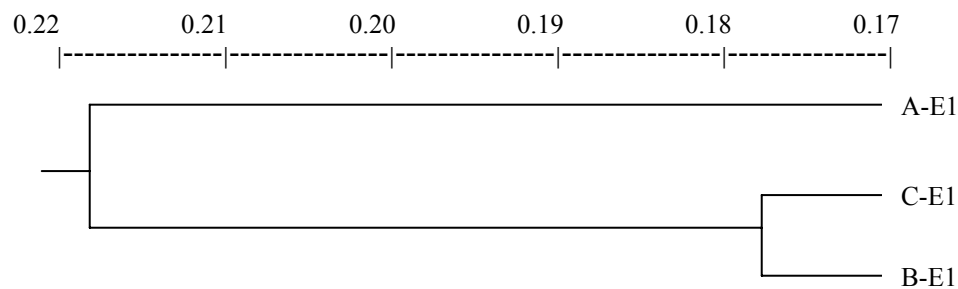


Figura 12. Dendrograma resultante da Análise de Agrupamento de 12 caracteres anatômicos da região internervural da folha, utilizando-se a Distância Euclidiana Média, entre os três clones de eucalipto no primeiro estágio (E1) do desenvolvimento foliar. A: clone resistente. B: clone suscetível. C: clone altamente suscetível.

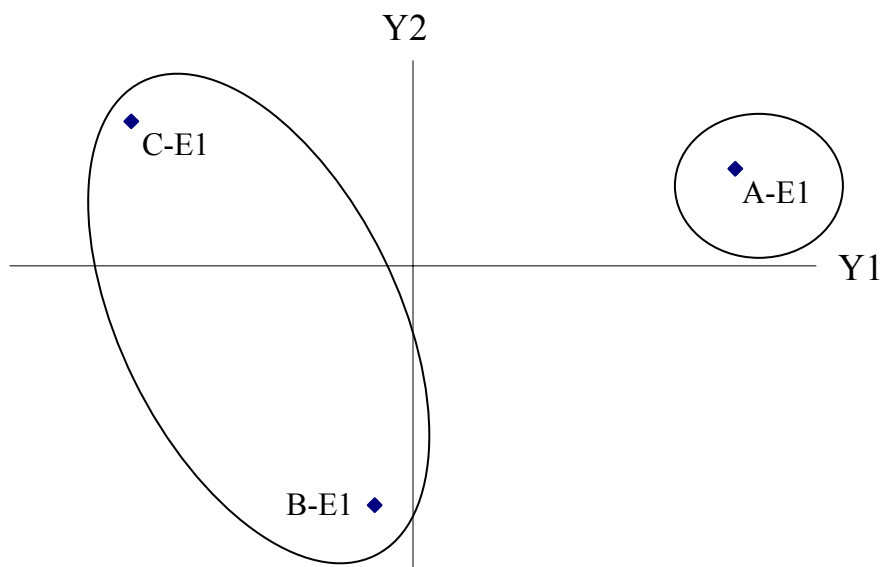


Figura 13. Dispersão gráfica dos três clones de eucalipto no primeiro estágio de desenvolvimento foliar, utilizando-se os dois primeiros componentes principais ( $Y_1$  e  $Y_2$ ) para o conjunto de 12 caracteres anatômicos quantitativos da lâmina foliar. A: clone resistente. B: clone suscetível. C: clone altamente suscetível. E1: primeiro estágio do desenvolvimento foliar.

Tabela 5. Valores médios dos 11 caracteres anatômicos quantitativos da região internervural da folha, no quinto estágio de desenvolvimento (E5) dos três clones de eucalipto. A: clone resistente à ferrugem; B: clone suscetível; C: clone altamente suscetível.

CARACTERES	Clones		
	A	B	C
Espessura cutícula face adaxial ( $\mu\text{m}$ )	9,51	8,63	7,02
Espessura cutícula face abaxial ( $\mu\text{m}$ )	7,36	7,24	5,97
Espessura epiderme face adaxial ( $\mu\text{m}$ )	13,88	14,47	15,10
Espessura epiderme face abaxial ( $\mu\text{m}$ )	11,02	12,35	13,30
Espessura do parênquima paliçádico adaxial ( $\mu\text{m}$ )	65,52	75,78	80,44
Espessura do parênquima lacunoso ( $\mu\text{m}$ )	170,00	163,81	176,26
Espessura da folha ( $\mu\text{m}$ )	260,42	266,41	285,10
% de parênquima paliçádico	25,16	28,44	28,21
% de parênquima lacunoso	65,28	61,49	61,82
Área de cavidades oleíferas/ $\text{mm}^2$ de superfície foliar	70,58	77,79	42,14
Número de cavidades oleíferas/ $\text{mm}^2$ de superfície foliar	5,19	5,97	2,97

Tabela 6. Coeficientes de correlação entre os 11 caracteres anatômicos quantitativos da região internervural da folha, no quinto estágio de desenvolvimento, dos três clones de eucalipto, e os dois componentes principais (Y<sub>1</sub> e Y<sub>2</sub>). Ord.: ordenação dos caracteres quanto ao poder discriminatório.

CARACTERES	Y1	ord.	Y2	ord.
Espessura cutícula face adaxial (µm)	0,9098	5	0,4149	7
Espessura cutícula face abaxial (µm)	0,9888	2	0,1493	10
Espessura epiderme face adaxial (µm)	-0,8383	7	-0,5452	5
Espessura epiderme face abaxial (µm)	-0,7703	8	-0,6377	4
Espessura do parênquima paliçádico adaxial (µm)	-0,6902	9	-0,7236	3
Espessura do parênquima lacunoso (µm)	-0,9011	6	0,4335	6
Espessura da folha (µm)	-0,9533	4	-0,3019	8
% de parênquima paliçádico	-0,3791	10	-0,9254	2
% de parênquima lacunoso	0,3644	11	0,9312	1
Área de cavidades oleíferas/mm <sup>2</sup> de superfície foliar	0,9927	1	-0,1202	11
Número de cavidades oleíferas/mm <sup>2</sup> de superfície foliar	0,9836	3	-0,1803	9
Informação retida (%)	89,32		10,68	
Informação acumulada (%)	89,32		100,00	

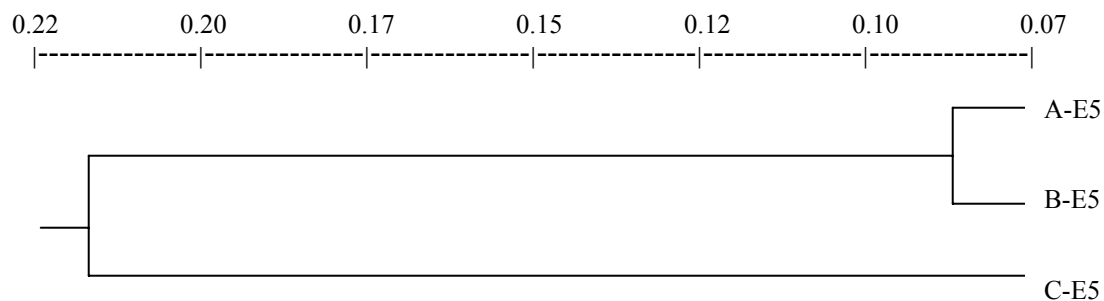


Figura 14. Dendrograma resultante da Análise de Agrupamento de 11 caracteres anatômicos da região internervural da folha, utilizando-se a Distância Euclidiana Média, entre os três clones de eucalipto no quinto estágio do desenvolvimento foliar . A: clone resistente; B: clone suscetível; C: clone altamente suscetível. E5: quinto estágio do desenvolvimento foliar.

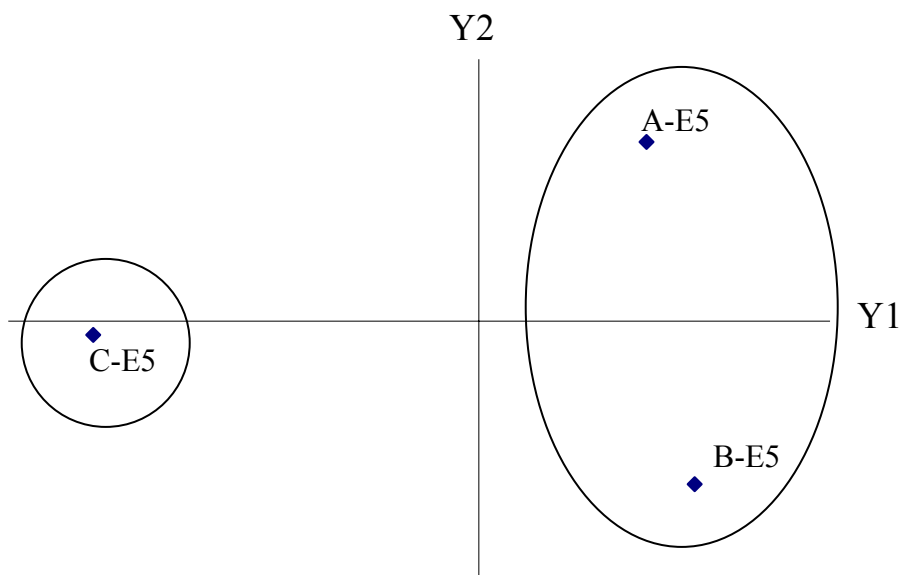


Figura 15. Dispersão gráfica dos três clones de eucalipto no quinto estágio de desenvolvimento foliar, utilizando-se os dois primeiros componentes principais ( $Y_1$  e  $Y_2$ ) para o conjunto das 11 caracteres anatômicos quantitativos da lâmina foliar. A: clone resistente; B: clone suscetível; C: clone altamente suscetível. E5: quinto estágio do desenvolvimento foliar.

## **Capítulo II**

**Aspectos da patogênese de *Puccinia psidii* pela micromorfologia da epiderme foliar de clones de eucalipto**

## Aspectos da patogênese de *Puccinia psidii* pela micromorfologia da epiderme foliar de clones de eucalipto

Renata Ruiz Silva Souza<sup>(1)</sup>, Roberto Antonio Rodella<sup>(2)</sup>, Edson Luiz Furtado<sup>(1)\*\*</sup>.

<sup>(1)</sup> Departamento de Produção Vegetal, Faculdade de Ciências Agrônomicas – UNESP, CEP 18.610-307 Botucatu-SP. E-mails: rrsilva@fca.unesp.br; elfurtado@fca.unesp.br

<sup>(2)</sup> Departamento de Botânica, Instituto de Biociências de Botucatu - UNESP, CEP 18618-000 Botucatu-SP. E-mail: rodella@ibb.unesp.br

\*Parte da Dissertação de Mestrado do primeiro autor: Bolsista da Capes

\*\* Bolsista do CNPq

Aceito para publicação em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

---

### Resumo

Silva-Souza, R.R.; Rodella, R.A.; Furtado, E.L. **Avaliação da patogênese de *Puccinia psidii* pela micromorfologia da epiderme foliar de clones de eucalipto.** *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 2007.

A ferrugem é uma das principais doenças em plantios de eucalipto, provocando sérios prejuízos à cultura, quando esta se encontra em estágio inicial de desenvolvimento. Para um melhor entendimento dos processos iniciais de infecção pelo patógeno, o trabalho teve como objetivo avaliar a patogênese de *Puccinia psidii* pela micromorfologia da epiderme foliar em clones de eucalipto. Para o ensaio foram utilizadas mudas de dois clones do híbrido *Eucalyptus urograndis*, proveniente do cruzamento entre *Eucalyptus urophylla* e *E. grandis*, selecionados em função da resposta à doença, sendo o clone A resistente e o clone C altamente suscetível à ferrugem. Discos foliares de três estágios de desenvolvimento da folha (E1, E3 e E5) foram inoculados no terço médio abaxial e mantidos em condições adequadas ao estabelecimento do patógeno e desenvolvimento da doença. Amostras foram coletadas em 24 e 120 horas após a inoculação, fixadas em glutaraldeído 2,5% e processadas para a análise em

microscópio eletrônico de varredura. O clone resistente manteve sua condição, nos três estágios foliares, em função da ausência de sintomas, provocados pelo patógeno, na superfície foliar e pela menor incidência de apressórios formados. O outro clone mostrou-se altamente suscetível à ferrugem, no primeiro e terceiro estágios foliares, devido à maior ocorrência de urediniósporos germinados e dotados de apressórios, bem como pela degradação dos tecidos superficiais da folha. O quinto estágio foliar mostrou-se resistente em ambos os clones, sendo que o material suscetível caracterizou-se pelo crescimento superficial do patógeno, sem ocorrência de penetração, e o resistente, pela inativação dos urediniósporos. Notou-se a formação de protuberâncias na superfície da folha, associadas ao patógeno, somente no primeiro e terceiro estágios foliares do clone resistente, em 120 horas após a inoculação, e no quinto estágio foliar do clone altamente suscetível, em 24 horas após a inoculação, sugerindo-se uma possível reação de defesa da planta.

Termos para indexação: *Puccinia psidii*, patogênese, eucalipto, resistência.

---

### Summary

Silva-Souza, R.R.; Rodella, R.A.; Furtado, E.L. **Evaluation of *Puccinia psidii* pathogenesis via leaf epidermis micromorphology of eucalyptus clones.** *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 2007.

Rust is one of the most important diseases in eucalyptus plantations, causing serious damages to stands in the initial stage of development. In order to better understand the initial processes of infection by the pathogen, this study aimed to evaluate *Puccinia psidii* pathogenesis based on the leaf epidermis micromorphology of eucalyptus clones. Seedlings from two clones of the *Eucalyptus urograndis* hybrid were used in the assay, selected based on their response to the disease; clone A was considered resistant and clone C was considered highly susceptible to rust. Leaf discs were inoculated at the middle third and were maintained at adequate conditions for pathogen establishment and development of the disease. Samples were collected 24 and 120 hours after inoculation, and were fixed in 2.5% glutaraldehyde and

processed for analysis under the scanning electron microscope. The resistant clone maintained its condition during the three leaf stages, based on the lack of symptoms on the leaf surface caused by the pathogen, and by the smaller incidence of appressoria formed. The other clone proved highly susceptible to rust during the first and third leaf stages, due to greater occurrence of germinated, appressoria-bearing uredospores, as well as because of degradation of leaf surface tissues. The fifth leaf stage was resistant in both clones, and the susceptible material was characterized by superficial growth of the pathogen, without occurrence of penetration, while the resistant material was characterized by uredospore inactivation. The formation of protuberances was noted on the leaf surface, in association with the pathogen, only in the first and third leaf stages of the resistant clone, after 120 hours of inoculation, and the fifth leaf stage of the highly susceptible, 24 hours of inoculation, suggesting a possible defense reaction by the plant.

Keywords: *Puccinia psidii*, pathogenesis, eucalyptus, resistance.

---

### **Introdução**

O avanço das áreas reflorestadas para regiões mais quentes e úmidas, o plantio de espécies mais suscetíveis ou de materiais clonais, sem diversidade genética, e a utilização repetitiva de uma mesma área para plantio criaram condições favoráveis à ocorrência de doenças (Alfenas et al., 2004). Dentre elas, a ferrugem causada por *Puccinia psidii* Winter é uma das mais limitantes no estabelecimento de novos plantios e na condução de brotações de algumas espécies e procedências de *Eucalyptus* (Ruiz et al., 1987; Ferreira, 1989).

A ferrugem é uma das principais doenças em plantios de eucalipto, provocando sérios prejuízos à cultura, quando esta se encontra em estágio inicial de desenvolvimento (Ferreira, 1989, Alfenas et al., 2004). As plantas ficam mais expostas e suscetíveis ao patógeno até os dois anos de idade, devido ao maior número de brotações emitidas nesta fase e à presença de órgãos tenros, ideais ao estabelecimento do agente causal (Ferreira, 1989, Demuner e Alfenas, 1991; Coutinho et al., 1998). Ocorre tanto em viveiros como em áreas de



plantio de eucalipto, sendo neste último a situação que melhor representa as perdas ocasionadas pela mesma.

