

DANIELA ANDRADE NEVES

**CONDIÇÕES FAVORÁVEIS À MANCHA FOLIAR CAUSADA POR
Xanthomonas axonopodis EM EUCALIPTO**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2007

DANIELA ANDRADE NEVES

**CONDIÇÕES FAVORÁVEIS À MANCHA FOLIAR CAUSADA POR
Xanthomonas axonopodis EM EUCALIPTO**

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

APROVADA: 20 de março de 2007.

Prof. Luiz Antônio Maffia
(Co-Orientador)

Dr. Douglas Lau
(Co-Orientador)

Prof. José Rogério de Oliveira

Dr. Olinto Liparini Pereira

Prof. Acelino Couto Alfenas
(Orientador)

*“Chegar ao objetivo é importante se assimilamos
as lições aprendidas no percurso.
A conquista, além disso, transforma-se
em um ponto de partida para iniciar outra busca e
continuar aprendendo”.*

Paulo Coelho

À minha mãe Noêmia.

Aos meus avós Nazareth e Sebastião.

À minha tia Geninha.

*Aos meus irmãos João Victor e
Thiago.*

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus, fonte de vida, amor e sabedoria.

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realização dos cursos de graduação em Engenharia Florestal e de pós-graduação em Fitopatologia.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelas bolsas de pesquisa concedidas durante a Iniciação Científica e pós-graduação.

Ao professor Acelino Couto Alfenas, pela amizade, confiança, pelos ensinamentos e pelas inúmeras oportunidades que me permitiram o desenvolvimento profissional.

Ao professor Luiz Antônio Maffia, pelo suporte estatístico, pelos ensinamentos e pela amizade.

Ao Dr. Douglas Lau, pela valiosa contribuição durante a condução dos experimentos, pelas sugestões, pela orientação e imensa paciência e amizade.

À Miranda e ao Lúcio, pela amizade, colaboração, pelas sugestões e palavras de incentivo.

Ao Aderlan, pelas sugestões e pela amizade.

À Dra. Sandra Kunieda, ao Dr. Edgard Picoli e ao Léo Batata, pela amizade e pelos primeiros ensinamentos no Laboratório de Patologia Florestal.

Ao Miguel Angel e ao Riva, pelas sugestões e colaborações.

Aos amigos Ricardo Roberto, Léo e Marisangela, pela amizade e ajuda nos trabalhos.

Ao Prof. Olinto e ao Prof. Jose Rogério, pela disponibilidade e amizade.

À Márcia Maria Brandão, pela grande amizade, pelo excelente convívio e pela grande disposição em nos ajudar.

À Talyta, pela grande amizade, pelas sugestões e pelo incentivo.

Ao Dr. Juan Rocabado, pela ajuda.

Ao Dr. Reginaldo Mafia pelas sugestões.

A todos os amigos do Laboratório de Patologia Florestal, pela agradável convivência durante a realização dos trabalhos.

À minha mãe, pelo apoio em todos os momentos, pela confiança, pela paciência, pelo amor e carinho e, especialmente, pelo incentivo na busca dos meus ideais e sacrifício para a realização dos meus sonhos.

Aos meus irmãos João Victor e Thiago, pelo amor, companheirismo e pela amizade.

Ao Jayme, por todo amor, companheirismo, incentivo e paciência.

Ao Tio Toninho, pela ajuda constante em todos os momentos da minha vida profissional.

Às grandes amigas Michelle, Fernanda e Renatinha, pelos ótimos momentos.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para que este trabalho fosse concluído com êxito.

BIOGRAFIA

DANIELA ANDRADE NEVES, filha de Maria Noêmia Maffia Andrade e João Silva Neves, nasceu em Viçosa, Estado de Minas Gerais, em 22 de dezembro de 1978.

Ingressou em 1999, no curso de Engenharia Florestal da Universidade Federal de Viçosa (UFV). Em 2000, realizou estágio no Departamento de Engenharia Florestal, atuando no Projeto Guaporé, sob orientação do professor Guido Assunção Ribeiro.

Em 2001, iniciou suas atividades de Iniciação Científica junto ao Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária – BIOAGRO, no Laboratório de Patologia Florestal e Genética da Interação Planta – Patógeno, sob a orientação do professor Acelino Couto Alfenas. Conclui a graduação em 2004, no qual foi bolsista de aperfeiçoamento no Departamento de Fitopatologia, sob a orientação do professor Acelino Couto Alfenas.

