

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

**AVALIAÇÃO DE RESISTÊNCIA, ANÁLISE EPIDEMIOLÓGICA E  
CARACTERIZAÇÃO ANATÔMICA DA MADEIRA EM CLONES DE  
*Eucalyptus* sp. INFECTADOS POR *Ceratocystis fimbriata***

**KARINA GOULART TUMURA**

Dissertação apresentada à Faculdade de  
Ciências Agronômicas da UNESP –  
Campus de Botucatu, para obtenção do  
título de Mestre em Ciência Florestal.

BOTUCATU – SP  
Fevereiro - 2011

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

**AVALIAÇÃO DE RESISTÊNCIA, ANÁLISE EPIDEMIOLÓGICA E  
CARACTERIZAÇÃO ANATÔMICA DA MADEIRA EM CLONES DE  
*Eucalyptus* sp. INFECTADOS POR *Ceratocystis fimbriata***

**KARINA GOULART TUMURA**

Orientador: Prof. Dr. Edson Luiz Furtado

Dissertação apresentada à Faculdade de  
Ciências Agronômicas da UNESP –  
Campus de Botucatu, para obtenção do  
título de Mestre em Ciência Florestal.

BOTUCATU – SP  
Fevereiro - 2011

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

T925a Tumura, Karina Goulart, 1983-  
Avaliação de resistência, análise epidemiológica e caracterização anatômica da madeira em clones de *Eucalyptus* sp. infectados por *Ceratocystis fimbriata* / Karina Goulart Tumura. - Botucatu : [s.n.], 2011

xii, 52 f. : tabs., gráfs., fots. color.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agronômicas, Botucatu, 2011  
Orientador: Edson Luiz Furtado  
Inclui bibliografia

1. Murcha. 2. Eucalipto. 3. Resistência. 4. Epidemiologia. I. Furtado, Edson Luiz. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Campus de Botucatu). Faculdade de Ciências Agronômicas. III. Título.

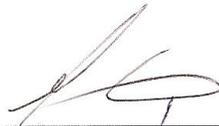
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS  
CAMPUS DE BOTUCATU  
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

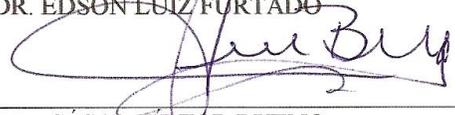
TÍTULO: "AVALIAÇÃO DE RESISTÊNCIA, ANÁLISE EPIDEMIOLÓGICA E  
CARACTERIZAÇÃO ANATÔMICA DA MADEIRA EM CLONES DE  
Eucalyptus sp. INFECTADOS POR Ceratocystis fimbriata"

ALUNA: KARINA GOULART TUMURA

ORIENTADOR: PROF. DR. EDSON LUIZ FURTADO

Aprovado pela Comissão Examinadora

  
\_\_\_\_\_  
PROF. DR. EDSON LUIZ FURTADO

  
\_\_\_\_\_  
PROF. DR. CÉSAR JÚNIOR BUENO

  
\_\_\_\_\_  
PROFA. DR. TATIANE MARIA RODRIGUES

Data da Realização: 04 de fevereiro 2011

Toda a nossa ciência, comparada com a realidade, é primitiva e infantil. E, no entanto, é a coisa mais preciosa que temos”

***Albert Einsten***

Aos meus queridos pais, **Edmundo Tumura e Vera Lúcia Goulart Tumura** (*in memorian*), razão de vida, carinho e sábios ensinamentos ministrados ao longo de minha existência.

Aos meus queridos avós, **Lídio Quadros Goulart** (*in memorian*) e **Odete Loureiro Goulart** (*in memorian*) por todo amor, carinho e condução durante toda a minha vida.

**DEDICO E OFEREÇO.**

## **AGRADECIMENTO ESPECIAL**

Ao meu orientador, *Prof. Dr. Edson Luiz Furtado*, pela incansável dedicação, orientação e sugestões pertinentes na elaboração deste trabalho. Agradeço também sua confiança e por acreditar em mim incondicionalmente, até mesmo nos momentos em que eu mesma não acreditei.

**MINHA ADMIRAÇÃO E GRATIDÃO.**

## AGRADECIMENTOS

Acima de tudo, a Deus, pela presença constante de luz em minha vida e pela graça recebida de poder conquistar tão almejada realização;

À minha família pela presença constante em minha vida;

À minha “mãedrastra”, Maria Madalena Bueno Camargo;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa concedida para realização deste trabalho;

À *Duratex S.A.* por ceder o material vegetal utilizado neste trabalho e também à *Fibria Celulose S.A. (Unidade Três Lagoas – MS)* por permitir a utilização de sua área para instalação de parcelas experimentais;

Aos professores dos programas de Pós Graduação em Agronomia – Proteção de Plantas e Ciência Florestal pelos ensinamentos e contribuições;

À *Profa. Dra. Carmen Regina Marcati* pelo conhecimento transmitido e disponibilização da estrutura do Laboratório de Anatomia da Madeira da FCA – UNESP;

À equipe do Laboratório de Anatomia da Madeira, em especial às amigas *Talita (Tixa) e Liliane* pelo auxílio e principalmente pela paciência que tiveram comigo durante o período de trabalho no laboratório;

Aos grandes amigos de longa data que com carinho, compreensão, conselhos, amizade e amor, contribuíram para a realização de mais esta etapa da minha vida: *Ana Paula Barbosa, Bruno Shiguelo Umeda, Carmen Aki Inafuku, Clauber Valverde Teles, Cristiane Ana de Jesus, Frederico Almeida de Jesus, João Henrique Cruciol, Raquel Albuquerque Souza, Roberta Podboi e Talita Merloti*;

Às amigas do período de graduação: ***Juliana Asenjo Rosa (Jurema), Julina de Lima Gonçalves (Zorba) e Talita dos Santos Angélico (Tixa)*** pelo companheirismo tanto nos momentos bons quanto nos ruins ao longo de todos esses anos;

Aos amigos conquistados ao longo da Pós Graduação: ***Alessandra Fagioli da Silva, Cristiane De Pieri, Fabiano Giglio Betelloni, Indiamara Marasca Juan Fernan Sierra Hayer, Júlio Massaharu Marubayashi, Karolina M.A.B.V.S. Dória, Lucas Mateus Rivero Rodrigues, Martha Maria Passador, Mônica Fecury Moura, Natália Corniani, Tadeu Antônio Fernandes da Silva Júnior, Talita Pletsch e Tatiana Mituti*** pelo companheirismo e convivência agradável;

Agradecimentos especiais às amigas ***Adriana Terumi Itako, Cinthia Dias Rocha e Djanira Rodrigues Negrão***;

E a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
Lista de tabelas .....	X
Lista de figuras .....	XI
Resumo .....	1
Summary.....	2
1. Introdução .....	4
2. Revisão bibliográfica .....	6
2.1 Gênero <i>Eucalyptus</i> – Importância econômica .....	6
2.2 A murcha de <i>Ceratocystis</i> .....	7
2.3 Resistência Genética e Interação Planta – Patógeno .....	9
2.4 Caracterização anatômica do eucalipto .....	12
2.5 Mecanismos de resistência – Fatores estruturais .....	13
2.6 Mecanismos de resistência – Fatores bioquímicos .....	14
2.7 Análise de dinâmica, estrutura de focos e índice de dispersão ..	15
3. Material e Métodos .....	18
3.1 Testes de resistência clonal .....	18
3.2 Caracterização anatômica da madeira .....	19
3.3 Testes histoquímicos .....	20
3.4 Levantamento em campo e análise espacial .....	21
3.4.1 Análise de dinâmica e estrutura de foco .....	21
3.4.2 Dinâmica Espacial – Índice de Dispersão .....	22
4. Resultados e Discussão .....	24
4.1 Testes de resistência clonal .....	24
4.2 Caracterização anatômica da madeira .....	31
4.3 Testes histoquímicos .....	37
4.4 Levantamento em campo e análise espacial .....	42
4.4.1 Análise de dinâmica e estrutura de foco .....	42
4.4.2 Dinâmica Espacial – Índice de Dispersão .....	44
5. Conclusões .....	45
6. Referências bibliográficas .....	46

**LISTA DE TABELAS**

	<b>Página</b>
Tabela 1: Lista de lotes e clones avaliados .....	30
Tabela 2: Ocorrência dos mecanismos de resistência nos cortes anatômicos avaliados .....	41
Tabela 3: Análise da dinâmica e estrutura de focos da murcha de <i>Ceratocystis</i> na região de Três Lagoas, MS .....	43
Tabela 4: Incidência da murcha de <i>Ceratocystis</i> na parcela experimental na região de Três Lagoas, MS; valores do Índice de Dispersão para dois tamanhos de quadrats para parcela experimental em região de Três Lagoas, MS e; valores do teste de $\chi^2$ significativos para a agregação da murcha de <i>Ceratocystis</i> .....	45

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Página</b>
Figura 1: Resistência ou suscetibilidade como resultado de combinação entre genótipos do hospedeiro e do patógeno segunda a teoria gene-a-gene .....	11
Figura 2: Mudas do lote 3 utilizadas para caracterização anatômica .....	19
Figura 3: Material utilizado para inoculação .....	19
Figura 4: Muda inoculada .....	19
Figura 5: Exemplo de funcionamento do software .....	23
Figura 6: Desenvolvimento de sintomas e mortalidade das mudas .....	25
Figura 7: Distribuição da frequência de classes de resistência apresentada pelos clones .....	25
Figura 8: Histograma com classes de frequência para o lote 1 .....	27
Figura 9: Frequência de classes de resistência (à esquerda) e porcentagem de classes de resistência apresentada pelos clones (à direita) apresentadas pelos clones do lote 1 .....	27
Figura 10: Histograma com classes de frequência para o lote 2 .....	28
Figura 11: Frequência de classes de resistência (à esquerda) e porcentagem de classes de resistência apresentada pelos clones (à direita) apresentadas pelos clones do lote 2 .....	28
Figura 12: Histograma com classes de frequência para o lote 3 .....	29
Figura 13: Frequência de classes de resistência (à esquerda) e porcentagem de classes de resistência apresentada pelos clones (à direita) apresentadas pelos clones do lote 3 .....	29
Figura 14: Camadas de crescimento em vista transversal .....	31
Figura 15: Anatomia da madeira de eucalipto de acordo com os três planos: transversal, longitudinal tangencial e longitudinal radial respectivamente (escala: 500µm; 200 µm e 100 µm respectivamente) .....	32
Figura 16: Camada de fibras gelatinosas devido à formação de lenho de tração (indicado pela seta) .....	32
Figura 17: Secção transversal, mostrando fibras com paredes espessas (indicada pela seta) .....	33

Figura 18: Secção transversal, mostrando vaso colonizado pelo fungo, no qual o micélio foi lignificado (indicado pela seta) .....	33
Figura 19: Secção transversal, mostrando a presença de tiloses traumáticas (da esquerda para direita: testemunha, material altamente resistente e material moderadamente resistente) .....	34
Figura 20: Secção transversal, mostrando a presença de compostos de natureza aromática (da esquerda para direita: material altamente resistente e material moderadamente resistente) .....	34
Figura 21: Secção longitudinal radial, mostrando a presença de tiloses (indicadas pelas setas) .....	36
Figura 22: Secção transversal corada com safrablue, mostrando a presença de tiloses, bem como a presença de compostos fenólicos nas células adjacentes aos vasos .....	36
Figuras 23 a 25: Secções transversais tratadas com cloreto de ferro III, evidenciando o resultado positivo do teste para compostos fenólicos (no sentido horário: testemunha, material altamente resistente e material moderadamente resistente) .....	37
Figuras 26 a 28: Testes histoquímicos para compostos fenólicos, mostrados nas secções transversais em maior aumento (material moderadamente resistente) .....	38
Figuras 29 a 31: Testes histoquímicos para compostos fenólicos com corante cloreto de ferro III a 10%, mostrados na secção tangencial radial (em sentido horário: testemunha; material altamente resistente e material moderadamente resistente) .....	38/39
Figura 32 a 34: Secções transversais tratadas com lugol, evidenciando o resultado positivo para presença de amido (em sentido horário: testemunha, material altamente resistente e material moderadamente resistente) .....	39
Figuras 35 a 37: Secções longitudinais radiais tratadas com lugol, evidenciando a grande quantidade de amido presente nas células do raio (material moderadamente resistente) .....	40
Figura 38: Distribuição em área, por região e clone de murcha de <i>Ceratocystis</i> .....	42

## RESUMO

A cultura do eucalipto é uma das mais importantes do Brasil, constituindo-se em fonte de energia e madeira renovável, além de suportar importantes processos agroindustriais para produção de celulose, papel e essências. O eucalipto, como outras espécies vegetais, é infectado por diversos patógenos, principalmente fungos, desde o viveiro até plantios adultos. Neste trabalho, foi estudado o agente causador da murcha de *Ceratocystis*. Trata-se de um típico patógeno de xilema (*Ceratocystis fimbriata* Ellis et. Halsted), cujo sintoma marcador é constatável nas secções transversais de órgãos lenhosos, na forma de estrias radiais escuras, da medula para o exterior do lenho ou da periferia do lenho para a medula ou descoloração (mancha escura) do tipo cunha em geral da periferia para a medula. Essas estrias no lenho são visíveis quando um ramo afetado é cortado transversalmente, pois o patógeno provoca a desintegração do sistema vascular. Trata-se de um fungo de rápida disseminação e que atinge plantas em diversos estágios de desenvolvimento, sendo por isso de difícil controle. Também é um patógeno encontrado há pouco tempo atacando o eucalipto, por isso, existem poucos estudos sobre o mesmo. Os objetivos deste estudo foram: a) verificar a suscetibilidade de clones visando encontrar material resistente; b) estudar a epidemiologia da doença em campo e; c) caracterizar anatomicamente a madeira do lenho infectado pelo patógeno e do lenho sadio. Para isso, utilizaram-se mudas de clones operacionais para inoculação do patógeno para avaliação de resistência; a avaliação epidemiológica foi feita de acordo com levantamentos de campo em parcela previamente instalada. Para a caracterização anatômica da madeira foi realizada caracterização macro e microscópica, bem como testes histoquímicos para detecção de estruturas de resistência bioquímica ao patógeno. Foram encontrados materiais com diversos níveis de resistência, desde a alta resistência até a alta suscetibilidade. Mecanismos de resistência bioquímica (compostos fenólicos) e estrutural (tiloses) puderam ser observados nos cortes anatômicos da madeira. Em campo, a doença apresentou distribuição espacial agregada, com tendência a agregação de focos e distribuição vertical (na linha de plantio).

**Palavras chave:** murcha, eucalipto, resistência, epidemiologia.

RESISTANCE EVALUATION, EPIDEMIOLOGICAL ANALYSIS AND ANATOMICAL CHARACTERIZATION OF WOOD IN *Eucalyptus* sp. CLONES INFECTED BY *Ceratocystis fimbriata*. Botucatu, 2011. 52f. Dissertação (Mestrado em Ciência Florestal) - Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista.

Author: KARINA GOULART TUMURA

Adviser: EDSON LUIZ FURTADO

## SUMMARY

The cultivation of eucalyptus is one of the most important in Brazil, constituting a source of renewable energy and wood, supporting important agro-industrial processes for production of pulp, paper and essences. Eucalyptus, like other plant species is infected by various pathogens, especially fungi, from nursery to adult trees. In this work, was studied the causative agent of Ceratocystis wilt. The fungus *Ceratocystis fimbriata* Ellis. et Halsted is a typical pathogen of the xylem, which the marker symptom is observable in the cross sections of woody organs in the form of dark radial striations, from core to the outer periphery of the wood or from the periphery to the core. These streaks in the wood are visible when an affected branch is cut across because pathogen causes the disintegration of the vascular system. It is a fungus of fast spreading and that affects plants in various stage of development and because of this is difficult to control. It is also a pathogen recently found attacking eucalyptus, so there are few studies on it. The objectives of this work were: a) verify the clonal susceptibility to the pathogen for aid breeding programs to obtain resistant materials; b) study epidemiological model for determination of disease progress on the field and; c) anatomical characterization of wood for observation of anatomical structural differences in the wood infected by the pathogen and sound wood. For this, seedlings of operational clones were used for inoculation to evaluate the resistance. Epidemiological assessment of spatial distribution was made according to field surveys with plots previously installed. To the anatomical characterization of the wood was performed microscopic characterization and histochemical tests for detection of resistance structures to the pathogen. Different resistance levels were found in the studied materials, since high resistance until high susceptibility. Biochemical and structural mechanisms of resistance (phenolics and tylosis respectively) could be observed in anatomical cuts of

wood. In the field, the disease showed a clustered distribution, with tendency to aggregation of foci and vertical distribution (in the plant line).