O fungo *Puccinia psidii*, causador da ferrugem, é parasita de diferentes espécies de mirtáceas nativas e exóticas, com a capacidade de se adaptar e infectar mirtáceas importadas e não originárias da América do Sul, como algumas espécies de eucalipto (Figueiredo, 2001).

A penetração de urediniosporos, na maioria das vezes, é direta, através da cutícula e epiderme, entre as paredes anticlinais das células epidérmicas, mediante a formação de apressório. Após a penetração tem início o processo de colonização intercelular dos tecidos do hospedeiro pelo patógeno, que por meio de haustórios intracelulares retira os nutrientes no interior das células do hospedeiro (Ferreira, 1989; Bedendo, 1995; Alfenas et al., 2004).

De acordo com Mendgen et al. (1996), os eventos iniciais da infecção ocorrem através da adesão do patógeno na cutícula e o crescimento direto de tubos germinativos na superfície das plantas.

Para um melhor entendimento dos processos iniciais de infecção pelo patógeno, torna-se importante o estudo das características da superfície foliar, já que a patogênese depende da resposta tigmotrópica do patógeno no reconhecimento do hospedeiro (Bailey et al., 1992; Jiménez-Díaz, 1996, citados por Jerba, 2003).

O objetivo do presente trabalho foi verificar possíveis diferenças estruturais na superfície epidérmica foliar e comparar o comportamento do patógeno na pré-infecção entre dois clones de eucalipto, em três estágios foliares.

### **Material e Métodos**

A condução do experimento foi realizada no Setor de Defesa Fitossanitária, do Departamento de Produção Vegetal, da Faculdade de Ciências Agrônômicas da UNESP em Botucatu- SP. Os estudos ao microscópio eletrônico de varredura foram realizados no Centro de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biociências de Botucatu - UNESP.

Para o ensaio foram utilizadas mudas de dois clones do híbrido *Eucalyptus urograndis*, com aproximadamente três meses de idade. As mudas foram cedidas pela empresa Votorantim Celulose e Papel S.A., e os clones selecionados em função da resposta ao ataque por *Puccinia psidii*, sendo o clone A resistente e o clone C altamente suscetível à ferrugem.

Esporos do fungo, cultivado em *Syzygium jambos* mantidos em casa-de-vegetação, no Departamento de Defesa Fitossanitária da Faculdade de Ciências Agrônomicas de Botucatu, foram coletados para o preparo da suspensão de inóculo.

Com a finalidade de garantir o local de deposição do inóculo para o estudo da microscopia eletrônica de varredura, a inoculação foi efetuada em discos foliares. Com o auxílio de um furador, foram cortados discos de 1,5 cm de diâmetro de folhas destacadas dos primeiros, terceiros e quintos pares dispostos no ramo, estabelecidos por Silva et. al, (2003).

Os discos foram colocados sobre espumas saturadas em água em bandejas plásticas (Figura 1) e inoculados no terço médio abaxial com uma suspensão de esporos, provenientes de *Syzygium jambos*, a uma concentração de  $9 \times 10^4$  esporos/mL. O método de inoculação utilizado foi o pincelamento, que se mostrou mais eficiente do que o método de deposição de microgotas, pela maior capacidade de espalhamento do inóculo e durabilidade dos discos.

Após a inoculação, as bandejas foram cobertas com tampa de vidro, para evitar a perda de umidade, e acondicionadas em uma câmara de inoculação com fotoperíodo de 12 horas e temperatura em torno de  $20^{\circ}\text{C}$  ( $\pm 1$ ), ideais para o desenvolvimento da doença.

Para se proceder ao estudo em microscopia eletrônica de varredura, as amostras foram coletadas em 24 e 120 horas após a inoculação do patógeno, visto que em 24 horas, sob condições ideais, os esporos de *Puccinia psidii* já estão germinados. As amostras coletadas foram fixadas em glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato 0,1M pH 7,3 e pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1% em tampão fosfato 0,1M pH 7,3. Em seguida, passou por uma desidratação em série de acetona, submetido à secagem em ponto crítico e metalização em ouro, para posterior análise em microscópio eletrônico de varredura “Philips SEM 515” (Robards, 1978).

## **Resultados e Discussão**

As Figuras 3-26 revelam a presença de ceras epicuticulares, compostas por placas, nos dois clones e nos três estágios foliares, comum em algumas espécies de eucalipto. Observa-se que nos locais de penetração do patógeno há menor ocorrência de ceras, podendo-se sugerir uma possível capacidade do patógeno em degradar esses componentes; só não se

sabe se esta camada é digerida pelos microrganismos e aproveitada por eles como fonte de energia. No entanto, são necessários estudos para comprovar esta hipótese. Este fato também foi observado por Magnani et al. (2007).

De acordo com Medeiros et al. (2003), a degradação direta das ceras epicuticulares é difícil de ser comprovada. Diversos fungos fitopatogênicos produzem cutinases (enzimas degradadoras da cutina) durante o processo de infecção, auxiliando a penetração do mesmo nos tecidos do hospedeiro, bem como a adesão dos esporos.

A atividade das cutinases, como auxiliares na adesão de esporos na cutícula, tem sido demonstrada em urediniósporos de ferrugens (Deising et al., 1992, citado por Mendgen et al., 1996). Pascholati (1995) também descreveu a importância dessas enzimas, para os fungos que penetram através da superfície intacta da planta, na degradação enzimática dessa barreira, constituindo em fator chave na patogenicidade.

Após 24 horas da inoculação do patógeno, verificou-se a germinação dos urediniósporos nos dois clones, no primeiro estágio foliar. No clone resistente (clone A) ocorreu, algumas vezes, a desidratação de alguns urediniósporos, tubos germinativos e apressórios formados (Figuras 3 e 4). Este evento de murcha também foi verificado por Magnani et al. (2007), no mesmo período, com urediniósporos de *Phakopsora pachyrhizi*. No clone suscetível, no mesmo estágio foliar, os urediniósporos germinaram, dando origem a tubos germinativos íntegros, de tamanhos variados, formando o apressório e iniciando o processo de infecção (Figuras 5 e 6).

Neste mesmo período, os terceiros e quintos estágios foliares mostraram reações similares nos dois clones, com a menor incidência de urediniósporos germinados na superfície foliar. A Figura 7 representa a germinação do urediniósporo fúngico, no clone resistente, no terceiro estágio foliar, evidenciando a estrutura de penetração (“peg”) entre as paredes anticlinais das células epidérmicas. Isto demonstra que o patógeno pode atacar até mesmo plantas resistentes à doença, entretanto, após a penetração do mesmo, as plantas resistentes podem formar barreiras, impedindo o avanço do patógeno em seus tecidos. No clone altamente suscetível, também no terceiro estágio foliar, foram observados urediniósporos germinados (Figuras 9 e 10).

No quinto estágio foliar, após 24 horas da inoculação, a resistência do clone A ficou mais evidente, com a baixa ocorrência de urediniósporos germinados e a ausência de

apressórios, como mostram as figuras 11 e 12. Porém, no clone C (altamente suscetível), observam-se extensos tubos germinativos e ausência da penetração, bem como a formação de protuberâncias na superfície da folha, formadas por células epidérmicas (Figuras 13 e 14). Magnani et al. (2007) verificaram que urediniósporos com tubos germinativos longos, não formavam apressórios e, quando isso ocorria, o mesmo era pequeno; já quando os tubos germinativos apresentavam-se curtos, os apressórios tiveram tamanho igual ou superior aos dos urediniósporos de origem, concordando com as observações do presente trabalho. De acordo com Hunt (1983), o tubo germinativo curto reduz a quantidade de energia endógena gasta com o crescimento e, desta forma, esta energia poderá ser utilizada na penetração das células.

Em 120 horas após a inoculação, no primeiro estágio foliar, ocorreu a progressão dos sintomas resultantes da ação do patógeno sobre a superfície foliar. No clone resistente surgem protuberâncias na superfície da folha, envolvendo os urediniósporos, como uma possível reação de proteção da planta (Figura 15 e 16). A Figura 15 mostra a associação da protuberância com o patógeno, evidenciando a desidratação dos apressórios e urediniósporos. Esta estrutura foi observada apenas no clone resistente, em todos os estágios foliares, 120 horas após a inoculação, e no quinto estágio foliar do clone altamente suscetível, 24 horas após a inoculação. No clone C (altamente suscetível), após 120 horas da inoculação, ocorreu a degradação dos tecidos, tanto da cutícula como da epiderme, indicando o provável início do processo de colonização do hospedeiro pelo patógeno (Figuras 17 e 18).

Neste período (120 h.a.i.), no terceiro estágio foliar, o clone resistente foi marcado pela presença das protuberâncias na superfície foliar (Figura 19), também observadas no primeiro estágio do mesmo clone; bem como pela baixa ocorrência de urediniósporos germinados (Figura 20). Diferentemente deste, o clone altamente suscetível, apresentou locais com a degradação dos tecidos superficiais, provocada pelo patógeno (Figuras 21 e 22).

No quinto estágio foliar, em 120 horas após a inoculação, foi mantida a integridade das células, sem o desenvolvimento da doença, em ambos os clones (Figuras 23-26). No material suscetível (C) o patógeno apresentou longos tubos germinativos e ausência de apressório e de “pegs” de penetração (Figura 25 e 26). Estes resultados são semelhantes aos encontrados por Araújo e Matsuoka (2004), em que longos tubos germinativos de *Alternaria solani* cresceram e formaram hifas na superfície da folha de tomateito resistente e suscetível à doença.

Assim, o clone A, resistente, manteve sua condição, nos três estágios foliares, pela ausência de sintomas na superfície foliar e menor incidência de apressórios formados, concordando com os resultados encontrados por Araújo e Matsuoka (2004).

O clone C mostrou-se altamente suscetível à ferrugem, no primeiro e terceiro estágios foliares, pela maior ocorrência de urediniósporos germinados e dotados de apressórios, bem como pela degradação dos tecidos superficiais da folha.

O quinto estágio foliar mostrou-se resistente em ambos os clones, sendo que o material suscetível caracterizou-se pelo crescimento superficial do patógeno, sem ocorrência de penetração, e o resistente, pela inativação dos urediniósporos. Estes resultados corroboram com aqueles encontrados por Xavier (1997) em genótipo de *Eucalyptus grandis* suscetível ao *Puccinia psidii*. A autora observou uma redução gradativa da germinação, formação de apressório e penetração da primeira até a quarta folha posicionada no ramo, sendo que no quinto estágio foliar não houve penetração e a germinação foi reduzida em relação ao observado nos quatro primeiros estágios foliares.

Notou-se a formação de protuberâncias na superfície da folha, associadas ao patógeno, somente no primeiro e terceiro estágios foliares do clone resistente, em 120 h.a.i. e no quinto estágio foliar do clone C, em 24 h.a.i., sugerindo-se uma possível reação de defesa da planta. No entanto, para uma exata interpretação dos resultados observados e do acompanhamento do processo de infecção na planta, serão realizados cortes histológicos para serem analisados em microscopia de luz.

Dessa forma, a observação em microscopia eletrônica de varredura permitiu a confirmação da resistência do clone A e da alta suscetibilidade do clone C, concordando com os resultados obtidos em inoculações artificiais e de índices da doença no campo.

O método de discos foliares e inoculação por pincelamento mostrou-se eficiente tanto para o estudo em microscopia eletrônica de varredura, quanto para testes de resistência ou suscetibilidade ao *P. psidii*, visto que após dez dias ocorreu o aparecimento dos sintomas no primeiro estágio foliar do clone suscetível (Figura 2). Vários autores verificaram a eficiência do método de inoculação em folhas destacadas (Xavier, 1997; Bigirimana e Hofte, 2001; Kamikoga, 2001; Rios et al., 2001; Jerba, 2003; Bizi et al., 2003; Jackson et al., 2004). Diferentemente de Magnani et al. (2007), que não observaram a produção de urediniósporos de *Phakopsora pachyrhizi* em folhas destacadas de soja e acondicionadas em bandejas.

### Conclusão

- O clone A, resistente, manteve sua condição, nos três estágios foliares, pela ausência de sintomas na superfície foliar e menor incidência de apressórios formados.
- O clone C mostrou-se altamente suscetível à ferrugem, no primeiro e terceiro estágios foliares, pela maior ocorrência de urediniósporos germinados e dotados de apressórios, bem como pela degradação dos tecidos superficiais da folha.
- O quinto estágio foliar mostrou-se resistente em ambos os clones, sendo que o material suscetível caracterizou-se pelo crescimento superficial do patógeno, sem ocorrência de penetração, e o resistente, pela inativação dos urediniósporos.
- Notou-se a formação de protuberâncias na superfície da folha, associadas ao patógeno, somente no primeiro e terceiro estágios foliares do clone resistente, em 120 h.a.i. e no quinto estágio foliar do clone C, em 24 h.a.i., sugerindo-se uma possível reação de defesa da planta.
- O método de inoculação em discos foliares de eucalipto mostrou-se eficiente para o estudo em microscopia eletrônica de varredura, bem como para testes de resistência à ferrugem.
- Para o acompanhamento do desenvolvimento do patógeno na folha, será efetuado estudo histopatológico.

### Referências Bibliográficas

ALFENAS, A.C.; ZAUZA, E.A.V.; MAFIA, R.G.; ASSIS, T.F. de. **Clonagem e doenças do eucalipto**. Editora UFV, Universidade Federal de Viçosa, p. 246-252. 2004.

ARAÚJO, J.C.A. DE; MATSUOKA, K. Histopatologia da Interação *Alternaria solani* e Tomateiros Resistente e Suscetível. **Fitopatologia Brasileira**. v. 29, n.3, 2004.

BEDENDO, I. P. Ferrugens. In: Bergamin Filho, A.; Kimati, H. e Amorim, L. **Manual de Fitopatologia: Princípios e Conceitos**. 3º ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v.1.,p. 872-880.

BIGIRIMANA, J.; HÖFTE, M. Bean Anthracnose: Inoculation Methods and Influence of Plant Stage on Resistance of *Phaseolus vulgaris* Cultivars. **Journal of Phytopathology**. v.149, n.7-8, p.403–408, 2001.

BIZI, R. M.; GRIGOLETTI JÚNIOR, A.; AUER, C. G. Métodos de inoculação de *Botrytis cinerea* em duas espécies de *Eucalyptus*. In: Evento de iniciação científica da embrapa florestas, 2, 2003, Colombo. **Anais**. Colombo: Embrapa Florestas, 2003. Cd-Rom.

COUTINHO, T.A., WINGFIELD, M.J., ALFENAS, A .C. & CROUS, P.W. ***Eucalyptus Rust: A Disease with the Potential for Serious International Implications***. Plant Disease, v. 82, n.7, p.819–825, july 1998.

DEMUNER, N. L. e ALFENAS, A. C. Fungicidas sistêmicos para o controle da ferrugem causada por *Puccinia psidii* em *Eucalyptus cloeziana*. **Fitopatologia Brasileira**. Brasília, v.16, n.3, p. 171-174, setembro 1991.

FERREIRA, F.A. **Patologia Florestal – Principais Doenças Florestais do Brasil**. Viçosa: Sociedade de Investigações Florestais, 1989. 570p.

FIGUEIREDO, M. B. **Doenças fúngicas emergentes em grandes culturas**. O Biológico. São Paulo, v. 63, n. 01/02, p. 29-32, jan-dez, 2001.

HUNT, P. Cuticular penetration by germinating uredospores. **Transactions of the British Mycological Society** 51:103-112. 1983.

JACKSON, S. L., MAXWELL, A., NEUMEISTER-KEMP, H. G., DELL, B., ST J. HARDY, G. E. Infection, hyperparasitism and conidiogenesis of *Mycosphaerella lateralis* on *Eucalyptus globulus* in Western Australia. **Australasian Plant Pathology**. v.33, n.1, p.49-53, 2004.