Em fevereiro de 2005, iniciou o curso de Mestrado em Fitopatologia na mesma Instituição, sob a orientação do professor Acelino Couto Alfenas.

SUMÁRIO

RESUMO	viii
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO	1
2. MATERIAL E MÉTODOS	3
2.1. Material vegetal.....	3
2.2. Preparo do inóculo e inoculação	3
2.3. Avaliação da doença	4
2.4. Progresso da mancha foliar bacteriana.....	4
2.5. Distribuição dos sintomas da mancha foliar bacteriana.....	4
2.6. Quantificação e sintomatologia de <i>Xanthomonas axonopodis</i> em folhas de eucalipto em diferentes idades	5
2.7. Severidade da mancha foliar bacteriana sob diferentes períodos de câmara úmida	6
2.8. Incidência da bacteriose em mudas sob diferentes sistemas de irrigação....	6
2.9. Severidade da mancha foliar bacteriana sob diferentes temperaturas.....	7
2.10. Infecção bacteriana em eucalipto sob diferentes combinações de temperatura e tempo de câmara úmida.....	7
2.11. Análises estatísticas.....	7
3. RESULTADOS.....	9
3.1. Progresso da mancha foliar bacteriana.....	9
3.2. Distribuição dos sintomas da mancha foliar bacteriana.....	9
3.3. Quantificação e sintomatologia de <i>Xanthomonas axonopodis</i> em folhas de eucalipto em diferentes idades	10
3.4. Severidade da mancha foliar bacteriana sob diferentes períodos de câmara úmida	12
3.5. Incidência da bacteriose em mudas sob diferentes sistemas de irrigação..	12
3.6. Severidade da mancha foliar bacteriana sob diferentes temperaturas.....	13
3.7. Infecção bacteriana em eucalipto sob diferentes combinações de temperatura e tempo de câmara úmida.....	14
4. DISCUSSÃO	16
5. CONCLUSÕES	19
6. REFÊRENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	20

RESUMO

NEVES, Daniela Andrade, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2007. **Condições favoráveis à mancha foliar causada por *Xanthomonas axonopodis* em eucalipto.** Orientador: Acelino Couto Alfenas. Co-Orientadores: Luiz Antônio Maffia e Douglas Lau.

Xanthomonas axonopodis é atualmente um dos principais patógenos foliares da eucaliptocultura no Brasil. Induz manchas foliares e desfolha em mudas no viveiro e plantas jovens no campo. No entanto, pouco se conhece sobre as condições que favorecem a infecção. Assim, neste trabalho estudaram-se o estabelecimento e o desenvolvimento da mancha foliar bacteriana causada por *X. axonopodis* em eucalipto em diferentes idades da folha, sob diferentes períodos de molhamento foliar e temperatura. A severidade da doença aumentou com a idade da folha, sendo maior no terceiro par de folhas completamente expandido, a contar do ápice para a base. Constatou-se também no terceiro par de folhas maior nível de colonização bacteriana expressa em unidades formadoras de colônia (ufc)/cm² de área foliar. A ocorrência de água livre por 12 h na superfície da folha pré-inoculação foi essencial para o aumento da severidade da doença. Contudo, com o aumento da duração do período de molhamento foliar, ocorreu decréscimo na severidade da doença. A faixa de temperatura ótima para o desenvolvimento da doença foi entre 26 e 30°C. Os resultados obtidos permitiram determinar as condições ótimas para o estabelecimento da doença. Plantas a serem inoculadas devem ser mantidas em câmara de nevoeiro por 12 h pré-inoculação e, a seguir, transferidas diretamente para câmara de crescimento a 26 – 30°C. As avaliações de severidade devem ser realizadas aos 20 dias após inoculação no quarto par de folhas, no sentido ápice-base do ramo, e a desfolha, avaliada 30 dias após a inoculação. Essas condições devem ser empregadas em estudos da resistência -

como seleção de genótipos resistentes - e consideradas na definição de estratégias de controle, com base no manejo das condições de cultivo.

ABSTRACT

NEVES, Daniela Andrade, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, March of 2007. **Favorable conditions for leaf spot development in eucalyptus caused by *Xanthomonas axonopodis***. Adviser: Acelino Couto alfenas. Co-Advisers: Luiz Antônio Maffia and Douglas Lau.

