

NILMARA PEREIRA CAIRES

**PROCESSO INFECCIOSO DE *Botrytis cinerea* EM FOLHAS DE
EUCALIPTO**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2013

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

C136p
2013 Caires, Nilmara Pereira, 1987-
Processo infeccioso de *Botrytis cinerea* em folhas de
eucalipto / Nilmara Pereira Caires. – Viçosa, MG, 2013.
viii, 27f. : il. ; 29 cm.

Orientador: Gleiber Quintão Furtado.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f. 23-27.

1. Eucalipto - Doenças e pragas. 2. Mofo-cinzento.
3. Microscopia. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Fitopatologia. Programa de Pós-Graduação em
Fitopatologia. II. Título.

CDD 22. ed. 634.973766

NILMARA PEREIRA CAIRES

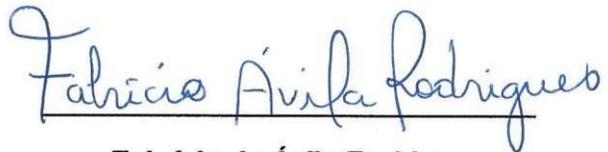
**PROCESSO INFECCIOSO DE *Botrytis cinerea* EM FOLHAS DE
EUCALIPTO**

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

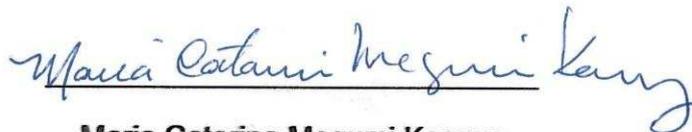
APROVADA: 16 de julho de 2013



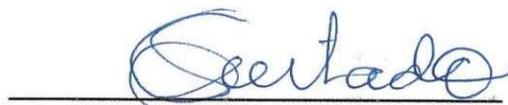
Olinto Liparini Pereira



Fabrício de Ávila Rodrigues



Maria Catarina Megumi Kasuya



**Gleiber Quintão Furtado
(Orientador)**

"Daqui a cinco anos você estará bem próximo de ser a mesma pessoa que é hoje, exceto por duas coisas: os livros que ler e as pessoas de quem se aproximar."

(Charles Jones)

**Aos meus pais, Rita e Nilton, as
pessoas mais importantes em minha
vida.**

Dedico e ofereço.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, minhas irmãs e meus avós pelo amor incondicional;

À Melissa, por me cobrar boas notas a cada ligação;

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

Ao Professor Gleiber Quintão Furtado, pela orientação, oportunidade e confiança;

À CAPES pelo auxílio financeiro e à Universidade Federal de Viçosa pela oportunidade;

Aos Professores do Departamento de Fitopatologia, pelos ensinamentos e conselhos tão valiosos;

Aos funcionários da Universidade Federal de Viçosa, principalmente ao Renildo por cuidar tão bem do nosso laboratório;

Ao Núcleo de Microscopia e Microanálise da Universidade Federal de Viçosa, (<http://www.nmm.ufv.br/>) por fornecer o apoio técnico e equipamentos para experimentos envolvendo microscopia eletrônica;

Aos professores Acelino Couto Alfenas, Olinto Liparini e Fabrício Ávila Rodrigues pelas sugestões e contribuições;

Aos amigos do Departamento de Fitopatologia: Adam, Diego, Sarita, Rose, Thalita e Alessandra pelas horas de estudo compartilhadas;

Ao Carlos, Stefânia e Inobert, pelas valiosas ajudas;

Aos amigos do laboratório pelo apoio e agradável convivência;

Ao estagiário Victor Mendes, pela ajuda na condução dos experimentos;

À Leila, Michele e Marina pela amizade;

À Elisa pelas dicas e incentivo;

À Laíse Rosado, por ser a melhor amiga que se pode ter;

Ao Samuel, por mesmo longe estar presente;

A todos que de alguma forma contribuíram para que este trabalho fosse possível.

BIOGRAFIA

NILMARA PEREIRA CAIRES, filha de Nilton de Souza Caires e Rita Mariana Marques Pereira, nasceu em 28 de março de 1987, em Eunápolis, Bahia, Brasil.

Em 2006, iniciou o curso de Agronomia na Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

Durante a graduação foi bolsista de Iniciação Científica na Unidade de Controle Biológico - Departamento de Fitopatologia, sob orientação do Professor Luiz Antonio Maffia.

Em Agosto de 2011, iniciou o curso de Mestrado em Fitopatologia na Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, sob orientação do Professor Gleiber Quintão Furtado.

SUMÁRIO

Resumo.....	vi
Abstract.....	viii
1. Introdução.....	1
2. Material e Métodos.....	5
2.1 Material vegetal.....	5
2.2. Obtenção, multiplicação do inóculo e inoculação.....	5
2.3 Microscopia de luz.....	6
2.4 Microscopia eletrônica de varredura.....	7
2.5 Expressão dos sintomas do mofo cinzento em folhas destacadas.	8
3. Resultados e Discussão.....	10
4. Conclusões.....	22
5. Referências Bibliográficas.....	23

RESUMO

CAIRES, Nilmara Pereira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2013. **Processo infeccioso de *Botrytis cinerea* em folhas de eucalipto.** Orientador: Gleiber Quintão Furtado.

O mofo cinzento (MC), causado por *Botrytis cinerea*, é uma importante doença que ocorre na produção de mudas de eucalipto. Assim, uma melhor compreensão da interação *B. cinerea* - eucalipto e as condições que favorecem o desenvolvimento do patógeno são a chave para a definição de estratégias eficazes para o controle da doença. Este trabalho objetivou estudar alguns aspectos do processo infeccioso de *B. cinerea* em folhas de eucalipto urograndis: avaliar a influência da face foliar (adaxial ou abaxial), idade da folha e luminosidade (claro ou escuro), no desenvolvimento de estruturas infectivas (tubo germinativo e apressórios) e severidade do mofo cinzento; elucidar o processo infeccioso: pré-penetração e penetração, colonização e reprodução de *B. cinerea* em folhas de eucalipto através de imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV). Em todos os experimentos foram utilizadas folhas destacadas de eucalipto urograndis (clone CNB011) e suspensão de 10^5 conídios de *B. cinerea*/mL para inoculação. Os estudos para avaliar o efeito da face foliar inoculada, luminosidade e da idade da folha no desenvolvimento de estruturas infectivas do fungo foram realizados na superfície de fragmentos de folhas inoculadas, coletadas 6 horas após a inoculação (hai), clareadas com álcool e cloral hidratado e observadas sob um microscópio óptico. A severidade do MC foi avaliada 10 dias após a inoculação. Para análises de microscopia eletrônica de varredura, fragmentos de folhas foram coletadas com 2, 4, 6, 12, 24 e 48 hai. Houve efeito significativo da face foliar e da luz na a germinação de conídios. Maior porcentagem de germinação (92%) e severidade (21%) foram observadas na superfície adaxial de folhas incubadas no escuro. Embora a porcentagem de germinação de conídios sobre a superfície das folhas jovens e velhas não diferiu estatisticamente, a severidade da doença em folhas jovens foi 34 vezes superior quando comparada com as folhas velhas (17,3% e 0,5%, respectivamente). Foram observadas por microscopia eletrônica de varredura conídios germinando produzindo de 1 a 4 tubos germinativos, mas não foi

observada a formação de apressórios. Os tubos germinativos penetraram diretamente na superfície de folhas intactas (nunca por estômatos). às 120 hai houve intensa colonização extra e intracelular do mesófilo por hifas do patógeno. O fungo reproduziu-se produzindo conidioforos do tipo macronematosos (na superfície foliar de ambas as faces) e micronematosos (na região subepidérmica). Embora o processo infeccioso de *B. cinerea* em diversos hospedeiros esteja bem descrito, este é o primeiro estudo envolvendo este patógeno e folhas de eucalipto.