JERBA, V. F. **Anatomia e ultra-estrutura foliar de cultivares de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.)** e sua relação com a resistência à antracnose. 2003. 108p. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

KAMIKOGA, A.T.M. **Método da folha destacada para avaliar resistência da soja ao oídio.** Tese (Doutorado). Curitiba – Universidade Federal do Paraná. 2001. 86p. Disponível em:<<http://dspace.c3sl.ufpr.br/dspace/bitstream/1884/7431/1/MetdFolhaDestacAvaliarResSojaOidio.pdf>> Acesso em 10, nov., 2007.

MAGNANI, E.B.Z.; ALVES, E.; ARAÚJO, D.V. Eventos dos Processos de Pré-Penetração, Penetração e Colonização de *Phakopsora pachyrhizi* em Foliolos de Soja. **Fitopatologia Brasileira**, v. 32, n.2, p. 156-160, 2007.

MEDEIROS, R.B. de; FERREIRA, M.A.S.V.; DIANESE, J.C. **Mecanismos de agressão e defesa nas interações planta-patógeno.** Brasília: Editora Universidade de Brasília, 290p. 2003.

MENDGEN. K.; Hahn, M.; Deising, H. Morphogenesis and mechanisms of penetration by plant pathogenic fungi. **Annual Review of Phytopathology**,. V. 34, p. 367-386, 1996.

PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B. Hospedeiro: Mecanismos de Resistência. In: Bergamin Filho, A.; Kimati, H. e Amorim, L. **Manual de Fitopatologia: Princípios e Conceitos.** 3º ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v.1.,p. 417-453.

RIOS, G.P., ANDRADE, E.M. & COSTA, J.L.S. Avaliação da resistência de cultivares e linhagens do feijoeiro comum a diferentes populações de *Uromyces appendiculatus*. **Fitopatologia Brasileira.** v.26, p.28-133, 2001.



ROBARDS, A.W. An introduction to techniques for scanning electron microscopy of plant cell. In: HALL, G.L. **Electron microscopy and cytochemistry of plant cells**. New York: Elsevier, p. 343-444. 1978.

RUIZ, R.A.R.; ALFENAS, A.C.; FERREIRA, F.A.; ZAMBOLIM, L. Fungicidas protetores e sistêmicos para o controle da ferrugem causada por *Puccinia psidii*. Revista **Árvore**. Viçosa, v.11, p.56-65, 1987.

SILVA, E. A. R.; FURTADO, E.L. e RODELLA, R. A. Influências da Maturação Foliar do Eucalipto na Suscetibilidade à Ferrugem. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 2003, Marília. **Anais**, Marília, 2003. CD-ROM.

XAVIER, A.A. **Patogênese da Ferrugem (*Puccinia psidii*) em Folhas de Genótipos de *Eucalyptus grandis***. 42p., 1997. Dissertação (Mestrado) -Resumo. Viçosa – Universidade Federal de Viçosa.

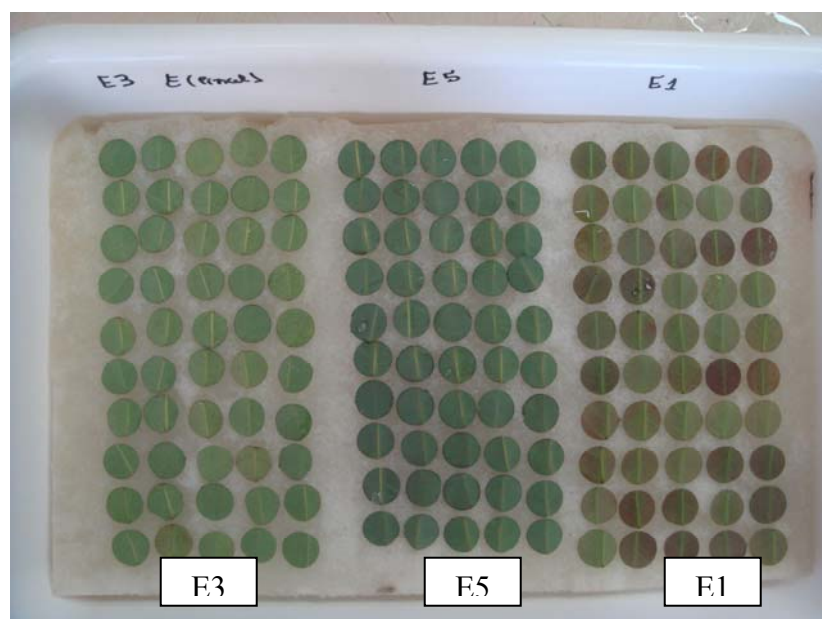


Figura 1. Discos foliares de clones de eucalipto, nos três estágios de desenvolvimento foliar, inoculados com *Puccinia psidii*. E1: primeiro estágio foliar; E3: terceiro estágio foliar; E5: quinto estágio foliar.

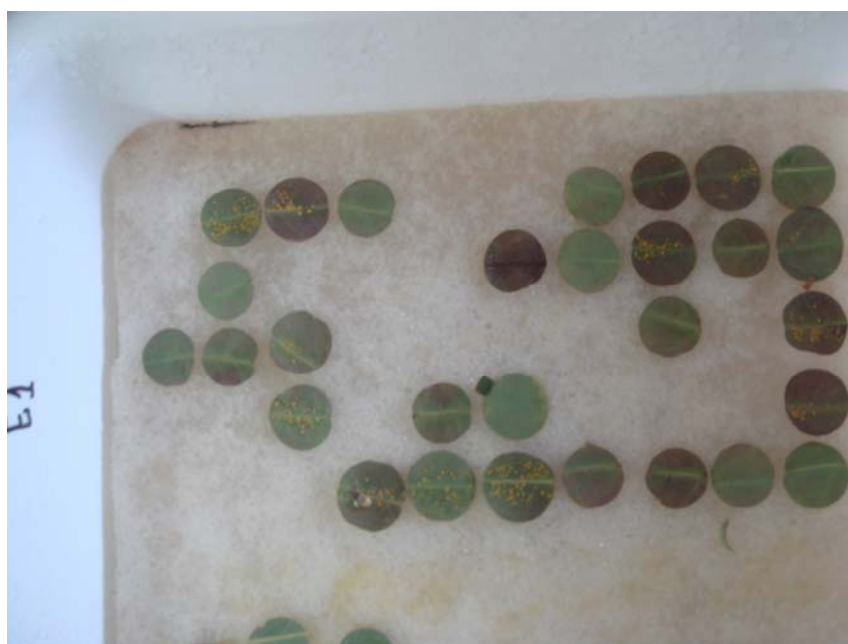
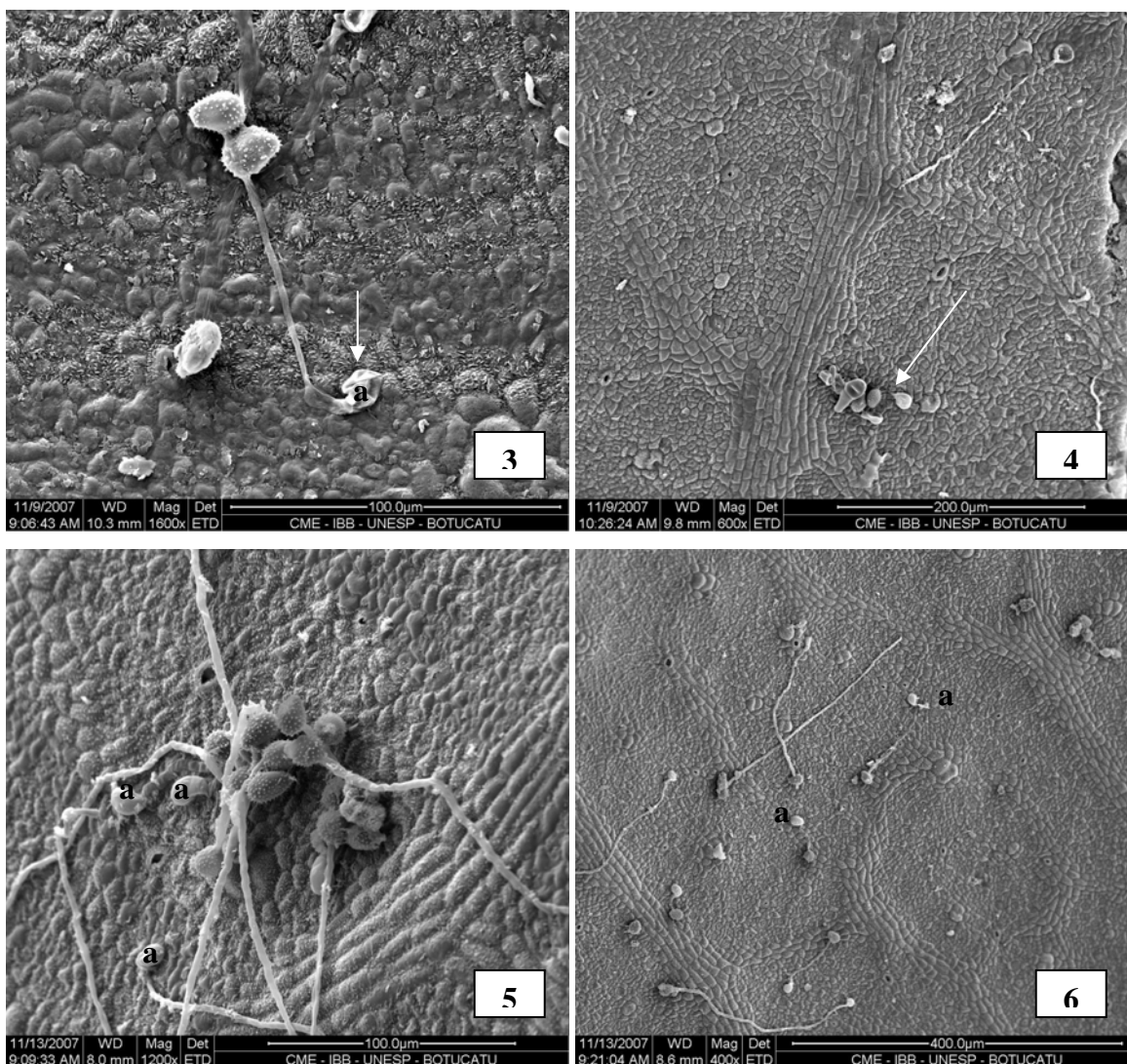
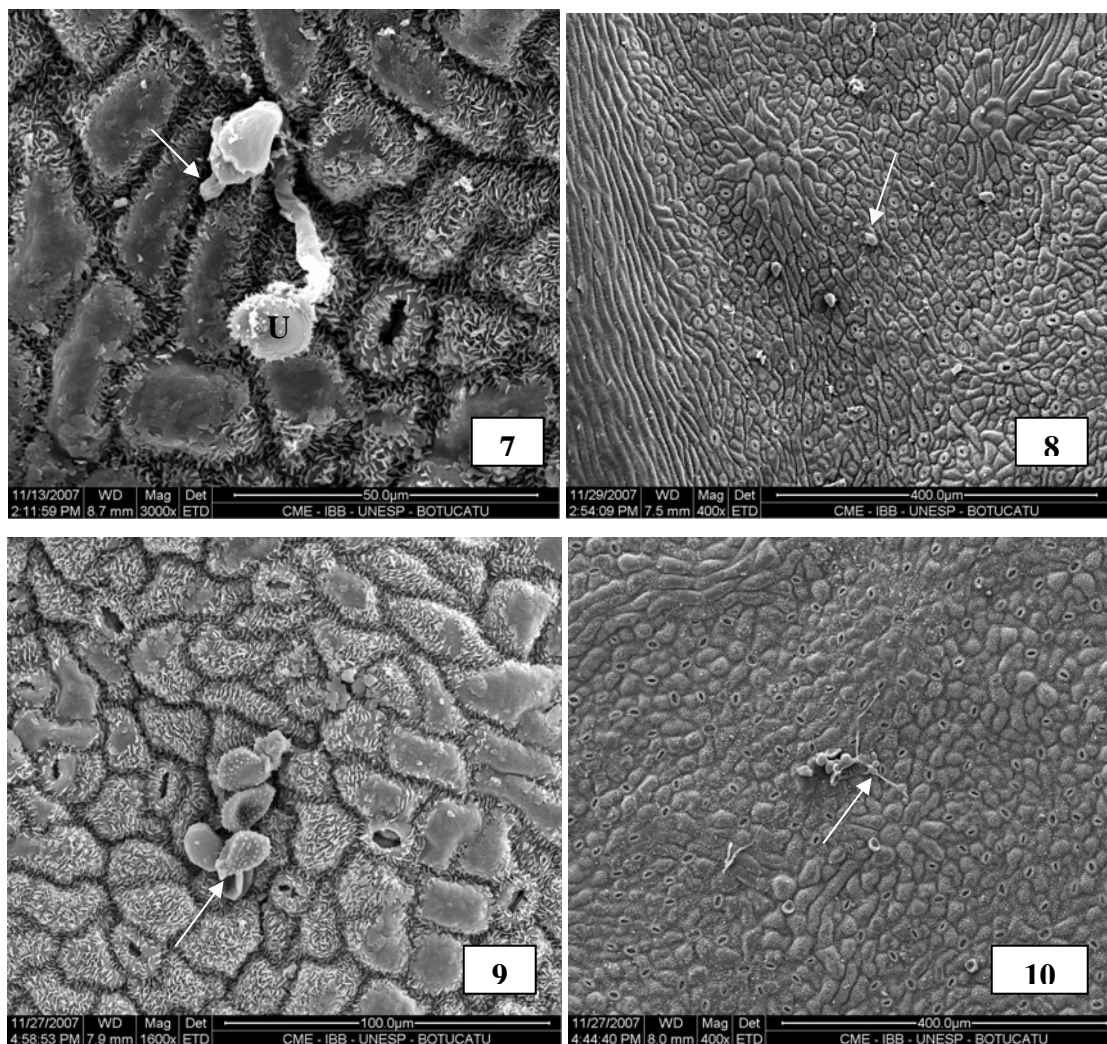


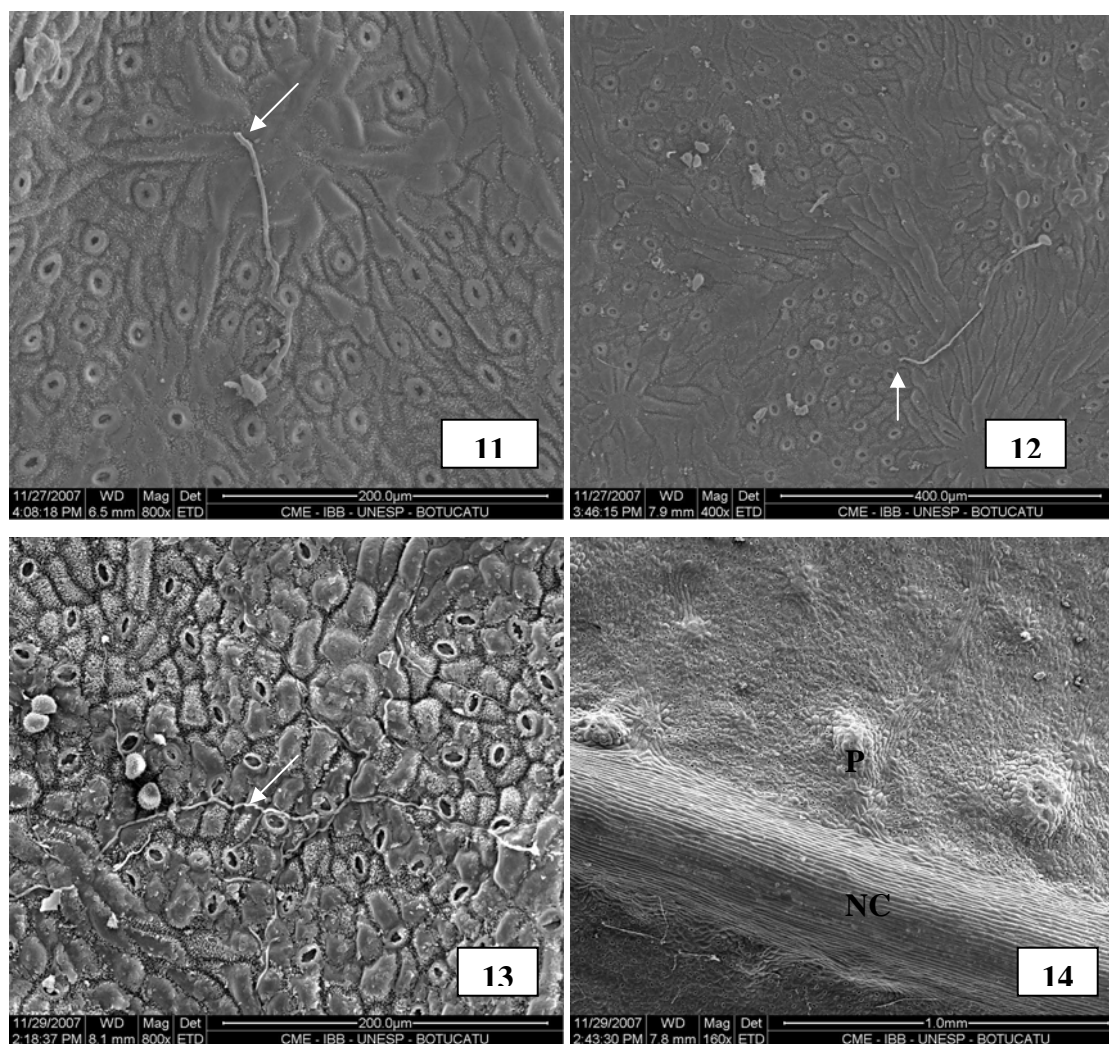
Figura 2. Discos foliares do primeiro estágio foliar do clone altamente suscetível (clone C) apresentando os sintomas de ferrugem, comprovando a eficiência do método de inoculação.