---

**Keywords:** wilt, *Eucalyptus*, resistance, epidemiology

## 1. INTRODUÇÃO

A cultura do eucalipto vem assumindo cada vez mais um papel importante na economia nacional. O setor brasileiro de celulose e papel é composto por cerca de 222 empresas localizadas em 539 municípios, em 18 Estados, em todas as regiões do país. As exportações do setor atingiram o valor de US\$ 5 bilhões e têm um saldo comercial de US\$ 3,7 bilhões, cerca de 14,4% da balança comercial brasileira (BRACELPA, 2010). Tendo em vista sua importância econômica, é vital controlar qualquer fator que venha a interferir no processo de produção da cultura do eucalipto, seja ele de origem abiótica ou biótica.

O eucalipto, como outras espécies vegetais, é infectado por diversos patógenos desde o viveiro até plantios adultos. Dentre esses, destaca-se um fungo relatado há pouco tempo, *Ceratocystis fimbriata* Ellis & Halsted, causador de murchas e cancos. (FERREIRA *et al.*, 1999). A murcha é um sintoma complexo que pode ter diferentes causas, como a deficiência hídrica do solo, absorção insuficiente de água pelas raízes ou descontinuidade na translocação pelo xilema da água absorvida pelas raízes. O colapso desse sistema de transporte em função de sua colonização por agentes patogênicos impede o fluxo normal da seiva bruta através dos vasos do xilema, levando a planta à morte. Os agentes causais de doenças vasculares são fungos e bactérias considerados parasitas facultativos, que sobrevivem na ausência de hospedeiros, em restos culturais e na matéria orgânica do solo (BEDENDO, 1995).

As plantas apresentam diversos mecanismos de resistência, que podem ter natureza estrutural e/ou bioquímica e que podem ser formados antes (pré-formada/constitutiva) ou após a infecção (pós-formada/induzida). Os fatores estruturais agem como uma barreira física, impedindo a penetração do patógeno e a colonização dos

tecidos da planta, enquanto que os fatores bioquímicos são substâncias produzidas pelo hospedeiro, que se mostram tóxicas ou criam condições adversas para o crescimento do patógeno no interior da planta (PASCHOLATI & LEITE, 1995). Para determinação de tais mecanismos de resistência podem ser utilizadas as técnicas de anatomia da madeira, com as quais é possível caracterizar as diferentes fases do ciclo do patógeno e suas possíveis alterações no hospedeiro.

O presente trabalho teve por objetivos: a) verificar a suscetibilidade de clone ao patógeno; b) estudar a epidemiologia da doença em campo e; c) caracterizar anatomicamente a madeira para observação de diferenças do lenho infectado pelo patógeno e do lenho sadio.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Gênero *Eucalyptus* – Importância econômica

O eucalipto pertence à Divisão Angiospermae, Classe Dicotyledonea, Ordem Myrtales, Família Myrtaceae e gênero *Eucalyptus* com muitas espécies, subespécies e alguns híbridos naturais, sendo também notórias as variedades fenotípicas intra-específicas decorrentes de condições ambientais ou da hibridação (BERTOLUCCI *et al.*, 1995; FOELKEL, 2007).

De acordo com Eldridge *et al.* (1994), as espécies do gênero *Eucalyptus* tiveram origem na Austrália e regiões próximas, como Timor, Indonésia, Papua Nova Guiné, Molucas, Irian Jaya e sul das Filipinas, confinadas predominantemente ao continente australiano, na faixa latitudinal entre 9°N e 45°S, encontrando-se amplamente distribuídas entre as altitudes de 30 a 2000m.

No Brasil, as plantações de eucalipto para fins industriais atingem, aproximadamente, três milhões de hectares, estabelecidas para a produção de celulose, papel, carvão vegetal para siderurgia em substituição ao carvão vegetal e para indústria moveleira. Espécies de eucalipto têm sido predominantemente utilizadas nos reflorestamentos brasileiros, devido ao seu rápido crescimento, capacidade de readaptação de determinadas espécies às diversas regiões ecológicas e pelo potencial econômico de utilização da sua madeira. As espécies do gênero *Eucalyptus* apresentam grande capacidade de extração de água e nutrientes, assimilação fotossintética e crescimento, permitindo o seu cultivo em ambientes considerados impróprios para outras espécies (FERREIRA *et al.*, 2007).

Dentre as principais espécies utilizadas, *Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden e seus híbridos interespecíficos, principalmente com a espécie *E. urophylla* continuam sendo importantes e usados de maneira intensiva e crescendo nos segmentos industriais e, mais recentemente, para produção de madeira serrada (GOMIDE & COLODETTE, 2006).

## 2.2 A murcha de *Ceratocystis*

*Ceratocystis fimbriata* Ellis & Halsted é o agente causal de doenças em muitas plantas lenhosas de importância econômica como, por exemplo, a acácia negra, o cacau, o café, a mangueira, a seringueira e o eucalipto. Pertencente à classe Pyrenomycetes, ordem Ophiostomatales, subdivisão Ascomycotina, produz peritécios negros, eruptivos, providos de conspícuo rostro. Os ascósporos são unicelulares, hialinos e são liberados em massa gelatinosa. Microconídios hialinos são produzidos no interior dos conidióforos, ao passo que os macroconídios pigmentados são produzidos nas extremidades destes (TRINDADE & FURTADO, 1997).

O fungo causador da murcha de *Ceratocystis* pode penetrar na planta pela epiderme através de um inseto vetor, moscas (Diptera) ou microcoleópteros (Coleoptera: Nitidulidae). Essa relação inseto-fungo é facilitada pelo fato da maioria das espécies de *Ceratocystis* produzirem aromas que atraem os insetos (Barnes *et al.*, 2003). A penetração pode ocorrer por ferimentos e, também, diretamente pelas raízes, não havendo necessidade de qualquer ferimento ou vetor.

Segundo Baker e Harrington (2004), trata-se de um típico patógeno de xilema, que tem seu desenvolvimento inicial no câmbio, entre a casca e o lenho. Um de seus sintomas típicos é visível nas seções transversais de órgãos lenhosos, na forma de estrias radiais escuras. Essas estrias no lenho são visíveis quando um ramo afetado é cortado transversalmente, pois o patógeno provoca a desintegração do sistema vascular da planta (FERREIRA & MILANI, 2002). O escurecimento dos vasos é atribuído ao transporte de substâncias resultantes da oxidação e polimerização de compostos fenólicos. Os sintomas da murcha surgem em consequência do bloqueio dos vasos pelo crescimento micelial do fungo, impedindo que a água absorvida pelo sistema radicular supra adequadamente a parte aérea da planta. Em ambientes favoráveis ao desenvolvimento da doença, a planta morre e o fungo passa a crescer no tecido em decomposição sobre o qual

realiza sua reprodução através da formação de esporos e estruturas de resistência (clamidósporos) (BEDENDO, 1995).

Em campo podem ser observados dois padrões de murcha: um deles com início nos ramos finos da copa e progride em direção ao tronco, matando a árvore lentamente; o outro começa pelas raízes e a planta morre repentinamente, muitas vezes sem apresentar os sintomas típicos da doença (FURTADO *et al.*, 2008). Quando o adensamento das estrias radiais escuras toma toda a circunferência interna do lenho das raízes ou da base do tronco, ocorre a inativação de xilema e a árvore morre. Se a inativação do xilema ocorrer em uma altura elevada do tronco principal, se tem a murcha e a subsequente morte do segmento terminal, havendo, por isso, alteração do balanço hormonal, resultando na emissão de brotações adventícias em setores medianos e basais do tronco (FERREIRA, 1989; FERREIRA & MILANI, 2002). Quando se tem morte do setor apical em consequência de estresse hídrico em alguma árvore já infectada por *C. fimbriata*, o avanço do patógeno, ascendentemente, é muito rápido, observando-se gradativo aumento de adensamento das estrias radiais escuras nas secções, no sentido base-ápice.

A detecção de *C. fimbriata* a partir de xilema infectado dá-se, rotineiramente, a partir de pedaços de lenho afetado deixados em câmara úmida, ou transferindo fragmentos de lenho infetado para meio de cultura ou pela deposição de fragmentos de lenho doente entre fatias de cenoura usadas como isca (BAKER & HARRINGTON, 2004).

A doença foi relatada pela primeira vez no Brasil em dezembro de 1997, em reflorestamentos clonais no sudeste da Bahia (FERREIRA *et al.*, 1999; Ferreira, 2000), onde se observaram talhões monoclonais de híbridos *E. urophylla* x *E. grandis* com mortalidade de plantas superior a 40%. No primeiro ano de observação da doença, verificou-se que ela se limitava a plantações monoclonais de dois genótipos. Após esse período, constatou-se a doença em mais três genótipos, sendo esses cinco genótipos, clones nobres dos pontos de vista silvicultural e tecnológico. Depois, constatou-se em hastes de brotações do banco clonal destinadas ao enraizamento de estacas, em estacas de enraizamento dentro da casa de vegetação e em mudas já enraizadas na fase de aclimação, no viveiro e a céu aberto. Posto isso, pode-se inferir que existe grande risco de introdução da doença em áreas livres do patógeno via mudas propagadas vegetativamente. Foi constatado o aparecimento da doença, a partir de 2001, em plantações

monoclonais também nos Estados de Mato Grosso do Sul, Bahia, Minas Gerais e de São Paulo (FERREIRA *et al.*, 2006).

O Brasil e o Uruguai foram os únicos países das Américas onde foi constatada a murcha de *Ceratocystis* em eucalipto. A doença foi também registrada em Uganda, República do Congo e África do Sul. Os isolados congolezes foram agrupados filogeneticamente com os isolados brasileiros de eucalipto, isolados de *Acacia mearnsii* de Wild. da África do Sul e de isolados de batata doce dos Estados Unidos e de Papua Nova Guiné. Já os isolados da África do Sul foram agrupados aos isolados de eucalipto da África e da América do Sul (ROUX *et al.*, 2000, 2001, 2004). Pode ser observada uma especialização do patógeno em relação ao hospedeiro e entre os isolados brasileiros, pois os isolados do eucalipto aparentemente são patogênicos somente ao eucalipto (BAKER *et al.*, 2003; ZAUZA *et al.*, 2004).

### **2.3 Resistência genética e Interação Planta - Patógeno**

A resistência genética de plantas a fitopatógenos pode ser classificada com base no número de genes envolvidos. Existem casos em que a presença de apenas um gene é suficiente para conferir resistência (resistência monogênica) e outros casos em que são necessários vários genes (resistência poligênica). Outra classificação de tipos de resistência considera o espectro de resistência contra diferentes raças do patógeno, onde, de acordo com essa abordagem tem-se a resistência horizontal e a resistência vertical (CAMARGO, 1995).

A resistência monogênica também é chamada de resistência qualitativa devido à diferença entre plantas resistentes e suscetíveis ser de fácil visualização, inexistindo reações intermediárias na ausência de outras fontes de variação que não a genética, gerando uma distribuição fenotípica descontínua. Quando cruzadas plantas suscetíveis com resistentes, a proporção de plantas suscetíveis e resistentes seguirá aquelas previstas por Mendel, de acordo com o modo de interação alélica. Ela já foi descrita em quase todos os patossistemas e tem sido usada, em muitos casos, com sucesso em programas de melhoramento, como por exemplo alface - *Bremia lactucae*, tomate - *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, dentre outros. Quanto a sua duração, a resistência monogênica tende a ser superada pelo patógeno em um curto espaço de tempo, pois as mudanças genéticas necessárias para isso devem ocorrer em apenas um *locus*.

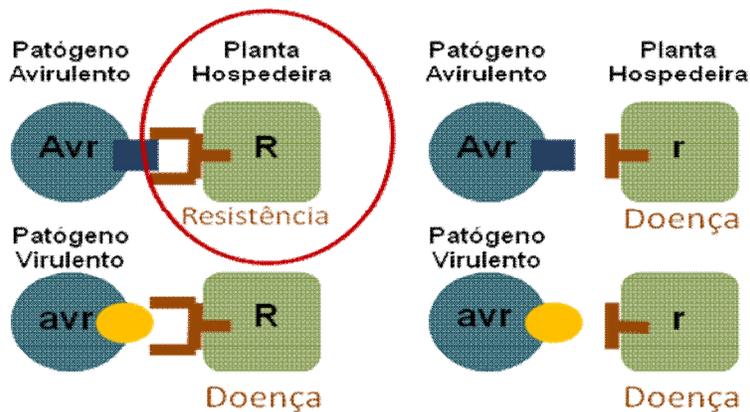
A resistência poligênica pode ser classificada como poligênica propriamente dita (muitos genes) ou oligogênica (poucos genes). Caracteriza-se pela variação contínua de graus de resistência, indo desde a extrema suscetibilidade até a extrema resistência. Por esse motivo também é chamada de resistência quantitativa, pois há necessidade de se quantificar a doença para diferenciar os materiais suscetíveis dos resistentes. Na prática, o número de genes envolvidos na resistência poligênica pode ser estimado através de fórmulas que consideram a magnitude da variação fenotípica observada em indivíduos da geração F2 resultantes do cruzamento entre plantas pertencentes aos extremos de resistência e suscetibilidade, ou seja, quanto maior a variação entre plantas, maior o número de genes envolvidos e maior o número de combinações diferentes entre eles, levando a um aumento do espectro fenotípico. A resistência poligênica é mais estável que a monogênica, pois para que surjam variantes do patógeno, assumindo as mesmas condições ambientais e genéticas, serão requeridas mudanças genéticas em vários *loci* de patogenicidade.

A resistência vertical (monogênica) confere imunidade ou hipersensibilidade contra determinadas raças do patógeno e por isso age na redução da quantidade efetiva de inóculo inicial, atrasando o início da epidemia. Já a resistência horizontal (poligênica) tem efeitos parciais e quantitativos: a eficiência de infecção é menor no material resistente, as lesões crescem mais lentamente, os esporos são produzidos mais tardiamente e em menor quantidade, afetando principalmente a taxa de desenvolvimento da doença.

Os patógenos produzem uma diversidade de sinais potenciais, e, de uma maneira análoga à produção de antígenos pelos patógenos de mamíferos, alguns destes são detectáveis por algumas plantas (BENT, 1996). No patógeno, um gene é chamado de gene de avirulência se sua expressão determina a produção de sinais que provocam uma forte resposta na planta com o apropriado gene de resistência (KEEN, 1990). No entanto, a expressão do gene de avirulência não impede o patógeno de ser virulento para hospedeiros que não tenham o correspondente gene de resistência.

Flor (1956) demonstrou a complementaridade dos sistemas gênicos do hospedeiro e do patógeno. Após investigar exaustivamente as interações entre vários genótipos de linho e do fungo *Melampsora lini*, ele propôs o modelo de relação gene-a-gene. Segundo ele, a incompatibilidade acontece quando uma planta possui um gene dominante de resistência que corresponde a um gene de avirulência em um determinado

patógeno (Figura 1). Uma única planta pode ter muitos genes de resistência, assim como o patógeno também pode ter vários genes de avirulência. A resposta de defesa, que evita a infecção, se dá a partir do momento em que a planta “reconhece” um particular produto do patógeno controlado pelo gene de avirulência. Conforme Lindsay *et al.* (1993), estes produtos do gene de avirulência implicados na percepção do ataque pela planta abrangem um grupo de moléculas coletivamente chamadas elicitores.



**Figura 1.** Resistência ou suscetibilidade como resultado de combinação entre genótipos do hospedeiro e do patógeno segundo a teoria gene-a-gene. Fonte: modificado de Lau *et al.*, 2007.