ABSTRACT

CAIRES, Nilmara Pereira, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2013. **Infection process of *Botrytis cinerea* on eucalyptus leaves.** Adviser: Gleiber Quintão Furtado.

Gray mold (MC), caused by the fungus *Botrytis cinerea*, is one of the most important diseases that occurs in *Eucalyptus* nurseries worldwide. Therefore, a better understanding of the interaction between *B. cinerea* and *Eucalyptus* sp., including the conditions that favor pathogen growth, is key to the development of effective strategies for disease management. All experiments were carried on detached leaves on detached leaves of eucalyptus urograndis clone CNB011, inoculated with a suspension of 10^5 conidia of *B. cinerea*/mL. Prior to the evaluations to assess the effect of leaf side, age and luminosity the development of infective structures of the fungus, inoculated leaves were bleached with ethanol and chloral hydrate and analyzed under an optical microscope. Disease severity was assessed 10 days after inoculation. SEM analyses were performed on leaf tissue collected 2, 4, 6, 12, 24 and 48 hours after inoculation (hai). There were significant effects of leaf side and luminosity on conidia germination. The highest germination percentage (92%) and severity (21%) were observed on the adaxial surface of leaves when incubated in the dark. Although the percentage of conidia germination on the surface of young and old leaves did not differ statistically, disease severity on young leaves was 34-fold higher when compared to old leaves (17.3% and 0,5% respectively). SEM analyses showed conidia germinated producing 1-4 germ tubes, but did not form appressorium. The germ tubes penetrated directly only the surface of intact leaves (but not stomata). Inter and intracellular colonization of the mesophyll by pathogen's hyphae could be observed at 120 hai. The fungus reproduces by producing macronematous conidiophores (on the leaf surface of both sides) and micronematous conidiophores (in the subepidermal region). Although the infectious process *B. cinerea* in different hosts are well described, this is the first study of this pathogen in eucalyptus leaves.

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, a área plantada com eucalipto no Brasil está em torno de 4,8 milhões de hectares e considerando a elevada demanda de produtos do setor florestal e a pressão da sociedade para redução do uso de madeira e derivados originados de florestas nativas, esta área tende a aumentar. Os números apontam que o segmento é responsável por 0,51% da arrecadação nacional, 3,8 bilhões de dólares em impostos e 7,9 bilhões em exportações. Além disso, o setor emprega 4,7 milhões de pessoas, o que corresponde a cerca de 5% da população economicamente ativa do Brasil (ABRAF, 2012).

A expansão da eucaliptocultura levou as empresas a aprimorarem o sistema de produção de mudas. Portanto, hoje o principal método de propagação do eucalipto é por meio da clonagem por miniestaquia (Alfenas et al., 2004). Os clones obtidos por programas de melhoramento são mantidos em minijardins clonais. Para tal, as miniestacas são estaqueadas em substrato e levadas para casa de enraizamento. Nesta, as mudas permanecem por 20 a 35 dias sob irrigação (nevoeiro) intermitente para manter uma lâmina de água sobre as folhas e umidade relativa em torno de 100% (Assis et al., 1992). Após esse período, as mudas são aclimatadas à sombra, por 5 a 10 dias, e transferidas para área de crescimento e rustificação, onde permanecem de 20 a 30 dias.

Nas últimas décadas, com a implantação de minijardins clonais, o mofo cinzento, doença causada pelo fungo *Botrytis cinerea* Pers, tornou-se uma das mais importantes doenças do eucalipto, principalmente devido à suscetibilidade

dos clones e ao sistema de produção de mudas por gerar condições ambientais muito favoráveis à ocorrência de epidemias (Ferreira, 1989; Alfenas et al., 2004).

O fungo *B. cinerea*, fase perfeita *Botryotinia fuckeliana*, é um patógeno necrotrófico, haplóide, filamentosos e heterotálico, podendo infectar mais de 200 espécies de plantas, resultando em consideráveis perdas econômicas. A sua dispersão pode ocorrer por meio de conídios, ascósporos, fragmentos micelial e escleródios (Jarvis, 1980; Williamson et al., 2007).

Em relação às condições favoráveis para o desenvolvimento da doença, ambientes com alta umidade e temperaturas amenas são ideais, por beneficiar a sobrevivência, a disseminação e a infecção (Williamson et al., 2007).

Os conídios são disseminados pelo vento, água da chuva e pela irrigação. Após sua germinação e penetração no tecido do hospedeiro, o fungo causa lesões que podem expandir rapidamente, dependendo das condições ambientais e suscetibilidade do hospedeiro. No tecido hospedeiro, ocorre esporulação e conseqüentemente a produção de inóculo para novos ciclos do patógeno (Ferreira, 1989).

O controle químico é a principal medida de controle de *B. cinerea* na maioria dos hospedeiros; entretanto, a variabilidade genética existente na população do patógeno e o uso excessivo de fungicidas, principalmente benzimidazoles e dicarboximidas, podem selecionar isolados do patógeno resistentes aos fungicidas (Martinez et al., 2003; Raposo et al., 1996). No Brasil, não há fungicidas registrados para o controle do mofo cinzento (MC) e para a maioria das doenças do eucalipto, o que torna ilegal esta estratégia de controle (Alfenas et al., 1999).

Em viveiros clonais de eucalipto a doença caracteriza-se pela morte de plantas em reboleiras ou distribuídas aleatoriamente no canteiro. Os sintomas são caracterizados pela ocorrência de lesões na região do colo com aspecto encharcado no início e depois adquirindo coloração escura, resultante da degradação dos tecidos, o que acarretará no tombamento e morte da muda (Krugner, 2005; Alfenas *et al.*, 2004). Em folhas, as lesões apresentam-se como manchas aquosas, amarronzadas e recobertas por uma massa acinzentada formada pelo micélio, conidióforos e conídios do fungo. Os sintomas começam pelo enrolamento da lâmina foliar, seguido da morte e queda das folhas (Williamson *et al.*, 2007).

Até o presente momento, não existem estudos que elucidam o processo infeccioso de *B. cinerea* em eucalipto. Porém estudos realizados com outras plantas hospedeiras como lírio, rosa e uva observou-se que na maioria dos casos, os conídios germinam formando apenas um tubo germinativo, mas também são observados até três ou cinco tubos por conídio (Coertze *et al.*, 2001; Hsieh *et al.*, 2001; Salinas & Verhoeff, 1995). Após a emissão do tubo germinativo segue-se a formação de estruturas de penetração. Tubos germinativos geralmente formam apressórios simples que podem não ser delimitados da ponta da hifa por um septo (Clark & Lorbeer, 1976; Garcia-Arenal & Sagasta, 1980). Quando nutrientes exógenos estão disponíveis ou se a infecção ocorre a partir de um micélio já estabelecido, a ramificação pode formar apressórios compostos com formato digitado ou lobado (GarciaArenal & Sagasta, 1980; Heuvel & Waterreus, 1983). Em superfícies duras como de tubérculos, pode haver a formação de estruturas maiores, as almofadas de

infecção, que resultam do crescimento contínuo e coalescência de apressórios (Horn, 1896; Sharman & Heale, 1977).

Em relação ao modo de penetração de *B. cinerea* nas plantas hospedeiras, diferentes vias têm sido descritas. Segundo Louis (1963), a penetração direta através da cutícula e de parede de células parece ser a regra. Em estudos realizados com cenoura (Sharman & Heale, 1979), rosa (Hammer & Evensen, 1994), pepino (Elad, 1988), uva (Coertze & Holz, 1999) e gérbera (Salinas & Verhoeff, 1995), a penetração do tubo germinativo foi direta. Porém, em lírio oriental também foi observada penetração por aberturas naturais (Hsieh *et al.*, 2001).