Figuras 3-6. Superfície abaxial da folha, no primeiro estágio de desenvolvimento (E1), de clones do híbrido *Eucalyptus urograndis*, 24 horas após a inoculação de *Puccinia psidii*. 3: Clone A (resistente) exibindo tubo germinativo provido de apressório (a), em estado de desidratação. 4: clone resistente (A) apresentando urediniósporos viáveis (seta). 5-6: Clone C (altamente suscetível) com vários urediniósporos germinados, apresentando apressórios íntegros (a).

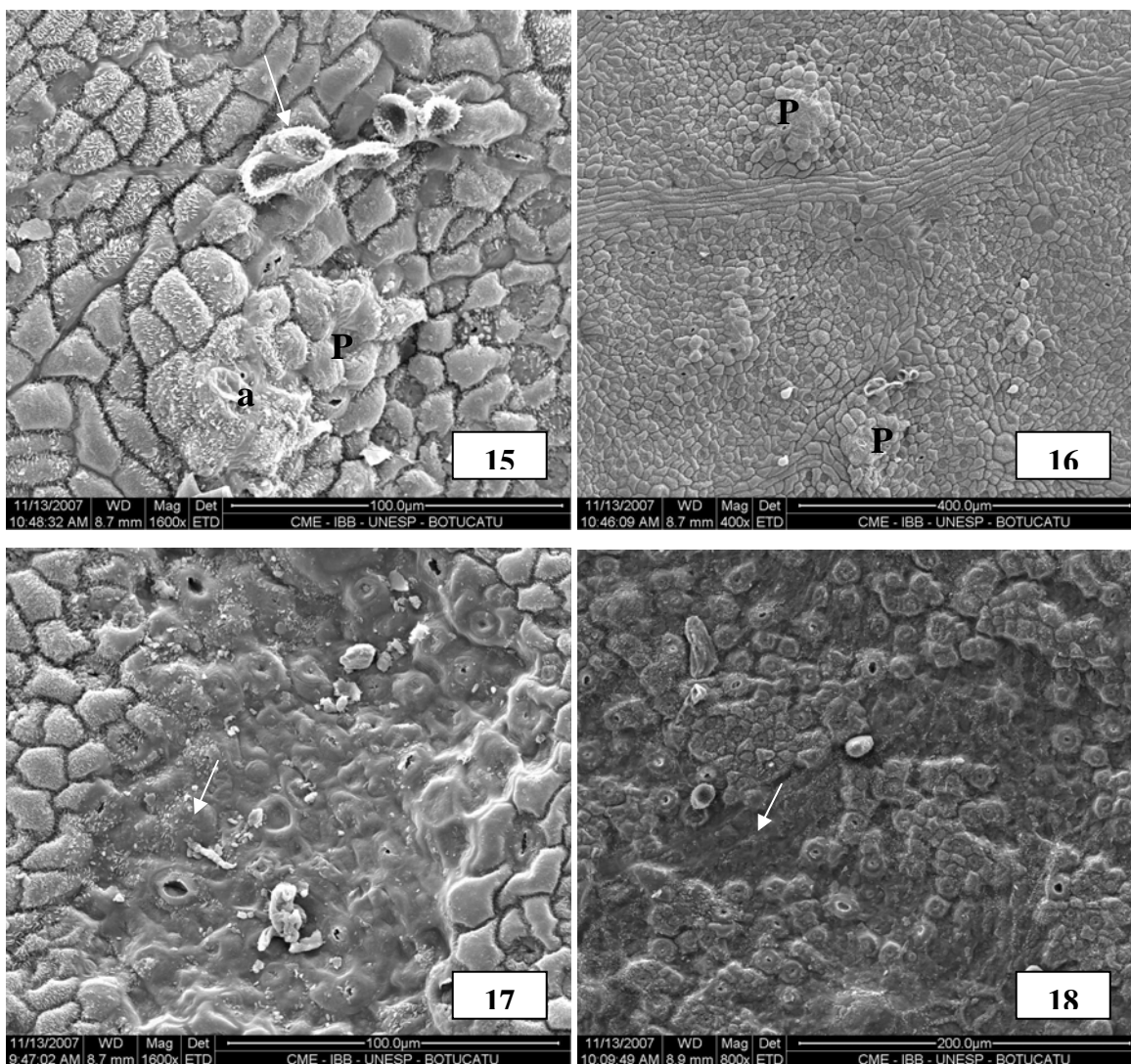


Figuras 7-10. Superfície abaxial da folha, no terceiro estágio de desenvolvimento (E3), de clones do híbrido *Eucalyptus urograndis*, 24 horas após a inoculação de *Puccinia psidii*. 7: Clone A (resistente) urediniósporo (U) apresentando “peg” (seta), em processo de penetração pelas paredes anticlinais das células epidérmicas. 8: clone resistente (A) demonstrando ausência de germinação de alguns urediniósporos (seta). 9-10: Clone C (altamente suscetível) mostrando urediniósporos germinados (seta).

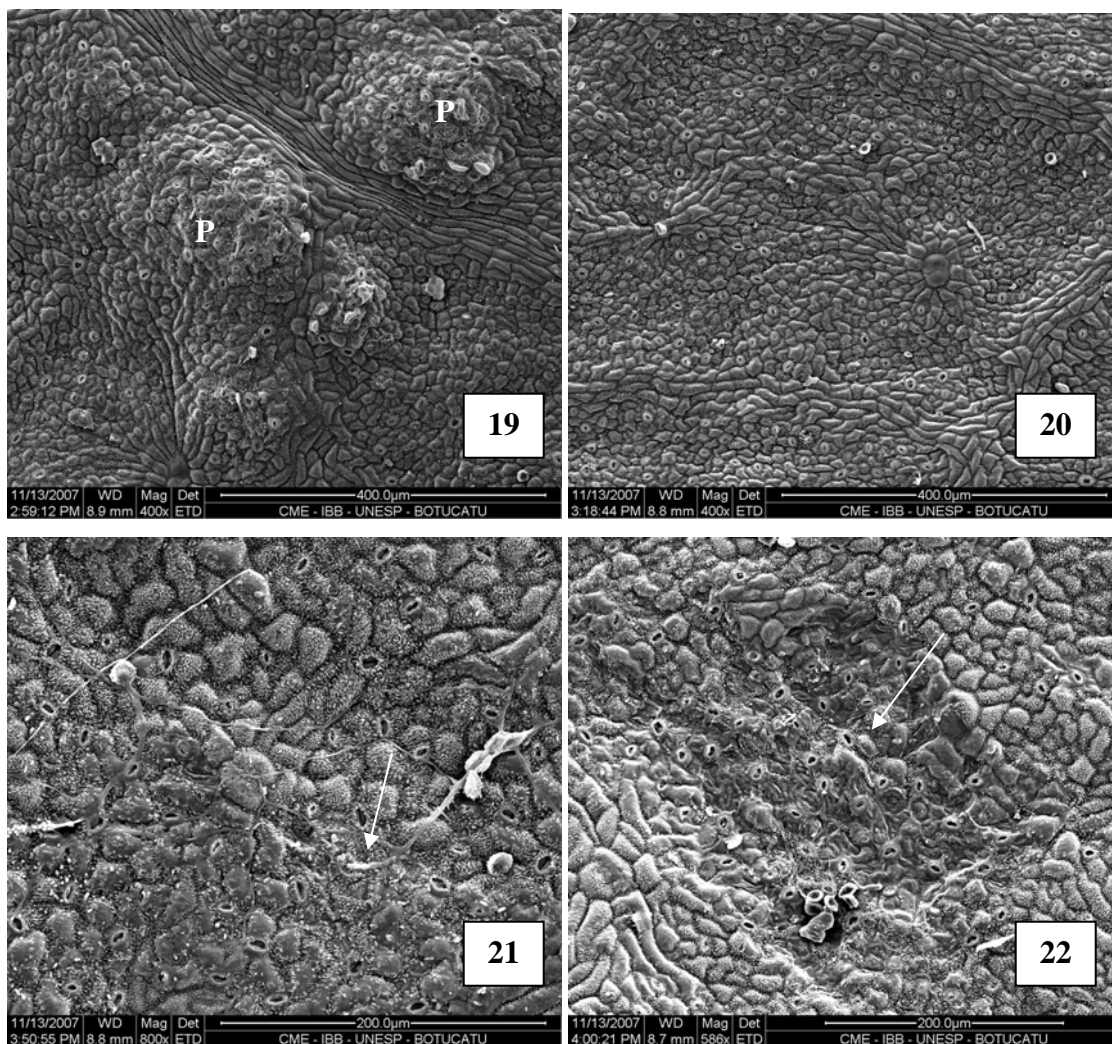


Figuras 11-14. Superfície abaxial da folha, no quinto estágio de desenvolvimento (E5), de clones do híbrido *Eucalyptus urograndis*, 24 horas após a inoculação de *Puccinia psidii*. 11-12: Clone A (resistente) com urediniósporos germinados, destituídos de apressório (setas). 13: Clone C (altamente suscetível) evidenciando extensos tubos germinativos sobre a superfície foliar, sem a ocorrência de penetração. 14: clone altamente suscetível (C) com a formação de protuberâncias (P) no local de deposição do inóculo, próximo à nervura central (NC).

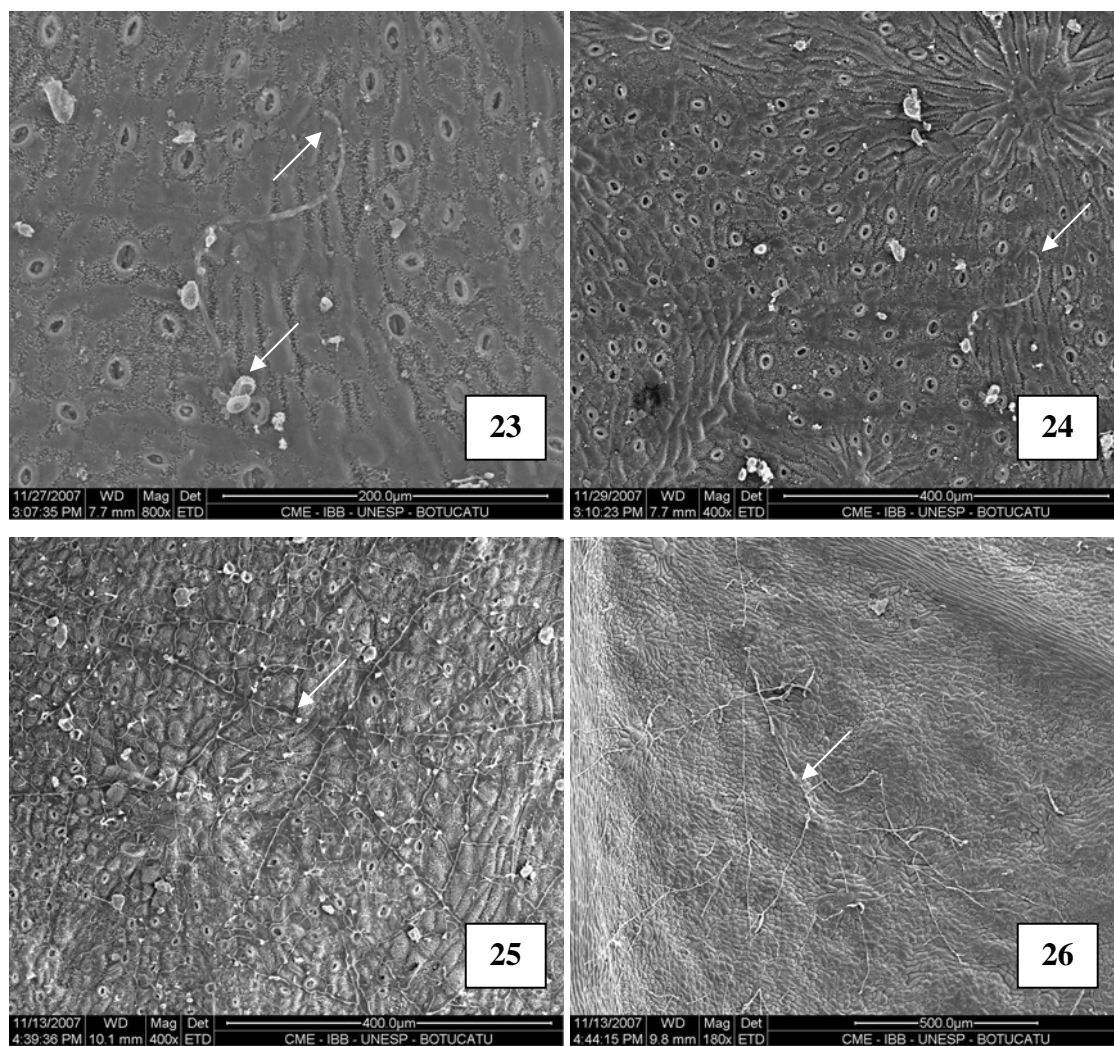




Figuras 15-18. Superfície abaxial da folha, no primeiro estágio de desenvolvimento (E1), de clones do híbrido *Eucalyptus urograndis*, 120 horas após a inoculação de *Puccinia psidii*. 15-16: Clone A (resistente) apresentando protuberâncias (P) na superfície da folha, com a desidratação do apressório (a); bem como a desidratação dos esporos (seta). 17-18: Clone C (altamente suscetível) exibindo a degradação dos tecidos epidérmicos (setas).



Figuras 19-22. Superfície abaxial da folha, no terceiro estágio de desenvolvimento (E3), de clones do híbrido *Eucalyptus urograndis*, 120 horas após a inoculação de *Puccinia psidii*. 19: Clone A (resistente) com protuberâncias (P) na superfície foliar. 20: clone resistente (A) sem a degradação dos tecidos. 21: Clone C (altamente suscetível) mostrando extensos tubos germinativos (seta). 22: clone C mostrando os danos causados pelo patógeno (seta).



Figuras 23-26. Superfície abaxial da folha, no quinto estágio de desenvolvimento (E5), de clones do híbrido *Eucalyptus urograndis*, 120 horas após a inoculação de *Puccinia psidii*. 23-24: Clone A (resistente) com esporos murchos (seta) e ausência de apressório (seta). 25-26: Clone C (altamente suscetível) exibindo extensos tubos germinativos sem a penetração do patógeno (setas).