Esse tipo de resistência é expresso por uma necrose localizada no sítio primário de infecção resultando na morte rápida de células em contato direto com o patógeno ou adjacentes a ele, denominando-se reação de hipersensibilidade (DANGL & JONES, 2001). A proteína codificada pelo gene R desencadeia a reação de hipersensibilidade, como resultado do reconhecimento da proteína codificada pelo gene Avr do patógeno (MARTIN *et al.* 2003). Após o reconhecimento, ocorre uma cadeia de transdução de sinais que resulta na ativação de respostas locais e sistêmicas (NIMCHUK *et al.*, 2003).

Outra forma de resistência conhecida é fenômeno da tolerância. Trata-se da capacidade inerente ou adquirida da planta em suportar o ataque de um patógeno. Materiais tolerantes não possuem a habilidade de prevenir e/ou restringir o crescimento do patógeno, o que a torna indistinguível do material suscetível, porém sua produtividade pode ser comparada a de um material resistente. Existem autores que não consideram a tolerância como forma de resistência, pois ela não afeta a reprodução do patógeno, tornando as plantas tolerantes reservatórios do inóculo em campo (AGRIOS, 2004).

O controle dos agentes causais de murchas é bastante difícil, sendo a utilização de materiais resistentes obtidos através de programas de melhoramento genético o melhor método de controle devido à especificidade apresentada na relação patógeno-hospedeiro. Para diversas culturas foram desenvolvidas variedades resistentes, tanto no caso de murchas de natureza fúngica como bacteriana, tornando viável o controle da doença (BEDENDO, 1995).

#### **2.4 Caracterização anatômica do eucalipto**

As primeiras observações sobre as características anatômicas da madeira do eucalipto foram realizadas na Austrália por Drew (1914). O autor analisou as características externas e algumas propriedades físicas da madeira de espécies de New South Wales.

Welch (1922) foi o pioneiro na identificação de espécies através da coloração apresentada pela reação dos extrativos da madeira solúveis em água com determinados reagentes químicos. Em 1927, relatou as características macro e microscópica da madeira, descrevendo 10 espécies de eucalipto.

Somente em 1934 com os trabalhos de Dadswell, houve um avanço significativo na anatomia da madeira e sua aplicação na identificação de espécies de eucalipto. O autor apresentou a descrição macro e microscópica e uma chave para a identificação de 37 espécies que apresentam madeira por ele determinada escura. Desenvolveu, também, em 1941, o método de cartão perfurado para a identificação de 48 espécies comerciais através das características da madeira.

No Brasil, destacam-se os trabalhos de Pereira (1933), Foelkel *et al.* (1976) e de Angyalossy-Alfonso (1983), que tratam da caracterização anatômica da madeira de espécies do gênero *Eucalyptus*.

Poucos são os trabalhos que relacionam diferenças anatômicas em resposta à infecção por fitopatógenos, principalmente em se tratando de anatomia da madeira. Alguns estudos anatômicos realizados em folhas (BLAZQUEZ & OWEN, 1963; GARCIA *et al.*, 1995; GARCIA *et al.*, 1999) mostram que clones resistentes e suscetíveis de seringueira (*Hevea* spp.) comportaram-se de maneira diferente após a penetração do fungo *Microcyclus ulei*, causador do mal das folhas. Os clones resistentes produzem rapidamente um material amarelo intracelular que, aparentemente, impede o progresso da

infecção e, conseqüentemente, a formação da fase sexual, fato esse que não ocorre em clones suscetíveis.

As plantas apresentam diversos tipos de resistências, que podem ter natureza estrutural e/ou bioquímica e que podem ser formadas antes (pré-formados) ou após a infecção (pós-formados/induzidos) (PASCHOLATI & LEITE, 1995).

## **2.5 Mecanismos de resistência – Fatores estruturais**

Como fatores de resistência estrutural podem ser mencionados o aumento de lignificação das paredes e a formação de tiloses. A lignificação tem um alto potencial de contribuição na defesa das plantas. Ela pode interferir no crescimento do patógeno através da modificação química das paredes celulares, tendo como resultado um aumento na resistência das paredes à ação de enzimas degradadoras, na difusão de toxinas do patógeno em direção ao hospedeiro e de nutrientes do hospedeiro em direção ao patógeno. Além disso, patógenos também podem ser lignificados e ter o crescimento interrompido. A hifa de penetração dos fungos pode sofrer a deposição de material celulósico (calose) e lignina, dando origem a uma bainha ou “tubo lignífero”, impedindo o progresso da hifa no interior do citoplasma (PASCHOLATI & LEITE, 1995).

A formação de tiloses ocorre nos vasos do xilema em resposta a stress abiótico e biótico como envelhecimento e/ou invasão de patógenos vasculares. Pode ser formada também para evitar a cavitação (formação de bolha de ar na coluna de água do vaso condutor). O protoplasma das células parenquimáticas adjacentes ao xilema sofre um processo de hipertrofia e cresce para dentro do elemento de vaso através das pontuações. Essas projeções protoplasmáticas podem aumentar em tamanho e número no interior dos elementos de vaso, levando à obstrução parcial ou total dos mesmos. Essa obstrução irá restringir o transporte de água, bem como poderá conter o avanço do patógeno para outros locais do hospedeiro (DICKINSON, 2000). Entretanto, as tiloses só podem contribuir com a resistência da planta se formadas precocemente e nas áreas próximas ao sítio inicial de infecção. De uma maneira geral, plantas resistentes às murchas vasculares têm a capacidade de formar maiores quantidades de tiloses que as suscetíveis (AGRIOS, 2004).

A presença de tecidos com células de paredes espessas também pode contribuir para com a restrição da colonização das plantas por fitopatógenos. No caso das folhas, por exemplo, o xilema e as fibras esclerenquimáticas, ricas em lignina, podem interromper o avanço de fungos e bactérias nesses tecidos, originando sintomas

denominados de manchas angulares. Esses sintomas, como os que ocorrem em folhas de pepino infectadas por *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* e folhas do algodoeiro infectadas por *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum*, resultam da capacidade dos patógenos em colonizar somente as áreas entre as nervuras. Essa restrição da colonização pode levar a uma redução do inoculo, bem como um menor número de folhas doentes por planta (PASCHOLATI & LEITE, 1995).

## 2.6 Mecanismos de resistência – Fatores bioquímicos

Um dos fatores bioquímicos de resistência são os compostos fenólicos. Muitas fitoalexinas, compostos antimicrobianos formados nas células vegetais em resposta à infecção microbiana, são fenólicas e quando os compostos fenólicos não apresentam papel ativo na resistência, eles possivelmente são utilizados como marcadores de resistência ou suscetibilidade. Os fenóis contribuem para a resistência de diversas maneiras: como inibidor na germinação conidial, quando os fenóis estão presentes antes da infecção; participando da reação de hipersensibilidade, quando os fenóis oxidados, de coloração marrom, aparecem durante a reação; precursores de lignina, contribuindo para a resistência das paredes celulares (SANIER *et al.*, 1992).

As fitoalexinas são metabólitos secundários, antimicrobianos, de baixa massa molecular, produzidas pelas plantas em resposta a estresses físicos, químicos ou biológicos. São capazes de impedir ou reduzir a atividade de agentes patogênicos, sendo a taxa de produção/acúmulo dependente dos genótipos do hospedeiro (Daniel & Purkayastha, 1995). São consideradas compostos biocidas, pois não têm ação toxicológica específica, sendo prejudiciais a bactérias, fungos, nematóides, plantas e animais. De maneira geral, o modo de ação das fitoalexinas sobre fungos inclui a granulação citoplasmática, desorganização dos conteúdos celulares, ruptura da membrana plasmática e inibição das enzimas fúngicas. Esses efeitos têm reflexo na inibição da germinação e alongamento do tubo germinativo e redução ou inibição do crescimento micelial (LO *et al.*, 1996).

Os compostos fenólicos são responsáveis pelo sabor, odor e coloração de diversos vegetais. Esse grupo de compostos é importante para proteger as plantas contra os raios UV, insetos, fungos, vírus e bactérias. Trata-se de substâncias que possuem pelo menos um anel aromático no qual ao menos um hidrogênio é substituído por um grupamento hidroxila. Os compostos fenólicos são sintetizados a partir de duas rotas

metabólicas principais: a via do ácido shiquímico e a via do ácido mevalônico, a qual é menos significativa. O ácido shiquímico é formado pela condensação de dois metabólitos da glicose, ou seja, o fosfoenolpiruvato e a eritrose-4-fostato. A junção do ácido shiquímico com uma molécula de fosfoenolpiruvato, forma o ácido corísmico. O ácido corísmico por sua vez gera os aminoácidos aromáticos (triptofano, fenilalanina e tirosina) que são precursores de vários alcalóides. Um dos primeiros grupos de compostos fenólicos formados a partir do ácido corísmico são os fenilpropanóides (PERES, 2007). Os fenilpropenos ou fenilpropanóides apresentam estruturas formadas basicamente de um anel aromático, constituído por seis carbonos ligados a uma cadeia lateral com três carbonos, contendo uma dupla ligação, apresentando grupos funcionais com oxigênio (MANN, 1994). Como exemplos de ação de compostos fenólicos tem-se o ácido clorogênico atuando no patossistema batata – *Verticillium albo-atrum*, no qual os cultivares com maiores quantidade deste composto são ao resistentes ao patógeno e o catecol no patossistema cebola - *Colletotrichum circinans*, onde os bulbos brancos mostram-se altamente suscetíveis ao ataque do patógeno, enquanto que os coloridos, devido a presença do catecol (vermelhos ou amarelos), resistentes (PASCHOLATI & LEITE, 1995).

## **2.7 Análise de dinâmica, estrutura de focos e índice de dispersão (ID)**

Conforme Bergamin Filho e Amorim (1996), epidemia é o aumento ou extensão da doença em uma dada população de plantas, enquanto endemia consiste na presença permanente da doença em uma determinada região geográfica, porém sem estar em expansão, ou seja, patógeno e hospedeiro estão em constante interação e equilíbrio. Não obstante, uma doença endêmica pode se tornar epidêmica, bastando, por exemplo, que ocorram mudanças no ambiente que favoreçam a rápida multiplicação e dispersão do patógeno. A possibilidade de ocorrência de uma epidemia está intimamente relacionada com a evolução de determinada doença, a qual envolve diferentes fases do ciclo de vida do patógeno. No que diz respeito ao número desses ciclos, as doenças podem ser consideradas monocíclicas ou policíclicas (VANDERPLANK, 1963). Para a ocorrência de uma epidemia de doença em plantas há necessidade contínua de condições favoráveis (VALE & ZAMBOLIM, 1996).

Do ponto de vista epidemiológico, as doenças de plantas podem ser classificadas em: juro composto ou de juro simples, segundo Vanderplank (1963) e poliéticas, segundo Zadocks (1974). A murcha do eucalipto causada por *Ceratocystis*

*fimbriata* é considerada uma doença poliética, ou seja, o progresso da epidemia se verifica ao longo dos anos. A partir dessa afirmação, existem estudos de dinâmica e estrutura de focos, através de planilhas de campo, os quais se fundamentam no número total de ocorrência de focos (NF), focos unitários (FU), número médio de plantas por foco (NMPF), índice de compactação do foco (ICF) e índice de formação de foco (IFF). Com essa verificação o estudo desempenhará um papel fundamental no processo de dispersão da doença e estrutura de focos, permitindo possivelmente correlacionar esta dispersão a diversos fatores adversos.

A análise de dinâmica e estrutura de focos (ADEF) foi desenvolvida para caracterizar espacialmente as epidemias, cujas avaliações são baseadas na incidência. Assim, um foco de doença é definido como, árvores com sintomas imediatamente adjacentes no padrão de proximidade vertical, horizontal ou diagonal (NELSON, 1996).

Pelo método da ADEF é possível caracterizar um número razoável de variáveis importantes no patossistema, tais como: número de focos com plantas doentes, número de focos unitários, a forma do foco, o número médio de plantas por foco e o índice de compactação do foco. Essas variáveis podem ser estudadas em função da incidência da doença e poderá contribuir nas informações oriundas de outras técnicas de análise espacial (NELSON, 1996; NELSON, 1995).

As variáveis da ADEF podem ser empregadas para complementar as informações oriundas de outras técnicas de análise espacial (JESUS JUNIOR & BASSANEZI, 2004) e visa um melhor entendimento do patossistema.

Um foco de doença é definido como um ponto de concentração localizada de plantas doentes ou lesões discretas, podendo ser uma fonte primária de infecção ou coincidir com uma área originalmente favorável ao estabelecimento da doença (NELSON, 1996) e tendem a influenciar no padrão posterior de transmissão da doença. Similarmente, um grupo pode ser definido como um número de plantas doentes agrupadas, entretanto, apesar dos dois termos serem sinônimos é interessante entender que um foco de doença pode consistir de uma única planta doente e um grupo, por sua vez, prediz uma ou mais de uma planta doente (NELSON, 1996; LARANJEIRA *et al.*, 1998).

O padrão espacial de uma doença numa linha de plantio ou numa parcela pode ser ao acaso ou agregado. Padrão ao acaso em doenças cujos patógenos são veiculados pelo ar significa que a probabilidade de um esporo cair sobre uma planta

hospedeira é igual para todas as plantas hospedeiras. Assim, a ocorrência da doença não é influenciada pela distância até a fonte de inóculo, seja a fonte localizada na mesma planta ou na vizinhança próxima. Padrão espacial ao acaso está intimamente relacionado a iguais oportunidades de infecção. Se, no entanto, em condições naturais, o patógeno se dispersa apenas a curtas distâncias (por respingos de chuva, por exemplo), a probabilidade de uma planta ser infectada é maior para aquelas plantas situadas próximas à fonte de inóculo do que para aquelas situadas longe da fonte de inóculo. Neste caso, o padrão espacial da doença não será ao acaso e, sim, agregado, com focos visíveis ao redor das fontes primárias de inóculo. Agregação é apenas um dos possíveis desvios para o padrão espacial ao acaso ou aleatório.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Testes de resistência clonal**

Receberam-se mudas de duas procedências distintas, totalizando 37 clones, sendo que para uma das procedências foram recebidos dois lotes diferentes de mudas, em períodos distintos. Todos os materiais tinham aproximadamente 4 meses de idade (figura 1). Primeiramente, foram avaliados 18 clones e, em um segundo momento, os 19 restantes.

As mesmas foram inoculadas através do método de disco de micélio. com o auxílio de um escalpelo fez-se um ferimento a, aproximadamente, 10cm do colo da muda, da casca até o lenho, onde foi colocado o disco com micélio do fungo, fazendo-se uma câmara úmida com algodão embebido em água destilada para vedar a lesão (figuras 2 e 3). Os isolados utilizados na inoculação foram obtidos em meio de cultura batata – dextrose - agar (BDA) a partir de plantas doentes oriundas de Minas Gerais.

Passados 30 dias da inoculação, realizou-se a avaliação das mudas, observando-se o tamanho da lesão transversal, os sintomas apresentados pelas mudas e se as mesmas estavam mortas. Os materiais de cada lote foram classificados em altamente resistente (AR), moderadamente resistente (MR), moderadamente suscetível (MS), suscetível (S) e altamente suscetível (AS) de acordo com a distribuição de frequência do tamanho da lesão longitudinal. Não houve mudas deixadas como testemunha.



**Figura 2.** Mudanças do lote 3 utilizadas para caracterização anatômica



**Figura 3.** Material utilizado para inoculação



**Figura 4.** Muda inoculada

### 3.2. Caracterização anatômica da madeira

Amostras, com cerca de 0,8cm de diâmetro, foram coletadas das mudas do lote 3, utilizadas nos testes de resistência clonal, 30 dias após a inoculação, sendo amostradas as classes altamente e moderadamente resistente, bem como testemunha. A caracterização anatômica e histoquímica do material suscetível não foi realizada devido a ausência desse tipo de material no lote amostrado. Cada muda foi amostrada em dois pontos, sendo um dos pontos de corte próximo ao ponto de inoculação e o outro mais próximo à copa da planta.

