

JOCIMAR CAIAFA MILAGRE

ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS RESULTANTES DA INFECÇÃO DE
Ceratocystis fimbriata EM *Eucalyptus* spp.

Monografia apresentada ao Departamento de Engenharia Florestal da Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do curso de Engenharia Florestal.

VIÇOSA
MINAS GERAIS, BRASIL
JULHO DE 2014

JOCIMAR CAIAFA MILAGRE

**ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS RESULTANTES DA INFECÇÃO DE
Ceratocystis fimbriata EM *Eucalyptus* spp.**

Monografia apresentada ao Departamento de Engenharia Florestal da Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do curso de Engenharia Florestal.

APROVADA em junho de 2014

Prof. Adriano Nunes Nesi
(CO-ORIENTADOR)

Dr. André Costa da Silva
(CO-ORIENTADOR)

Prof. Acelino Couto Alfenas
(ORIENTADOR)

AGRADECIMENTOS

A Deus, por eu ter forças e felicidade para continuar minha trajetória.

À toda minha família, especialmente aos meus irmãos, sobrinhos e à minha mãe, Maria Aparecida, que, com muito amor e carinho, não mediu esforços para que eu chegasse até esta etapa da minha vida.

Aos meus grandes “amigos-irmãos”, Vicente, Luiz e Amana, pelo apoio incondicional, pela companhia e pelos ótimos momentos.

Ao meu orientador, Acelino Couto Alfenas, pelo apoio, pelos ensinamentos e pela orientação que me levaram à execução e conclusão deste trabalho.

Ao professor Adriano Nunes Nesi, pelo apoio, pela compreensão, orientação e pelos ensinamentos.

Ao André, Mário e Franklin pela ajuda e pelos ensinamentos durante a execução deste trabalho.

À Nadia, pelo apoio, pela compressão e pelos momentos inesquecíveis.

À professora Ana Paula Ramos, pelos sorrisos, ensinamentos e pelo carinho.

A todo o pessoal dos laboratórios de Patologia Florestal e Metabolismo e Nutrição de Plantas, especialmente à Márcia, ao Lucas, ao Lúcio, à Jéssica, à Mara, ao Paulo, à Danielle, ao Leandro e à Raquel.

A todos meus grandes amigos, inclusive aqueles que fiz durante o tempo que morei em Lisboa, pela convivência e pelos bons momentos.

À Universidade Federal de Viçosa, pelo conhecimento e pelas oportunidades.

Aos Departamentos de Fitopatologia e Biologia Vegetal.

Aos Laboratórios de Patologia Florestal/Bioagro, de Metabolismo e Nutrição de Plantas, à empresa Clonar Resistência a Doenças Florestais, pela manutenção das plantas do experimento e à Sociedade de Investigações Florestais, pela concessão da bolsa de estágio.

E a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.
Muito obrigado!

BIOGRAFIA

Jocimar Caiafa Milagre, filho de José Gomes Milagre e Maria Aparecida Caiafa Milagre, nasceu em 24 de maio de 1990 em Guarani, Minas Gerais.

Estudou no Centro Federal de Educação Tecnológica de Rio Pomba (CEFET-RP) de 2006 a 2008, onde concluiu o ensino médio e o Curso Técnico em Agroindústria.

Em 2009, ingressou no curso de Engenharia Florestal na Universidade Federal de Viçosa (UFV). Nesta universidade foi bolsista de Iniciação Científica na área de Fisiologia Vegetal, monitor na disciplina de Anatomia das Espermatófitas e realizou estágio na área de Solos Florestais.

Foi bolsista de Graduação Sanduíche do CNPq, na Universidade Técnica de Lisboa (Lisboa, Portugal), onde foi estudante e estagiário no Laboratório de Patologia Florestal “Érico Veríssimo” no período de setembro de 2012 a agosto de 2013.

Atualmente é estagiário no Laboratório de Patologia Florestal da UFV sob a orientação do Prof. Acelino Couto Alfenas.

CONTEÚDO

| | |
|---|-----------|
| EXTRATO | vi |
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 2. OBJETIVOS | 3 |
| 2.1 Objetivo geral | 3 |
| 2.2 Objetivos específicos | 3 |
| 3. METODOLOGIA | 4 |
| 3.1. Material vegetal, condições de cultivo e desenho experimental | 4 |
| 3.2. Inóculo | 5 |
| 3.3. Inoculação e avaliação da severidade da doença | 5 |
| 3.4. Determinação do potencial hídrico foliar | 6 |
| 3.5. Determinação dos parâmetros de trocas gasosas | 6 |
| 3.6. Determinação dos parâmetros de fluorescência da clorofila <i>a</i> | 6 |
| 3.7. Crescimento vegetativo e biomassa seca de raízes e parte aérea | 7 |
| 3.8. Análises estatísticas | 7 |
| 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 8 |
| 5. CONCLUSÕES | 22 |
| 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 23 |

EXTRATO

MILAGRE, Jocimar Caiafa. Monografia do curso de graduação em Engenharia Florestal. Universidade Federal de Viçosa, junho de 2014. **Alterações fisiológicas resultantes da infecção de *Ceratocystis fimbriata* em *Eucalyptus* spp.** Orientador: Acelino Couto Alfenas. Co-orientadores: Adriano Nunes Nesi e André Costa da Silva.

Atualmente, a murcha-de-ceratocystis, causada por *Ceratocystis fimbriata*, é considerada uma das principais doenças dos plantios de eucalipto no Brasil. Essa doença tem causado grandes danos no crescimento volumétrico, rendimento de celulose e redução do valor da madeira destinada à serraria. Esses danos podem ser em consequência das alterações fisiológicas que esse fungo pode causar nas plantas afetadas. O fungo coloniza principalmente o sistema vascular de plantas suscetíveis, podendo resultar na murcha e morte das mesmas. Com isso, este trabalho teve como objetivo, avaliar as alterações fisiológicas resultantes da infecção por *C. fimbriata*, em plantas de dois clones de eucalipto, sendo um híbrido resistente (*Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*) e outro suscetível à doença (*Eucalyptus grandis*). Avaliações de potencial hídrico foliar, trocas gasosas e florescência da clorofila *a*, foram realizadas em mudas dos dois clones, inoculadas ou não com o fungo. Biomassa seca da parte aérea e do sistema radicular, foram determinadas ao final do experimento, assim como a avaliação da severidade da doença. Alterações negativas foram encontradas no potencial hídrico foliar (Ψ) de plantas suscetíveis inoculadas (SI) com o progresso da doença. Assimilação líquida de carbono (*A*), condutância estomática (g_s), taxa transpiratória (*E*),

rendimento quântico do *quenching* fotoquímico (q_p) e a taxa de transporte linear de elétrons (ETR) foram significativamente menores em plantas SI, 25 dias após a inoculação (25dai). Entretanto, não foram observados danos ao fotossistema II nos quatro tratamentos (suscetível inoculado, suscetível não inoculado, resistente inoculado e resistente não inoculado). Apesar de plantas SI não apresentarem taxas de crescimento relativo menores, a biomassa seca da parte aérea e do sistema radicular foi menor quando comparadas aos demais tratamentos. A percentagem de tecido doente (%TD) foi significativamente maior em plantas consideradas suscetíveis que foram inoculadas. Foi sugerido que, o estresse hídrico causado pela infecção, por se tratar de um fungo vascular, leva à redução do potencial hídrico foliar e consequente diminuição da condutância estomática. Essa diminuição, por sua vez, decresce as taxas de fotossíntese e transpiração das plantas. A compreensão dessas alterações fisiológicas fornece conhecimentos adicionais importantes para entender as alterações que ocorrem durante o processo infeccioso de *C. fimbriata* em eucalipto e que podem gerar um decréscimo considerável na produtividade da cultura.

1. INTRODUÇÃO

Com o aumento da demanda de madeira, principalmente para a indústria de papel e celulose, o cultivo do eucalipto ampliou-se muito nas últimas décadas, elevando essa cultura à categoria de essência mais plantada nos programas de reflorestamento no Brasil. Grandes maciços florestais estão distribuídos por todas as regiões do país, totalizando em 2012, uma área plantada de 5.102.030 hectares (ABRAF, 2013).

Essas grandes áreas de plantações florestais, são, em sua maioria, compostas por uma única espécie ou por clones originados de um mesmo material genético, o que pode conduzir em um aumento da incidência de pragas e doenças.

Dentre as doenças que afetam a cultura, destaca-se a murcha-de-ceratocystis, causada pelo fungo *Ceratocystis fimbriata* Ellis & Halsted. Esta é atualmente, uma das principais doença da eucaliptocultura brasileira. Esse patógeno apresenta ampla distribuição geográfica, variada gama de hospedeiros e induz perdas significativas nas culturas afetadas (Alfenas et al., 2009; Ferreira et al., 2013). Segundo Mafia et al. (2013), a doença pode levar à redução de 87% do crescimento volumétrico e até 13,7% de redução do rendimento em celulose, além de redução do valor da madeira destinada à serraria.

O patógeno infecta principalmente os tecidos vasculares, promovendo o escurecimento radial e murcha nas plantas afetadas. Consequentemente ocorre baixo

desenvolvimento das plantas, surgimento de brotações epicórmicas ao longo do fuste, cancos, intumescimento da base do tronco, morte de ponteiros e, até mesmo, morte da planta (Alfenas et al., 2009).