Apesar da importância econômica do mofo cinzento para a cultura do eucalipto, informações sobre a interação de *B. cinerea* com esta espécie florestal não são conhecidas. Por esta razão, torna-se necessário um entendimento do processo de patogênese, pois o entendimento do tempo de ocorrência das fases de penetração, colonização e reprodução poderá permitir o uso mais eficiente de produtos químicos, entre outras medidas de manejo. Com base no exposto, o presente trabalho teve como objetivo geral estudar o processo infeccioso do fungo *B. cinerea* em folhas de eucalipto. Os objetivos específicos foram:

- avaliar a influência da face foliar (adaxial ou abaxial), luminosidade e da idade da folha no desenvolvimento de estruturas infectivas do patógeno (tubo germinativo e apressório) e na severidade do mofo cinzento;
- elucidar o processo de infecção de *B. cinerea* em folhas de eucalipto.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material vegetal

Foram utilizadas plantas com 120 dias de idade do clone CNB 011 (CENIBRA) de eucalipto “urograndis” (*E. grandis* x *E. urophylla*), cultivados em vasos com 3 litros contendo substrato suplementado com MAP e NPK.

2.2. Obtenção, multiplicação do inóculo e inoculação

Para a realização dos experimentos, foi utilizado um isolado de *B. cinerea* obtido de mudas de eucalipto doentes em casa de vegetação do Departamento de Fitopatologia/UFV no município de Viçosa-MG. Para multiplicação do inóculo de *B. cinerea*, discos de micélio foram repicados para placas de Petri contendo meio batata-dextrose-ágar (BDA) e mantidos em incubadora do tipo BOD, a 20°C. Para preparação de inóculo, água destilada esterelizada foi adicionada às placas de Petri até cobrir a colônia, sendo as estruturas reprodutivas removidas com auxílio de um bastão de vidro. A concentração de inóculo foi ajustada para 10⁵ conídios/mL após contagem em uma câmara de Neubauer, adicionou-se à suspensão Tween 80 na concentração de 0,05% (v/v).

Folhas de plantas de eucalipto utilizadas para as análises microscópicas, com cerca de 120 dias, foram dispostas em caixas acrílicas do tipo “Gerbox”, contendo papel germitest umedecidos com água destilada esterelizada e 8 gotas de 10 µL da suspensão de conídios foram depositadas nas faces adaxial ou abaxial das folhas. Posteriormente, estas foram incubadas a 20 °C, na presença ou ausência de luz.

2.3. Microscopia de Luz

Para avaliar a influência da face foliar (adaxial ou abaxial), luminosidade (luz ou escuro) e da idade da folha (velha ou nova) no desenvolvimento de estruturas infectivas de *B. cinerea* (tubos germinativos e apressórios), cinco fragmentos de folhas de aproximadamente 1 cm² foram coletados aleatoriamente de cada tratamento 6 hai. Para o clareamento dos fragmentos, estes foram, primeiramente depositados em frascos contendo álcool 70%. Este solvente foi substituído até que quase toda a clorofila fosse removida. Posteriormente, os fragmentos foram transferidos para frascos de vidro contendo solução saturada de cloral hidratado (30 gL⁻¹) e mantidos por três dias com o objetivo de se obter o máximo de clareamento. Os fragmentos foram montados em lâminas contendo uma gota de água glicerinada, corados com lacto fucsina (0,1%) e observados em microscópio de luz.

Para avaliar o efeito da idade da folha no desenvolvimento de estruturas infectivas, folhas destacadas do segundo ramo da planta (velhas), e folhas destacadas do penúltimo ramo (novas), da base para o ápice, foram inoculadas na face adaxial e mantidas no escuro. Posteriormente, os fragmentos de folhas foram coletados às 2, 4, 6, 12, 24 e 48 hai e submetidos aos mesmos procedimentos para clareamento citados anteriormente.

Em ambos os experimentos, foram avaliados a porcentagem de germinação de conídios e de formação de apressórios por meio da contagem de 100 conídios aleatórios por repetição, em microscópio de luz (Motic Instruments Inc., BA210, Canadá) com aumento de 20 x. Os conídios foram

considerados germinados quando apresentaram comprimento do tubo germinativo igual ou superior ao seu diâmetro.

2.4. Microscopia eletrônica de varredura

Para o processo infeccioso, folhas destacadas de eucalipto foram inoculadas e visualizadas sob microscópio eletrônico de varredura (LEO, modelo 1430VP). Para isso, 5 fragmentos de folhas foram coletados as 2, 4, 6, 12, 24, 48, 120 e 168 horas após inoculação (hai). Os fragmentos foram depositados em microtubos plásticos contendo 1 mL de solução fixadora (2,5% v/v de glutaraldeído em tampão cacodilato de sódio 0,05 M, pH 7,2) e mantidos em temperatura de 8°C. Duas horas após, os fragmentos foram lavados em tampão cacodilato de sódio (0,1 M) e desidratados em uma série alcoólica de 30, 50, 70, 80, 95 e 100%, com intervalos de 10 min entre as trocas. Após a desidratação, o material foi submetido à secagem no ponto crítico em CO₂ utilizando-se o aparelho “Critical Point Dryer” (Balzers, modelo CPD020). Os fragmentos coletados 120 e 168 hai tiveram a epiderme removida, com o auxílio de uma fita adesiva, ou foram seccionados com auxílio de uma lâmina de barbear, para visualização da colonização fúngica no interior do tecido hospedeiro. Os fragmentos foram montados sobre suportes metálicos de alumínio e cobertos com ouro por meio de metalização no aparelho “Sputter Coater” acoplado a um “Freezing Drying Unit” (Balzers, FDU010). Posteriormente, os fragmentos foram analisados em microscópio eletrônico de varredura (LEO, modelo 1430VP) operando a 20 Kv e WD variando de 12 a 31mm. Para cada tratamento, três fragmentos de folha foram examinados ao microscópio eletrônico de varredura.

2.5. Expressão dos sintomas do mofo cinzento em folhas destacadas

Folhas de eucalipto urograndis (clone CNB011) foram coletadas, lavadas em água destilada estéril e espalhadas sobre toalhas de papel estéril para secagem. Estas foram atomizadas com uma suspensão 10^5 conídios/mL e cada folha foi depositada com a face inoculada voltada para cima em uma placa de Petri com ágar água contendo 100 mgL^{-1} de benzimidazole, segundo metodologia proposta por Arraiano et al. (2001). As placas de Petri contendo as folhas inoculadas foram incubadas em câmaras de crescimento com temperatura ajustada para 20°C .

Para avaliar a influência da face foliar e luminosidade no desenvolvimento do mofo cinzento, folhas foram inoculadas na face adaxial ou abaxial e mantidas sob luz constante ou escuro. O experimento foi montado em delineamento inteiramente casualizado em arranjo fatorial (2×2), com cinco repetições por tratamento. Cada repetição foi constituída de duas folhas incubadas em uma placa de Petri.

Para avaliar a influencia da idade da folha no desenvolvimento do mofo cinzento, coletaram-se folhas do penúltimo ramo das mudas (novas) e folhas do segundo ramo da copa (velhas) da base para o ápice. Estas folhas foram inoculadas na face adaxial e mantidas no escuro. O experimento foi montado em delineamento inteiramente casualizado, com dez repetições por tratamento. Cada repetição foi constituída de duas folhas em uma placa de Petri.

A severidade do mofo cinzento foi avaliada aos 10 dias após inoculação. Para isso, as folhas foram digitalizadas e as imagens analisadas quanto à proporção de tecido doente e sadio, por meio do software QUANT[®] (V. 1.01;

Universidade Federal de Viçosa, 2003). Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade utilizando-se o software SAS (Version 9.0, Cary, USA).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os conídios de *B. cinerea* apresentaram germinação na face adaxial e abaxial de folhas de eucalipto na presença e ausência de luz. A análise estatística mostrou efeito significativo ($P < 0,01$) dos fatores face foliar, luminosidade e desta interação na porcentagem de germinação de conídios, sendo observada maior porcentagem de germinação (92%) quando as folhas foram inoculadas na face adaxial e mantidas no escuro (Figura 1). Resultados semelhantes foram observados para o patossistema *Exserohilum turcicum* - milho (Levy & Cohen, 1983). Quanto ao efeito da luz, os fungos fitopatogênicos podem ser classificados em três grupos: a luz não tem efeito e os esporos germinam igualmente, a luz é essencial para a germinação ou a luz inibe a germinação como observado para os patógenos *Erysiphe cichoracearum* (Colhoun, 1973); *Physoderma maydis* (Hebert & Keelman, 1958) e *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* (Knights & Lucas, 1980), respectivamente.