Para as análises anatômicas da madeira, as amostras foram fixadas em FAA 70 (formaldeído – álcool 70% – ácido acético), de acordo com metodologia descrita por Johansen (1940) e, posteriormente, transferidas para uma solução de água com

glicerina por sete dias para facilitar o corte das amostras. Os cortes foram realizados nos planos transversal e longitudinais (tangencial e radial) com aproximadamente 20 a 25 $\mu$ m de espessura em micrótomo de deslize.

Todos os cortes utilizados para caracterização anatômica foram tratados com hipoclorito de sódio 50%, lavados em água acética 1% e corados com safranina aquosa 1% e azul de astra 1% (ROESER, 1972), visando o contraste das estruturas celulares. Após a coloração dos cortes, os mesmos foram desidratados em série etílica (10% - 30% - 50% - 70% - 90% - 96% - 100%). A fixação do corante foi feita em acetato de butila. As lâminas contendo cortes dos três plano (transversal, tangencial e radial) corados foram montadas permanentemente com Entellan<sup>®</sup>.

A análise e a captura de imagens do material foram realizadas em microscópio de luz transmitida Axioskop 40, marca Zeiss, Câmera Axio Cam MRC e computador com o Sistema de Análise de Imagens (programas Axiovision e Axioviewer).

### **3.3 Testes histoquímicos**

Preparações temporárias dos materiais altamente resistentes, moderadamente resistentes e testemunha foram utilizadas para a realização dos testes destinados à detecção de compostos fenólicos e amido.

Para tal, foram utilizados cortes naturais, previamente lavados em água destilada, provenientes dos materiais acima citados. Os testes foram realizados de acordo com a técnica de Johansen (1940), com material fixado em FAA 70: para o teste de compostos fenólicos, cortes dos planos transversal e longitudinal radial foram tratados com solução aquosa de cloreto de ferro III a 10% e observados em seguida para detecção dos compostos. Determinou-se, também, a presença de amido nos tecidos, de acordo com metodologia de Johansen (1940), onde cortes dos planos transversal e longitudinal radial foram tratados com solução de lugol (iodo 1% + iodeto de potássio 2% em água destilada) e observados em seguida para detecção do amido.

A análise e a captura de imagens do material foram realizadas em microscópio de luz transmitida Axioskop 40, marca Zeiss, Câmera Axio Cam MRC e computador com o Sistema de Análise de Imagens (programas Axiovision e Axioviewer).

### **3.4 Levantamento em campo e avaliação espacial (Análise de Dinâmica e Estrutura de Foco)**

Para a área total estudada, localizada no Mato Grosso do Sul, foram levantados aproximadamente 30.000ha em três regiões de plantio distintas, em talhões com idade de 6 a 18 meses de idade e em oito clones operacionais da empresa em questão. O método utilizado para coleta dos dados foi o de caminhamento percorrendo-se, aproximadamente, 30 metros talhão adentro para se evitar o efeito de borda.

A avaliação espacial foi conduzida também no Mato Grosso do Sul em parcela experimental de 250 plantas. Os dados foram obtidos a partir dos levantamentos previamente realizados por pessoal técnico. Foi contabilizada a incidência de plantas sadias e doentes, considerando-se como doentes todas as plantas que apresentaram os sintomas típicos da doença, tais com desfolha intensa, presença de canelura e rachaduras na base tronco e superbrotação ao longo do fuste

Para o levantamento e análise dos dados, utilizou-se um sistema de banco de dados em um coletor, sendo os mesmos transferidos posteriormente ao Microsoft Excel.

Os cálculos da distribuição espacial e estrutura de foco foram feitos através de software desenvolvido por Porcena (2008, não publicado) (figura 4). O software foi rodado em Sistema Operacional GNU/Linux usando a distribuição OpenSuse e foi compilado em GCC usando a IDE Eclipse, o código fonte utilizado é o mesmo compilado em Windows.

#### **3.4.1 Análise de dinâmica e estrutura de foco**

A murcha do eucalipto causada por *Ceratocystis fimbriata* é considerada uma doença poliética, ou seja, o progresso da epidemia se verifica ao longo dos anos. A partir dessa afirmação, existem estudos de dinâmica e estrutura de focos, através de planilhas de campo, os quais se fundamentam no número total de ocorrência de focos (NF), focos unitários (FU), número médio de plantas por foco (NMPF), índice de compactação do foco (ICF) e índice de formação de foco (IFF). Com essa verificação o estudo desempenhará um papel fundamental no processo de dispersão da doença e estrutura de focos, permitindo possivelmente correlacionar esta dispersão a diversos fatores adversos.

No estudo da estrutura dos focos da murcha de *Ceratocystis* em clones de eucalipto foi quantificado o índice médio de forma de focos (IFF) e o índice médio de compactação de focos (ICF), através das equações:

- $IFF = [(lf/lc)/NF]$

Em que:

Valores de IFF = 1,0 indicam focos isodiamétricos.

Valores de IFF > 1,0 indicam focos com maior comprimento na direção entre as linhas de plantio.

Valores de IFF < 1,0 indicam focos com maior comprimento na direção da linha de plantio.

- $ICF = [(NPF/lc*lf)/NF]$

Em que:

Valores de ICF próximos a 1,0 indicam focos mais compactos, isto é, maior agregação e proximidade entre todas as plantas pertencentes ao foco.

A partir desses dados, pode-se inferir sobre o processo de dispersão da doença com a possibilidade de obter conclusões favoráveis, visando o estudo de melhoramento da espécie voltada à produção.

### 3.4.2 Dinâmica espacial – Índice de Dispersão (ID)

A análise do padrão espacial da murcha de *Ceratocystis* foi realizada através de mapeamento da área a partir de dados binários (presença ou ausência de árvores doentes). Foram contabilizadas como árvores doentes as que apresentaram os sintomas típicos da doença e calculou-se a incidência da mesma em cada data de avaliação com a seguinte fórmula:  $(p = T/D)$ . Em que: T = número total de árvores na parcela; D = número total de árvores doentes.

Os dados de incidência foram a base para o cálculo do índice de dispersão (ID) (GOTTWALD *et al.*, 1995; MADDEN *et al.*, 1995; LARANJEIRA & BERGAMIN FILHO, 1998; 2004). Cada mapa foi dividido em dois tamanhos de quadrats de 4 (2x2) e 10 (5x2) árvores/quadrat. Para cada mapa e tamanho de quadrat foi realizada uma análise individual.

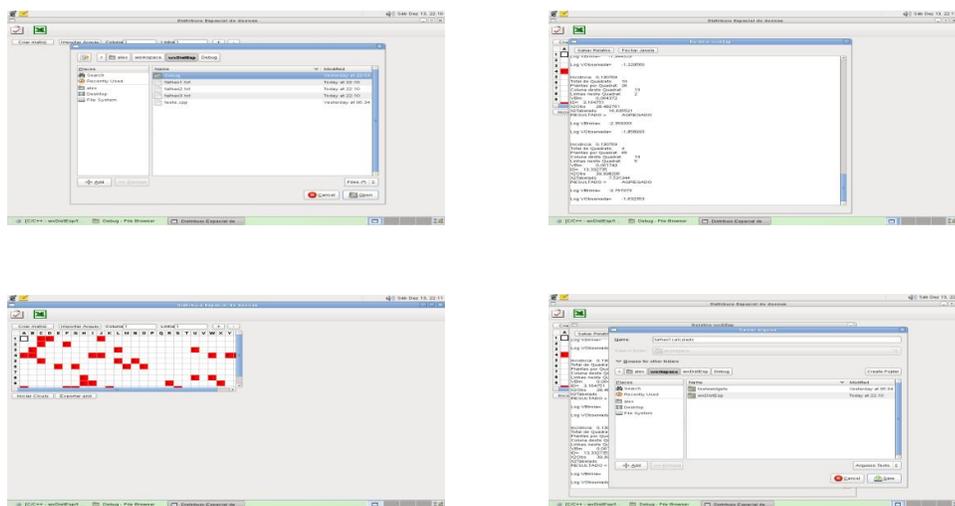
A análise da distribuição das árvores com murcha dentro dos quadrats, em cada avaliação, foi estimada pela análise binomial, através do cálculo do

índice de dispersão binomial, que é a (Vobs) variância observada entre quadrats e a (Vbin) variância da distribuição binomial (MADDEN & HUGHES, 1995).

Para cada uma das avaliações e para cada tamanho de quadrat, a análise binomial (planta doente ou sadia) foi calculada na forma de variância observada (Vobs), conforme metodologia de Gottwald *et al.*, (1996) e Hughes & Madden, (1992) em que:  $V_{bin} = p(1-p)/n$  onde:  $p$  = incidência da doença na parcela  $n$  = número de árvores no quadrat  $V_{obs} = \Sigma[(x_i - np)^2/n^2(N-1)]$  onde:  $X_i$  = número de árvores doentes no quadrat e  $N$  = número total de quadrats.

Para o cálculo do índice de dispersão (ID) utilizaram-se os resultados da  $V_{obs}/V_{bin}$ , sendo possível concluir, sobre o padrão de distribuição espacial das árvores doentes em cada mapa e para cada quadrat.

Para os valores de ID obtidos de cada quadrat foi aplicado o teste do  $\chi^2$  (qui-quadrado) para verificar se o valor calculado foi maior ou igual a 1 a nível de significância de 5%. Valores de ID significativamente iguais a 1 indicam que as árvores com murcha estão distribuídas aleatoriamente no campo. Valores de ID significativamente maiores que 1 indicam que as árvores com murcha estão agregadas (Madden & Hughes, 1995).

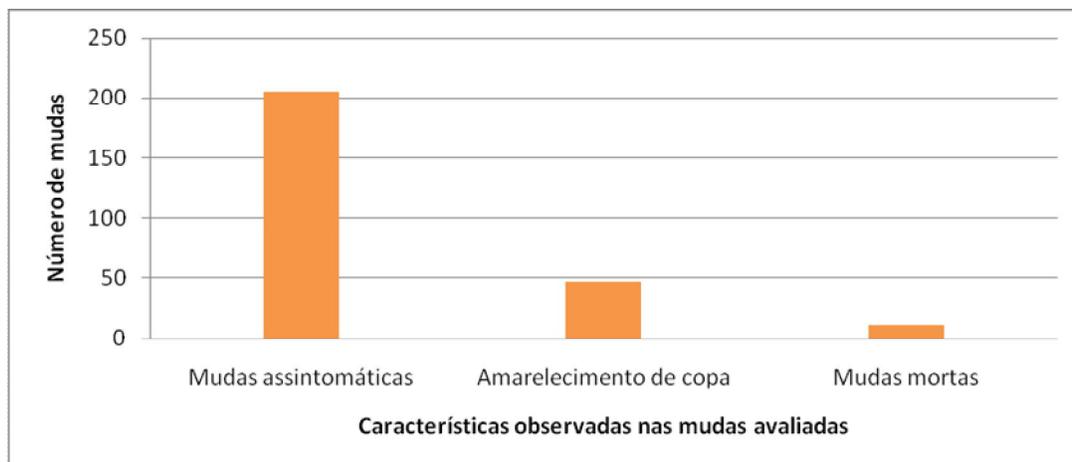


**Figura 5.** Exemplo de funcionamento do software

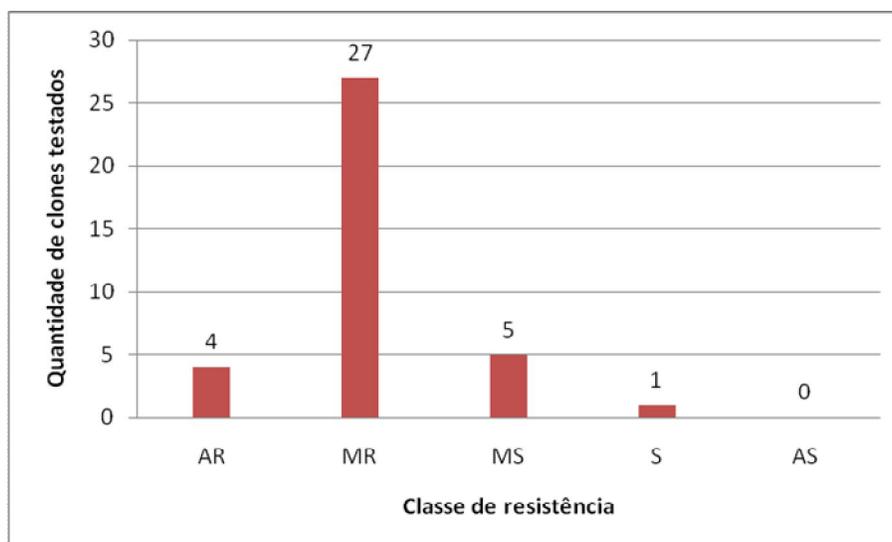
## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1 Testes de resistência clonal**

A maioria dos clones apresentou resistência moderada, sendo que somente um apresentou suscetibilidade ao patógeno. Porém, um ponto deve ser destacado: a alta frequência de mudas que desenvolveram a doença, mas permaneceram assintomáticas, pois esse fato pode dificultar a diagnose da doença em campo (Figura 6). Houve uma variação substancial no comprimento da descoloração do xilema entre os clones de cada lote (Tabela 1). Os materiais foram alocados, através da distribuição de frequência de acordo com o tamanho da lesão, em cinco classes de resistência, obtendo-se as seguintes porcentagens para cada uma delas: 10,81% de clones altamente resistentes; 72,97% de clones moderadamente resistentes; 13,51% de clones moderadamente suscetíveis; e 2,70% de clones suscetíveis (Figura 7).



**Figura 6.** Desenvolvimento de sintomas e mortalidade das mudas



**Figura 7.** Distribuição da frequência de classes de resistência apresentada pelos clones dos três lotes de mudas, onde: AR – altamente resistente; MR – moderadamente resistente; MS – moderadamente suscetível; S – suscetível; AS – altamente suscetível)

Observaram-se diferenças entre os três lotes de mudas avaliados, sendo que o primeiro apresentou somente indivíduos moderadamente suscetíveis e moderadamente resistentes; o segundo apresentou desde indivíduos altamente resistentes até indivíduos suscetíveis e, por fim, o terceiro lote apresentou somente indivíduos alta e moderadamente resistentes (tabela 1; figuras de 8 a 13).

Os estudos para resistência a murcha de *Ceratocystis*, esse importante e potencial patógeno da cultura do eucalipto, estão no começo. Resistência a esse mesmo fungo foi encontrada no cacau (*Theobroma cacao*) e *Coffea arabica* e ela se

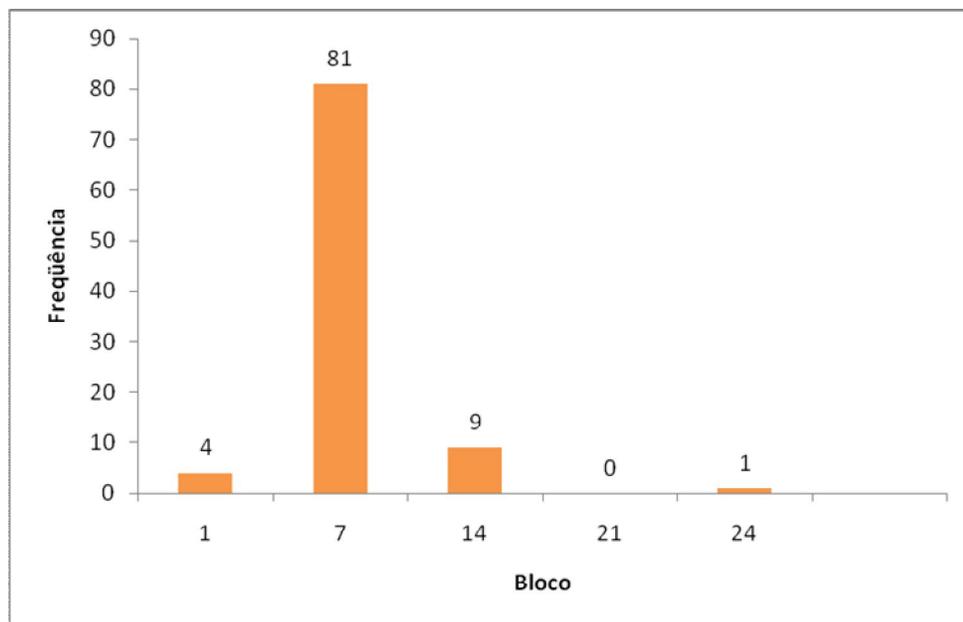
mostrou altamente valiosa para o manejo da doença (DOMINGUEZ & VELÁSQUEZ, 1972; IZQUIERDO, 1988; ZULUAGA, VALENCIA & GONZALEZ, 1971).