De forma geral, mecanismos fisiológicos das plantas são afetados quando são atacadas por patógenos (Nogués et al., 2002, Ribeiro et al., 2003; McElrone e Forseth, 2004; Pinkard e Mohammed, 2006; Domiciano et al., 2009; Pascual et al., 2010; Alves et al., 2011). Características fotossintéticas, como trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a* têm sido consideradas como eficientes indicadores do comportamento do aparato fotossintético sob condições de estresse, inclusive no caso de ataque de patógenos (Pinkard e Mohammed, 2006; Berger et al., 2007; Domiciano et al., 2009; Pascual et al., 2010; Alves et al., 2011).

Estudos demonstraram que infecções provocadas por patógenos foliares, levaram a um decréscimo nas taxas fotossintéticas (Berger et al. 2007; Chou et al., 2000; Domiciano et al., 2009), modificações no aparato fotossintético (Lichtenthaler and Miehe, 1997) e na captura, uso e dissipação da luz (Baker and Rosenqvist, 2004; Bonfig et al., 2006; Alves et al., 2011). Entretanto, não há trabalhos demonstrando a interferência de patógenos vasculares nos processos fisiológicos de espécies florestais. Tendo em mente que esses patógenos ao colonizar o sistema vascular das plantas comprometem principalmente a translocação de água e nutrientes, é de fundamental importância entender as implicações deste fato sobre os mecanismos fisiológicos na planta.

Reduções na fotossíntese podem ser causadas por estresse hídrico, que induzem o fechamento dos estômatos, limitando a disponibilidade de CO₂ nos cloroplastos, com efeitos diretos sobre a etapa bioquímica da fotossíntese (Bowden et al., 1990, Saeed et al., 1999, McElrone e Forseth, 2004 e Pascual et al., 2010). Em plantas de eucalipto, os poucos estudos existentes sobre alterações fisiológicas em respostas a patógenos são ao nível de folha (Pinkard e Mohammed, 2006; Alves et al., 2011) e nada é conhecido a respeito desses aspectos para interação com patógenos vasculares.

Diante do exposto, o objetivo desse trabalho foi avaliar as alterações fisiológicas resultantes da infecção por *C. fimbriata* em dois clones comerciais de eucalipto com diferentes níveis de resistência.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar as alterações fisiológicas em clones de eucalipto considerados resistente e suscetível, após a infecção de *Ceratocystis fimbriata*.

2.2 Objetivos específicos

- I. Verificar como a condução de líquidos é influenciada pela infecção de *C. fimbriata* em eucalipto resistente e suscetível, através da avaliação do potencial híbrido foliar;
- II. Avaliar parâmetros de trocas gasosas e de fluorescência da clorofila *a*, em clones de eucalipto resistente e suscetível à murcha-de-ceratocystis, durante o processo de infecção do fungo;
- III. Avaliar o comportamento dos clones de eucalipto considerados resistente e suscetível no que diz respeito à severidade da doença, crescimento e à partição de biomassa seca.

3. METODOLOGIA

3.1. Material vegetal, condições de cultivo e desenho experimental

O experimento foi realizado em Viçosa, Minas Gerais (20°45'S, 650 m de altitude), nas instalações do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa. Foram utilizados dois clones comerciais de eucalipto, distintos quanto à resistência à murcha-de-ceratocystis: o clone CLR236 do híbrido *E. grandis* x *E. urophylla* como resistente e o clone CLR240 de *Eucalyptus grandis* como suscetível. As mudas dos clones foram transplantadas para vasos com capacidade de 5 L, contendo substrato MecPlant® enriquecido com superfosfato simples (6 Kg/m³) e Osmocote® (NPK 19:06:10), e mantidas em casa de vegetação até atingir o ponto de inoculação. A temperatura e umidade médias na casa de vegetação, durante a realização do experimento, foram de 25 °C e 79%, respectivamente.

Os ensaios foram montados em delineamento inteiramente casualizado, com 4 tratamentos, sendo os clones A06 (resistente) e 1172 (suscetível) inoculados e não inoculados, com 6 repetições, num total de 24 parcelas. Os tratamentos foram denominados por RN (clone resistente não inoculado), RI (clone resistente inoculado), SN (clone suscetível não inoculado) e SI (clone suscetível inoculado).

3.2. Inóculo

Foi utilizado o isolado SBS-1 de *C. fimbriata* da coleção micológica do Laboratório de Patologia Florestal/Bioagro (UFV), obtido a partir de um clone híbrido de *E. grandis* com sintomas de murcha, na região de Teixeira de Freitas, BA. O isolado foi identificado através de suas características morfológicas e moleculares, sendo utilizado em estudos de resistência (Rosado et al., 2010; Guimarães et al., 2010) e variabilidade genética (Oliveira, 2010). O fungo foi cultivado em placas de Petri (9 cm de diâmetro) contendo meio MEYA (2% de extrato de malte; 0,2% extrato de levedura e 2% de ágar), a 28 ± 1 °C, fotoperíodo de 12 h e intensidade luminosa de $40 \mu\text{mol}$ de fótons $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$, durante dez dias. Para a coleta dos esporos (conídios, aleuroconídios e ascósporos), foi adicionada água esterilizada contendo Tween 20 a 1% às placas e, em seguida, raspou-se a superfície da colônia com alça de Drigalski. A suspensão de esporos foi filtrada em camada dupla de gaze. A concentração do inóculo foi determinada sob microscópio óptico em câmara de Neubauer e calibrada para $2,0 \times 10^6$ esporos mL^{-1} .

3.3. Inoculação e avaliação da severidade da doença

A inoculação das plantas foi realizada 60 dias após o transplante. Com o auxílio de um bisturi foi realizado um corte longitudinal, de aproximadamente 2 cm de comprimento e cerca de 0,2 cm de profundidade, na altura de 5 cm acima do coleto no caule das plantas, onde foi depositado 1,0 mL da suspensão de esporos. O ferimento foi coberto com filme de PVC para evitar o ressecamento e a entrada de outros microrganismos. Nas plantas não inoculadas também foi feito um corte longitudinal, no qual foi aplicada uma solução de água com Tween a 1%.

A avaliação da severidade da doença foi realizada no 60º dia após a inoculação. Foram avaliados a altura das plantas e o comprimento das lesões (sintoma típico de escurecimento do lenho causado pelo patógeno no caule da planta). Com esses dados, foi calculada a porcentagem de tecido doente, dividindo-se o comprimento da lesão pela altura da planta e multiplicando-se por 100.

3.4. Determinação do potencial hídrico foliar

As medições do potencial hídrico foliar foram realizadas na terceira folha completamente expandida (contada a partir do ápice do ramo) do terceiro ramo (contado a partir do ápice da planta). Foi realizada uma avaliação antes da inoculação das plantas e 14, 28 e 35 dias após a inoculação (dai). As avaliações foram realizadas no período da antemanhã (Ψ_{am}) e ao meio-dia (Ψ_{md}), utilizando uma bomba de pressão tipo Scholander (modelo PMS 100). Cada folha foi cortada na base do pecíolo, com auxílio de um bisturi, e imediatamente inserida na câmara de pressão.

3.5. Determinação dos parâmetros de trocas gasosas

A caracterização de trocas gasosas foi realizada 60 dias após o transplântio no período de 8h às 12h, em folhas localizadas nas mesmas posições das utilizadas nas medições de potencial hídrico. Foi realizada uma avaliação antes da inoculação das plantas, 17 e 25 dias após a inoculação (dai). Para isso foi utilizado o sistema de determinação de concentração de gases por infravermelho (IRGA, Licor modelo LI-6400XT, Lincoln, EUA). Foram determinadas a taxa de assimilação líquida de carbono (A , $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), condutância estomática (g_s , $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), relação entre as concentrações interna e externa de CO_2 da folha (C_i/C_a) e taxa de transpiração (E , $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) sob concentração de CO_2 (~ 385-410 ppm), temperatura e vapor de água ambientes. Durante as avaliações os valores de temperatura do ambiente e da folha variaram de 22 a 32 °C e 23 a 28 °C, respectivamente. A densidade de fluxo de fótons utilizada foi de 1000 $\mu\text{mol de fótons m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Paralelamente, a respiração no escuro (R_d , $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) foi determinada das 21h às 24h, sob concentração fixa de CO_2 de 400 ppm.

3.6. Determinação dos parâmetros de fluorescência da clorofila *a*

A fluorescência da clorofila *a* foi determinada pelo fluorômetro de luz modulada acoplado ao IRGA, descrito acima, na mesma folha escolhida para as trocas gasosas. Após serem adaptados ao escuro, por 1 hora, os tecidos foliares foram inicialmente

expostos a um fraco pulso de luz vermelho-distante ($1-2 \mu\text{mol}$ de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$), para a determinação da fluorescência inicial (F_0). Em seguida, um pulso de luz saturante, com irradiância de $6000 \mu\text{mol}$ fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e duração de 1 segundo, foi aplicado para estimar a fluorescência máxima emitida (F_m). Procedeu-se, então, à estimativa de outros parâmetros relacionados com a fluorescência, como o rendimento quântico máximo do fotossistema II (F_v/F_m), rendimento quântico do *quenching* fotoquímico (q_p), rendimento quântico do *quenching* não-fotoquímico (NPQ) e a taxa de transporte linear de elétrons (ETR).