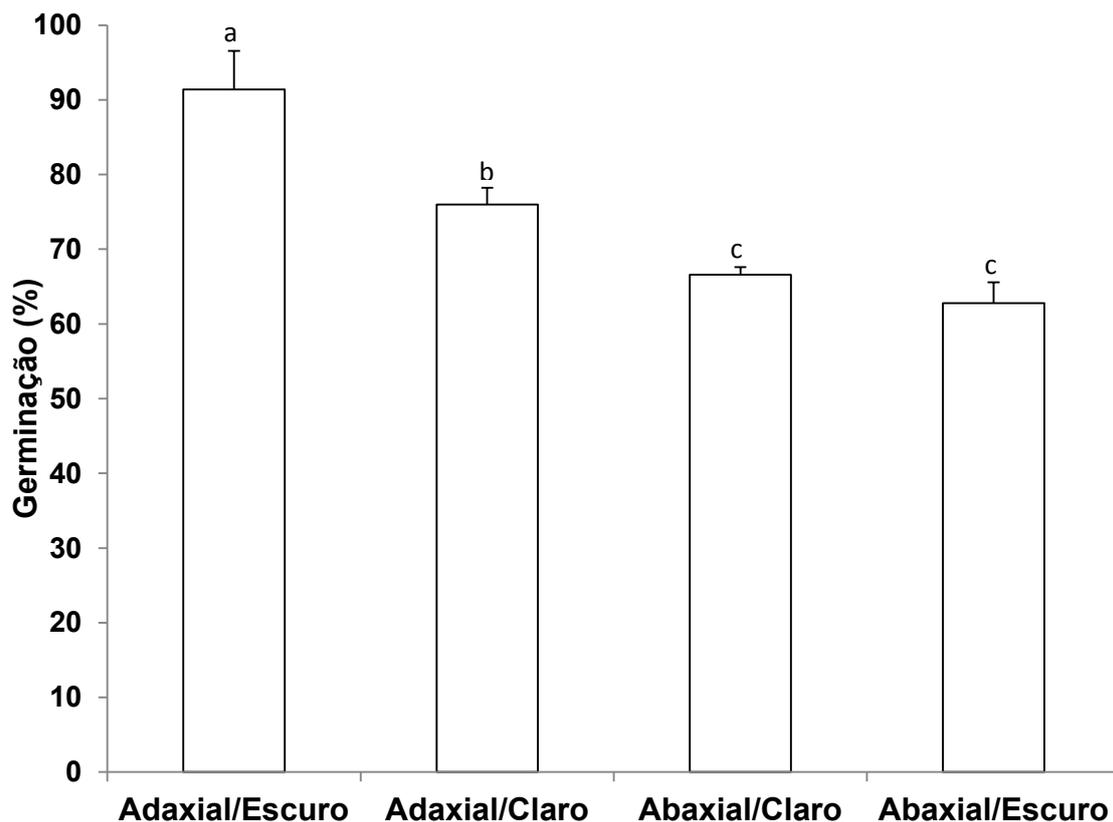


Figura 1. Influência de diferentes combinações face foliar de eucalipto urograndis (clone CNB 011) e luminosidade na germinação de conídios de *Botrytis cinerea* às 6 horas após a inoculação. Médias seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. O erro padrão da média está representado em cada barra.

Com relação ao efeito da face foliar na germinação dos conídios, maiores valores foram observadas sobre a face adaxial. Porém, essas diferenças não estão relacionadas à distribuição da cera epicuticular nesta superfície foliar, pois não foram observadas diferenças, por meio das imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV), da organização estrutural da camada de cera entre as faces foliares de eucalipto (Figura 2).

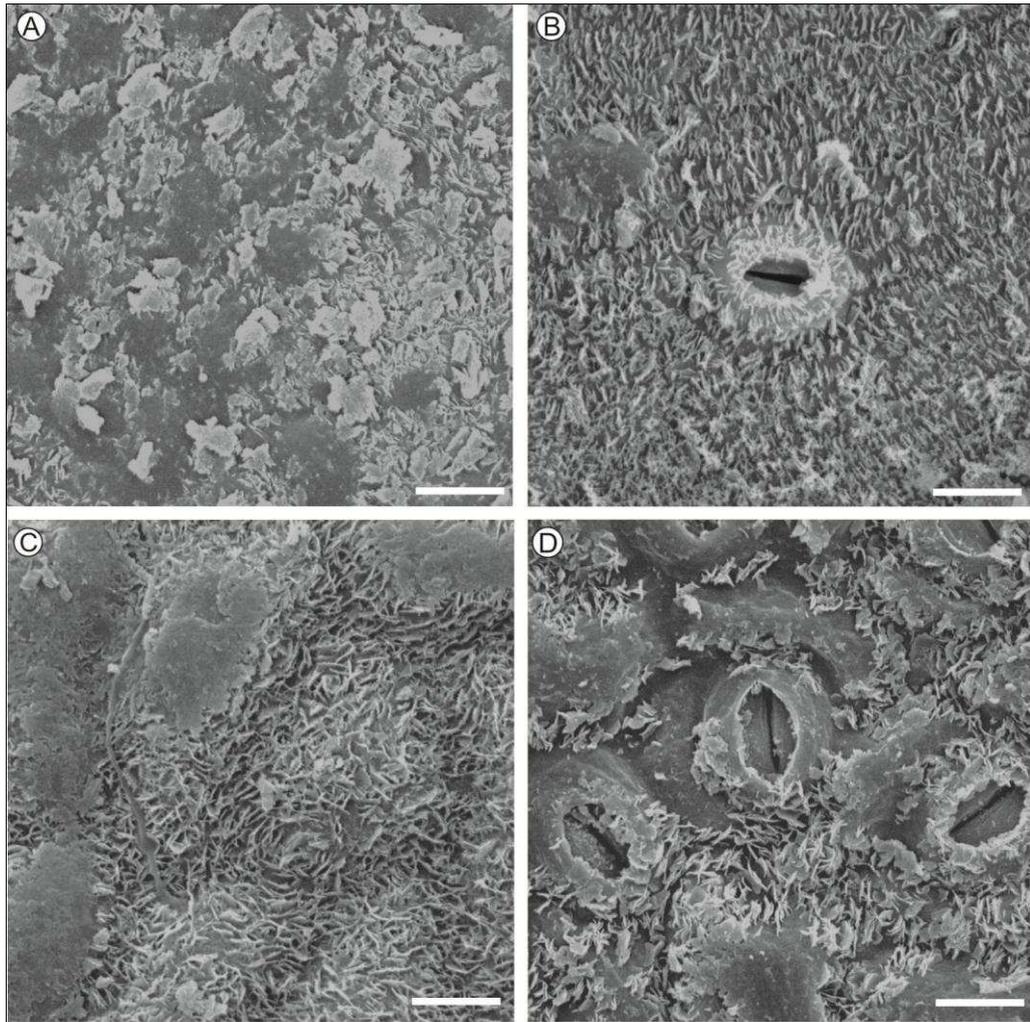


Figura 2. Eletromicrografias de varredura da superfície foliar de eucalipto urograndis (clone CNB011) (A) face adaxial de folhas novas (B) face abaxial de folhas novas (C) face adaxial de folhas velhas (D) face abaxial de folhas velhas (Barras = 10 μm).