No Brasil, a doença causou mortalidade substancial em apenas alguns clones de híbridos de *E. grandis* X *E. urophylla*. Porém, deve ser ressaltado que esses materiais são de alta qualidade silvicultural e possuem muitas características superiores, como por exemplo, teor de celulose e crescimento rápido, o que passa ser um problema, tendo em vista que uma das recomendações de controle é a não utilização de materiais suscetíveis em áreas onde sabidamente o patógeno é encontrado.

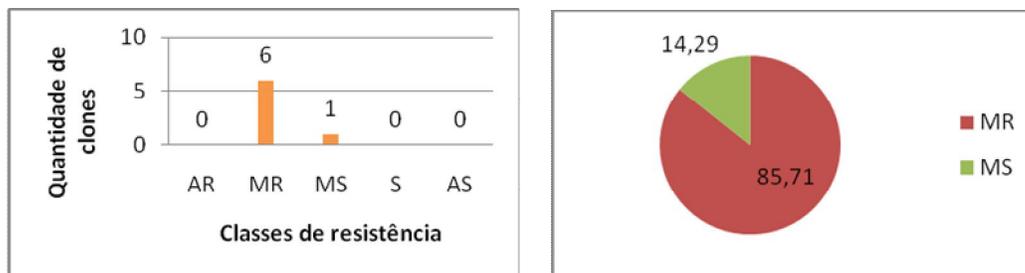
Mais trabalhos são necessários para se determinar a idade ideal para avaliação da resistência a murcha de *Ceratocystis*, contudo a descoloração do xilema, muito mais que a mortalidade, vem se apresentando como um parâmetro melhor para avaliação da resistência e suscetibilidade (BAKER *et al.*, 2003). A ausência do sintoma murcha ou mortalidade pode estar relacionada à idade das mudas, sendo que mudas mais novas, sob condições ótimas de crescimento podem morrer mais rápido que plantas mais velhas.

Além da utilização de clones resistentes, o manejo da doença pode incluir: remoção e destruição das plantas infectadas, diminuição nos ferimentos e rotação de culturas com plantas que não sejam hospedeiras do patógeno. A doença também pode ser disseminada para novas áreas através de cepas doentes e cuidados devem ser tomados para que a doença não seja propagada vegetativamente. Dentre todas essas alternativas de controle, a utilização de clones altamente resistentes ou imunes é a opção de manejo mais efetiva para o controle do patógeno.

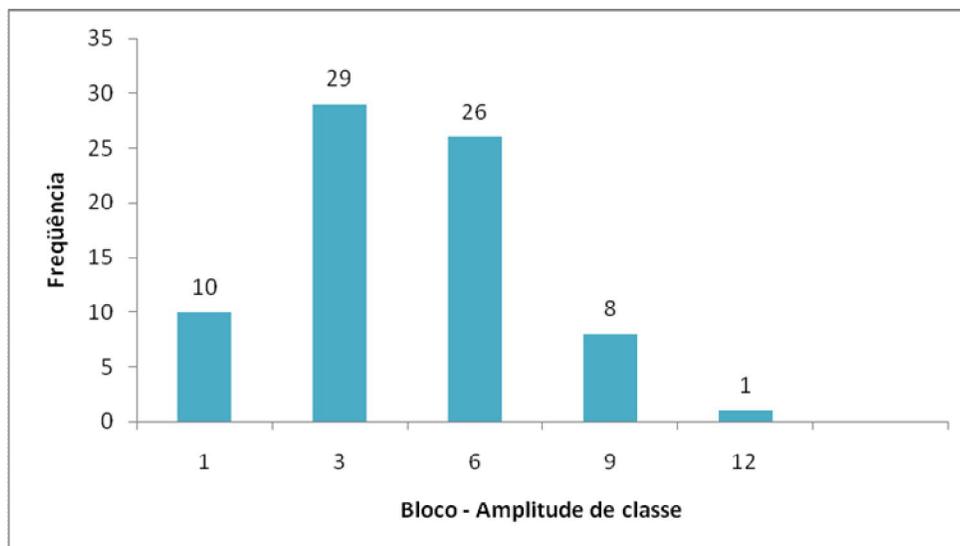
Os resultados obtidos nos testes de resistência foram semelhantes aos atingidos por Machado *et al.* (2008), nos quais os autores testaram a resistência interespecífica do eucalipto, obtendo como resposta uma maioria de clones moderadamente resistentes.



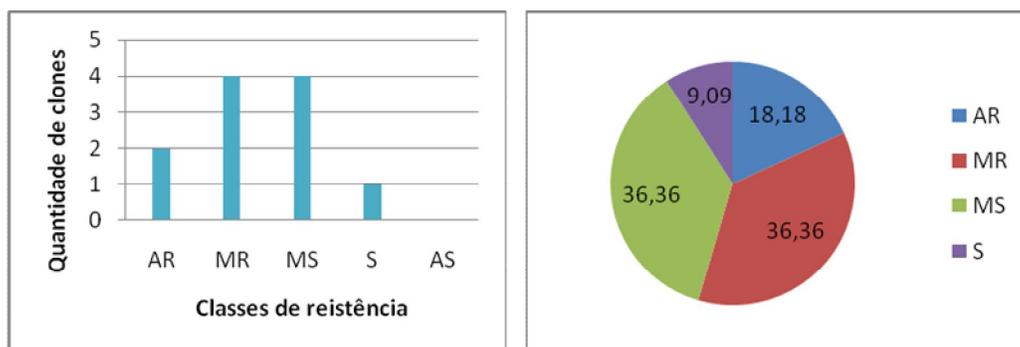
**Figura 8.** Histograma com classes de frequência para as mudas do lote 1, sendo as amplitudes de classe: 0-1: altamente resistente; 1,1 – 7: moderadamente resistente; 7,1 – 14: moderadamente suscetível; 14,1 – 21: suscetível; 21,1 – 24: altamente suscetível



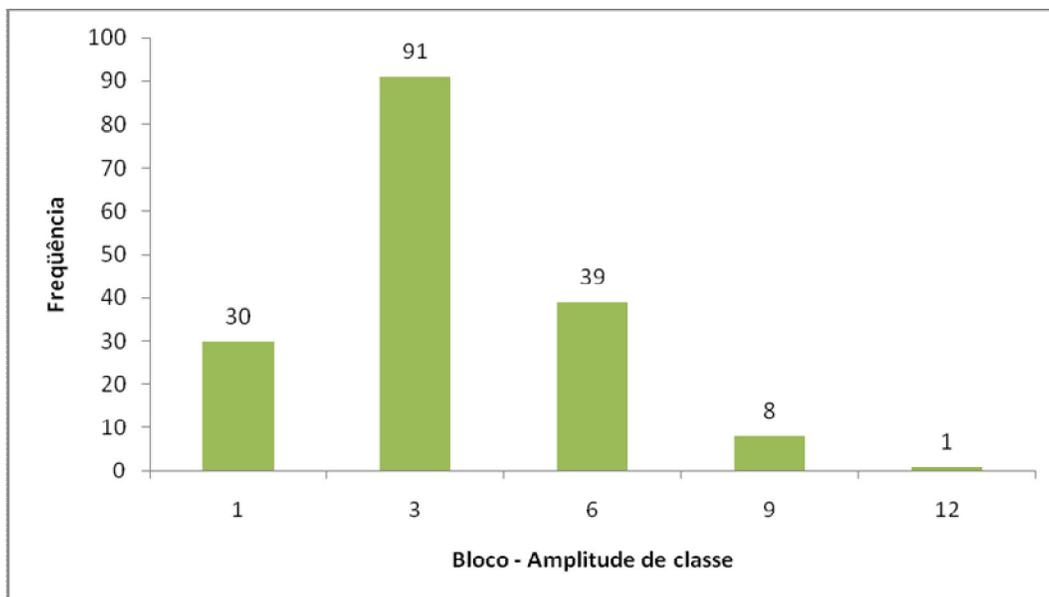
**Figura 9.** Frequência de classes de resistência (à esquerda) e porcentagem de classes de resistência (à direita) apresentada pelos clones do lote 1, onde: AR – altamente resistente; MR – moderadamente resistente; MS – moderadamente suscetível; S – suscetível; AS – altamente suscetível



**Figura 10.** Histograma com classes de frequência para as mudas do lote 2, sendo as amplitudes de classe: 1: 0-1: altamente resistente; 3: 1,1 – 3: moderadamente resistente; 6: 3,1 – 6 moderadamente suscetível; 9: 6,1 – 9: suscetível; 12: 9,1 – 12: altamente suscetível



**Figura 11.** Frequência de classes de resistência (à esquerda) e porcentagem de classes de resistência apresentada pelos clones (à direita) apresentadas pelos clones do lote 2 (AR – altamente resistente; MR – moderadamente resistente; MS – moderadamente suscetível; S – suscetível; AS – altamente suscetível)



**Figura 12.** Histograma com classes de frequência para as mudas do lote 3, sendo as amplitudes de classe: 1: 0-1: altamente resistente; 3: 1,1 – 3: moderadamente resistente; 6: 3,1 – 6 moderadamente suscetível; 9: 6,1 – 9: suscetível; 12: 9,1 – 12: altamente suscetível



**Figura 13.** Frequência de classes de resistência (à esquerda) e porcentagem de classes de resistência apresentada pelos clones (à direita) apresentadas pelos clones do lote 3 (AR – altamente resistente; MR – moderadamente resistente; MS – moderadamente suscetível; S – suscetível; AS – altamente suscetível)

**Tabela 1.** Lista de lotes e clones avaliados. Legenda: altamente resistente (AR); moderadamente resistente (MR); moderadamente suscetível (MS); suscetível (S) e altamente suscetível (AS)

	<b>CLONE</b>	<b>TAMANHO DE LESÃO</b>	<b>RESISTÊNCIA</b>
<b>LOTE 1</b>	1	8,17	MS
	2	2,4	MR
	3	3,34	MR
	4	5,65	MR
	5	3,86	MR
	6	2,73	MR
	7	2,17	MR
<b>LOTE 2</b>	8	2,54	MR
	9	6,70	S
	10	2,19	MR
	11	0,73	AR
	12	3,16	MS
	13	4,54	MS
	14	0,97	AR
	15	5,28	MS
	16	2,09	MR
	17	2,94	MR
	18	4,77	MS
<b>LOTE 3</b>	19	2,45	MR
	20	1,96	MR
	21	1,46	MR
	22	2,53	MR
	23	1,04	MR
	24	1,01	MR
	25	2,35	MR
	26	1,11	MR
	27	1,06	MR
	28	0,98	AR
	29	1,47	MR
	30	1,75	MR
	31	2,01	MR
	32	1,85	MR
	33	1,52	MR
	34	0,88	AR
	35	1,34	MR
	36	1,56	MR
	37	2,24	MR

## 4.2 Caracterização anatômica da madeira

### 4.2.1 Caracterização macroscópica

Devido ao tamanho das amostras utilizadas, não foi possível observar todas as características. Porém, pode-se observar a presença de camadas de crescimento distintas, vasos solitários e arranjo dos vasos em diagonal (figura 14).

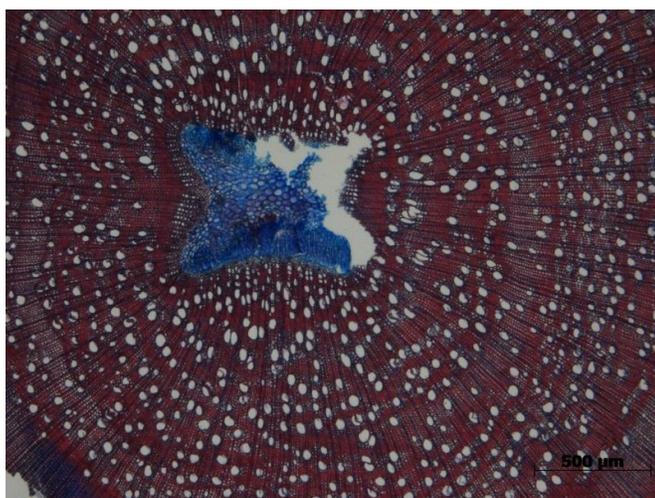
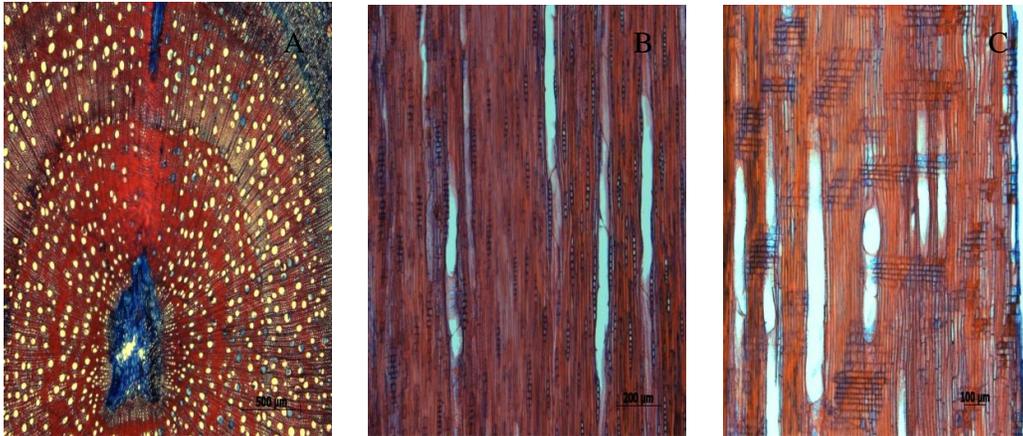


Figura 14. Camadas de crescimento em vista transversal

### 4.2.2 Caracterização microscópica

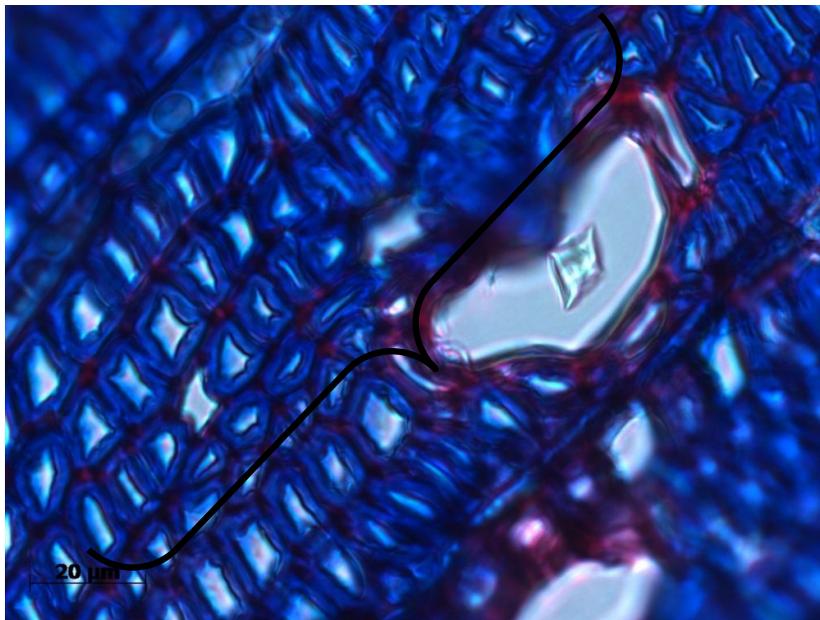
**Camadas de crescimento:** presentes – **Vasos:** porosidade difusa; vasos exclusivamente solitários e com arranjo em diagonal; tiloses de origem traumática presentes; placas de perfuração simples; pontoações intervasculares alternas; pontoações raio-vasculares iguais às pontoações intervasculares. – **Parênquima axial:** presença de parênquima vasicêntrico. – **Raios:** exclusivamente solitários; com corpo formado por uma faixa de células eretas, duas fileiras de células quadradas e corpo de células procumbentes; presença de conteúdo. – **Fibras:** com pontoações simples; não septadas; parede celular fina a espessa; presença de camada de fibras gelatinosas. – **Estrutura estratificada:** ausente. – **Elementos secretores:** ausentes. – **Inclusões minerais:** ausentes.