3.7. Crescimento vegetativo e biomassa seca de raízes e parte aérea

Antes da inoculação foi feito a medição da altura de todas as plantas utilizadas no experimento. No final do experimento (60 dias após a inoculação) foi realizada outra medição com objetivo de verificar a interferência do fungo no crescimento das plantas. Com isso, foi determinada a taxa de crescimento relativo (TCR) através da metodologia de análise de crescimento citada por Magalhães (1985), conforme a equação 1. Logo após, as plantas foram cortadas na região do coleto, separando-se as raízes da parte aérea. Em sequência, o material foi levado à estufa de ventilação forçada a 65°C até atingir um peso constante para determinação da biomassa seca da parte aérea e sistema radicular. Foram calculadas as porcentagens da biomassa seca da parte aérea e do sistema radicular na biomassa seca total (% PA e % SR, respectivamente).

$$(1) \text{ TCR} = \frac{(\ln(H_f) - \ln(H_i))}{n^\circ \text{ dias}}$$

Onde, TCR = taxa de crescimento relativo do caule, H_f = altura final e H_i = altura inicial.

3.8. Análises estatísticas

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA). Os valores médios, quando significativos, foram separados pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software Statistica versão 12 (StatSoft 2012). Avaliação da normalidade e homogeneidade foi realizada com os resíduos de onde não se verificou desvios das pressuposições envolvidas na análise.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em plantas suscetíveis inoculadas (SI), o sintoma de murcha, manifestou-se no 15º dia após a inoculação e por volta do 40º dia já podiam ser observadas alterações na morfologia do caule com a formação de cancro a partir do ponto de inoculação e se estendendo ao longo do caule (Figuras 1B e 1C). Também foi observado em plantas SI, o intumescimento da região da inoculação e formação de brotações epicórmicas abaixo do ponto de inoculação do fungo, sintomas esses apresentados, típicos da murcha-deceratocystis (Figura 1C).

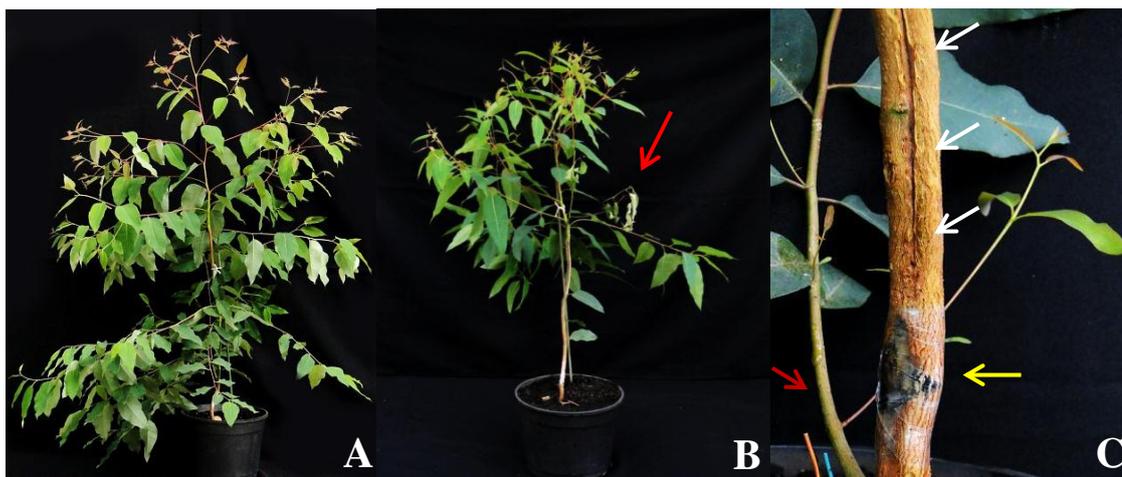


FIGURA 1. Planta resistente inoculada (A) e planta suscetível inoculada (B) 20 dias após a inoculação. Em B, o sintoma de murcha (seta) da parte aérea da planta. Em C, o sintoma de cancro no caule (setas brancas). Na mesma figura, pode-se observar um intumescimento no ponto de inoculação (seta amarela) em planta suscetível inoculada. Também são indicadas em C, brotações epicórmicas (seta vermelha).

A percentagem de tecido doente (%TD), calculada a partir do comprimento da lesão interna provocada pela inoculação, foi significativamente maior em plantas consideradas suscetíveis que foram inoculadas, comprovando a diferença do nível de resistência entre os dois clones testados (Figura 2). Além de comprovar a resistência e a suscetibilidade dos clones utilizados neste trabalho, estes valores evidenciam que após a inoculação, o fungo se dissemina através do caule, comprometendo-o ao longo de sua extensão.

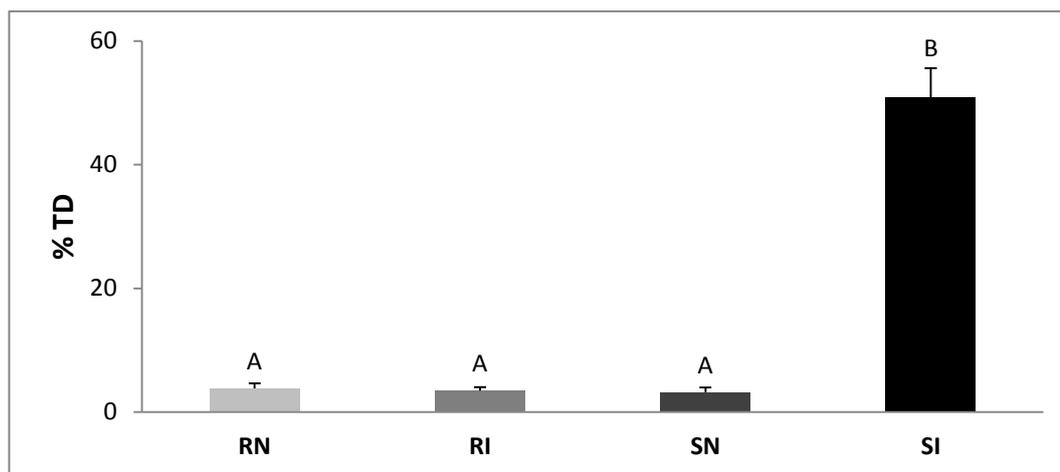


FIGURA 2. Percentagem de tecido doente (%TD) das plantas resistente não inoculada (RN), resistente inoculada (RI), suscetível não inoculada (SN) e suscetível inoculada (SI), determinada 60 dias após a inoculação. Os valores são apresentados como médias \pm erro-padrão, calculados a partir de seis repetições. Letras maiúsculas distintas indicam diferenças significativas entre os tratamentos na avaliação (teste de Tukey, $P < 0,05$).

Os valores de potencial hídrico nos períodos da antemanhã (Ψ_{am}) e próximo ao meio-dia (Ψ_{md}) foram relativamente menores em plantas SI em 28 e 35dai. A redução atingiu 50%, quando comparadas plantas SI com plantas suscetíveis não inoculadas (SN) em 35 dias após a inoculação no período da antemanhã (Figuras 3A e 3B). Segundo Aguirreolea et al. (1995), patógenos associados à murchas vasculares aumentam a resistência ao movimento de água no xilema ao colonizar o interior dos elementos condutores. Essa redução pode ser influenciada por diferentes fatores incluindo a própria presença de estruturas do patógeno, seus metabólitos, enzimas extracelulares ou a formação de substâncias como gomas e tiloses (Aguirreolea et al., 1995, Pascual et al., 2010). De acordo com Pascholati et al. (2008), o ataque de espécies do gênero *Ceratocystis* pode levar a planta a desenvolver estresse hídrico devido à obstrução dos elementos xilemáticos pelo crescimento de hifas do patógeno e/ou produção de esporos, e, em alguns casos também pelo incremento da viscosidade da seiva como observado para *Ceratocystis ulmi* em ulmus.