Em relação ao desenvolvimento do mofo cinzento quando a face adaxial ou abaxial foi inoculada e mantida sob luz ou escuro, foi observado uma maior severidade quando a inoculação foi realizada na face adaxial e as folhas incubadas no escuro (21%) quando comparadas com as combinações face adaxial/claro (12%), face abaxial/escuro (10%) e face abaxial/claro (3%) (Figura 3). Resultados semelhantes foram observados para o patossistema *Phakopsora pachyrhizi* - soja (Furtado et al; 2009). Os autores investigaram o efeito da quantidade e do arranjo da camada de cera epicuticular em folhas de soja na densidade de lesões e da severidade da ferrugem asiática. Porém, a intensidade diferencial da ferrugem observado nas superfícies foliares não se correlacionou com as características da cera epicuticular. Os menores valores de densidade de lesões na superfície abaxial, possivelmente, foram decorrentes de barreiras existentes após o processo de pré-penetração. Com relação à cera epicuticular, não houve diferenças evidentes entre a superfície adaxial e abaxial das folhas de soja de tal forma que pudessem explicar diferenças observadas na infecção de *P. pachyrhizi*.

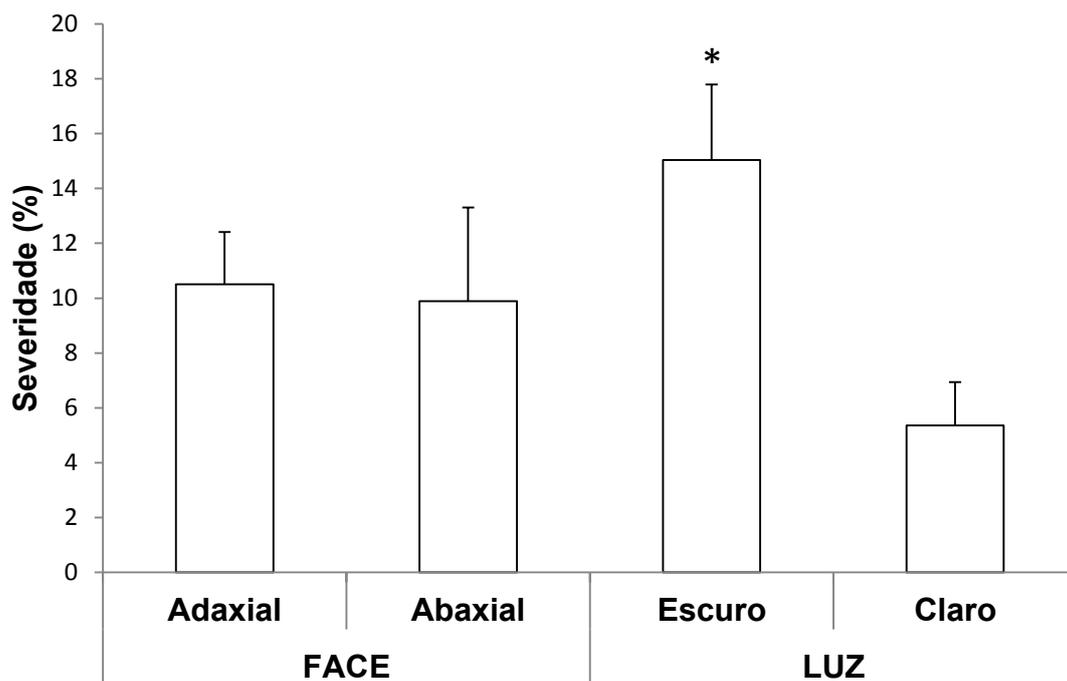


Figura 3. Severidade do mofo cinzento em folhas de eucalipto urograndis Clone CNB011, 10 dias após a inoculação de *Botrytis cinerea* nas faces adaxial ou abaxial, sob luz ou escuro. Barras com * diferiram estatisticamente pelo teste *t* a 5%. O erro padrão da média está representado em cada barra.

Não houve diferença estatística entre folhas novas e velhas para a porcentagem de germinação de conídios de *B. cinerea* (Figura 4). Porém, a idade da folha influenciou no desenvolvimento do mofo cinzento. A severidade foi significativamente maior em folhas novas (17,3%) quando comparadas com folhas velhas (0,5%) (Figura 5). O efeito da idade de folha de plantas na infecção de patógenos tem sido investigado em diferentes patossistemas. O incremento na severidade de doenças com aumento na idade de folha parece ser a regra. A exemplo dos patossistemas *Alternaria porri* - cebola (Everts & Lacy, 1996), *Botrytis fabae* - fava (Bouhassan, 2004), *Pyricularia oryzae* - arroz (Roumen, 1992) e *Cylindrocladium pteridis* – eucalipto (Graça et al., 2009).

Esta maior suscetibilidade ao mofo cinzento observado em folhas novas de eucalipto não mostrou relação com a germinação de conídios de *B. cinerea*, pois a germinação deste patógeno na superfície de folhas novas e velhas foi igual (Figura 4).

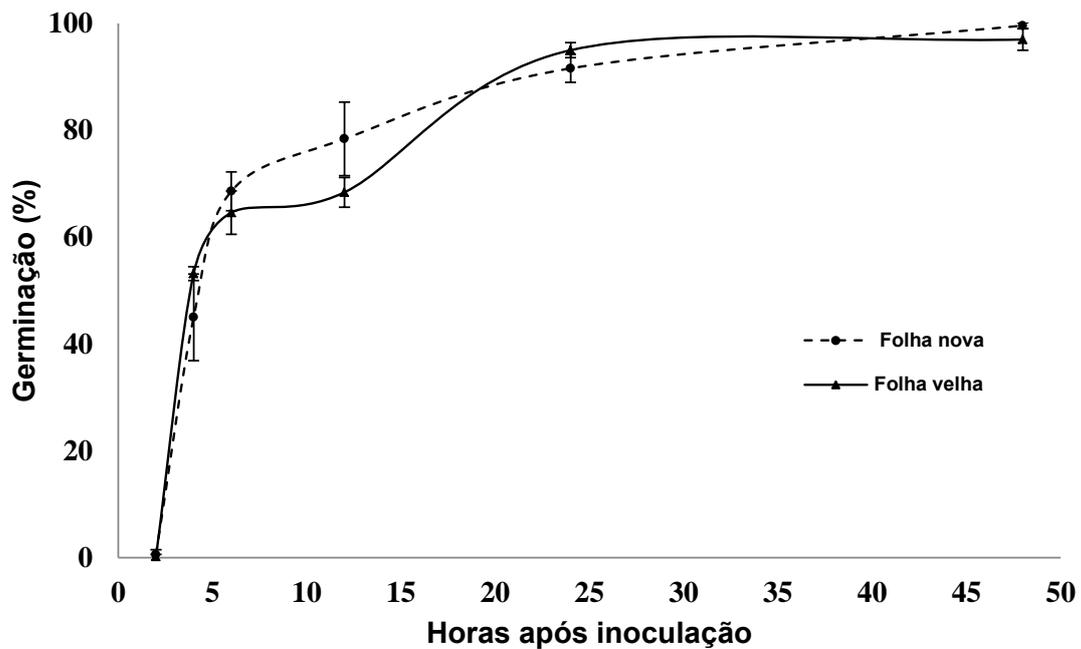


Figura 4. Germinação de conídios de *Botrytis cinerea* na face adaxial de folhas novas e velhas de eucalipto urograndis clone CNB011. O erro padrão da média está representado em cada barra.