**Figura 15.** Anatomia da madeira de eucalipto de acordo com os três planos: transversal (A), longitudinal tangencial (B) e longitudinal radial (C) (escala: 500μm; 200 μm e 100 μm respectivamente)

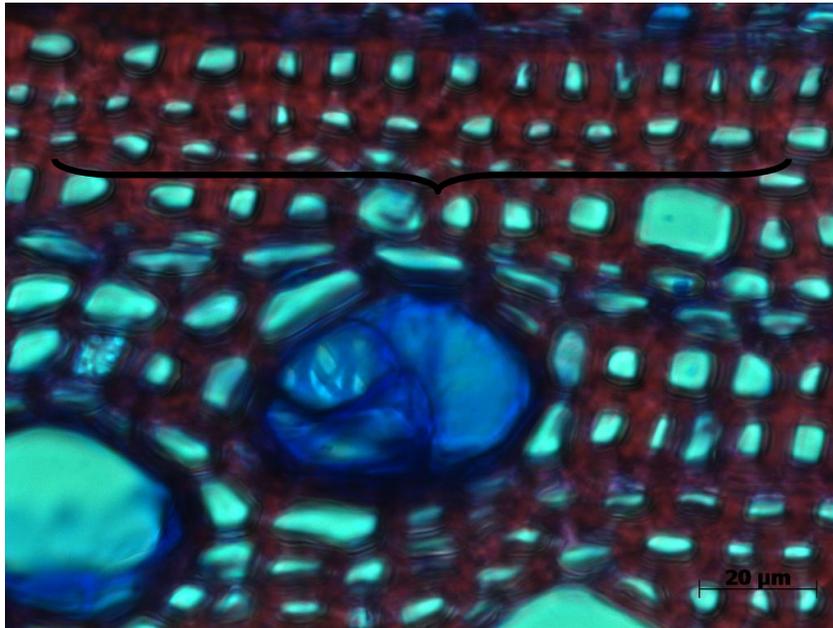
Pode-se observar:

a) A ocorrência de camadas de fibra gelatinosa em todos os materiais pela formação de lenho de tração devido a maneira como as mudas se desenvolveram (figura 16);



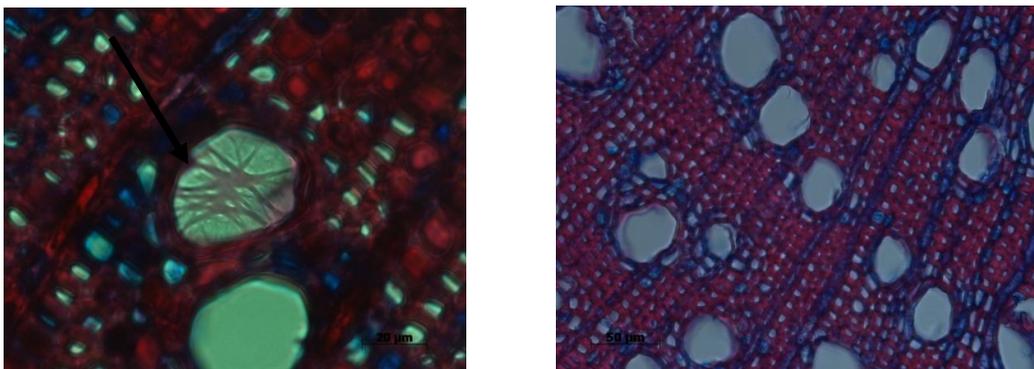
**Figura 16.** Camada de fibras gelatinosas devido à formação de lenho de tração (em azul).

b) Fibras com paredes muito espessas, fato que podem contribuir para a restrição da colonização da planta pelo patógeno nos materiais altamente e moderadamente resistentes (figura 17);



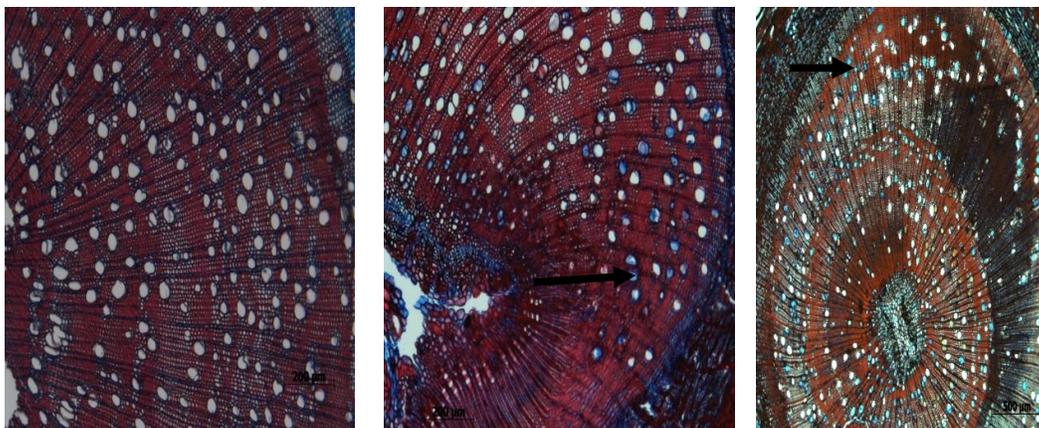
**Figura 17.** Secção transversal, mostrando fibras com paredes espessas (indicada pela seta)

c) A suspeita de ocorrência, em alguns casos, de lignificação do micélio do patógeno dentro do elemento de vaso (figura 18);



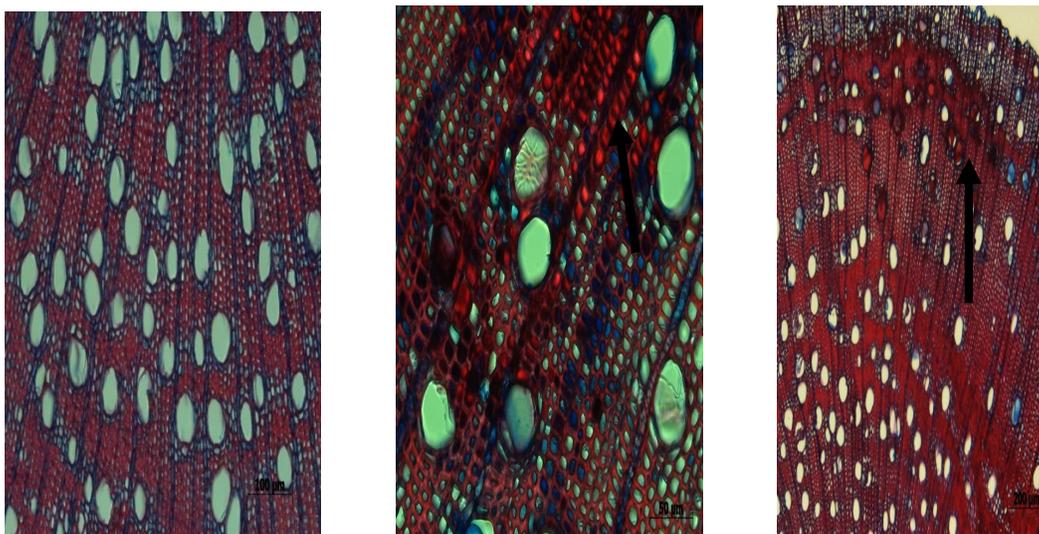
**Figura 18.** Secção transversal, mostrando vaso colonizado pelo fungo, com suspeita de lignificação do micélio (indicado pela seta) na foto à esquerda, em comparação com a testemunha (foto à direita)

d) A formação de tiloses traumáticas nos materiais altamente e moderadamente resistentes, evidenciada pela sua formação do exterior para o inteiro do caule, como resposta à inoculação das mudas (figura 19);



**Figura 19.** Secção transversal, mostrando a presença de tiloses traumática (apontadas pelas setas; da esquerda para direita: testemunha, material altamente resistente e material moderadamente resistente)

e) Presença de compostos de natureza aromática, mostrados no plano transversal na figura 20, nos materiais altamente e moderadamente resistentes, os quais foram submetidos a testes histoquímicos.

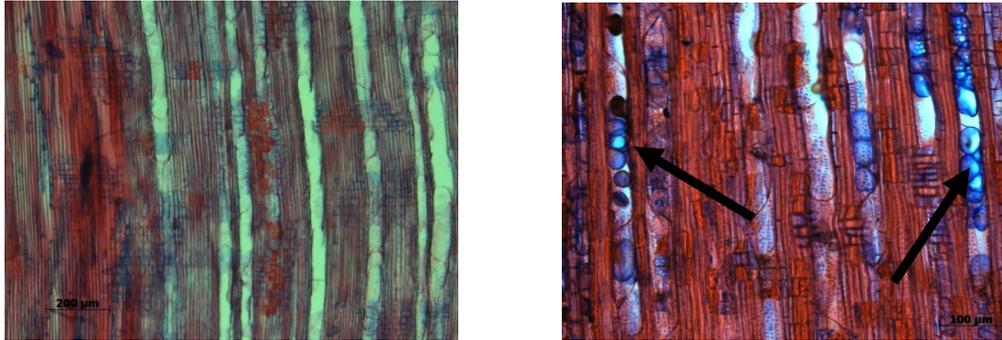


**Figura 20.** Secção transversal, mostrando a presença de compostos de natureza aromática (da esquerda para direita: testemunha, material altamente resistente e material moderadamente resistente)

A presença de tecidos com células de paredes espessas pode contribuir para com a restrição da colonização das plantas por fitopatógenos. No caso de folhas, por exemplo, o xilema e as fibras esclerenquimáticas, ricas em lignina, podem interromper o avanço de fungos e bactérias nesses tecidos, originando sintomas denominados de manchas angulares (AGRIOS, 2004). Esses sintomas, como os que ocorrem em folhas de pepino infectadas por *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* e folhas do algodoeiro infectadas por *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum*, resultam da capacidade dos patógenos em colonizar somente as áreas entre as nervuras. Essa restrição da colonização pode levar a uma redução do inóculo, bem como um menor número de folhas doentes por planta (PASCHOLATI & LEITE, 1995).

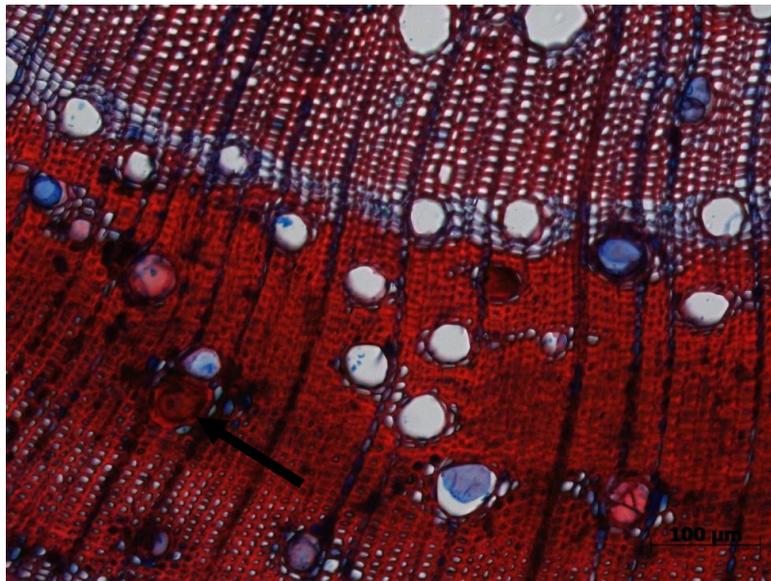
A lignina é uma das substâncias mais importantes da parede celular, podendo estar presente na lamela média e nas paredes primária e secundária. A lignificação, a qual pode ocorrer como antecessora da degeneração citoplasmática, em depósitos extracelulares e nas paredes das células, exibe um alto potencial de contribuição na defesa das plantas, podendo interferir no crescimento de patógenos através da modificação química das paredes celulares, tendo como resultado um aumento na resistência das paredes à ação de enzimas degradadoras da mesma, na difusão de toxinas do patógeno para o hospedeiro e de nutrientes e água do hospedeiro para o patógeno (PASCHOLATI & LEITE, 1995). Além disso, patógenos também podem ser lignificados, sendo seu crescimento no interior do hospedeiro paralisado. A hifa de penetração dos fungos pode sofrer a deposição de material celulósico e lignina, formando um tubo lignífero, que impede o progresso da hifa no interior do citoplasma (DICKINSON, 2000) (figura 18).

As tiloses (figura 21) são formadas nos elementos de vaso em resposta a estresses abióticos, envelhecimento e/ou invasão por patógenos vasculares e à cavitação (formação de bolhas de ar na coluna de água do vaso condutor). O protoplasma das células parenquimáticas adjacentes ao elemento de vaso sofre um processo de hipertrofia e se projeta para o interior do vaso através das pontuações. Essas projeções protoplasmáticas podem aumentar em tamanho e número no interior dos vasos, obstruindo parcial ou totalmente os mesmos. Essa obstrução restringirá o transporte de água, bem como poderá conter o avanço do patógeno para tecidos saudáveis do hospedeiro (DICKINSON, 2000).



**Figura 21.** Secção longitudinal radial, mostrando a presença de tiloses (indicadas pelas setas); foto à esquerda pertence à testemunha

De acordo com Agrios (2004), a formação de tiloses pode contribuir com a resistência da planta somente quando ocorre precocemente e nas áreas próximas ao sítio inicial de infecção. De uma maneira geral, plantas resistentes a murchas vasculares exibem a capacidade de formar maiores quantidades de tiloses do que plantas suscetíveis. A restrição de movimentação do patógeno dada pelas tiloses é seguida pelo acúmulo de terpenóides fungitóxicos (figura 22).



**Figura 22.** Secção transversal corada com safrablue, mostrando a presença de tiloses, bem como a presença de compostos fenólicos nas células adjacentes aos vasos

### 4.3 Testes histoquímicos

Os compostos fenólicos são responsáveis pelo sabor, odor e coloração de diversos vegetais. Além disso, constituem um importante grupo de composto que atua na proteção das plantas contra os raios UV, insetos, fungos, vírus e bactérias. Há inclusive certas espécies vegetais que desenvolveram compostos fenólicos para inibir o crescimento de outras plantas competidoras (PERES, 2007).

Para todos os materiais testados, o teste para presença de compostos fenólicos foi positivo (fotos 23 a 31), sugerindo sua ação contra *Ceratocystis fimbriata*.