### **Capítulo III**

**Composição de óleos essenciais em três estágios foliares de clones de eucalipto e sua relação com a ferrugem, causada pelo fungo *Puccinia psidii***

## **Composição de óleos essenciais em três estágios foliares de clones de eucalipto e sua relação com a ferrugem, causada pelo fungo *Puccinia psidii*\***

Renata Ruiz Silva-Souza<sup>(1)</sup>, Roberto Antonio Rodella<sup>(2)</sup>, Márcia Ortiz Mayo Marques<sup>(3)</sup>, Edson Luiz Furtado<sup>(1)\*\*</sup>.

<sup>(1)</sup> Departamento de Produção Vegetal, Faculdade de Ciências Agrônomicas – UNESP, CEP 18.610-307 Botucatu-SP. E-mail: rrsilva@fca.unesp.br; elfurtado@fca.unesp.br.

<sup>(2)</sup> Departamento de Botânica, Instituto de Biociências de Botucatu - UNESP, CEP 18618-000 Botucatu-SP. E-mail: rodella@ibb.unesp.br.

<sup>(3)</sup> Centro de P & D de Recursos Genéticos Vegetais, Instituto Agronômico de Campinas, CEP 13012-970 Campinas-SP. E-mail: mortiz@iac.sp.gov.br.

\*Parte da Dissertação de Mestrado do primeiro autor: Bolsista da Capes

\*\* Bolsista do CNPq

Aceito para publicação em: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_\_

---

### **Resumo**

Silva-Souza, R.R; Rodella, R.A; Marques, M.O.M; Furtado, E.L. **Composição de óleos essenciais em três estágios foliares de clones de eucalipto e sua relação com a ferrugem, causada pelo fungo *Puccinia psidii*. Pesquisa Agropecuária Brasileira, 2007.**

A resistência bioquímica é um mecanismo de defesa utilizado pelas plantas para inibir a ação do patógeno, expondo-o às substâncias tóxicas provenientes de reações químicas que ocorrem nas células do hospedeiro. Devido à importância dos óleos essenciais na proteção das plantas contra fatores ambientais e bióticos, inibindo a ação de patógenos, o objetivo do trabalho foi caracterizar a composição de óleos essenciais em folhas frescas, em três estágios de desenvolvimento (E1, E3 e E5), de três clones de eucalipto, procurando-se relacionar com a resistência à ferrugem, causada pelo fungo *Puccinia psidii*. Os óleos foram extraídos por hidrodestilação e analisados por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas.

Os dados da composição química e os respectivas porcentagens dos constituintes foram submetidos aos testes estatísticos multivariados de análise de agrupamento e análise de componentes principais. O trabalho permitiu a discriminação dos clones estudados e a obtenção de dois marcadores bioquímicos de resistência à ferrugem do eucalipto, o limoneno e o  $\gamma$ -terpineno. O clone altamente suscetível apresentou alta porcentagem de  $\gamma$ -terpineno e o clone resistente apresentou alta porcentagem de limoneno. Assim, foi possível relacionar a composição química dos óleos essenciais com as diferentes respostas dos clones à ferrugem.

Termos para indexação: óleos essenciais, *Puccinia psidii*, resistência, eucalipto.

---

### Summary

Silva-Souza, R.R; Rodella, R.A; Marques, M.O.M; Furtado, E.L. **Essential oil composition at three leaf stages of eucalyptus clones and their relationship with rust caused by the fungus *Puccinia psidii*. Pesquisa Agropecuária Brasileira, 2007.**

Biochemical resistance is a defense mechanism used by plants to inhibit a pathogen's action, by exposing it to toxic substances from chemical reactions that take place in cells of the host. Due to the importance of essential oils in protecting plants against environmental and biotic factors, thus inhibiting the action of pathogens, the objective of this study was to characterize the essential oil composition of fresh eucalyptus leaves at three developmental stages (E1, E3, and E5) in three clones, attempting to relate them to resistance against eucalyptus rust caused by the fungus *Puccinia psidii*. The oils were extracted by hidrodestillation and were analyzed by gas chromatography-mass spectrometry. The chemical composition data and their respective constituent contents were submitted to multivariate statistical tests, namely cluster analysis and principal components analysis. The study allowed the discrimination of the clones studied and the identification of two biochemical marks, the limonene and the  $\gamma$ -terpinene. The highly susceptible clone showed higher percentage of  $\gamma$ -terpinene and the resistant clone was different because of its higher percentage of limonene. Consequently, it was possible to relate the chemical composition of essential oils with different clone responses to eucalyptus rust.

Keywords: essential oils, *Puccinia psidii*, resistance, eucalyptus.

---

### **Introdução**

As ferrugens são doenças causadas por patógenos biotróficos que necessitam do hospedeiro vivo para sua sobrevivência, retirando nutrientes e utilizando-os nos seus processos vitais, sem causar a morte da planta. No entanto, esses nutrientes encontram-se no interior das células vegetais e tornam-se acessíveis aos patógenos somente quando estes conseguem penetrar nos tecidos do hospedeiro, ultrapassando barreiras físicas e o arsenal bioquímico de defesa da planta (Ferreira, 1989; Bedendo, 1995; Pascholati e Leite, 1995).

A resistência bioquímica é um mecanismo de defesa utilizado pelas plantas para inibir a ação do patógeno, expondo-o às substâncias tóxicas provenientes de reações químicas que ocorrem nas células do hospedeiro. Essas substâncias estarão em alta concentração nos tecidos sadios das plantas quando forem pré-formadas, e em baixos níveis, antes da infecção, quando pós-formadas (Pascholati e Leite, 1995; Agrios, 2005). As substâncias pré-formadas como compostos fenólicos, alcalóides e terpenóides, juntamente com outras substâncias, são produtos do metabolismo secundário das plantas, com a capacidade de garantir vantagens à sobrevivência e perpetuação da sua espécie (Coutinho et al., 2004; Santos, 2004).

Embora o metabolismo secundário não esteja diretamente envolvido nos processos vitais da planta, ele desempenha um papel importante na sua interação com fatores bióticos. As rotas metabólicas são ativadas em algumas fases de desenvolvimento da planta ou períodos de estresse, causados por limitações nutricionais ou ataque microbiológico (Mann, 1987, citado por Santos, 2004).

Os terpenóides, que englobam, dentre outros, os mono e os sesquiterpenos presentes nos óleos essenciais, são ativos contra bactérias, fungos, vírus e protozoários (Cowan, 1999).

Os óleos essenciais podem apresentar uma composição química e odores bem distintos, devido às variações climáticas, ambientais e culturais que as plantas estão submetidas, bem como aos fatores relacionados à época e horário de coleta, métodos de extração e estágios de desenvolvimento da planta (Santos, 2004).

A composição química do óleo essencial de uma planta é determinada geneticamente, sendo geralmente específica para um determinado órgão, e característica para seu estágio de desenvolvimento, mas as condições ambientais são capazes de causar variações significativas (Simões e Spitzer, 2004).

Os óleos essenciais extraídos de folhas de espécies de eucalipto são formados por misturas complexas de compostos orgânicos voláteis que incluem hidrocarbonetos, álcoois, aldeídos, cetonas, ácidos e ésteres. São compostos, predominantemente, por mono e sesquiterpenos, sendo os monoterpenos os mais abundantes (Boland et al., 1991).

Na maioria das espécies de eucalipto, os óleos essenciais estão localizados em cavidades ou glândulas secretoras lisígenas distribuídas no mesofilo da folha, mais precisamente entre as células dos parênquimas abaxial e adaxial (Johnson, 1926; Accorsi, 1941; Metcalfe e Chalk, 1957; Esau, 1974; Boland et al., 1991; Castro e Machado, 2006). No entanto, em *Corymbia citriodora* essas glândulas estão ausentes no mesofilo da folha, sendo substituídas por emergências secretoras de essência oleosa, distribuídas em ambas as epidermes (Accorsi, 1941; Metcalfe e Chalk, 1957).

A composição das secreções oleosas presentes nas cavidades secretoras da folha de eucalipto ainda não é totalmente conhecida; no entanto, alguns autores sugerem a presença de alguns terpenos, como o 1,8-cineol, felandreno e piperitona, e de misturas de óleos essenciais e compostos fenólicos (Metcalfe e Chalk, 1979; Boland et al., 1991; Castro e Machado, 2006).

A literatura tem apresentado vários trabalhos demonstrando o potencial dos óleos essenciais no controle de algumas doenças de plantas, inibindo ou reduzindo o crescimento micelial e a germinação de esporos. Em contrapartida, existem estudos que também revelam a capacidade destes compostos em atrair o patógeno ou estimular o seu processo infeccioso no hospedeiro. Este fato foi sugerido por Bizi (2006) que, ao testar “in vivo” o efeito dos óleos essenciais de *Eucalyptus globulus*, *Pinus* spp. e *Corymbia citriodora*, verificou a ausência total de controle de *Botrytis cinerea* e *Oidium* sp. em *Eucalyptus dunnii* e *E. benthamii*, respectivamente.

No entanto, a literatura é escassa quando se trata de híbridos de eucalipto, principalmente relacionando a composição do óleo com a resistência a algumas doenças.

Assim, o presente trabalho foi realizado com a finalidade de caracterizar a composição de óleos essenciais em folhas frescas, em três estágios de desenvolvimento, de

três clones de eucalipto, provenientes do cruzamento entre *Eucalyptus urophylla* e *E. grandis*, procurando-se relacionar com a resistência à ferrugem, causada pelo fungo *Puccinia psidii*.

### **Material e Métodos**

Para o experimento, foram selecionados três clones do híbrido *Eucalyptus urograndis*, proveniente do cruzamento entre *Eucalyptus urophylla* e *Eucalyptus grandis*, cedidos pela empresa Votorantim Celulose e Papel S.A. A escolha dos mesmos foi efetuada pela resposta à ferrugem, em condições de campo, sendo um clone resistente (clone A), um suscetível (clone B) e um altamente suscetível (clone C).

Tendo em vista que a doença ocorre em brotações e órgãos em início de desenvolvimento, foram coletadas folhas, em três diferentes estágios de desenvolvimento (Figura 3), estabelecidos por Silva (2003), para efeito comparativo. Estas foram selecionadas de acordo com a sua disposição nos ramos, sendo os primeiros, os terceiros e os quintos pares escolhidos para o estudo, já que apresentam diferenças anatômicas estruturais, bem como variação no grau de suscetibilidade à ferrugem.

As amostras foram coletadas em Janeiro de 2007 em fazendas próximas à cidade de Jacareí, no Estado de São Paulo, em plantios de eucalipto com um ano de idade, em área pertencente à empresa Votorantim Celulose e Papel S.A. Para reduzir possíveis fatores de interferência na composição dos óleos essenciais, as plantas selecionadas para o estudo eram provenientes do mesmo talhão e submetidas às mesmas condições de solo, clima e aspectos silviculturais.

A extração dos óleos foi efetuada no Laboratório de Fitoquímica do Centro de P & D de Recursos Genéticos vegetais do Instituto Agrônomo de Campinas, através da hidrodestilação em aparelho Clevenger (Figura 4). Para isso, folhas frescas foram picadas, pesadas e colocadas em balões de vidro de 2000 mL com água destilada.

Após duas horas de extração, os óleos foram analisados em cromatógrafo gasoso acoplado a um detector de espectrometria de massas (CG-EM, Shimadzu, QP-5000), operando a 70eV, com coluna capilar DB-5 (J&W Scientific, 30,0m x 0,25mm x 0,25µm), gás de arraste hélio (1,0 mL/min), split 1/20, injetor a 240°C e detector a 230°C. O óleo essencial de cada amostra (1 µL) foi solubilizado em acetato de etila (1mL) e injetado 1µL dessa solução na

coluna capilar a uma programação de temperatura de 60°C a 240° C, a 3°C/min, sendo três injeções para cada tratamento correspondentes às repetições.

A identificação das substâncias foi realizada através da comparação dos seus espectros de massas e índice de retenção de Kovats com o banco de dados do sistema CG-EM (Nist. 62 lib.) e com a literatura (Adams, 2001).

A proporção relativa das substâncias presentes nos óleos essenciais foi expressa em porcentagem e efetuada pelo cromatógrafo gasoso (CG-DIÇ, Shimadzu, GC-2010), com detector de ionização de chama, com coluna capilar DB-5 (J&W Scientific, 30,0m x 0,25mm x 0,25µm), fluxo de 1,7 mL/min e split de 1:30; utilizando-se uma programação de 50°C a 180°C, 5°C/min, 180°C a 280°C, 10°C/min e a 280°C por 10 minutos.

Após a caracterização da composição dos óleos essenciais, os dados de porcentagem foram submetidos aos testes estatísticos multivariados de análise de agrupamento e análise de componentes principais (Sneath e Sokal, 1973), para correlacionar a composição de óleos essenciais com a resistência ou suscetibilidade das plantas à ferrugem das mirtáceas.

## Resultados e Discussão

A análise da composição química dos óleos essenciais de clones de *Eucalyptus urograndis*, em três estágios foliares, mostrou que de 75 a 95% dos óleos é constituído por monoterpenos e o restante por sesquiterpenos. As principais substâncias identificadas e as respectivas porcentagens em cada amostra são apresentadas na Tabela 1. Os cromatogramas obtidos na análise dos óleos essenciais estão expostos nas Figuras 6-14.

Os compostos majoritários dos óleos essenciais foram o  $\alpha$ -pineno (15-41%), limoneno (3-34%), 1,8-cineol (18-41%) e  $\gamma$ -terpineno (0,18-20%). Resultado semelhante foi encontrado no óleo extraído de folhas de *Eucalyptus cinerea* proveniente de Curitiba, onde os principais constituintes foram 1,8-cineol,  $\alpha$ -pineno, limoneno e  $\alpha$ -terpineol (Franco, 2005), também verificados em *Eucalyptus urophylla*, cultivado em Taiwan, juntamente com outras substâncias como ocimeno e 4-terpineol (Shieh, 1998).

Em folhas de *Eucalyptus grandis* provenientes de Goiás, as principais substâncias presentes no óleo foram o  $\gamma$ -terpineno, o-cimeno,  $\beta$ -pineno e 1-8 cineol (Estanislau et. al., 2001). Esta mesma espécie cultivada na Austrália, apresentou como substâncias majoritárias

três monoterpenos,  $\alpha$ -pineno (22%), 1,8-cineol (6%) e  $\alpha$ -terpineol (5%), e duas  $\beta$ -triketonas, leptospermona e flavosona (Boland et al., 1991).

Os rendimentos dos óleos essenciais, extraídos de folhas secas, dos três clones de eucalipto estudados, bem como os rendimentos referentes aos estágios de desenvolvimento das folhas estão expostos na Tabela 2. Observa-se que o clone C (altamente suscetível) apresentou menor rendimento quando comparado aos outros clones, nos três estágios foliares, sendo que o primeiro estágio demonstrou menor quantidade de óleo essencial extraído. Este resultado, juntamente com outros fatores, pode ser relacionado com a maior suscetibilidade do estágio um (E1) à ferrugem, visto que maiores quantidades de óleos essenciais podem estar envolvidas nos processos de defesa da planta.

Os rendimentos obtidos (0,85 a 2,28%) são semelhantes ao observado por Lassak (1988) e Boland (1991) em folhas frescas de várias espécies de eucalipto, onde os mesmos variam de 0,2 a 6%. Resultados bem similares também foram obtidos de folhas secas, jovens e maduras, trituradas e não trituradas de povoamentos florestais de *Corymbia citriodora* com 6 meses, 7 anos e 45 anos de idade, por Andrade e Gomes (2000), que apresentaram um rendimento de 0,79 a 1,47 %. Os mesmos autores verificaram que os maiores rendimentos foram provenientes de folhas maduras e trituradas, concordando com os resultados obtidos no presente trabalho (Tabela 2).

O menor rendimento do óleo essencial de folhas jovens, em estágios iniciais de desenvolvimento, como demonstra a Tabela 2, também pode ser considerado como um fator adicional à predisposição da planta ao ataque pelo *P. psidii*.