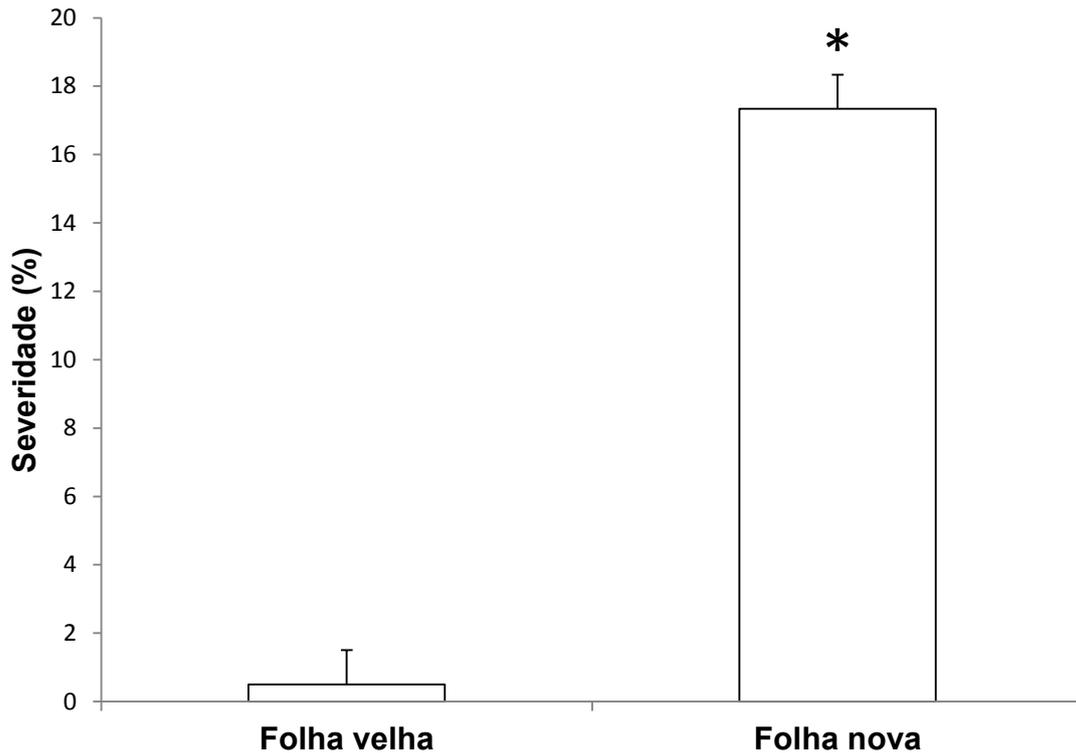


Figura 5. Severidade do mofo cinzento em folhas novas e velhas de eucalipto urograndis clone CNB011, 10 dias após a inoculação. Barras com * diferiram estatisticamente pelo teste *t* a 5% de probabilidade. O erro padrão da média está representado em cada barra.

Os estudos de MEV permitiram observar que conídios de *B. cinerea* emitiram de 1 a 4 tubos germinativos (Figura 6A, B e D). Formação de mais de um tubo germinativo também foi observado para outras interações, como *B. cinerea* - cenoura (Sharman & Heale, 1977) e *Botrytis elliptica* - lírio oriental (Hsieh et al., 2001) e *Alternaria porri* – cebola (Everts & Lacy, 1996). A formação de mais de um tubo germinativo pode estar relacionada a uma maior agressividade do patógeno (Babu, 2009).

A formação de apressórios é uma etapa que pode ser essencial para o processo infeccioso em alguns patossistemas. Em outros, no entanto, essa

etapa parece ser dispensável. O desenvolvimento e a morfologia de apressórios podem ser influenciados por fatores físicos, tais como a temperatura e a umidade (Emmet & Parbery, 1975) e também pelo hospedeiro (Doss et al., 1988). Na interação *B. cinerea* – eucalipto, não foi observado a formação de apressórios na superfície das folhas. Salinas & Verhoeff (1995) ao estudar a infecção de flores de gérbera por *B. cinerea* obtiveram resultados semelhantes. Porém, a formação desta estrutura foi relatada para outros hospedeiros como cenoura, fava, lírio e uva (Sharman & Heale, 1977; McKeen, 1974; Hsieh et al., 2001, Coertze & Holz, 2001).

Em relação ao modo de penetração de *B. cinerea* em folhas de eucalipto, foi observada apenas a penetração direta (Figura 6E). Esta observação corrobora com o fato de não ter sido observado uma maior severidade quando folhas de eucalipto foram inoculadas na face abaxial, onde exclusivamente foi observada a presença de estômatos (Figura 1). Foi observado também o desenvolvimento de tubo germinativo em direção às células guarda dos estômatos, porém sem penetração na cavidade subestomática. Este fato sugere a inexistência de quimiotropismo para esta interação. A ausência de quimiotropismo também já foi relatada para outros patossistemas: *Ramularia areola* – algodão (Curvelo et al., 2010), *Stemphylium botryosum* – alfafa (Cowling et al., 1982), *Stemphylium solani* - tomate (Bentes e Matsuoka, 2005).

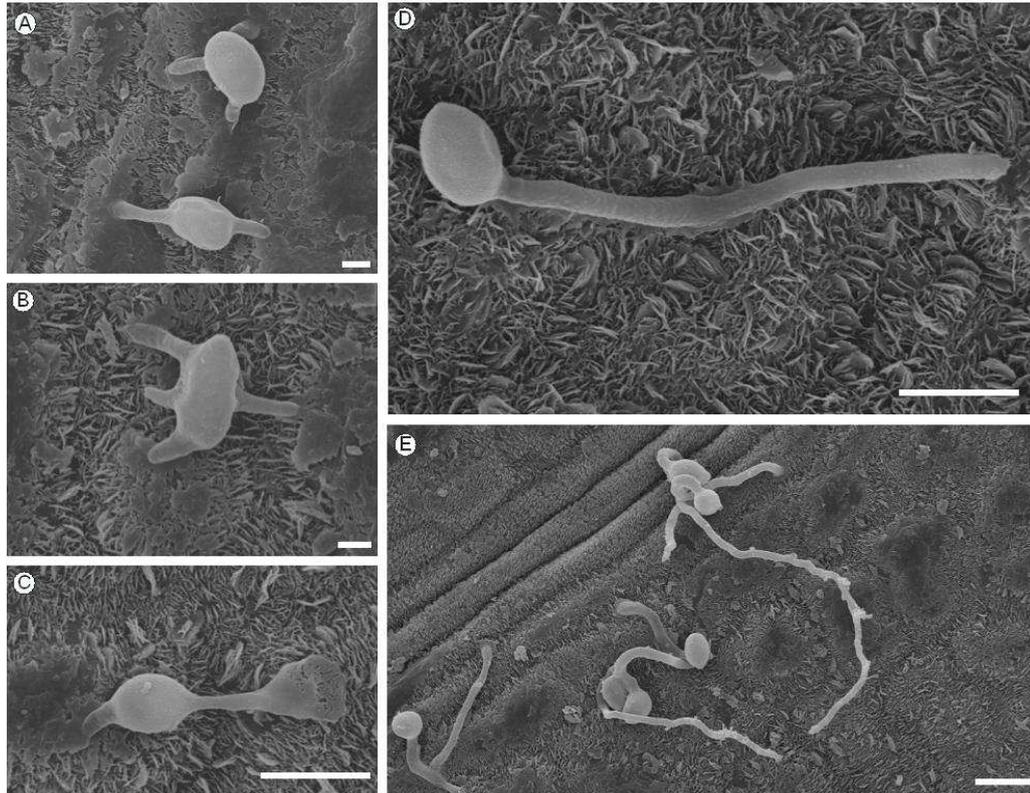


Figura 6. Eletromicrografias de varredura da germinação de conídios de *Botrytis cinerea* em folhas de eucalipto urograndis (clone CNB 011). (A) conídios germinados apresentando dois e três tubos germinativos curtos, 6 horas após inoculação (hai) (B) conídio germinados apresentando quatro tubos germinativos curtos, 6 hai (C) evidência de adesão em conídio germinado, 6hai (D) Conídio germinado apresentando um tubo germinativo longo, 6hai (E) Penetração direta na superfície foliar, 12hai. Barras = 3 μm (A e B), 10 μm (C e D) e 100 μm (E).