Figura 23

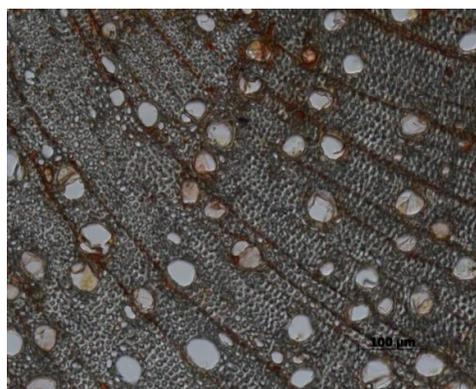


Figura 24



Figura 25

**Figuras 23, 24 e 25.** Secções transversais tratadas com cloreto de ferro III, evidenciando o resultado positivo do teste para compostos fenólicos (no sentido horário: testemunha, material altamente resistente e material moderadamente resistente)

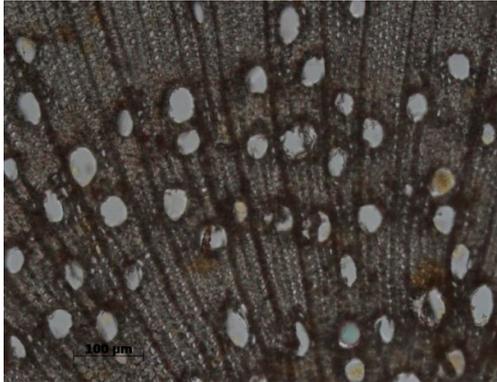


Figura 26

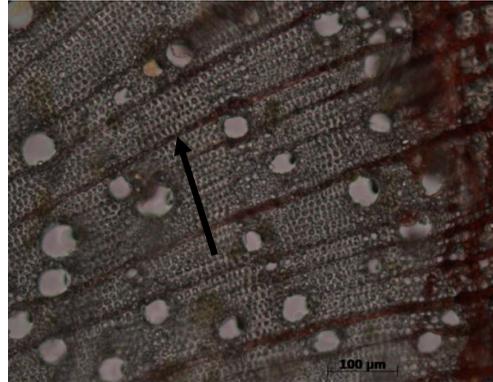


Figura 27

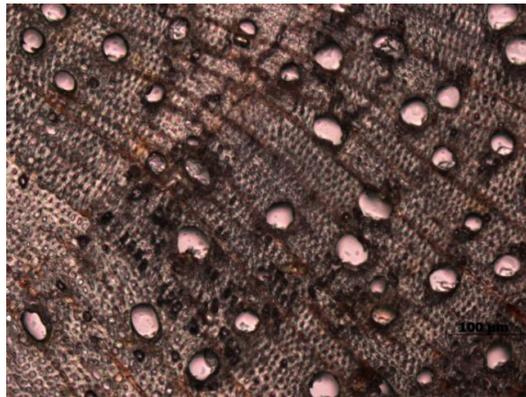


Figura 28

**Figuras 26 a 28.** Testes histoquímicos para compostos fenólicos com corante cloreto de ferro III a 10%, mostrados nas secções transversais em maior aumento (no sentido horário: testemunha; material altamente resistente e material moderadamente resistente);



Figura 29

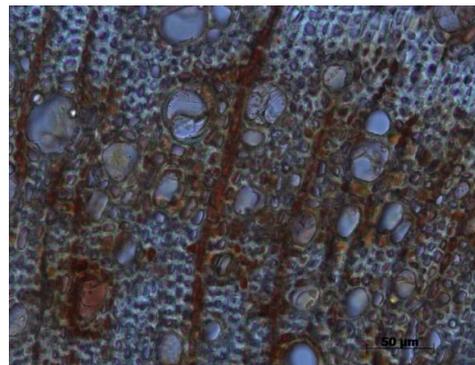


Figura 30

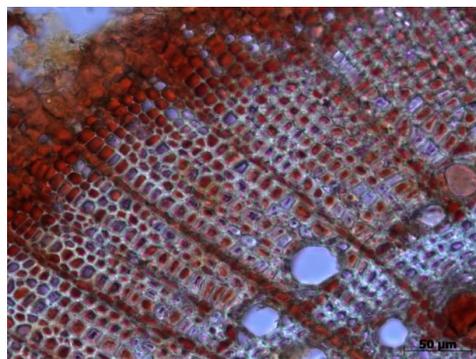


Figura 31

**Figura 29 a 31.** Testes histoquímicos para compostos fenólicos com corante cloreto de ferro III a 10%, mostrados nas secções radiais (em sentido horário: testemunha; material altamente resistente e material moderadamente resistente)

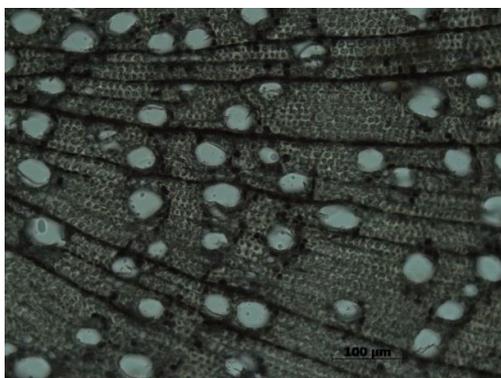


Figura 32

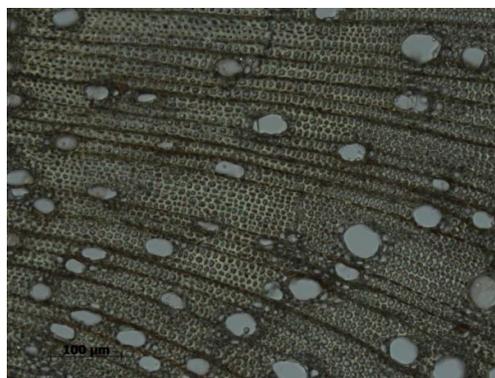


Figura 33



Figura 34

**Figuras 32 a 34.** Secções transversais tratadas com lugol, evidenciando o resultado positivo para presença de amido (em sentido horário: testemunha, material altamente resistente e material moderadamente resistente)

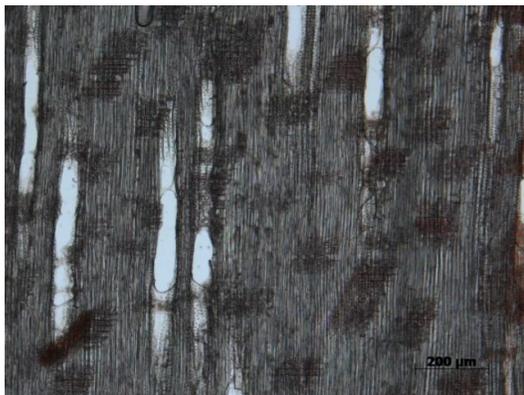


Figura 35

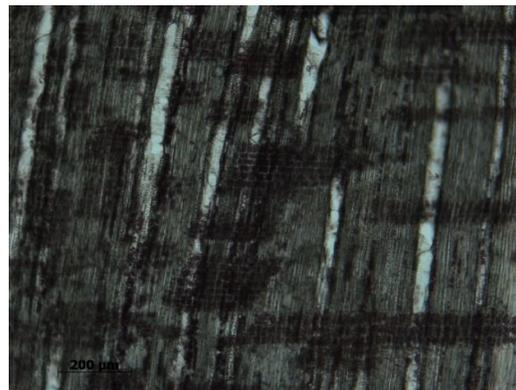


Figura 36



Figura 37

**Figuras 35 a 37.** Secções longitudinais radiais tratadas com lugol, evidenciando a grande quantidade de amido presente nas células do raio (em sentido horário: testemunha, material altamente resistente e material moderadamente resistente)

Diferentes respostas foram encontradas quanto à formação dos mecanismos de resistência nos diferentes materiais, como pode ser visto na Tabela 2.

Pode-se dizer que a produção de compostos fenólicos foi induzida pelo patógeno, pois na testemunha eles estão ausentes, corroborando o resultado atingido por Veiga *et al.* (1992), onde a produção de um composto fenólico (tanino) foi apontado como um dos fatores que conferiam resistência a pragas e doenças ao cultivar de amendoim SO-909.

A formação de tiloses apresentou correlação positiva com o tipo de material, sendo maior nos materiais altamente resistente e ausente na testemunha.

A ausência de amido no material altamente resistente pode ser devido à sua quebra para produção de energia, que posteriormente foi mobilizada para formação de algum mecanismo de defesa. Já na testemunha, existe alta quantidade de amido, fato que pode estar relacionado à ausência do patógeno em seus tecidos. A diminuição na atividade fotossintética em tecidos doentes foi demonstrada por um grande número de pesquisadores, porém pode-se verificar um aumento da atividade, imediatamente após o início da interação com o patógeno, por um período bastante reduzido, podendo levar a um acúmulo anormal de amido (figuras 32 a 37), seguido, invariavelmente, pela diminuição da taxa de fotossíntese, devido ao surgimento de áreas cloróticas a necrosadas, onde ocorre a destruição de moléculas de clorofila (KENAGA, 1974). No caso de infecção por patógenos vasculares, os estômatos permanecem parcialmente fechados, a quantidade de clorofila é reduzida e a fotossíntese pára antes mesmo que a planta murche (AGRIOS, 2004).

As formações de tiloses e compostos fenólicos podem ser apontadas como possíveis marcadores de resistência estruturais e bioquímicos, respectivamente, pelo padrão de resposta observado para ambos, assim como a presença de taninos e pectinas foram apontados como possíveis marcadores de resistência na cultivar SO-909 de amendoim (VEIGA *et al.*; 1992).

**Tabela 2.** Ocorrência dos mecanismos de resistência nos cortes anatômicos do caule

RESISTÊNCIA	TILOSES		AMIDO		COMPOSTOS FENÓLICOS	
	BASE	ÁPICE	BASE	ÁPICE	BASE	ÁPICE
AR	+++	+	+	AUSENTE	+	++
MR	++	++	+++	+++	+++	+++
TESTEMUNHA	AUSENTE	AUSENTE	++	++	AUSENTE	AUSENTE

Onde:

Classes de resistência: AR = altamente resistente; MR = moderadamente resistente.

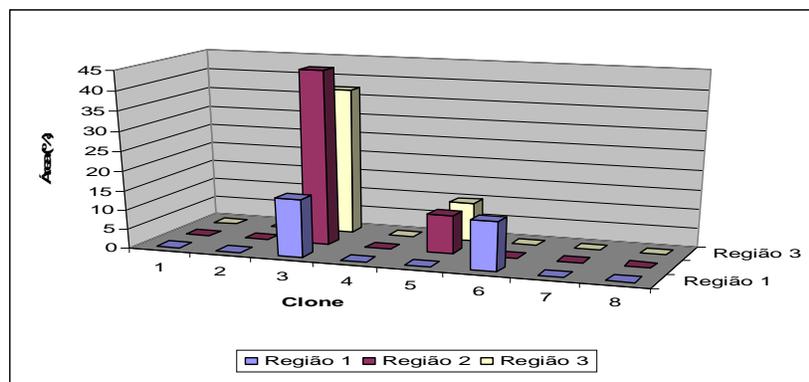
+ = presença em pequena quantidade

++ = presença em quantidade moderada

+++ = presença em grande quantidade

#### 4.4 Levantamento em campo e avaliação espacial (Análise de Dinâmica e Estrutura de Focos)

No levantamento total da área, localizada em Três Lagoas/Mato Grosso do Sul, foi observado alto grau de incidência da doença na área levantada. A doença foi detectada em três clones operacionais (figura 38).



**Figura 38.** Distribuição em área, por região e clone de murcha de *Ceratocystis*

##### 4.4.1 Análise de dinâmica e estrutura de focos

No Brasil, a técnica da ADEF foi utilizada em estudos na citricultura como: (i) a clorose variegada dos citros (CVC), *Xylella fastidiosa*, que apresentou um padrão de dispersão levemente agregado (LARANJEIRA *et al.*, 2004); (ii) testes de diagnose da CVC pelos métodos de sintomas e por sorologia DIBA PCR (NUNES *et al.*, 2001); (iii) diferenças dos padrões espaciais das plantas com cancro cítrico na presença ou ausência da larva minadora do citrus (*Phyllocnistis citrella* Stainton) (BASSANEZI *et al.*, 2003; BERGAMIM FILHO *et al.*, 2004) e (iv) morte súbita dos citros (MSC) em pomares do norte de São Paulo e sul do Triângulo Mineiro (JESUS JUNIOR & BASSANEZI, 2004). Para a cultura do eucalipto, a técnica da ADEF foi utilizada nos estudos da ferrugem causada por *Puccinia psidii* (MASSON, 2009), do cancro basal causado por *Cryosphorte cubensis* (SOUZA, 2007) e da seca de ponteiros em *Corymbia citriodora* causada por *Botryosphaeria ribis/ Dothyorella* sp. (COLTURATO, 2009). Deve-se ressaltar que ainda existem poucos estudos para a cultura do eucalipto, bem como outras culturas utilizando-se a técnica da ADEF.

No estudo da estrutura dos focos da murcha de *Ceratocystis*, foi quantificado o índice médio de forma de focos (IFF) e o índice médio de compactação de focos (ICF) (tabela 3).

**Tabela 3.** Análise da dinâmica e estrutura de focos da murcha de *Ceratocystis* na região de Três Lagoas, MS

AVALIAÇÃO	INCIDÊNCIA	NPD	NF	NFU	NMPF	IFF	ICF
1	10,77	28	14	8	2	0,77	1,01
2	13,08	34	17	10	2	0,83	1,18
3	25,71	72	17	6	4,24	0,80	1,08

Onde:

NPD = número de plantas doentes

NF = número de focos

NFU = número de focos unitários

NMPF = número médio de plantas por foco

IFF = índice de formação de foco

ICF = índice de compactação de focos

Os valores do índice de forma de focos (IFF), quando analisados em conjunto para as três avaliações, apresentaram-se em um grupo com IFF menores que 1, indicando que a murcha de *Ceratocystis* ocorreu em distribuição vertical na direção da linha de plantio, sugerindo haver crescimento maior do número de plantas doentes nas linhas ocupadas pelo foco, em detrimento do crescimento do foco e do número de linhas. Esse resultado assemelha-se ao obtido por Souza (2007) no estudo da distribuição espacial do cancro basal do eucalipto.

A dinâmica e estrutura de focos ADEF da murcha de *Ceratocystis* em clones de eucalipto permite conhecer o modo como ocorre o desenvolvimento espacial da doença. Os resultados obtidos parecem indicar que a ocorrência da murcha na região do estudo apresentou um número menor de focos unitários no povoamento de menor incidência; número reduzido de árvores por foco; maior compactação dos focos, indicando maior agregação e proximidade entre todas as plantas pertencentes ao foco, originando focos com maior comprimento na direção da linha de plantio.

Na parcela estudada, os valores de ICF indicam que a dinâmica espacial da murcha de *Ceratocystis* em clones de eucalipto tem leve tendência à compactação, numa tendência à agregação dos focos.

#### **4.4.2 Dinâmica espacial – Índice de Dispersão (ID)**

Os valores de incidência da murcha de *Ceratocystis* na parcela experimental instalada nas três avaliações realizadas estão apresentados na tabela 4. A cada valor de índice de dispersão foi aplicado o teste do qui-quadrado ( $\chi^2$ ). Os valores de ID > 1 foram estimados em ambos os tamanhos de quadrat calculados, sendo o maior valor para a terceira avaliação da parcela experimental, indicando a ocorrência de agregada da murcha de *Ceratocystis*. Tal agregação sugere que a murcha de *Ceratocystis* é causada por um agente biótico, com alto poder infectivo quando do plantio com materiais suscetíveis no campo, e de rápida e eficaz disseminação, infectando plantas sadias em diferentes direções, sendo preferencialmente no sentido da linha de plantio. A doença exibe um padrão de agregação desde baixos valores de incidência no campo. Pode-se dizer também que para a região de estudo o inseto vetor da doença ainda não está presente no ciclo do patógeno.

Outras doenças também apresentaram o mesmo padrão de agregação, tais como a hérnia das crucíferas (ROSA, 2010); a ferrugem e o cancro basal do eucalipto (MASSON, 2009; SOUZA, 2007).

Baixa agregação de plantas dentro dos quadrat foi registrada no patossistema citros x ácaro da leprose, em São Paulo (BASSANEZI & LARANJEIRA, 2007). Também em citros a dispersão espacial da CVC ocorreu de forma agregada, com focos que envolvem entre nove e quinze plantas (Laranjeira, 1997; 2004). Nesse estudo, os baixos percentuais de agregação de árvores com murcha obtidos através do índice de dispersão, dentro dos quadrat, devem estar relacionados com a baixa incidência da doença nos povoamentos nesse primeiro ciclo da cultura.

**Tabela 4.** Incidência da murcha de *Ceratocystis* na parcela experimental na região de Três Lagoas, MS; valores do Índice de Dispersão para dois tamanhos de quadrats para parcela experimental em região de Três Lagoas, MS e; valores do teste de  $\chi^2$  significativos para a agregação da murcha de *Ceratocystis*.