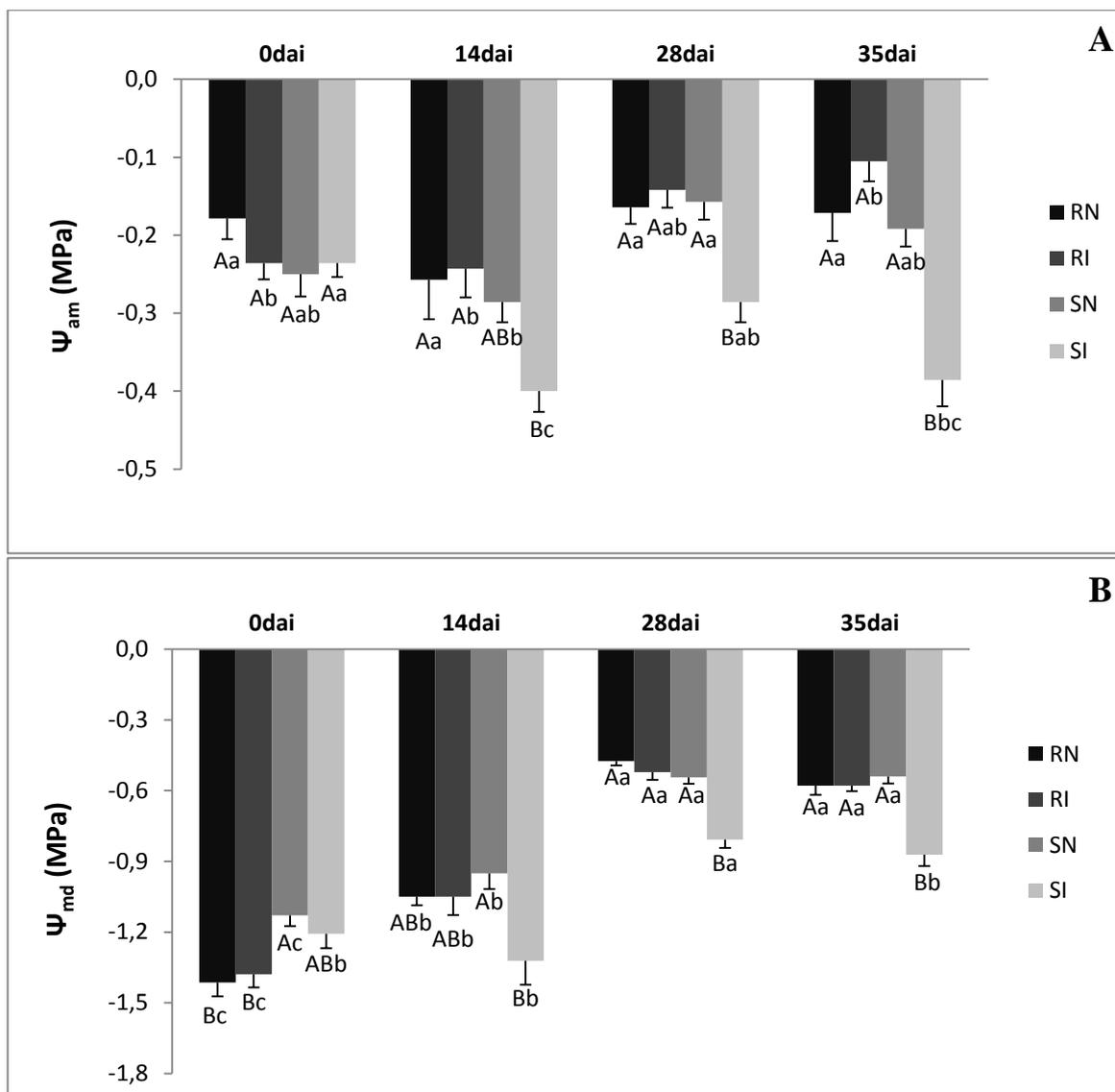


FIGURA 3. Potencial hídrico foliar em MPa das plantas resistente não inoculada (RN), resistente inoculada (RI), suscetível não inoculada (SN) e suscetível inoculada (SI), avaliadas antes, 14, 28 e 35 dias após a inoculação (dai). A, potencial hídrico foliar no período da antemanhã (Ψ_{am}). B, potencial hídrico foliar ao meio-dia (Ψ_{md}). Os valores são apresentados como médias \pm erro-padrão, calculados a partir de seis repetições. Letras maiúsculas distintas indicam diferenças significativas entre os tratamentos no mesmo tempo de avaliação (teste de Tukey, $P < 0,05$). Letras minúsculas distintas indicam diferenças significativas entre os tempos de avaliação para um mesmo tratamento (teste de Tukey, $P < 0,05$).

Antes da inoculação (0dai) foram encontradas diferenças significativas entre as taxas de assimilação de CO₂ (*A*) de plantas resistentes (RN e RI) e suscetíveis (SN e SI), demonstrando que o clone CLR236 (resistente) apresenta uma maior capacidade fotossintética quando comparado ao clone CLR240 (Figura 4A). Condutância estomática (*g_s*), *A* e taxa de transpiração (*E*) foram significativamente menores em plantas SI, 25 dias após a inoculação (25dai), em relação aos demais tratamentos (Figuras 4A, 4B e 5A). Aos 25dai constatou-se a redução de aproximadamente 7, 7 e 2% em *A*, *g_s* e *E*, respectivamente, quando se compara plantas RN e RI. Essas mesmas reduções atingem 30, 53 e 37% quando se compara plantas SN e SI. Além do efeito do ferimento da inoculação, estes valores podem estar relacionados com uma menor disponibilidade de água na folha causada pelo parcial bloqueio dos vasos do xilema por *C. fimbriata* em plantas SI. Resultados semelhantes foram encontrados por Ribeiro et. al (2003), em que plantas de laranja visivelmente assintomáticas, infectadas por *Xylella fastidiosa*, apresentaram um decréscimo nas taxas fotossintética e transpiratória e na condutância estomática. Limitações na fotossíntese foram verificadas em diversos trabalhos com patógenos vasculares como *Verticillium dahliae* (Bowden et al., 1990; Saeed et al., 1999; Pascual et al. 2010), *Xylella fastidiosa* (Ribeiro et al., 2003; McElrone e Forseth, 2004) e *Fusarium oxysporum* (Nogués et al., 2002; Pshibytko et al., 2006). A redução na assimilação de CO₂ ocorreu provavelmente devido ao fechamento parcial dos estômatos pela restrição hídrica, fato que pode ser evidenciado pela drástica redução da *g_s*, e à menor concentração de CO₂ nas folhas (menor relação *C_i/C_a*) para plantas SI. Além de restrições fisiológicas, reduções na fotossíntese podem ser causadas por efeitos diretos sobre a bioquímica da fotossíntese (McElrone e Forseth, 2004; Pshibytko, 2006; Pascual et al. 2010), tal como a redução da atividade (Lorenzini et al., 1997; Saeed et al., 1999) e regeneração (Nogués et al., 2002) da Rubisco.

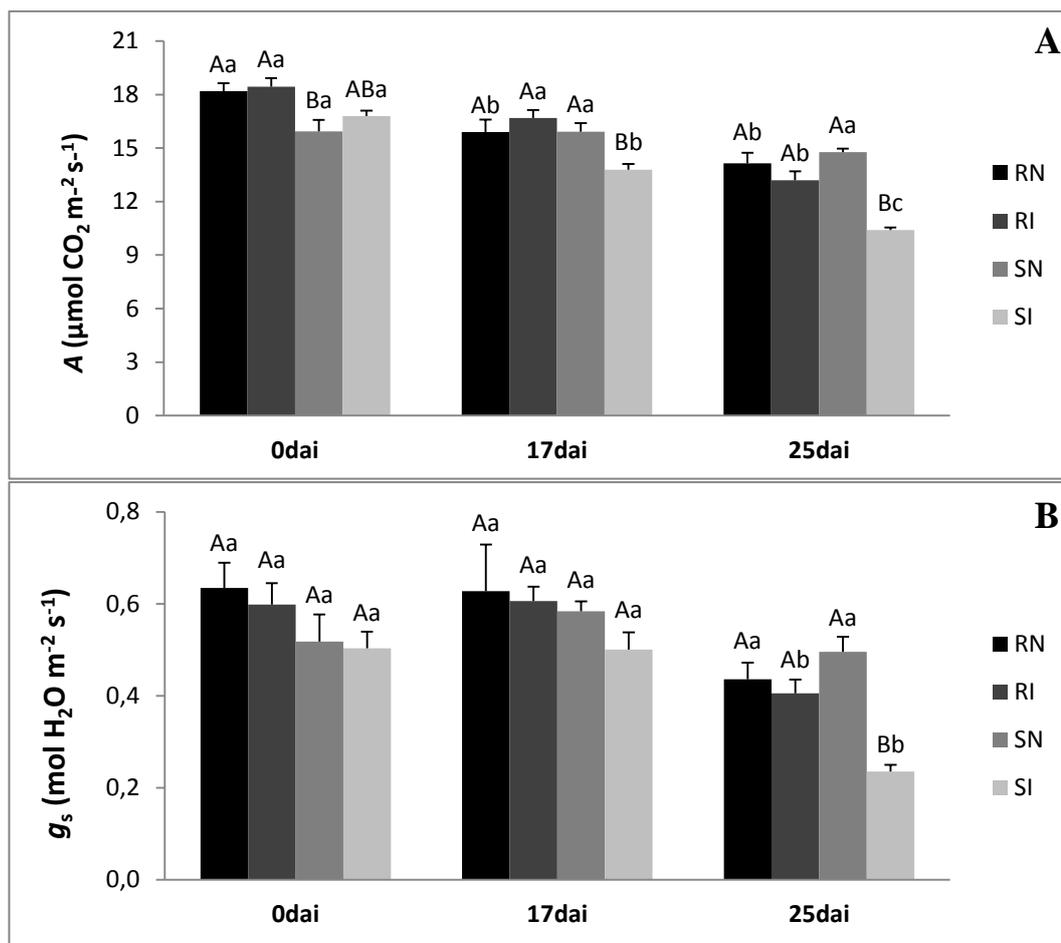


FIGURA 4. Parâmetros de trocas gasosas das plantas resistente não inoculada (RN), resistente inoculada (RI), suscetível não inoculada (SN) e suscetível inoculada (SI), avaliadas antes, 17 dias e 25 dias após a inoculação (dai). A, taxa de assimilação líquida de CO₂ em folhas (A). B, condutância estomática (g_s). Os valores são apresentados como médias ± erro-padrão, calculados a partir de seis repetições. Letras maiúsculas distintas indicam diferenças significativas entre os tratamentos no mesmo tempo de avaliação (teste de Tukey, P<0,05). Letras minúsculas distintas indicam diferenças significativas entre os tempos de avaliação para um mesmo tratamento (teste de Tukey, P<0,05).