Para uma melhor visualização e correlação dos fatores, foram consideradas somente as substâncias identificadas e mais abundantes, as quais foram submetidas às análises estatísticas multivariadas de agrupamento e de componentes principais.

Os valores médios, referentes às três repetições, das 13 substâncias e seus respectivos teores (%) presentes nos óleos essenciais dos três clones de *Eucalyptus*, em três estágios do desenvolvimento foliar, estão relacionados na Tabela 1.

Os valores da Tabela 3 referem-se aos coeficientes de correlação entre as 13 substâncias e os dois primeiros componentes principais ( $Y_1$  e  $Y_2$ ).



O componente  $Y_1$ , com informação retida de 54,88% apresentou altos coeficientes de correlação para as substâncias orto-cimeno,  $\gamma$ -terpineno, 4-terpineol,  $\alpha$ -acetato de terpenila, terpinoleno e  $\alpha$ -pineno. Para o segundo componente principal, a informação retida foi de 24,53%, cujo valor é considerado baixo e, conseqüentemente, apenas a porcentagem relativa de limoneno e 1,8-cineol apresentaram poder de discriminação satisfatório, enquanto que os demais não contribuíram para a diferenciação.

O dendrograma resultante da Análise de Agrupamento (Figura 1) permitiu discriminar os tratamentos em seis grupos diferentes na escala de similaridade a uma distância de 0,20. O grupo um foi constituído pelo primeiro estágio foliar do clone C (altamente suscetível à ferrugem); o grupo dois pelo terceiro e quinto estágios foliares do clone C; o grupo três pelo primeiro estágio foliar do clone A (resistente à ferrugem); o grupo quatro pelo terceiro e quinto estágios foliares do clone A; o grupo cinco pelo primeiro estágio foliar do clone B (suscetível à ferrugem) e o grupo seis foi constituído pelo terceiro e quinto estágios foliares do clone B.

Observa-se pelo dendrograma da Análise de Agrupamento (Figura 1) que os primeiros estágios foliares diferenciaram-se dos outros, quanto à composição química dos óleos essenciais, para todos os clones estudados. Este resultado evidencia que o estágio inicial de desenvolvimento das folhas de eucalipto são mais suscetíveis ao ataque do *Puccinia psidii*, patógeno causador da ferrugem (Ferreira, 1989), podendo-se sugerir o envolvimento dos óleos essenciais na proteção da planta contra o patógeno.

Verifica-se também que o dendrograma da Figura 1, considerando o valor de 0,35 na escala de distância, e a dispersão gráfica da Figura 2, mostraram a formação de três grupos distintos, referentes aos três clones, sendo o grupo um formado pelo clone C e os seus estágios foliares, o grupo dois pelo clone A, juntamente com seus estágios foliares e o grupo três pelo clone B e seus estágios foliares. Assim, o clone C apresentou alto poder de dissimilaridade em relação aos clones A e B, possibilitando a sua diferenciação quanto ao grau de suscetibilidade à doença, com base na composição química dos óleos essenciais e na proporção relativa referente às substâncias presentes.

Através dos valores do primeiro componente principal (Tabela 3) associados à dispersão gráfica (Figura 2), constatou-se que o clone C (altamente suscetível à doença), nos

três estágios foliares, apresentou as maiores porcentagens de  $\gamma$ -terpineno,  $\alpha$ -acetato de terpenila, orto-cimeno, 4-terpineol, terpinoleno e menor teor de  $\alpha$ -pineno. Para o segundo componente principal, o clone A (resistente) nos três estágios foliares, diferenciou-se por apresentar maior porcentagem de limoneno e menor de 1,8-cineol, também conhecido como eucaliptol, em seus óleos essenciais; situação inversa ocorreu para os clones B e C.

O efeito fungitóxico do limoneno, do 1,8-cineol e do  $\alpha$ -pineno, bem como do  $\beta$ -mirceno e  $\beta$ -pineno, presentes em óleos essenciais de *Cymbopogon Martini*, *Thymus zygis*, *Cinnamomum zeylanicum* e *Eugenia caryophylla*, foram observados por Wilson et al. (1997) contra *Botrytis cinerea*. Hammer et al. (2003) também observou efeito inibitório do crescimento de vários fungos por 4-terpineol,  $\alpha$ -terpineol, linalol,  $\alpha$ -pineno e  $\beta$ -pineno, seguido por 1,8-cineol.

No entanto, a atividade antifúngica e antimicrobiana podem ser resultados da interação de muitos compostos, agindo sinergicamente, podendo as substâncias isoladas não ser tão efetivas quanto o conjunto de compostos e suas respectivas concentrações. Este fato foi verificado por Vilela (2007) em que a substância 1,8-cineol, isolada do óleo essencial de *Eucalyptus globulus* foi responsável por apenas 5,5 % da inibição do crescimento micelial de *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*, a uma concentração de 1.500  $\mu$ L, enquanto que 500  $\mu$ L do óleo apresentou uma inibição micelial de 90%. A ineficiência do 1,8-cineol isolado também foi relatada por Lis-Balchin et al. (1998), que verificou uma correlação inversa entre a substância e a atividade antifúngica sobre *Aspergillus niger*, *A. ochraceus* e *Fusarium culmorum*.

Todos os clones estudados apresentaram os mesmos constituintes nos óleos essenciais, nos três estágios foliares, variando apenas a porcentagem de cada composto. Assim, não foi possível relacionar a presença ou ausência de um composto específico no clone A ou Clone C, que pudesse conferir aos mesmos a resistência ou alta suscetibilidade ao *Puccinia psidii*, respectivamente, mas sim a diferença na porcentagem de determinadas substâncias. Este resultado pode ser explicado pelo fato de que os três clones são provenientes do cruzamento entre *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*. Através das diferenças nas porcentagens dos constituintes, submetidas à análise estatística multivariada, foi possível diferenciar o clone altamente suscetível (clone C) dos demais, bem como discriminar o

primeiro estágio foliar dos outros dois estágios, indicando possíveis relações dos óleos essenciais com a ferrugem.

### Conclusões

- Diferenças na porcentagem relativa dos constituintes químicos, presentes nos óleos essenciais, permitiram discriminar os clones estudados;
- O rendimento foi crescente em relação aos estágios foliares, e quanto aos clones, o altamente suscetível apresentou menor rendimento em comparação aos outros clones.
- Identificação de dois marcadores bioquímicos de resistência à ferrugem do eucalipto: maior % de limoneno em clones resistentes e maior % de  $\gamma$ -terpineno em clones suscetíveis.
- Foi possível relacionar a composição química dos óleos essenciais com as diferentes respostas dos clones à ferrugem.

### Referências Bibliográficas

ACCORSI, W. R. **Contribuição para o estudo anatômico comparativo das espécies *Eucalyptus tereticornis* Smith e *Eucalyptus citriodora* Hooker.** 1941. 104 p. Tese (functional) – Universidade de São Paulo- ESALQ, Piracicaba.

ADAMS, R. P. **Identification of essential oil compenets by cromatography / mass spectrocopy.** Allured Publ. Corp., Carol Stream, 2001.

AGRIOS, G.N. How plants defend themselves against pathogens. In: **Plant Pathology.** San Diego: Academic Press, 2005, p. 208-248.

ANDRADE, A. M e GOMES, S. S. Influência de alguns fatores não genéticos sobre o teor de óleo essencial em folhas de *Eucalyptus citriodora* Hook. **Floresta e Ambiente.** v. 7, n. 1, p. 181 - 189, jan./dez, 2000.

BEDENDO, I. P. Ferrugens. In: Bergamin Filho, A.; Kimati, H. e Amorim, L. **Manual de Fitopatologia: Princípios e Conceitos**. 3º ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v.1.,p. 872-880.

BIZI, R.M. **Alternativas de controle do mofo-cinzento e do oídio em mudas de eucalipto**. 2006. 70p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

BOLAND, D.J.; BROPHY, J.J.; HOUSE, A. P. N. 1991. ***Eucalyptus* leaf oils: use, chemistry, distillation and marketing**. Inkata Press, Sydney, p. 73-87.

CASTRO, M.M.; MACHADO, S.R. Células e tecidos secretores. In: APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; CARMELLO-GUERREIRO, S. M. **Anatomia vegetal**. Viçosa: Ed. UFV, 2 ed. 2006. p. 179-204.

COUTINHO, H.D.M. ; BEZERRA, D.A.C.; LÔBO, K.; BARBOSA, I.J.F. **Atividade antimicrobiana de produtos naturais**. Julho de 2003/Junho de 2004. p. 77-85. Disponível em: <[http://www.adufpb.org.br/publica/conceitos/10/art\\_11.pdf](http://www.adufpb.org.br/publica/conceitos/10/art_11.pdf)> Acesso em: 24 set. 2006.

COWAN, M.M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 12, p. 564-582. 1999.

ESAU, K. **Anatomia das plantas com sementes; tradução**: Berta Lange de Morretes. São Paulo, Editora: Edgard Blucher, 1974, 293 p.

ESTANISLAU, A.A.; BARROS, F.A.S.; PENA, A.P.; SANTOS, S.C.; FERRI, P.H.; PAULA, J.R. Composição química e atividade antibacteriana dos óleos essenciais de cinco espécies de *Eucalyptus* cultivadas em Goiás. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 11, n. 2, p. 95-100, 2001.

FERREIRA, F.A. **Patologia Florestal – Principais Doenças Florestais do Brasil**. Viçosa: Sociedade de Investigações Florestais, 1989. 570p.

FRANCO, J. **Prospecção fitoquímica e análise química e microbiológica do óleo essencial de *Eucalyptus cinerea* F. MUELL. ex. BENTH., Myrtaceae**. 2005. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

HAMMER, K.A.; CARSON, C.F. e RILEY, T.V. Antifungal activity of the components of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. **Journal of Applied Microbiology**, v. 95, p.853–860, 2003.

JOHNSON, E.D. A comparison of the juvenile and adult leaves of *Eucalyptus globulus*. **New Phytologist**, v. 25, n. 3, p. 202-212, 1926.

LASSAK, E. V. The Australian. Eucalyptus oil industry, past and present. **Chemistry in Australia**, Victoria, v. 55, p. 396-398, 1988.

LIS-BALCHIN, M.; DEANS, S.G.; EAGLESHAM, E. Relationship between bioactivity and chemical composition of commercial essential oils. **Flavour and Fragrance Journal**, v.13, p. 98-104, 1998.

METCALFE, C.R.; CHALK, L. Myrtaceae. In: **Anatomy of the Dicotyledons**. v.1. Oxford: Clarendon Press, 1957. p.620-631.

PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B. Hospedeiro: Mecanismos de Resistência. In: Bergamin Filho, A.; Kimati, H. e Amorim, L. **Manual de Fitopatologia: Princípios e Conceitos**. 3º ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v.1.,p. 417-453.

SANTOS, R.I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5º ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/ Editora da UFSC, 2004. p. 403-434.

SHIEH, J.C. Yields and chemical components of essential oils in *Eucalyptus urophylla* leaves. **Taiwan Journal of Forest Science**. v.13, n. 4, p. 291-300, 1998.

SIMÕES, C.M.O. e SPITZER, V. Óleos voláteis. In: **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5º ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/ Editora da UFSC, 2004. p. 467-496.

SILVA, E. A. R.; FURTADO, E.L. e RODELLA, R. A. Influências da Maturação Foliar do Eucalipto na Suscetibilidade à Ferrugem. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 2003, Marília. **Anais**, Marília, 2003. CD-ROM.

SNEATH, P.H.A. e SOKAL, R.R. **Numerical Taxonomy**. San Francisco: W.h. Freeman, 1973. 573p.

VILELA, G.R. **Efeito do óleo essencial de *Eucalyptus globulus* sobre espécies produtoras de aflatoxinas**. 2007. 64p. Dissertação (Mestrado). Universidade de São Paulo-ESALQ, Piracicaba.

WILSON, C.L.; SOLAR, J.M.; GHAOUTH, A.EL; WISNIEWSKI, M.E. Rapid evaluation of plant extracts and essential oils for antifungal activity against *Botrytis cinerea*. **Plant Disease**, v. 81, n.2, p. 204-210, 1997.

Tabela 1. Valores médios (%) das 13 substâncias químicas mais abundantes dos óleos essenciais, presentes em três estágios foliares (E1, E3 e E5), dos três clones de eucalipto. Clone A: resistente à ferrugem; clone B: suscetível. Clone C: altamente suscetível. IK Calc.: Índice de Kovats calculado. IK Lit.: Índice de Kovats da literatura (Adams, 2001).

SUBSTÂNCIAS	Clone A			Clone B			Clone C			IK Calc.	IK Lit.
	E1	E3	E5	E1	E3	E5	E1	E3	E5		
$\alpha$ - pineno	20,62	19,88	20,24	33,55	39,64	41,31	15,33	17,29	18,08	932	939
$\alpha$ -felandreno	2,88	4,41	2,77	2,97	1,44	1,13	0,81	0,67	0,49	1004	1005
orto-cimeno	0,96	1,35	1,79	0,83	0,49	0,43	3,89	3,28	3,17	1021	1022
limoneno	29,37	33,87	33,22	4,77	4,65	4,16	2,94	3,45	3,53	1027	1031
1,8 cineol	18,56	22	27,45	35,08	38,97	40,47	21,93	33,91	35,14	1028	1033
cis- $\beta$ -ocimeno	2,19	1,37	0,85	3,8	2,1	1,65	2,93	2,13	1,45	1034	1040
$\gamma$ -terpineno	0,4	0,51	0,46	0,18	0,21	0,24	15,14	19,31	19,91	1056	1062
terpinoleno	0,88	0,63	0,6	0,97	0,4	0,35	1,77	1,14	0,90	1086	1088
4- terpineol	0,74	0,75	0,9	0,22	0,29	0,34	1,18	1,63	2,04	1172	1177
$\alpha$ - terpineol	5,1	3,54	2,73	4,55	5,54	5,16	3,93	2,35	2,71	1186	1189
$\alpha$ -acetato de terpenila	3,19	3,4	3,21	0,64	0,27	0,18	6,79	5,69	6,03	1345	1350
trans-cariofileno	1,92	1,22	0,5	1,23	0,67	0,37	1,7	1,08	0,71	1417	1418
viridifloreno	1,29	0,41	0,28	2,24	0,88	0,52	3,59	1,71	1,04	1493	1493

Tabela 2. Rendimento (%) dos óleos essenciais, provenientes de folhas secas dos três clones de eucalipto (clone A- resistente à ferrugem, Clone B- suscetível e Clone C-altamente suscetível), em três estágios foliares (E1, E3 e E5).

Clones	Estágios foliares		
	E1	E3	E5
A	1,61	2,28	1,88
B	1,44	1,6	1,85
C	0,85	1,35	1,82



Tabela 3. Coeficientes de correlação entre as 13 substâncias químicas dos óleos essenciais, presentes em três estágios foliares (E1, E3 e E5), dos três clones de eucalipto e os dois componentes principais (Y<sub>1</sub> e Y<sub>2</sub>). Ord.: ordenação das substâncias quanto ao poder discriminatório.