AVALIAÇÃO	INCIDÊNCIA(%)	ÍNDICE DE			
		DISPERSÃO (I.D.)		$\chi^2$ calculado > $\chi^2$ tabelado	
		QUADRAT		QUADRAT	
		2x2	2x5	2x2	2x5
1	10,77	143,38	5,19	7354	109
2	13,08	114,92	4,37	9176	129
3	25,71	383,60	13	26428	351

## 5. CONCLUSÕES

Há evidências da ação dos mecanismos de resistência (tilose, espessamento da parede de fibras, lignificação micelial e formação de compostos fenólicos) na contenção da infecção da planta pelo patógeno.

De acordo com os cortes anatômicos, pode-se dizer que a reação de defesa da planta após a inoculação com o patógeno é sistêmica, tendo em vista a formação dos mecanismos de resistência tanto na base, próximo ao ponto de inoculação, como no ápice da muda.

Foram encontrados materiais altamente resistentes à doença, que poderão futuramente ser fonte de resistência em programas de melhoramento genético e também utilizados para plantios em áreas onde sabidamente o patógeno é encontrado.

A doença apresentou interação clonal em campo, verificada no levantamento de área total, tendo em vista o ataque em materiais específicos.

Para a parcela estudada, a doença apresentou distribuição espacial agregada, com tendência a agregação de focos e distribuição vertical (na linha de plantio). Pode-se dizer que devido ao padrão de distribuição espacial apresentado pela doença, o inseto vetor da doença ainda não está presente na área estudada.

## 6. REFERÊNCIAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CELULOSE E PAPEL (BRACELPA). Disponível em: <<http://www.bracelpa.org.br>>. Acesso em: 16 fev. 2011.

AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. San Diego: Elsevier Academic Press, 5. ed. 2005. 922p.

ANGYALOSSY-ALFONSO, V. A. Caracterização anatômica da madeira e casca das principais espécies de *Eucalyptus*, cultivadas no Estado de São Paulo. **Silvicultura**, São Paulo, v. 8, n. 28, p. 720-725, 1983.

BAKER, C. J. et al. Genetic variability and host specialization in the Latin American clade of *Ceratocystis fimbriata*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 93, n. 10, p. 1274-1284, 2003.

BAKER, C. J.; HARRINGTON, T. C. *Ceratocystis fimbriata*. Kew, Surrey: CABI Publishing, 2004. 14 p.

BARNES, I. et al. *Ceratocystis pirilliformis*, a new species from *Eucalyptus nitens* in Australia. **Mycologia**, Corballis, v. 95, n. 5, p. 865-871, 2003.

BASSANEZI, R. B. et al. Spatial and temporal analyses of citrus sudden death as a tool to generate hypotheses concerning its etiology. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 93, n. 4, p. 502-512, 2003.

BEDENDO, I. P. Doenças vasculares. In: AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H. (Eds.). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 3. ed. São Paulo: Ceres, 1995. v. 1, p. 838-847.

BENT, A. F. Plant disease resistance genes: functions meets structure. **The Plant Cell**, Rockville, v. 8, n. 10, p. 1757-1771, 1996.

BERGAMIN FILHO, A.; AMORIM, L. **Doenças de plantas tropicais: epidemiologia e controle econômico**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1996. 289 p.

BERGAMIN FILHO, A.; HAU, B.; AMORIM, L.; JESUS JUNIOR, W. C. Análise espacial de epidemias. In: VALE, F. R.; JESUS JUNIOR, W.C; ZAMBOLIM, L.

(Eds.). **Epidemiologia aplicada ao manejo de doenças de plantas**. Belo Horizonte: Perfil, 2004. p. 193-240.

BERTOLUCCI, F.; REZENDE, G.; PENCHEL, R. Produção e utilização de híbridos de eucalipto. **Silvicultura**, São Paulo, v. 51, n. 8, p. 12-16, 1995.

BASSANEZI, R. B; LARANJEIRA, F. F. Spatial patterns of leprosis and its vector in commercial citrus groves in Brazil. **Plant Pathology**, Malden, v. 56, p. 97-106, 2007.

BLAZQUEZ, C. H.; OWEN, J. H. Histological studies of *Dothidella ulei* on susceptible and resistant *Hevea* clones. **Phytopathology**, St. Paul, v. 53, n. 1, p. 58-65, 1963.

CAMARGO, L. E. A. Análise genética da resistência e da patogenicidade. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 3. ed. São Paulo: Ceres, 1995. v. 1. p. 470-492.

COLTURATO, A.B. **Epidemiologia e manejo da seca de ponteiros de *Corymbia citriodora* (*Botryosphaeria ribis*/ *Dothyorella* sp.)**. 2009. 68 f. Tese (Doutorado em Agronomia /Proteção de Plantas)-Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2009.

DADSWELL, H. E. Methods for the identification of the light-colored woods of the genus *Eucalyptus*. **Bulletin CSIRO**, Melbourne, v. 67, n. 5, p. 1-84, 1934.

DANGL, J. L.; JONES, J. D. Plant pathogens and integrated defense responses to infection. **Nature**, Nova York, v. 411, n. 6839, p 826-833, 2001.

DANIEL, M.; PURKAYASTHA, R. P. **Handbook of phytoalexin metabolism and action**. New York: Marcel Dekker, 1995. 615 p.

DICKINSON, W. C. **Integrative plant anatomy**. San Diego: Academic Press, 2000. 533 p.

DOMINGUEZ, R. P. F.; VELÁSQUEZ, F. Selección de plantas de caçao (*Theobroma cacao* L.) por resistência al hongo *Ceratocystis fimbriata*. **Revista de la Facultad de Agronomía de la Universidad Central de Venezuela**, Maracay, v. 6, n. 1, p. 57-73, 1972.

ELDRIDGE, K. G. et al. Eucalypt domestication and breeding. Oxford: **Oxford Science Publications**, 1994. 288 p.

ELLIOTT, J. M. Some methods for the statistical analysis of samples of benthic invertebrates. 2. ed. Cumbria: Fresh Biological Association, 1983, 160 p. (Scientific Publication, 25).

FERREIRA, F. A. **Patologia florestal**: principais doenças florestais no Brasil. Viçosa, Sociedade de Investigações Florestais, 1989. 570 p.

FERREIRA, F. A. et al. Murcha de *Ceratocystis* em eucalipto no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**. Brasília, v. 24, p. 284, 1999. Suplemento.

FERREIRA, F. A. Constatação rápida de *Ceratocystis fimbriata* na doença murcha de *Ceratocystis* em eucalipto por meio de cortes histopatológicos à mão livre. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 25, p. 372, 2000. Suplemento.

FERREIRA, F. A.; MILANI, D. **Diagnose visual e controle das doenças abióticas e bióticas do eucalipto no Brasil**. Mogi Guaçu: International Paper, 2002. 104 p.

FERREIRA, F. A. et al. Sintomatologia da murcha de *Ceratocystis fimbriata* em eucalipto. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 30, n. 2 p. 155-162, 2006.

FLOR, H. H. The complementary genic systems in flax and flax rusts. **Advance Genetic**, New York, v. 8, p. 29-54, 1956.

FOELKEL, C. E. B.; ZVINAKEVICIUS, C; ANDRADE, J. O. M. O cancro do eucalipto e sua influência sobre a qualidade da celulose Kraft. **Cenibra Pesquisa**, Belo Oriente, n. 58, 1978. 34 p.

FOELKEL, C. As plantações de florestas no Brasil. In: BORÉM, A. (Ed.). **Biotecnologia florestal**. Viçosa: Suprema Gráfica e Editora, 2007. p. 13-24.

FURTADO, E. L. et al. **Doenças do eucalipto e coleta de materiais para análise patológica**. Botucatu: Votorantim Celulose e Papel, 2008. 56 p.

GARCIA, D. et al. Chemical and structural barriers to *Microcyclus ulei*, the agent of South American leaf blight, in *Hevea* spp. **European Journal of Forest Pathology**, Berlin, v. 25, n. 6/7, p. 282-292, 1995.

GARCIA, D. et al. Evaluation of the resistance of 36 *Hevea* clones to *Microcyclus ulei* and relation to their capacity to accumulate scopoletin and lignins. **European Journal of Forest Pathology**, Berlin, v. 29, n. 5, p. 323-338, 1999.

GOMIDE, J. L.; COLODETTE, J. L. Qualidade da madeira. In: BOREM, A. **Biociencia florestal**. Viçosa: Ed. Viçosa, 2007. 144 p.

GOTTWALD, T. R.; AVINENT, L. Analysis in the spatial spread of sharka (plum pox virus) in apricot and peach orchards in eastern Spain. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 79, n. 3, p. 266-278, 1995.

GOTTWALD, T. R.; CAMBRA, M; MORENO, P; CAMARASA, E; PIQUER, J. Spatial and temporal analyses of citrus tristeza virus in eastern Spain. **Phytopathology** Saint Paul, v. 86, n. 1, p. 45-55, 1996.

HUGHES, G.; MADDEN, L. V. Aggregation and incidence of disease. **Plant Pathology**. Malden, v. 41, n. 6, p. 657-660, 1992.

IZQUIERDO, J. E. Comportamiento de genotipos de cafetas ante *Ceratocystis fimbriata*. **Cienc.Tec. Agric. Cafe y Cacao**, Turrialba, v. 1, n. 1/2, p. 53-59, 1988.

JESUS JUNIOR, W. C.; BASSANEZI, R. B. Análise da dinâmica e estrutura de focos da morte súbita dos citros. **Fitopatologia Brasileira**. Brasília, v. 29, n. 4, p. 399-405, 2004.

JOHANSEN, S. A. **Plant microtechnique**. New York: Mcgraw Hill Book Co, 1940. 523 p.

KEEN, N. T. Gene-for-gene complementarity in plant-pathogen interactions. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v. 24, p. 447-463, 1990.

KENAGA, C. B. **Principles of phytopathology**. Lafayette: Balt Publishers, 1974. 654 p.

LARANJEIRA, F. F. **Dinâmica espacial e temporal da clorose variegada dos citros**. 1997. Dissertação (Mestrado em Proteção de Plantas)-Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1997.

LARANJEIRA, F. F.; BERGAMIN FILHO, A; AMORIM, L. Dinâmica e estrutura de focos da clorose variegada dos citros (CVC). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 23, n. 1, p. 36-41. 1998.

LARANJEIRA, F. F. et al. Análise espacial do amarelecimento fatal do dendezeiro como ferramenta para elucidar sua etiologia. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 23, n. 3, p. 397-403, 1998.

LARANJEIRA, F. F. et al. Dinâmica espacial da clorose variegada dos citros em três regiões do Estado de São Paulo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 1, p. 56-65, 2004.

LAU, D. et al. Resistência a doenças: aplicações em patossistemas florestais. In: BOREM, A. **Biocologia florestal**. Viçosa: Ed. Viçosa, 2007. p. 143-173.

LINDSAY, W. P.; LAMB, C. J.; DIXON, R. Microbial recognition and activation of plant defense systems. **Trends in Microbiology**, Amsterdam, v. 1, n. 5, p. 181-186, 1993.

LO, L. C. et al. Phytoalexin accumulation in sorghum: identification of a methyl ester of luteolinidin. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, Nova York, v. 49, n. 1, p. 21-31, 1996.

MACHADO, P. S. et al. Resistência interespecífica de *Eucalyptus* à murcha-de-ceratocystis, causada por *Ceratocystis fimbriata*. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, DF, v. 33, p. 268, 2008. Suplemento.

MADDEN L. V. et al. Spatial pattern analysis of the incidence of aster yellows disease in lettuce. **Researches on Population Ecology**, Kyoto, v. 37, p. 279-289, 1995.

MADDEN L.V.; HUGHES, G. Plant disease incidence: distributions, heterogeneity and temporal analysis. **Annual Review Phytopathology**, v. 33, p. 529-564, 1995.

MANN, J. **Chemical aspects of biosynthesis**. Oxford: Oxford University Press, 1994. 96p.

MARTIN, G. B.; BOGDANOVA, A. J.; SESSA, G. Understanding the function of plant disease resistance proteins. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 54, p. 23-61, 2003.

MASSON, M. V. **Ferrugem do eucalipto: planejamento evasivo, estimativa de dano e análise da viabilidade do controle químico.** 2009. 167 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Proteção de Plantas)-Faculdade de Ciências Agrônomicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2009.

NIMCHUK, Z. et al. Recognition and response in plant immune system. **Annual Review Genetics, Palo Alto**, v. 37, p. 579-609, 2003.

NELSON, S. C. Spatiotemporal distance class analysis of plant disease epidemics. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 85, n. 1. p. 37-43, 1995.

NELSON, S. C. A simple analysis of disease foci. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 86, n. 4, p. 332-339, 1996.

NUNES, W. M. C. et al. Dinâmica espacial de foco da clorose variegada dos citros (CVC) avaliada por meio da sintomatologia e serologia. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 23, n. 5, p. 1215-1219, 2001.

PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B. Hospedeiro: mecanismos de resistência. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos.** 3. ed. v.1. São Paulo: Ceres, 1995. p. 417-452.

PEREIRA, J. A. Contribuição para a identificação macrográfica das nossas madeiras. **Anuario da Escola Polytechnica**, São Paulo, Bulletin 9, p. 1-165, 1933.

PERES, L. E. P. **Metabolismo secundário.** Disponível em: <[www.ciagri.usp.br/lazaropp/FisioVegGradBio/MetSec.pdf](http://www.ciagri.usp.br/lazaropp/FisioVegGradBio/MetSec.pdf)>. Acesso em: 04 jan. 2010.

ROSA, D.D. ***Plasmodiophora brassicae* X Brassicaceas: Variabilidade genética e patogênica, epidemiologia da doença e efeito de exsudatos radiculares e plantas não brassicaceas no controle.** 2010. 100 f. Tese (Doutorado em Agronomia/Proteção de Plantas)-Faculdade de Ciências Agrônomicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2010.

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

ROUX, J. et al. Diseases in plantation *Eucalyptus* in Uganda. **South African Journal of Science**. Pretoria, v. 97, n. 1/2, p. 16-18, 2001.

ROUX, J. et al. *Ceratocystis* species infecting stem wounds on *Eucalyptus grandis* in South Africa. **Plant Pathology**, Malden, v. 53, n. 4, p. 414-421, 2004.

SANIER, C. et al. Relationship between resistance to *Microcyclus ulei* and clonal foliar phenolics of rubber trees. **Journal Rubber Research Institute of Malaysia**, Kuala Lumpur, v. 7, n. 1, p. 38-59, 1992.

SOUZA, S. E. **Dinâmica espaço-temporal e danos do cancro basal em *Eucalyptus grandis***. 2007. 160 f. Tese (Doutorado em Agronomia/Proteção de Plantas). Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2007.

TRINDADE, D. R.; FURTADO, E. L. Doenças da seringueira. In: KIMATI, H. et al. (Eds). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 3. ed. v.2. São Paulo: Ceres, 1997. p. 628-641.

VALE, F. X. R.; ZAMBOLIN, L. Influência da temperatura e da umidade nas epidemias de doenças de plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Viçosa, v. 4, p. 149-207, 1996.

VANDERPLANK, J. E. **Plant diseases: epidemics and control**. Academic Press: New York, 1963. 349 p.

VEIGA, R. F. A. et al. Análise histoquímica foliar do amendoim: genótipos TATU e SO-909. **Bragantia**, Campinas, v. 51, n. 2, 1992, p. 129-149.

WAUGH, G. Sawing of young fast-grow eucalyptus. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL SOBRE PRODUTOS SÓLIDOS DE MADEIRA DE ALTA TECNOLOGIA, 1., 1998, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte, 1998. p. 69-81.

WELCH, M. B. A method of identification of some hardwoods. **Journal and Proceedings of the Royal Society New South Wales**, Sydney, v. 56, p. 241-248, 1922.

ZAUZA, E. A. V. et al. Resistance of *Eucalyptus* clones to *Ceratocystis fimbriata*. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 88, n. 7, 2004. p.758-760.

ZULUAGA, V.; VALENCIA, A. G.; GONZALEZ, J. Contribucion al estudio de la naturaleza de la resistencia del cafeto a *Ceratocystis fimbriata* (Ell. & Haslt.) Hunt. **Cenicafe**, Chinchiná (Caldas), v. 22, n., p. 43-68, 1971.