Apesar da assimilação de CO₂ ser maior para as plantas resistentes antes da inoculação, não foram encontradas diferenças significativas entre os clones resistente e suscetível para os demais parâmetros de trocas gasosas. A relação entre as

concentrações interna e externa de CO₂ da folha (C_i/C_a) foi menor para as plantas SI e RN em 25dai (Figura 5B). Como encontrado por Pascual et al. (2010) a taxa respiratória no escuro (R_d) foi levemente maior em plantas inoculadas quando comparadas com plantas não inoculadas em 25dai (Figura 6).

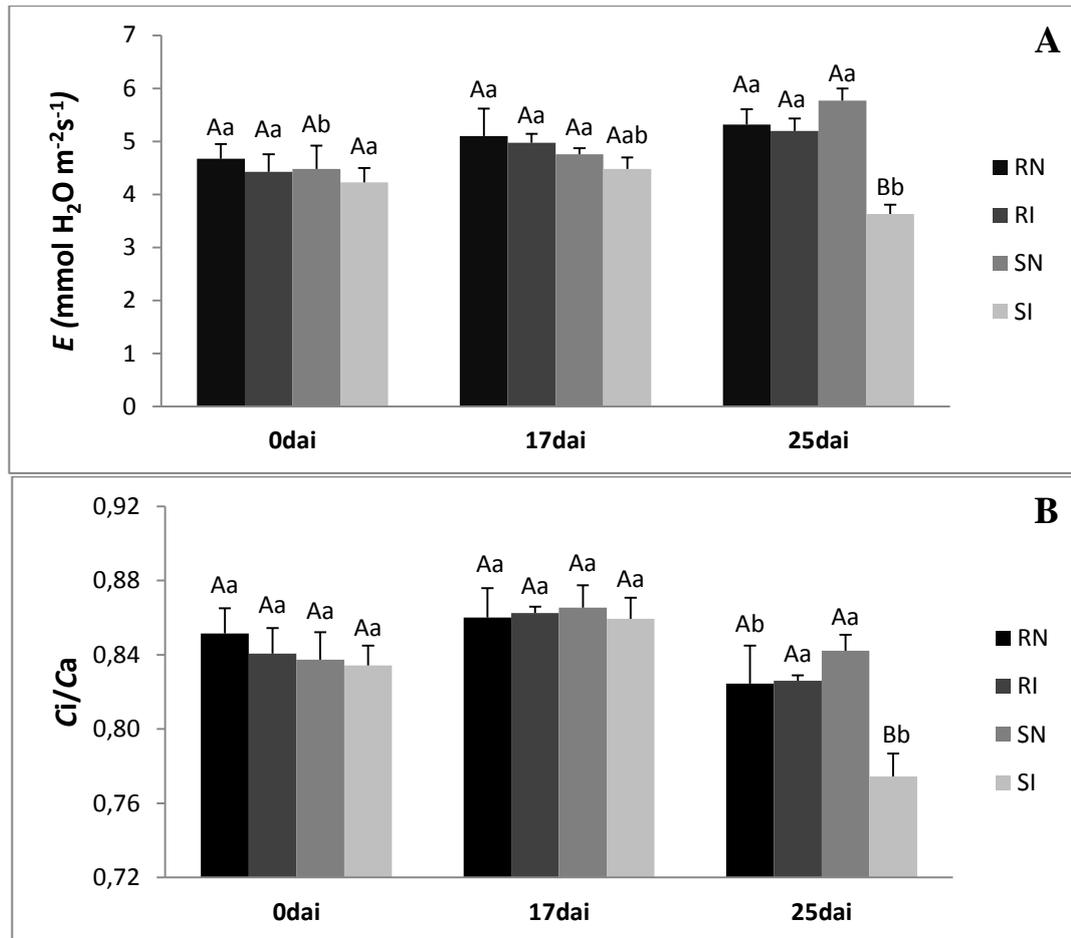


FIGURA 5. Parâmetros de trocas gasosas das plantas resistente não inoculada (RN), resistente inoculada (RI), suscetível não inoculada (SN) e suscetível inoculada (SI), avaliadas antes, 17 dias e 25 dias após a inoculação (dai). A, taxa transpiratória (E). B, relação entre as concentrações interna e externa de CO₂ da folha (C_i/C_a). Os valores são apresentados como médias \pm erro-padrão, calculados a partir de seis repetições. Letras maiúsculas distintas indicam diferenças significativas entre os tratamentos no mesmo tempo de avaliação (teste de Tukey, $P < 0,05$). Letras minúsculas distintas indicam diferenças significativas entre os tempos de avaliação para um mesmo tratamento (teste de Tukey, $P < 0,05$).

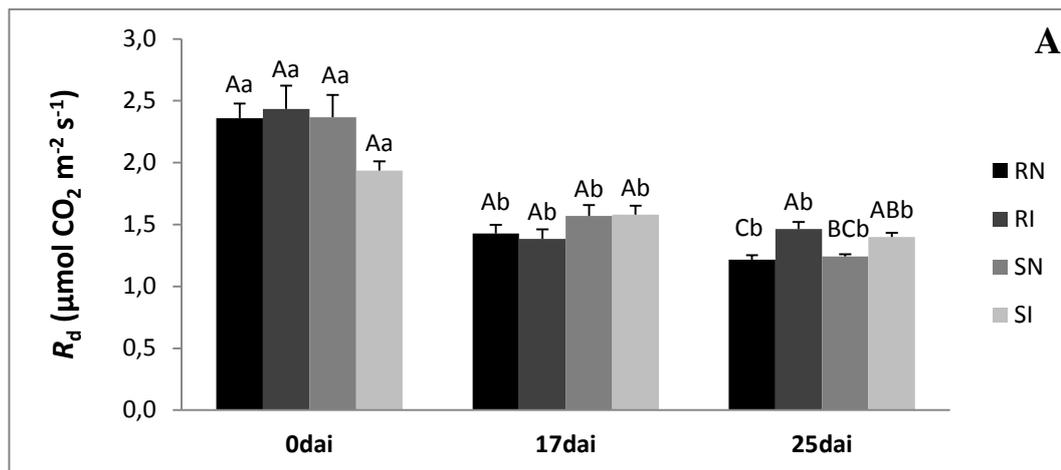


FIGURA 6. Taxa respiratória no escuro (R_d) das plantas resistente não inoculada (RN), resistente inoculada (RI), suscetível não inoculada (SN) e suscetível inoculada (SI), avaliadas antes, 17 dias e 25 dias após a inoculação (dai). Os valores são apresentados como médias \pm erro-padrão, calculados a partir de seis repetições. Letras maiúsculas distintas indicam diferenças significativas entre os tratamentos no mesmo tempo de avaliação (teste de Tukey, $P < 0,05$). Letras minúsculas distintas indicam diferenças significativas entre os tempos de avaliação para um mesmo tratamento (teste de Tukey, $P < 0,05$).

Antes da inoculação, o rendimento quântico máximo do fotossistema II (F_v/F_m) foi menor em plantas resistentes. Em 25dai as plantas SI apresentaram valores significativamente maiores em relação aos outros tratamentos para este mesmo parâmetro (Figura 7A), porém, em nenhum dos pontos de avaliação, os tratamentos apresentaram valores que indicam dano fotoinibitório ao fotossistema II. Esses resultados também foram encontrados por Ribeiro et. al (2003) em plantas de laranja infectadas por *Xylella fastidiosa*. Entretanto, menores valores para F_v/F_m são mais comuns de serem encontrados em plantas estressadas por patógenos (Nogués et al., 2002; Pshibytko et al., 2006; Bonfig et al., 2006; Alves et al., 2011). Em 17 dai, plantas SN e SI apresentaram menores valores de rendimento quântico do *quenching* fotoquímico (q_p) e rendimento quântico do *quenching* não fotoquímico (NPQ) (Figuras 8A e 8B). As plantas SI apresentaram no ponto 25dai os menores valores de q_p e taxa de transporte linear de elétrons (ETR) quando comparadas às outras plantas (Figuras 7A e 6B). Menores valores de q_p e ETR também foram encontrados por Nogués et al. (2002)

e Pascual et al. (2010), respectivamente. Esses valores indicam que *C. fimbrita* leva à diminuição da dissipação da energia pelo processo fotossintético, além de diminuir o transporte de elétrons ao longo da cadeia transportadora de elétrons nos tilacóides dos cloroplastos.