SUBSTÂNCIAS	Y1	ord	Y2	ord
$\alpha$ - pineno	-0,7118	6	-0,6984	3
$\alpha$ -felandreno	-0,6315	8	0,6486	4
orto-cimeno	0,9711	1	0,1510	11
limoneno	-0,4220	10	0,9000	1
1,8 cineol	-0,1454	12	-0,8474	2
cis- $\beta$ -ocimeno	0,1102	13	-0,4328	5
$\gamma$ -terpineno	0,9698	2	-0,1207	12
terpinoleno	0,7963	5	0,0881	13
4- terpineol	0,8766	4	0,2169	10
$\alpha$ - terpineol	-0,6402	7	-0,4092	6
$\alpha$ -acetato de terpenila	0,9174	3	0,3870	8
trans-cariofileno	0,2697	11	0,3930	7
viridifloreno	0,5939	9	-0,2320	9
Informação retida (%)	54,88		24,53	
Informação acumulada	54,88		79,41	

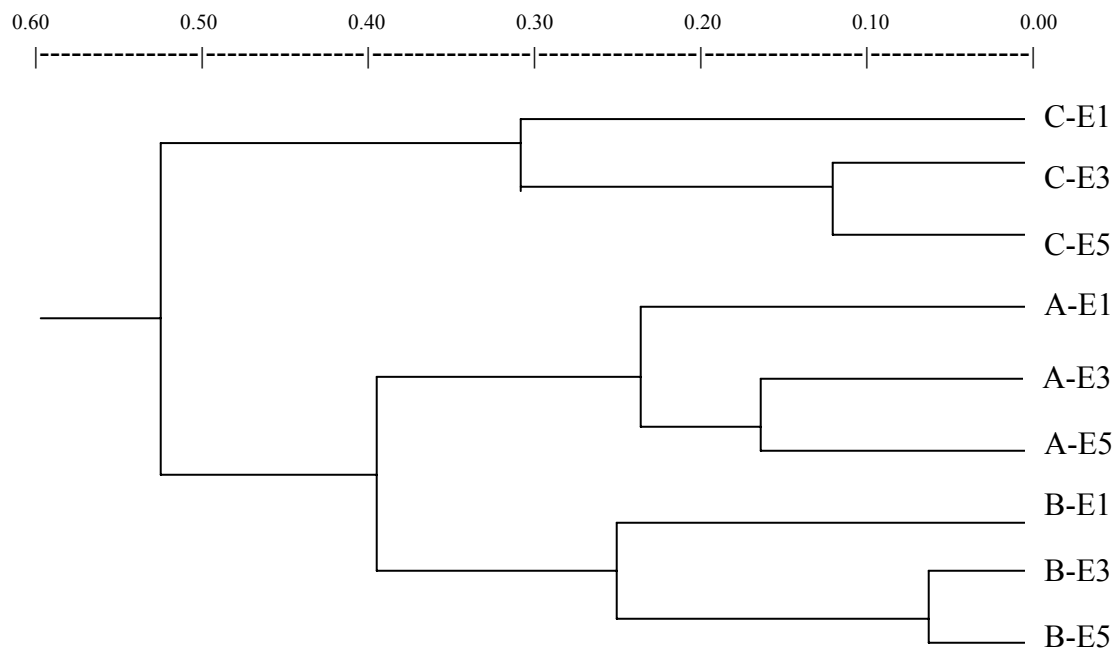


Figura 1. Dendrograma resultante da Análise de Agrupamento das 13 substâncias químicas dos óleos essenciais, utilizando-se a Distância Euclidiana Média, entre os três clones de eucalipto e os três estágios do desenvolvimento foliar. A: clone resistente. B: clone suscetível. C: clone altamente suscetível. E1, E3, E5: estágios do desenvolvimento foliar.

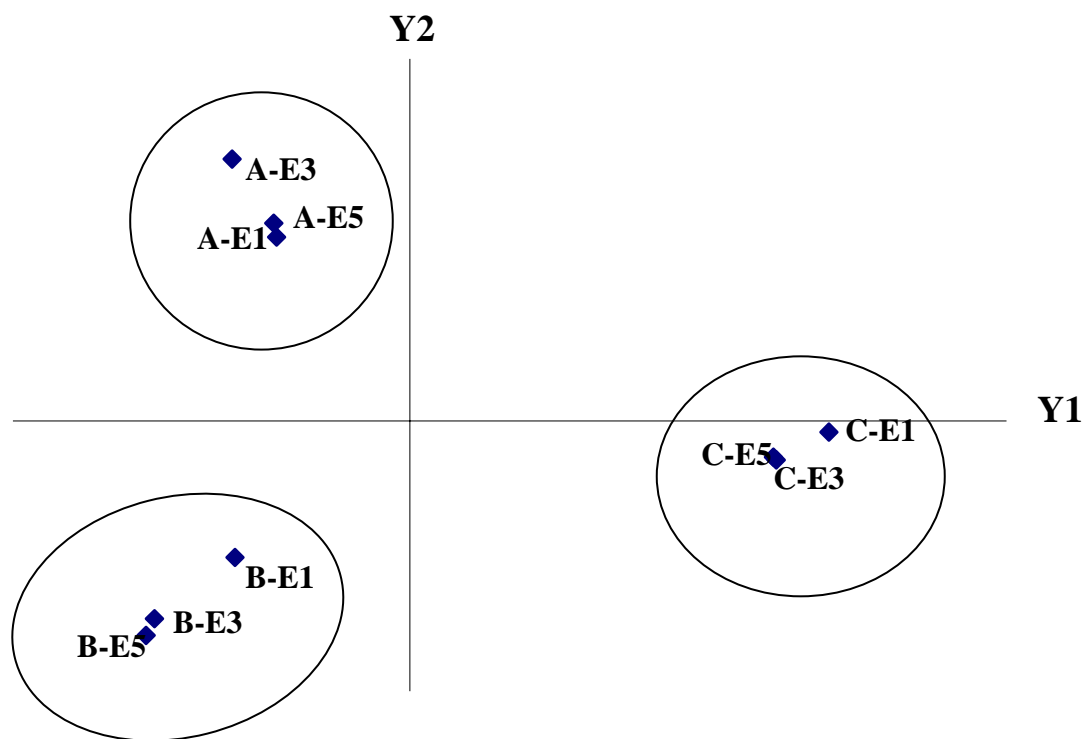


Figura 2. Dispersão gráfica dos três clones de eucalipto e os três estágios de desenvolvimento foliar, utilizando-se os dois primeiros componentes principais ( $Y_1$  e  $Y_2$ ) para o conjunto das 13 substâncias químicas presentes na composição dos óleos essenciais. A: clone resistente. B: clone suscetível. C: clone altamente suscetível. E1, E3, E5: estágios do desenvolvimento foliar.

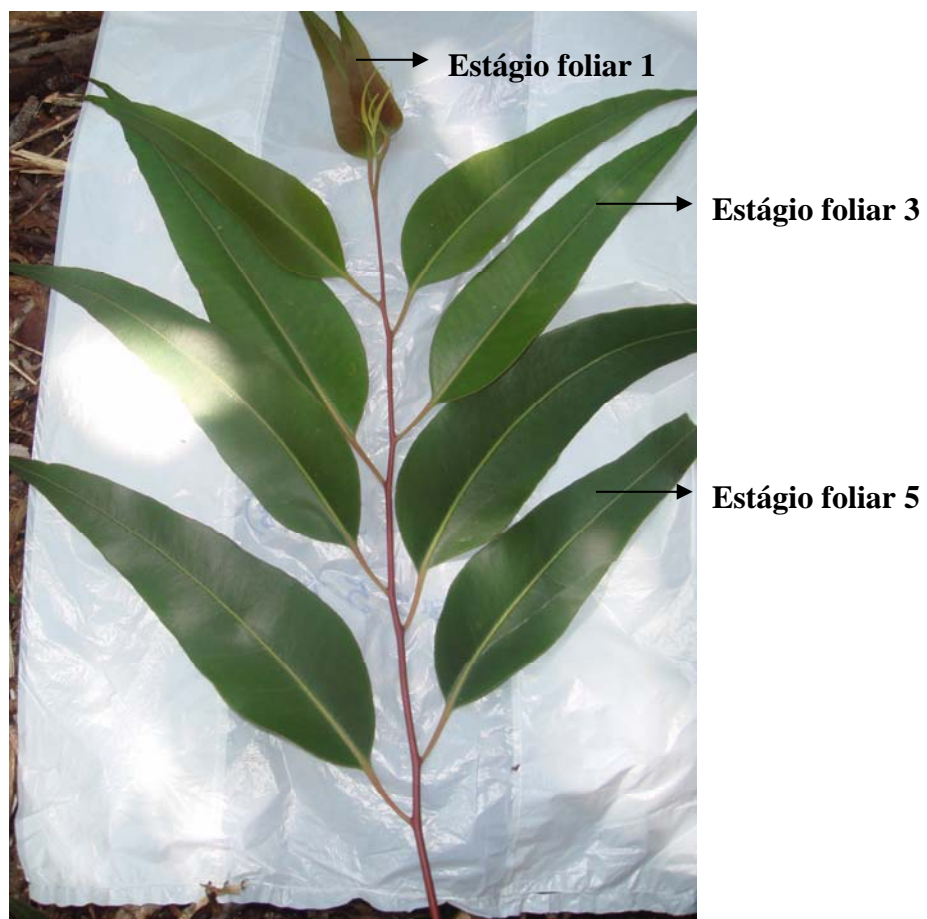


Figura 3. Representação dos três estágios de desenvolvimento foliar dispostos em ramo de eucalipto.



Figura 4. Aparelhos de Clevenger, pertencentes ao Instituto Agrônomo de Campinas, utilizados para a extração dos óleos essenciais.



Figura 5. Cromatógrafo à gás, acoplado ao espectro de massas (GCMS), pertencente ao Instituto Agrônomo de Campinas, utilizado para a análise dos óleos essenciais.

## 5. CONCLUSÕES GERAIS

- O clone A confirmou a sua resistência pela maior espessura das cutículas abaxial e adaxial, maior espessura do parênquima paliçádico adaxial, maior % de parênquima paliçádico, maior número e área de cavidades oleíferas, menor espessura da epiderme abaxial e menor espessura e % de parênquima lacunoso;
- O clone A, resistente, manteve sua condição, nos três estágios foliares, pela ausência de sintomas na superfície foliar e menor incidência de apressórios formados.
- O clone C mostrou-se altamente suscetível à ferrugem, no primeiro e terceiro estágios foliares, pela maior ocorrência de urediniósporos germinados e dotados de apressórios, bem como pela degradação dos tecidos superficiais da folha.
- O quinto estágio foliar mostrou-se resistente em ambos os clones, sendo que o material suscetível caracterizou-se pelo crescimento superficial do patógeno, sem ocorrência de penetração, e o resistente, pela inativação dos urediniósporos.
- Foram identificados dois marcadores bioquímicos, o limoneno, presente em maior quantidade no clone resistente e o  $\gamma$ -terpineno, presente em maior quantidade no clone
- O rendimento foi crescente em relação aos estágios foliares, e quanto aos clones, o altamente suscetível apresentou menor rendimento em comparação aos outros clones.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, C. L. M.; CÂMARA, F. L. A.; FURTADO, E. L.; ALMEIDA, C. I.; MAIA, E. Uso de óleos essenciais para controle de *Alternaria solani*, fungo do tomateiro cultivado em ambiente protegido. In: III SIMPÓSIO BRASILEIRO DE ÓLEOS ESSENCIAIS, 2005, Campinas. **Documentos IAC**, Campinas: IAC, 2005. p.75.

ACCORSI, W. R. **Contribuição para o estudo anatômico comparativo das espécies *Eucalyptus tereticornis* Smith e *Eucalyptus citriodora* Hooker**. Tese (functional) – Universidade de São Paulo- ESALQ, Piracicaba, 1941. 104 p.

ADAMS, R. P. **Identification of essential oil compenets by cromatography / mass spectrocopy**. Allured Publ. Corp., Carol Stream, 2001.

AGRIOS, G.N. How plants defend themselves against pathogens. In: AGRIOS, G.N. **Plant Pathology**. San Diego: Academic Press, 2005, p. 208-248.

ALFENAS, A.C.; DEMUNER, N.L.; BARBOSA, M.M. A ferrugem e as opções de controle. **Correio Agrícola**, v.1, p.18-20. 1989.

ALFENAS, A. C., ZAUZA, E. A .V. e ASSIS, T. F. First record of *Puccinia psidii* on *Eucalyptus globulus* and *E. viminalis* in Brazil. **Australasian-Plant-Pathology**. v. 32, n.2, p. 325-326, 2003.

ALFENAS, A.C.; ZAUZA, E.A.V.; MAFIA, R.G.; ASSIS, T.F. de. **Clonagem e doenças do eucalipto**. Viçosa: Editora UFV, 2004. 442p.

ANDRADE, A. M e GOMES, S. S. Influência de alguns fatores não genéticos sobre o teor de óleo essencial em folhas de *Eucalyptus citriodora* Hook. **Floresta e Ambiente**. v. 7, n. 1, p. 181 - 189, jan./dez, 2000.

ARAÚJO, J.C.A. DE; MATSUOKA, K. Histopatologia da Interação *Alternaria solani* e Tomateiros Resistente e Suscetível. **Fitopatologia Brasileira**. v. 29, n.3, p.268-275, 2004.

BAKER, E.A.; HUNT, G.M.. Developmental changes in leaf epicuticular waxes in relation to foliar penetration. **New Phytologist**. v. 88, p.731-747, 1981.

BARBIERI,R.L.; CARVALHO, F. I F. de. Coevolução de plantas e fungos patogênicos. **Revista Brasileira de Agrocência**, v.7, n. 2, p. 79-83 mai-ago, 2001.

BARTYNSKA, M. e BUDZIKUR RAMZA, E. The action of some essential oils on fungi. **Bulletin of the Polish Academy of Sciences Biological Sciences**. v. 49, n.4, p.327-331, 2001

BEDENDO, I. P. Ferrugens. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H. E AMORIM, L. **Manual de Fitopatologia: Princípios e Conceitos**. 3º ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v.1., p. 872-880.

BENNETT, R.N. e WALLSGROVE, R.M. Secondary metabolites in plant defence mechanisms. **New Phytologist**. v. 127, n.4, p. 617-633, 1994.



BIZI, R.M. **Alternativas de controle do mofo-cinzeno e do oídio em mudas de eucalipto**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 2006. 70p.

BLUM , L. E. B. e DIANESE, J. C. Padrões de liberação de urediniósporos e desenvolvimento da ferrugem do jambeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v. 36, n. 6, p. 845-850, jun. 2001.

BOLAND, D.J.; BROPHY, J.J.; HOUSE, A. P. N. **Eucalyptus leaf oils: use, chemistry, distillation and marketing**. Inkata Press, Sydney. 1991, 249 p.

CAMARGO, F.R.A.; TAKAHASHI, S.S.; FURTADO, E.L.; VALLE, C.F.; BONINE, C.A.V. Ocorrência e evolução da ferrugem do eucalipto em duas regiões do Estado de São Paulo. **Fitopatologia Brasileira**, v.22, p.254, 1997.

CASTRO, H.A. **Padronização de metodologia de inoculação e avaliação da resistência de *Eucalyptus* spp. a ferrugem causada por *Puccinia psidii* Winter**. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, ESALQ, Piracicaba, 1983.

CASTRO, M.M.; MACHADO, S.R. Células e tecidos secretores. In: APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; CARMELLO-GUERREIRO, S. M. **Anatomia vegetal**. Viçosa: Editora UFV, ed. 2, 2006. p. 179-204.

COELHO, L.; ALFENAS, A.C. e FERREIRA, F.A. Variabilidade fisiológica de *Puccinia psidii*-ferrugem do eucalipto. **Summa Phytopathologica**, v. 27, n.3, p. 295-300, 2001.

COUTINHO, H.D.M. ; BEZERRA, D.A.C.; LÔBO, K.; BARBOSA, I.J.F. **Atividade antimicrobiana de produtos naturais**. Julho de 2003/Junho de 2004. Disponível em: <[http://www.adufpb.org.br/publica/conceitos/10/art\\_11.pdf](http://www.adufpb.org.br/publica/conceitos/10/art_11.pdf)> Acesso em: 24 set. 2006.

COUTINHO, T.A., WINGFIELD, M.J., ALFENAS, A. C. & CROUS, P.W. *Eucalyptus* Rust: A Disease with the Potential for Serious International Implications. **Plant Disease**, v. 82, n.7, p.819–825, Julho, 1998.

COWAN, M.M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 12, p. 564-582. 1999.

DAGNE, E.; BISLAT D.; ALEMAYEHU M.; WORKU T. Essential Oils of Twelve *Eucalyptus* Species from Ethiopia. **J. Essent. Oil Res.** v.12, p. 467-470, 2000.