As primeiras lesões nas folhas foram observadas às 120 hai. Por meio de MEV, foi possível observar a colonização inter e intracelular de *B. cinerea* (Figura 7A e B). Este fato é corroborado pelo fato deste fungo ser um patógeno necrotrófico, ou seja, invade células secretando enzimas degradativas que destroem tecidos foliares (Williamson et al., 2007). A esporulação do patógeno ocorreu a partir das 168 hai tanto da face adaxial quanto abaxial da folha (Figura 8E). Na região subepidérmica, foi possível observar o crescimento de conidióforos que não diferiam em tamanho e morfologia das hifas que lhes deram origem (Figura 8B), o que se assemelha a conidióforos micronematosos, os quais podem ser encontrados em algumas espécies de *Cladosporium* (Schubert, 2007). Simultaneamente, foram produzidos conidióforos de morfologia e porte já observados em espécies de *Botrytis*, os quais foram vistos emergindo através da epiderme intacta de ambas as faces foliares (Figura 8A, C e D).

Embora o processo infeccioso de *B. cinerea* em diversos hospedeiros esteja bem descrito, este é o primeiro estudo envolvendo este patógeno e folhas de eucalipto.

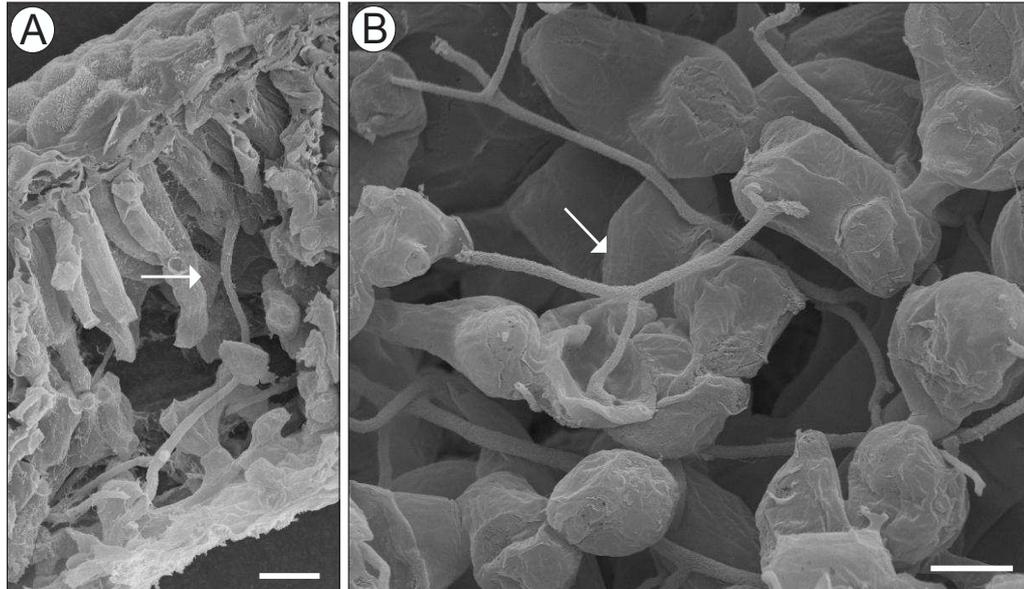


Figura 7. . Eletromicrografias de varredura da colonização de *Botrytis cinerea* em folhas de eucalipto urograndis às 120 horas após inoculação. (A) Corte transversal de folha, evidenciando crescimento de hifa fúngica (seta) (B) crescimento de hifas (seta) inter e intracelular no parênquima. Barras = 20 e 10 μm , respectivamente, para A e B.

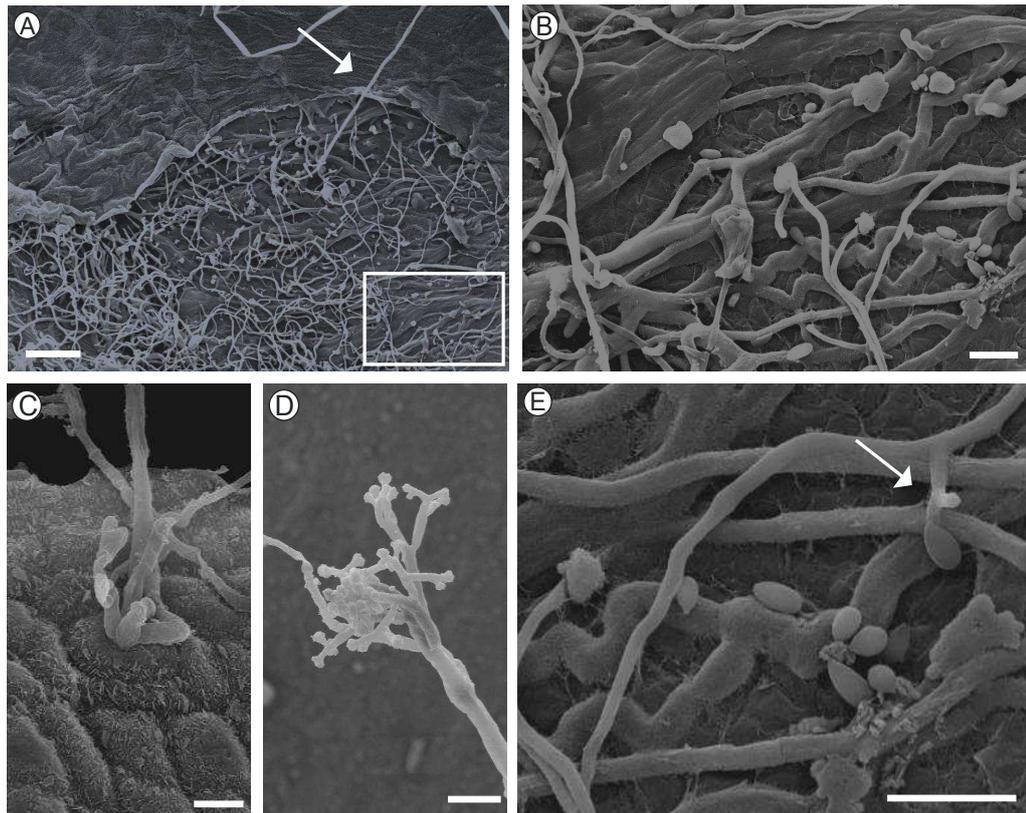


Figura 8. Eletromicrografias de varredura dos aspectos da reprodução de *Botrytis cinerea* em folhas de eucalipto urograndis (clone CNB 011). (A) região subepidérmica apresentando crescimento de conidióforos do tipo micronematoso, simultaneamente com conidióforo macronematoso (seta) emergindo da superfície foliar (B) detalhe da imagem A mostrando conidióforos micronematosos (C) conidióforo emergindo na superfície intacta da folha, às 120 horas após inoculação (D) detalhe de conidióforo (E) Célula conidiogênica na região subepidérmica. Barras = 30 μm (B, D e E), 100 μm (A) e 10 μm (C).

4. CONCLUSÕES

Os resultados deste trabalho permitem concluir que:

- houve maior germinação de conídios de *B. cinerea* na face adaxial de folhas novas, mantidas no escuro, o que contribuiu para maior severidade do mofo cinzento;
- a penetração de *B. cinerea* em folhas de eucalipto ocorre tipicamente de maneira direta;
- *Botrytis cinerea* coloniza extra e intracelularmente o mesófilo foliar;
- conidióforos de *B. cinerea* emergem de ambas as faces foliares intactas de eucalipto.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAF (2012) Anuário Estatístico da ABRAF: Ano Base 2011. ABRAF, Brasília.

Alfenas AC, Sanfluentes E, Teixeira AD, Milani D (1999) Mofo cinzento, causado por *Botrytis cinerea* (Persoon ex Fries) em estacas e microestacas de *Eucalyptus* sp., resistência a benomil e erradicação do patógeno com água quente. Revista Árvore 23: 497-500.