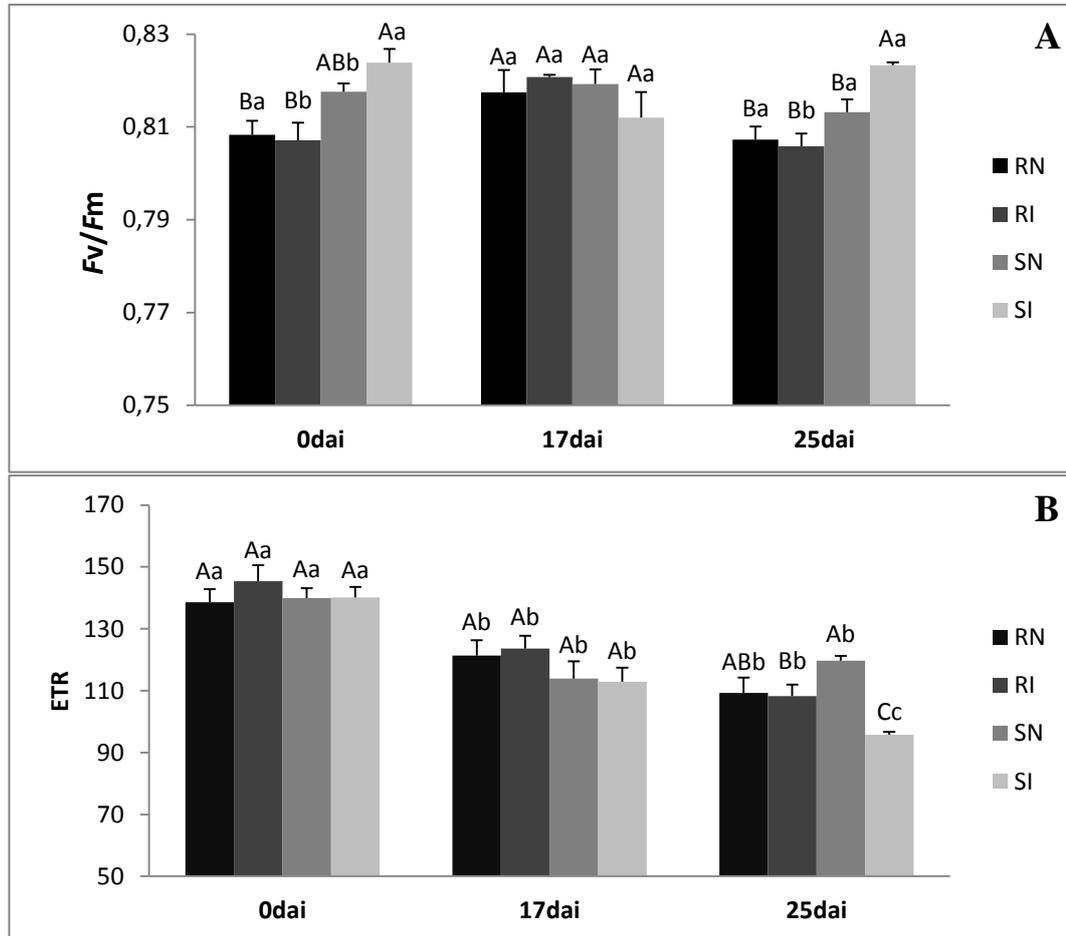


FIGURA 7. Parâmetros de fluorescência da clorofila *a* das plantas resistente não inoculada (RN), resistente inoculada (RI), suscetível não inoculada (SN) e suscetível inoculada (SI), avaliadas antes, 17 dias e 25 dias após a inoculação (dai). A, rendimento quântico máximo do fotossistema II (Fv/Fm). B, taxa de transporte linear de elétrons (ETR). Os valores são apresentados como médias \pm erro-padrão, calculados a partir de seis repetições. Letras maiúsculas distintas indicam diferenças significativas entre os tratamentos no mesmo tempo de avaliação (teste de Tukey, $P < 0,05$). Letras minúsculas distintas indicam diferenças significativas entre os tempos de avaliação para um mesmo tratamento (teste de Tukey, $P < 0,05$).

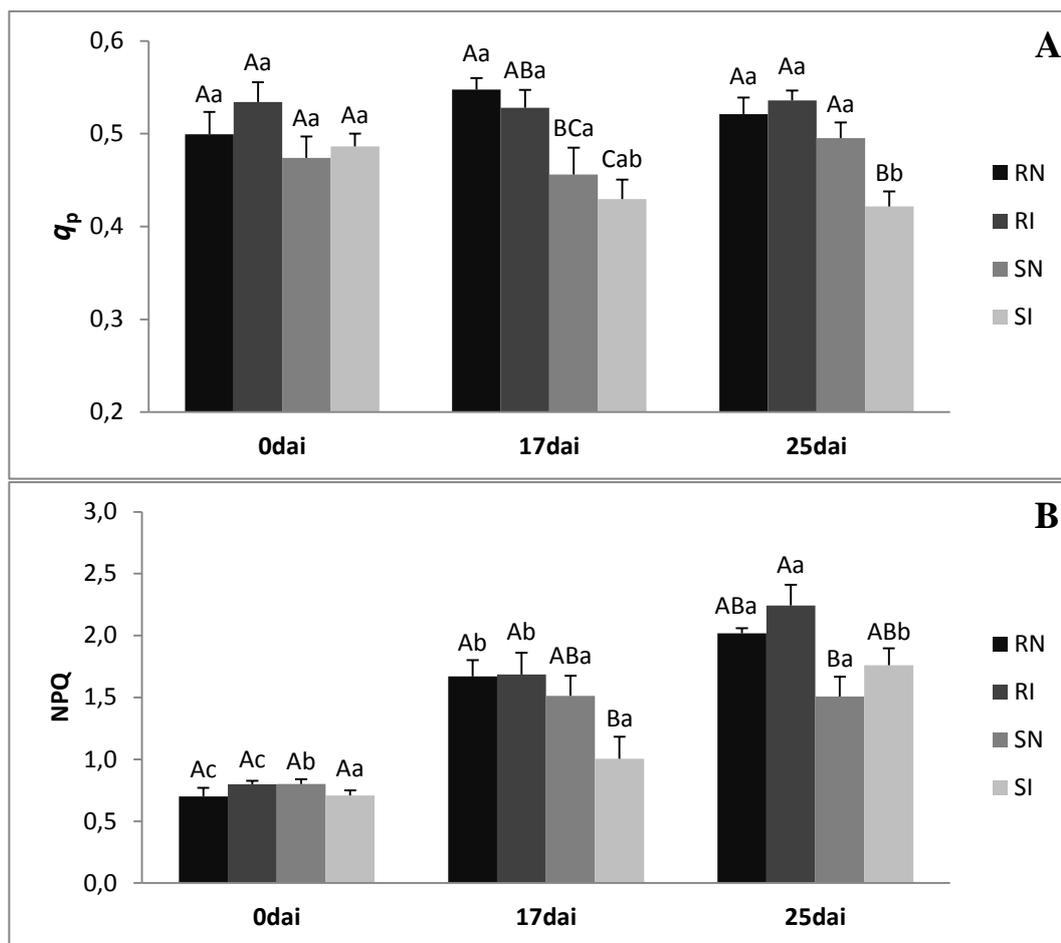


FIGURA 8. Parâmetros de fluorescência da clorofila *a* das plantas resistente não inoculada (RN), resistente inoculada (RI), suscetível não inoculada (SN) e suscetível inoculada (SI), avaliadas antes, 17 dias e 25 dias após a inoculação (dai). A, rendimento quântico do *quenching* fotoquímico (q_p). B, rendimento quântico do *quenching* não-fotoquímico (NPQ). Os valores são apresentados como médias \pm erro-padrão, calculados a partir de seis repetições. Letras maiúsculas distintas indicam diferenças significativas entre os tratamentos no mesmo tempo de avaliação (teste de Tukey, $P < 0,05$). Letras minúsculas distintas indicam diferenças significativas entre os tempos de avaliação para um mesmo tratamento (teste de Tukey, $P < 0,05$).

As taxas de crescimento relativo da parte aérea foram maiores para plantas resistentes (RN e RI). Não foram observadas diferenças significativas nas taxas de

crescimento entre as plantas SN e SI, 60 dias após a inoculação (Figura 9A). Entretanto, as plantas SI apresentaram os menores valores de biomassa seca da parte aérea (Figura 9B). Biomassa seca do sistema radicular foi significativamente menor para plantas SI, quando comparada às demais plantas (Figura 9B). Nogués et al. (2002) encontrou valores significativamente menores para massa seca total, de folhas e do sistema radicular de plantas de tomate infectadas com *Fusarium oxysporum*. A percentagem da biomassa seca da parte aérea na biomassa seca total (% PA) foi significativamente menor em plantas SN (Figura 10A). Já para a percentagem de biomassa seca do sistema radicular na biomassa seca total (% SR), as plantas SN apresentaram os maiores valores quando comparadas aos demais tratamentos (Figura 10B). Tais resultados sugerem que o fungo está afetando o transporte de substâncias no floema, fazendo com que os fotoassimilados não cheguem de forma eficiente para promover o desenvolvimento normal da raiz. Em conjunto estes dados demonstram a interferência do fungo *C. fimbriata* no crescimento volumétrico de mudas de eucalipto infectadas, resultado que também foi verificado por Mafia et al. (2013), porém em plantas adultas.