DEMUNER, N. L. e ALFENAS, A. C. Fungicidas sistêmicos para o controle da ferrugem causada por *Puccinia psidii* em *Eucalyptus cloeziana*. **Fitopatologia Brasileira**. Brasília, v.16, n.3, p. 171-174, Setembro 1991.

DETHIER M.; NDUWIMANA A.; COERDIER Y.; MENUT C.; LAMATY G. Aromatic Plants of Tropical Central Africa XVI. Studies on Essential Oils of Five *Eucalyptus* Species Grown in Burundi. **J. Essent Oil Res.**, v.6, p. 463-473, 1994.

EDWARDS, S.J.; ISAAC, S.; COLLIN, H.A.; CLIPSON, N.J. Stereological analysis of celery leaves infected by *Septoria apiicola*. **Mycological Research**. v. 103, p.750-756, 1999.

ESAU, K. **Anatomia das plantas com sementes; tradução:** Berta Lange de Morretes. São Paulo, Editora: Edgard Blucher, 1974, 293 p.

ESTANISLAU, A.A.; BARROS, F.A.S.; PENA, A.P.; SANTOS, S.C.; FERRI, P.H.; PAULA, J.R. Composição química e atividade antibacteriana dos óleos essenciais de cinco espécies de *Eucalyptus* cultivadas em Goiás. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 11, n. 2, p. 95-100, 2001.

FERREIRA, F.A. Ferrugem do eucalipto. **Revista Árvore**, Viçosa, v.7, n.2, p.23-27, 1983.

FERREIRA, F.A. **Patologia Florestal – Principais Doenças Florestais do Brasil**. Viçosa: Sociedade de Investigações Florestais, 1989. 570p.

FERREIRA, F.A.; SILVA, A.R.C. **Comportamento de procedências de *Eucalyptus grandis* e de *E. saligna* à ferrugem (*Puccinia psidii*)**. Fitopatologia Brasileira 7:23-27. 1982.

FIGUEIREDO, M. B. Doenças fúngicas emergentes em grandes culturas. **O Biológico**. São Paulo, v. 63, n. 01/02, p. 29-32, Jan-Dez, 2001.

FRANCO, J. **Prospecção fitoquímica e análise química e microbiológica do óleo essencial de *Eucalyptus cinerea* F. MUELL. ex. BENTH., Myrtaceae**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 2005.

FRENCH, R.C. Stimulation of uredospore germination in wheat stem rust by terpenes and related compounds. **Botanical Gazette**, v. 122, n. 3, p. 194-198, 1961.

GERRITS, P.O. **The application of glycol metacrylate in histotechnology; some fundamental principles**. Germany : Leica GmbH, 1991. 80p.

FURTADO, G. Q. **Germinação de urediniósporos e variabilidade fisiológica de *Puccinia psidii* Winter**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras. 2002. 55 p.

GOTTLIEB, O. Phytochemicals: differentiation and function. **Phytochemistry**, v.29, n.6, p.1715-1724, 1990.

HAMMER, K.A.; CARSON, C.F.; RILEY, T.V. Antifungal activity of the components of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. **Journal of Applied Microbiology**, v. 95, p.853–860, 2003.

HUNT, P. Cuticular penetration by germinating uredospores. **Transactions of the British Mycological Society**. v.51, p.103-112, 1983.

JANSSEN A.M, SCHEFFER J.J.C, BAERHEIM-SVENDSEN A. Antimicrobial activity of essential oils: a 1976-1986 literature review. **Planta Med**, v.53, p. 395-398. 1987.

JERBA, V. F. **Anatomia e ultra-estrutura foliar de cultivares de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) e sua relação com a resistência à antracnose**. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Botucatu. 2003. 108p.

JOFFILY, J. Ferrugem do eucalipto. **Bragantia**, Campinas, v. 4, n. 8, p. 475-487, 1944.

JOHANSEN, D.A. **Plant microtechnique**. New York :McGraw-Hill, 1940. 523p.

JOHNSON, E.D. A comparison of the juvenile and adult leaves of *Eucalyptus globulus*. **New Phytologist**, v. 25, n. 3, p. 202-212, 1926.

JONES, C.G.; FIRN, R.D.; MALCOLM, S.B. On the evolution of plant secondary chemical diversity. **Philosophical Transactions: Biological Sciences**, v. 333, n. 1267, p.273-280. 1991.

KORNDORFER, G. H. ; RODRIGUES, F.Á. . Importância do silício na incidência e na resistência às doenças de plantas. Piracicaba, 2005. **Potafos**, 2005 (Resumo de Palestra). Disponível em: <[http://web.cena.usp.br/.../2006/YAMADA/POTAFOS%20\(E\)/Gaspar%20Korndorfer/Anais%20do%20Gaspar%20Korndorfer.doc](http://web.cena.usp.br/.../2006/YAMADA/POTAFOS%20(E)/Gaspar%20Korndorfer/Anais%20do%20Gaspar%20Korndorfer.doc)> Acesso em: 18 jul. 2007.

LASSAK, E. V. The Australian. Eucalyptus oil industry, past and present. **Chemistry in Australia**, Victoria, v. 55, p. 396-398, 1988.

LIMA, R. K.; CARDOSO, M. G.; SANTOS, C. D.; FREIRE, J. M.; NASCIMENTO, E. A.; MORAIS, S. A. L. Avaliação do óleo essencial de folhas de goiabeira (*Psidium*

*guajava* L.) em diferentes horários de coleta. In: III Simpósio Brasileiro de óleos essenciais. 2005, Campinas. **Documentos IAC**, Campinas, 2005, p.115.

LIS-BALCHIN, M.; DEANS, S.G.; EAGLESHAM, E. Relationship between bioactivity and chemical composition of commercial essential oils. **Flavour and Fragrance Journal**, v.13, p. 98-104, 1998.

MAFFEIS, A. R.; SILVEIRA, R. L. V. A. e BRITO, J. O. Reflexos das deficiências de macronutrientes e boro no crescimento de plantas, produção e qualidade de óleo essencial em *Eucalyptus citriodora*. **Scientia Forestalis**. n. 57, p. 87-98, jun. 2000.

MAGNANI, E.B.Z.; ALVES, E.; ARAÚJO, D.V. Eventos dos Processos de Pré-Penetração, Penetração e Colonização de *Phakopsora pachyrhizi* em Foliolos de Soja. **Fitopatologia Brasileira**, v. 32, n.2, p. 156-160, 2007.

MCGARVEY, D.J.; CROTEAU, R. Terpenoid Metabolism. **The Plant Cell**, v.7, n.7. p.1015-1026. 1995.

MEDEIROS, R.B. de; FERREIRA, M.A.S.V.; DIANESE, J.C. **Mecanismos de agressão e defesa nas interações planta-patógeno**. Brasília: Editora Universidade de Brasília, 2003. 290p.

MEDRADO, M. J. S.; HOEFLICH, V. A. e CASTRO, A. W. V. 2005. **Embrapa: evolução do setor florestal no século XXI**. Disponível em: <<http://www.celuloseonline.com.br/Colunista/colunista.asp?IDAssuntoMateria=271&iditem=>> Acesso em 26 jan. 2006.

MENDGEN. K.; HAHN, M.; DEISING, H. Morphogenesis and mechanisms of penetration by plant pathogenic fungi . **Annual Review of Phytopathology**. v.34, p. 367-386, 1996.

METCALFE, C.R.; CHALK, L. Myrtaceae. In: METCALFE, C.R.; CHALK, L. **Anatomy of the Dicotyledons**. v.1. Oxford: Clarendon Press, 1957. p.620-631.

NUTMAN, F. J.; ROBERTS, F. M. Studies on the biology of *Hemileia vastatrix* Berk & Br. **Transactions British Mycological Society**, v.46; p.27-48, 1963.

O'BRIEN, T.P.; FEDER, N. e McCULLY, M.E. Polychromatic staining of plant cell walls by Toluidine Blue O. **Protoplasma**. v.59, p.367-373, 1964.

OGUNWANDE. I. A. ; OLAWORE, N.O.; ADELEKE, K.A. ; KONIG, W.A. Chemical composition of the essential oils from the leaves of three *Eucalyptus* species growing in Nigeria. **Journal of Essential Oil Research: JEOR**, Sep/Oct, 2003.

PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B. Hospedeiro: Mecanismos de Resistência. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H. E AMORIM, L. **Manual de Fitopatologia: Princípios e Conceitos**. 3º ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v.1, p. 417-453.

PYROZINSKI, K.A.; HAWKSWORTH, D.L. Coevolution of fungi with plants and animals. **Mycologia**. v. 81, n. 3, p. 490-493. Mai - Jun., 1989.

RANASINGHE, L.; JAYAWARDENA, B. e ABEYWICKRAMA, K. Fungicidal activity of essential oils of *Cinnamomum zeylanicum* (L.) and *Syzygium aromaticum* (L.) Merr et L.M.Perry against crown rot and anthracnose pathogens isolated from banana. **Letters in Applied Microbiology**. v. 35, p.208–211. 2002.

ROBARDS, A.W. An introduction to techniques for scanning electron microscopy of plant cell. In: HALL, G.L. **Electron microscopy and cytochemistry of plant cells**. New York: Elsevier, p. 343-444. 1978.

ROMOFF, P.; FÁVERO, O.A.; LAGO, J.H.G. Análise química e variação sazonal e circadiana do óleo volátil das folhas de *Syzygium cuminii*. In: III Simpósio Brasileiro de óleos essenciais. 2005, Campinas. **Documentos IAC**, Campinas, 2005, p.17.

RUIZ, R.A.R.; ALFENAS, A.C.; FERREIRA, F.A.; ZAMBOLIM, L. Fungicidas protetores e sistêmicos para o controle da ferrugem causada por *Puccinia psidii*. Revista **Árvore**. Viçosa, v.11, p.56-65, 1987.

RUIZ, R.A.R, ALFENAS, A.C., FERREIRA, F.A. & VALLE, F.X.R. Influência de temperatura, do tempo de molhamento foliar, fotoperíodo e da intensidade de luz sobre a infecção de *Puccinia psidii* em eucalipto. **Fitopatologia Brasileira**, v.14, p.55-61, 1989.

SALGADO, A.P.S.P.; CARDOSO, M.G; SOUZA, P,E, de; SOUZA, J.A. de; ABREU, C.M.P.; PINTO, J.E.B.P. Avaliação da atividade fungitóxica de óleos essenciais de folhas de *Eucalyptus* sobre *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea* e *Bipolaris sorokiniana*. **Ciênc. agrotec..** Lavras. .27, n.2, p.249-254, mar./abr., 2003.

SALGADO, A. P. S. P.; CARDOSO, M. G.; SOUZA, J. A.; SOUZA, P. E.; SHAN, A. Y. K. V.; GONÇALVES, L. D. Constituintes químicos do óleo essencial de folhas de *Eucalyptus* e sua atividade biológica. **Poços de Caldas:SBQ**, 2001.

SALVATORI, R. K.; POVH, F. P.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; BERNARDO, R. Atividade antifúngica do óleo essencial de *Eucalyptus citriodora*. In: XXV Congresso Paulista de fitopatologia, 2002, Esp. Santo do Pinhal. **Anais**, v.1. p. 143-143. 2002.

SAMBUGARO, R. **Caracterização anatômica foliar de clones de seringueira (*Hevea* spp.) visando resistência ao *Microcyclus ulei***. Dissertação (mestrado)- Universidade Estadual Paulista, Botucatu. 2003. 61p.

SAMPAIO, A. N. História. In: ANDRADE, E. N. **O Eucalipto**. 2ª ed. Cia Paulista de Estradas de Ferro, SP. 1939. p. 58-64.

SANTOS, A. F.; AUER, C. G.; GRIGOLETTI JÚNIOR, A. Doenças do eucalipto no sul do Brasil: identificação e controle. **Embrapa: Circular Técnica**. Colombo, Junho, 2001.

SANTOS, R.I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P. de; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5º ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/ Editora da UFSC, 2004. p. 403-434.

SCATENA, V.L; SCREMIN-DIAS, E. Parênquima, colênquima e esclerênquima. In: APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; CARMELLO-GUERREIRO, S. M. **Anatomia vegetal**. 2 ed. Viçosa: Ed. UFV, 2006. p. 179-204.

SCHUMACHER, M.V.; CALIL, F.N E VOGEL, H. L.M. **Silvicultura aplicada**. Santa Maria, 2005. Disponível em: <[http://www.ufsm.br/petagonomia/apostilas/apostila\\_silvicultura\\_aplicada.pdf](http://www.ufsm.br/petagonomia/apostilas/apostila_silvicultura_aplicada.pdf)> Acesso em: 15 de Julho de 2007.

SHIEH, J.C. Yields and chemical components of essential oils in *Eucalyptus urophylla* leaves. **Taiwan Journal of Forest Science**. v.13, n. 4, p. 291-300, 1998.

SILVA, E. A. R.; FURTADO, E.L. e RODELLA, R. A. Influências da Maturação Foliar do Eucalipto na Suscetibilidade à Ferrugem. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 2003, Marília. **Anais**, Marília, 2003. CD-ROM.

SILVA, L.M.; ALQUINI, Y. e CAVALLET, V.J. Inter-relações entre a anatomia vegetal e a produção vegetal. **Acta Botanica Brasilica**. v.19, n.1, p.183-194. 2005.



SILVEIRA, R. L.V. A.; MUNIZ, M.R.A.; SILVA, C.R.; CAMARGO, F.R.A. de. **Aspectos nutricionais envolvidos na ocorrência de doenças com ênfase para a ferrugem (*Puccinia psidii*) do eucalipto.** Disponível em <<http://www.rragroflorestal.com.br/divulgacao/pdf/ferrugem.pdf>>. Acesso em: 12, mar, 2007.

SMITH, A.H.; PINKARD, E.A.; HUNTER, G.C.; WINGFIELD, M.J.; MOHAMMED, C.L. Anatomical variation and defence responses of juvenile *Eucalyptus nitens* leaves to *Mycosphaerella* leaf disease. **Australasian Plant Pathology**, v.35, p. 725-731, 2006.

SIMÕES, C.M.O. e SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P. de; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** 5º ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/ Editora da UFSC, 2004. p. 467-496.

SNEATH, P.H.A. e SOKAL, R.R. **Numerical Taxonomy.** San Francisco: W.h. Freeman, 1973. 573p.

SUZUKI, M.S. e SILVEIRA, S. F. Germinação in vitro de uredíniosporos de *Puccinia psidii* armazenados sob diferentes combinações de umidade relativa e temperatura. **Summa Phytopathologica**, v. 29. n. 2, 2003.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant Physiology.** 2 ed. Sinauer Associates, Sunderland. 1998.

TOMMERUP, I.C.; ALFENAS, A.C. e OLD, K.M. Guava rust in Brazil-a threat to *Eucalyptus* and other Myrtaceae. **New Zealand Journal of Forestry Science**, v.33, n.3, p.420-428. 2003.

VALVERDE, S.R. As plantações de eucalipto no Brasil. **Sociedade Brasileira de Silvicultura.** Disponível em: <[http://www.sbs.org.br/destaques\\_plantacoesno brasil.htm](http://www.sbs.org.br/destaques_plantacoesno brasil.htm). 2004> Acesso em: 20, set., 2007.

VILELA, G.R. **Efeito do óleo essencial de *Eucalyptus globulus* sobre espécies produtoras de aflatoxinas.** Dissertação (Mestrado). Universidade de São Paulo-ESALQ, Piracicaba. 2007. 64p.

WILSON, C.L.; SOLAR, J.M.; GHAOUTH, A.EL; WISNIEWSKI, M.E. Rapid evaluation of plant extracts and essential oils for antifungal activity against *Botrytis cinerea*. **Plant Disease**, v. 81, n.2, p. 204-210, 1997.

ZENI, T. L.; GRIGOLETTI JR., A.; AUER, C. G.; MAGALHÃES, W. L. E.; DUARTE, J. A. S.; BIZI, R. M. Uso de extrato aquoso e óleo de eucaliptos no controle de fungos fitopatogênicos *in vitro*. In: **III Evento de iniciação científica da Embrapa Florestas.** Colombo, PR. 2004.