Alfenas AC, Zauza EAV, Mafia RG, Assis TF (2004) Clonagem e doenças do eucalipto. Viçosa MG. Imprensa Universitária, UFV.

Arraiano LS, Brading PA, Brown JKM (2001) A detached seedling leaf technique to study resistance to *Mycosphaerella graminicola* (anamorph *Septoria tritici*) in wheat. Plant Pathology 50: 339-346.

Assis TF, Rosa OP, Gonçalves SI (1992) Propagação clonal de *Eucalyptus* por microestaquia. In: CONGRESSO FLORESTAL ESTADUAL, 7., 1992, Nova Prata. Anais... Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, RS. p. 824.

Babu AM, Philip T, Kariappa BK, Kamble CK (2009) Scanning and electron microscopy of the infection process of *Cercospora henningsii* on cassava leaves. Journal of Phytopathology 157: 57-62.

Bentes JLS, Matsuoka K (2005) Histopatologia da interação *Stemphylium solani* e tomateiro. Fitopatologia Brasileira 30: 224-231.

Bouhassan A, Sadiki M, Tivoli B, Porta-Puglia A (2004) Influence of growth stage and leaf age on expression of the componentes of partial resistance of fava bean to *Botrytis fabae* Sard. Phytopathologia Mediterranea 43: 318-324.

Clark CA, Lorbeer JW (1976) Comparative histopathology of *Botrytis squamosa* and *B. cinerea* on onion leaves. Phytopathology 66: 1279-1289.

Coertze S, Holz G (1999) Surface colonization, penetration, and lesion formation on grapes inoculated fresh or after cold storage with single airborne conidia of *Botrytis cinerea*. Plant Disease 83: 917-924.

Coertze S, Holz G, Sadie A (2001) Germination and establishment of infection on grape berries by single airborne conidia of *Botrytis cinerea*. Plant Disease 85: 668-677.

Colhoun J (1973) Effects of environmental factors on plant disease. Annual Review of Phytopathology 11: 343-364.

Cowling WA, Gilchrist DG, Graham JH (1982) Byotypes of *Stemphylium botryosum* on alfafa in North America. Phytopathology 72: 679-684.

Curvelo CRS, Rodrigues FA, Berger PA, Rezende DC (2010) Microscopia eletrônica de varredura do processo infeccioso de *Ramularia areola* em folhas de algodoeiro. Tropical Plant Pathology 35: 108-113.

Doss RP, Potter SW, Soeldner AH, Christian JK, Fukunaga LE (1995) Adhesion of germlings of *Botrytis cinerea*. Applied and Environmental Microbiology 61: 260-265.

Doss RP, Christian JK, Chastagner GA (1988) Infection of easter lily leaves from conidia of *Botrytis elliptica*. Canadian Journal of Botany 66: 1204-1208.

Elad Y (1988) Scanning electron microscopy of parasitism of *Botrytis cinerea* on flowers and fruits of cucumber. Transactions of the British Mycological Society 91: 185-190.

Emmet RW, Parbery DG (1975) Appressoria. Annual Review of Phytopathology 13: 147-167.

Everts KL, Lacy ML (1996) Factors influencing infection of onion leaves by *Alternaria porri* subsequent lesion expansion. Plant Disease 80: 276-280.

Ferreira FA (1989) Patologia Florestal: Principais Doenças no Brasil. Viçosa. Sociedade de Investigações Florestais.

Furtado GQ, Alves SAM, Godoy CV, Salatino MLF, Massola NSJ (2009) Influência da luminosidade e da camada de cera epicuticular de superfícies de folhas de soja na infecção de *Phakopsora pachyrhizi*. Tropical Plant Pathology 34: 306-312.

Garcia-arenal F, Sagasta EM (1980) Scanning electron microscopy of *Botrytis cinerea* penetration of bean (*Phaseolus vulgaris*) hypocotyls. Phytopathologische Zeitschrift 99: 37-42.

Graça RN, Alfenas AC, Maffia LA, Titon M, Alfenas RF, Lau D, Rocabado JM (2009) Factors influencing infection of eucalypts by *Cylindrocladium pteridis*. Plant Pathology 58: 971-981.

Hammer PE, Evensen KB (1994) Differences between rose cultivars in susceptibility to infection by *Botrytis cinerea*. Phytopathology 84: 1305-1312.

Hebert TT, Keelman A (1958) Factors influencing the germination of resting sporangia of *Physoderma maydis*. Phytopathology 48: 102-105.

Heuvel JVD, Waterreus LP (1983) Conidial concentration as an important factor determining the type of prepenetration structures formed by *Botrytis cinerea* on leaves of French bean (*Phaseolus vulgaris*). Plant Pathology 32: 263-272.

Horn MEC (1896) The organs of attachment in *Botrytis vulgaris*. Botanical Gazette 22: 329-333.

Hshieh TF, Huang JW, Hisiang T (2001) Light and scanning electron microscopy studies on the infection of oriental lily leaves by *Botrytis elliptica*. European Journal of Plant Pathology 107: 571-581.

Jarvis WR (1980) Epidemiology. . In: Coley-Smith JR, Verhoeff K, Jarvis WR (Eds.) The biology of *Botrytis*. New York. Academic Press. pp. 219-250.

Knights IK, Lucas JA (1980) Photosensitivity of *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* uredinospores *in vitro* and on leaf surface. Transactions of the British Mycological Society 74: 537-542.

Krugner TL, Auer CG (2005) Doenças do eucalipto. In: Kimati H, Amorim L, Rezende, JAM, Bergamin Filho A, Camargo, LEA (Eds.) Manual de Fitopatologia: Doenças das Plantas Cultivadas. São Paulo SP. Ceres. pp. 319-332.

Levy Y, Cohen Y (1983) Differential effect of light on spore germination of *Exserohilum turcicum* on corn leaves and corn leaf impressions. *Phytopathology* 73: 249-252.

Louis D (1963) Les modalités de la pénétration du *Botrytis cinerea* Pers. dans les plantes. *Annales des Epiphytes* 14: 57-72.

Martinez F, Blancard D, Lecomte P, Levis C, Dubos B, Fermaud M (2003) Phenotypic differences between vacuina and transposa subpopulations of *Botrytis cinerea*. *European Journal of Plant Pathology* 109: 479-488.

Mckeen WE (1974) Mode of penetration of epidermal cell walls of *Vicia faba* by *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* 64: 461-467.

Raposo R, Delcan J, Melgarejo P (1996) Distribution and fitness of isolates of *Botrytis cinerea* with multiple fungicide resistance in Spanish greenhouses. *Plant Pathology* 45: 497-505.

Roumen EC, Bonman JM, Parlevliet JE (1992) Leaf age related partial resistance to *Pyricularia oryzae* in tropical lowland rice cultivars as measured by the number of sporulating lesions. *Phytopathology* 82: 1414-1417.

Salinas J, Verhoeff K (1995) Microscopical studies of the infection of gerbera flowers by *Botrytis cinerea*. *European Journal of Plant Pathology* 101: 377-386.

Sharman S, Heale JB (1977) Penetration of carrot roots by the grey mould fungus *Botrytis cinerea* Pers. ex Pers. *Physiological Plant Pathology* 10: 63-71.

Sharman S, Heale JB (1979) Germination studies on *Botrytis cinerea* infecting intact carrot (*Daucus carota*) roots. Transactions of the British Mycological Society 73: 147-154.

Schubert K, Goenewald JZ, Braun U, Dijksterhuis J, Staring M, Hill CF, Zalar P, Hoog GS, Crous PW (2007) Biodiversity in the *Cladosporium herbarum* complex (*Davidiellaceae*, *Capnodiales*) with standardization of methods for *Cladosporium* taxonomy and diagnostics. Studies in Mycology 58: 105-156.

Williamson B, Tudzynski B, Tudzynski P, Van Kan JAL (2007) *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. Molecular Plant Pathology 8: 561-580.