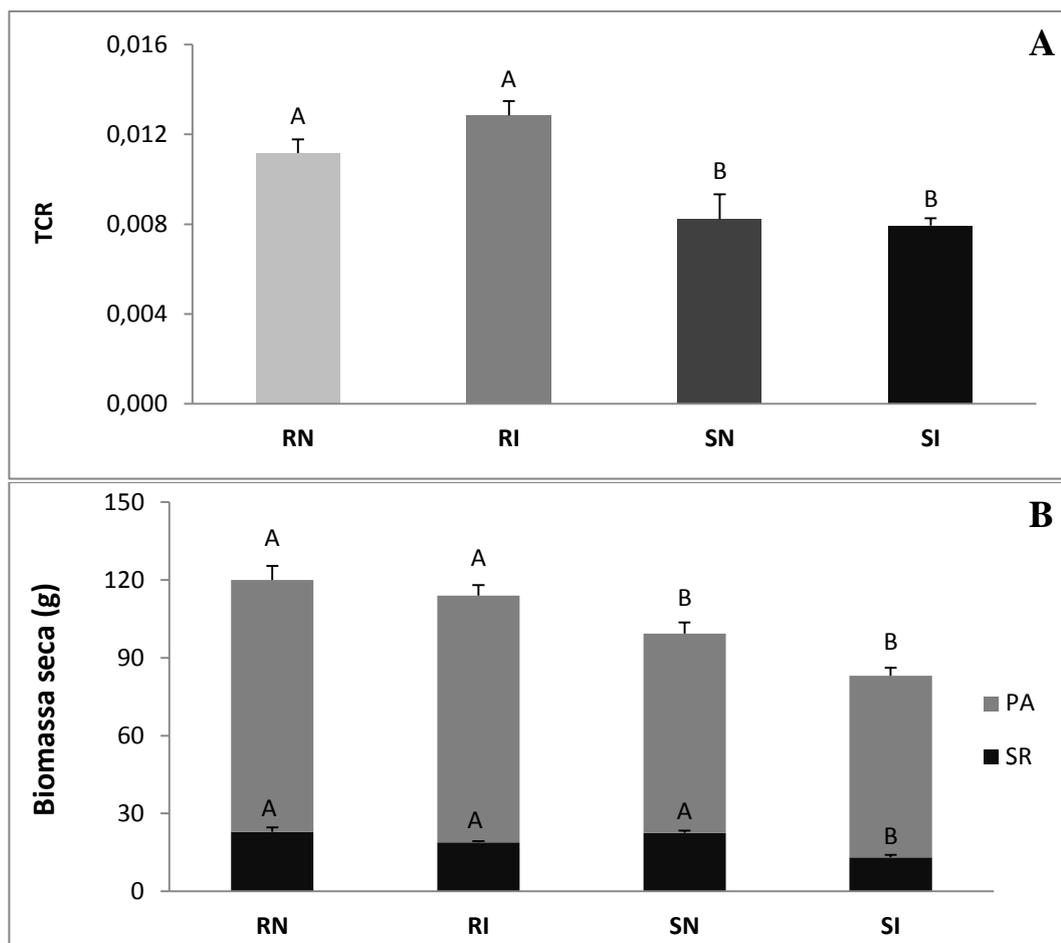


FIGURA 9. A, taxa de crescimento relativo da parte aérea (TCR). B, biomassa seca da parte aérea (PA) e sistema radicular (SR), em gramas, das plantas resistente não inoculada (RN), resistente inoculada (RI), suscetível não inoculada (SN) e suscetível inoculada (SI), determinadas 60 dias após a inoculação. Os valores são apresentados como médias \pm erro-padrão, calculados a partir de seis repetições. Letras maiúsculas distintas indicam diferenças significativas entre os tratamentos na avaliação (teste de Tukey, $P < 0,05$).

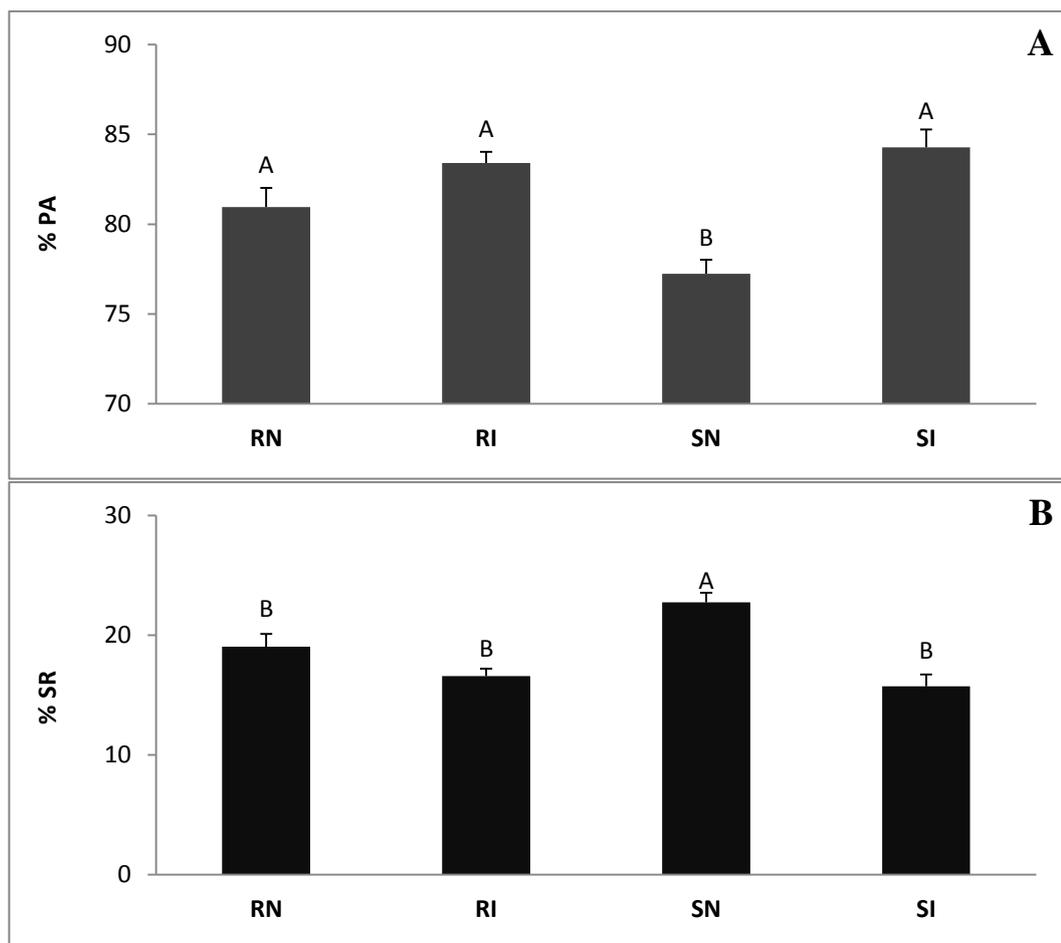


FIGURA 10. Partição de biomassa seca das plantas resistente não inoculada (RN), resistente inoculada (RI), suscetível não inoculada (SN) e suscetível inoculada (SI), determinada 60 dias após a inoculação. A, percentagem da biomassa seca da parte aérea na biomassa seca total (% PA). B, percentagem da biomassa seca do sistema radicular na biomassa seca total (% SR). Os valores são apresentados como médias \pm erro-padrão, calculados a partir de seis repetições. Letras maiúsculas distintas indicam diferenças significativas entre os tratamentos na avaliação (teste de Tukey, $P < 0,05$).

Este estudo sugere que, o estresse hídrico causado pela a infecção por *C. fimbriata* em clones suscetíveis de eucalipto leva à redução do potencial hídrico foliar, provocando a redução da condutância estomática. Esta diminuição, por sua vez, conduz

ao decréscimo das taxas fotossintética e transpiratória das plantas. A compreensão dessas alterações fisiológicas auxiliará na compreensão das interações existentes entre a planta e *C. fimbriata*, bem como os danos e perdas que esse patógeno pode causar na cultura.

5. CONCLUSÕES

Os resultados deste trabalho permitem concluir que:

- 1- O estresse hídrico causado pela infecção por *C. fimbriata* leva à redução do potencial hídrico foliar, provocando a redução da condutância estomática. Esta diminuição, por sua vez, diminui as taxas fotossintética e transpiratória das plantas.
- 2- As alterações fisiológicas resultantes da infecção por *C. fimbriata* levam à diminuição da biomassa seca do sistema radicular das plantas afetadas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIRREOLEA, J.; IRIGOYEN, J.; SÁNCHEZ-DÍAZ, M.; SALAVERRI J. Physiological alterations in pepper during wilt induced by *Phytophthora capsici* and soil water deficit. **Plant Pathology**, v. 44, p. 587-596, 1995.

ALFENAS, A.C.; ZAUZA, E.A.V.; MAFIA, R.G.; ASSIS T.F. **Clonagem e doenças do eucalipto**. 2 ed. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa-Editora UFV. 500p, 2009.

ALVES, A.A.; GUIMARÃES L.M.S.; CHAVES, A.R.M.; DAMATTA, F.M.; ALFENAS, A.C. Leaf gas exchange and chlorophyll a fluorescence of *Eucalyptus urophylla* in response to *Puccinia psidii* infection. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 33, p. 1831–1839, 2011.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PRODUTORES DE FLORESTAS PLANTADAS. **Anuário Estatístico da ABRAF**: Ano base 2012/ABRAF, Brasília, DF, 146p, 2013.

BARNES, I.; ROUX, J.; WINGFIELD, B.D.; O'NEIL, M.; WINGFIELD, M.J. *Ceratocystis fimbriata* infecting *Eucalyptus grandis* in Uruguay. **Australasian Plant Pathology**, v.32, p.361-366, 2003.

BAKER, C.J.; HARRINGTON, T.C.; KRAUS, U.; ALFENAS, A.C. Genetic variability and host specialization in the Latin American clade of *Ceratocystis fimbriata*. **Phytopathology**, v. 93, p. 1274-1284, 2003.

BAKER N.R.; ROSENQVIST, E. Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: an examination of future possibilities. **Journal of Experimental Botany**, v. 55, p. 1607–1621, 2004.

BERGER, S.; SINHA, A.K.; ROITSCH, T. Plant physiology meets phytopathology: plant primary metabolism and plant–pathogen interactions. **Journal of Experimental Botany**, v. 58, p. 4019–4026, 2007.

BONFIG, K.B.; SCHREIBER U.; GABLER,A.; ROITSCH, T.; BERGER, S. Infection with virulent and avirulent *P. syringae* strains differentially affects photosynthesis and sink metabolism in *Arabidopsis* leaves. **Planta**, v. 225, p. 1–12, 2006.

BOWDEN, R.L.; ROUSE, D.I.; SHARKEY T.D. Mechanism of photosynthesis decrease by *Verticillium dahlia* in potato. **Plant Physiology**, v. 94, p. 1048-1055, 1990.

CHOU, H.; BUNDOCK, N.; ROLFE, S.A.; SCHOLES, J.D. Infection of *Arabidopsis thaliana* leaves with *Albugo candida* (white blister rust) causes a reprogramming of host metabolism. **Molecular Plant Pathology**, v. 1, p. 99–113, 2000.

DOMICIANO, G.P.; RESENDE, R.S.; RODRIGUES, F.A.; DAMATTA, F.M. Alteração na fotossíntese de plantas infectadas por patógenos. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 17, p. 305–339, 2009.

FERREIRA, F.A.; DEMUNER, A.M.; DEMUNER, N.L.; PIGATTO S. Murcha de *Ceratocystis* em eucalipto no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 24, p. 284, 1999. (Suplemento).

FERREIRA, F.A. **Etiologia da murcha de *Ceratocystis fimbriata* em eucalipto no Brasil**, Viçosa, MG, 68p, 2004.

FERREIRA, F.A.; MAFFIA, L.A.; BARRETO, R.W; DEMUNER, N.L.; PIGATTO, S. Sintomatologia da murcha de *Ceratocystis fimbriata* em eucalipto. **Revista Árvore**, v. 30, p.155-162, 2006.

FERREIRA, M.A.; HARRINGTON, T.C.; GONGORA-CANUL, C.C.; MAFIA, R.G.; ZAUZA, E.A.V.; ALFENAS, A.C. Spatial-temporal patterns of *Ceratocystis* wilt in *Eucalyptus* plantations in Brazil. **Forest Pathology**, v. 43, p. 153-164, 2013.

GUIMARÃES, L.M.S.; TITON, M.; LAU, D.; ROSSE, L.; OLIVEIRA, L.S.S.; ROSADO, C.C.G.; CHRISTO, G.G.O.; ALFENAS, A.C. *Eucalyptus pellita* as a source of resistance to rust, ceratocystis wilt and leaf blight. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.10, p. 124-131, 2010.

HARRINGTON, T.C.; BAKER, C.J. & ALFENAS, A.C. Host specialization of *Ceratocystis fimbriata* in Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, v.26, p.383, 2001.

LAIA, M.L.; ALFENAS, A.C.; HARRINGTON, T.C. Isolation, detection in soil, and inoculation of *Ceratocystis fimbriata*, causal agent of wilting, die-back and canker in Eucalyptus (Abstract). **Fitopatologia Brasileira**, v. 25, p. 384, 2000.

LICHTENTHALER, H.K.; MIEHÉ, J.A. Fluorescence imaging as a diagnostic tool for plant stress. **Trends in Plant Science**, v. 2, p. 316–320, 1997.

LISEC, J.; SCHAUER, N.; KOPKA, J.; WILLMITZER, L.; FERNIE, A.R. Gas chromatography mass spectrometry-based metabolite profiling in plants. **Nature Protocols**, v. 1, p. 387–396, 2006.

LORENZINI, G.; GUIDI, L.; NALI, C.; CIOMPI, S.C.; SOLDATIN, G.F. Photosynthetic response of tomato plants to vascular wilt diseases. **Plant Science**, v. 24, p. 143-152, 1997.

MAFIA, R.G.; ALFENAS, A.C.; FERREIRA, E.M.; BINOTI, D.H.B. Método de seleção e identificação de fontes de resistência à murcha do eucalipto causada por *Ceratocystis fimbriata*. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 35, p. 817-824, 2011.

MAFIA, R.G.; FERREIRA, M.A.; ZAUZA, E.A.V.; SILVA, J.F.; COLODETTE, J.L.; ALFENAS, A.C. Impact of *Ceratocystis* wilt on eucalyptus tree growth and cellulose pulp yield. **Forest Pathology**, v. 43, 379-385, 2013.

MAGALHÃES, A.C.N. Análise quantitativa do crescimento. In: **FERRI, M.G. (coord.) Fisiologia vegetal**. São Paulo: EPU, v. 1, p. 331-350, 1985.

McELRONE, A.J.; FORSETH, I.N. Photosynthetic responses of a temperate liana to *Xylella fastidiosa* infection and water stress. **Phytopathology**, v. 152, p. 9-20, 2004.

NOGUÉS, S.; COTXARRERA, L.; ALEGRE, L.; TRILLAS, M.I. Limitations to photosynthesis in tomato leaves induced by *Fusarium* wilt. **New Phytologist**, v. 154, p. 461-470, 2002.

OLIVEIRA, L.S.S. **Variabilidade patogênica de *Ceratocystis fimbriata* em *Eucalyptus* spp.** 2010. 25 p. Dissertação de Mestrado. Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, 25p.

PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B.; STANGARLIN, J.R.; CIA, P. **Interação planta-patógeno: Fisiologia, Bioquímica e Biologia Molecular.** Piracicaba: Fealq, v. 1, 627 p, 2008.

PASCUAL, I.; AZCONA, I.; MORALES, F.; AGUIRREOLEA; SÁNCHEZ-DÍAZ, M. Photosynthetic response of pepper plants to wilt induced by *Verticillium dahliae* and soil water deficit. **Journal of Plant Physiology**, v. 167, p. 701-708, 2010.

PINKARD, E.A.; MOHAMMED, C.L. Photosynthesis of *Eucalyptus globulus* with *Mycosphaerella* leaf disease. **New Phytologist**, v. 170, p. 119–127, 2006.

PSHIBYTKO, N.L.; ZENEVICH, L.A.; KABASHNIKOVA, L.F. Changes in the photosynthetic apparatus during fusarium wilt of tomato. **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 53, p. 25-31, 2006.

RIBEIRO, R.V.; MACHADO, E.C.; OLIVEIRA, R.F. Early photosynthetic responses of sweet orange plants infected with *Xylella fastidiosa*. **Physiological and Molecular Plant Pathology** v. 62, p. 167–173, 2003.

ROESSNER U.; LUEDEMANN A.; BRUST, D.; FIEHN O.; LINKE T.; WILLMITZER L.; FERNIE A.R. Metabolic profiling allows comprehensive phenotyping of genetically or environmentally modified plant systems. **Plant Cell**, v. 13, p. 11–29, 2001.

ROSADO, C.C.G.; GUIMARÃES, L.M.S.; TITON, M.; LAU, D.; ROSSE, L.; RESENDE, M.D.V.; ALFENAS, A.C. Resistance to ceratocystis wilt (*Ceratocystis fimbriata*) in parents and progênies of *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*. **Silvae Genetica**, v. 59, p. 99-106. 2010.

ROUX, J. et al. A serious new wilt disease of *Eucalyptus* caused by *Ceratocystis fimbriata* in Central Africa. **Forest Pathology**, v. 30, p. 175-184, 2000.

ROUX, J.; VAN WYK, M.; HATTING, H.; WINGFIELD, M.J. *Ceratocystis* species infecting stem wounds on *Eucalyptus grandis* in South Africa. **Plant Pathology**, v.53, p.414-421. 2004.

SAEED, I.M.A.; McGUIDWIN, A.E.; ROUSE, D.I.; SHARKEY, T.D. Limitation to photosynthesis in *Pratylenchus penetrans* and *Verticillium dahlia* infected potato. **Crop Science**, v. 39, p. 1340-1346, 2009.

ZAUZA, E. A.V.; ALFENAS, A.C.; HARRINGTON, T.C.; MIZUBUTI, E.S.; SILVA, J.F. Resistance of *Eucalyptus* clones to *Ceratocystis fimbriata*. **Plant Disease**, v. 88, p. 758-760, 2004.