Xanthomonas axonopodis has become one of the main leaf pathogens in Brazilian eucalyptus plantations. It causes leaf spots and defoliation in nursery seedlings and young plants in the field. There is, however, little information on the conditions favoring the infection. This work studied the establishment and development of bacterial leaf spot caused by *X. axonopodis* in eucalyptus at different leaf ages, under different leaf wetting periods and temperatures. Disease severity increased with leaf age, being higher in the third fully expanded leaf pair, from apex to base. In addition, higher level of bacterial colonization was found in the third leaf pair expressed as colony forming units (cfu)/cm² leaf area. The presence of free water on the leaf surface, for 12 h pre-inoculation, was essential for increasing disease severity. However, the extension of the leaf-wetting period caused a reduction in the disease severity. The optimum temperature range for disease development was between 26 and 30°C. The results allowed to determine the optimum conditions for the disease establishment. Plants should be kept in fog room for 12 h pre-inoculation and then immediately transferred to growth room at 26 - 30°C. Evaluations of severity should be carried out at 20 days after inoculation in the fourth leaf pair, from apex to base, and defoliation at 30 days after inoculation. Such conditions are to be used in resistance studies, such as selection of resistant genotypes and should be taken into consideration when defining control strategies based on the management of cultivation conditions.

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, entre as enfermidades foliares do eucalipto, a mancha foliar e a desfolha, causadas por bactérias, têm sido das mais frequentes e severas na maioria das regiões eucaliptocultoras do Brasil (Alfenas et al., 2004; Gonçalves, 2003). Recentemente, no biênio 2003/04, cerca de quatro milhões de mudas clonais foram descartadas em consequência da desfolha causada por bacteriose foliar (Alfenas, 2006). O primeiro registro de uma enfermidade bacteriana em eucalipto ocorreu nos anos 70, quando Truman (1974) descreveu a seca de ponteiros em *Corymbia citriodora* (Hook) Hill & Johnson, causada por *Xanthomonas campestris* pv. *eucalypti* (Truman 1974) Dye 1978 (= *Xanthomonas eucalypti* Truman 1974), em Sydney, Austrália. No Brasil, o primeiro relato da doença ocorreu em 1995, em mudas de *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden *E. grandis*, em viveiro da região de Itapetininga, São Paulo, e foi atribuída a *Pseudomonas cichorii* (Swingle 1925) Stapp 1928 (Pomella et al., 1995). Posteriormente, *Xanthomonas campestris* (Pammel 1895) Dowson 1939 foi detectada em mudas de *Eucalyptus* sp. em viveiro da região de Mogi Guaçu, São Paulo (Reis et al., 1996), e *Erwinia* sp. associada à seca de ponteiros de *E. grandis* (Maschio et al., 1997). Subseqüentemente, a enfermidade foi registrada em condições de viveiro e campo e atribuída a diferentes espécies de bactérias (Alfenas et al., 2001; Gonçalves et al., 2001; Ferreira & Milani, 2002).

Em 2003, Gonçalves, a partir de ampla amostragem de materiais doentes oriundos do Rio Grande do Sul, São Paulo, Minas Gerais, Bahia, Mato Grosso do Sul, Amapá e Pará, verificou por meio de análises bioquímicas e moleculares que a doença pode estar associada a *X. axonopodis*, *X. campestris*, *P. syringae*, *P. cichorii*, *Erwinia* sp., entre outras não identificadas (Gonçalves, 2003). No entanto, nove isolados foram inoculados por atomização de suspensão bacteriana,

e apenas *X. axonopodis*, *X. campestris* e *P. cichorii* foram patogênicas a plantas intactas, com eucalipto sendo a primeira predominante (Gonçalves, 2003).

A enfermidade causada por *X. axonopodis* incide em viveiro e campo, podendo provocar danos significativos em materiais genéticos muito suscetíveis sob condições favoráveis à infecção. Os sintomas caracterizam-se inicialmente por lesões encharcadas do tipo anasarca, internervurais, angulares, concentradas ao longo da nervura principal, nas margens da folha ou distribuídas aleatoriamente sobre o limbo. Com o progresso da doença, as lesões tornam-se de aspecto ressecado e coloração palha a marrom-clara, podendo conter orifícios no centro da lesão ou áreas recortadas do limbo em consequência do aborto da área necrosada (Gonçalves, 2003).

Ao microscópio, observa-se, pelo teste de exsudação em gota, a existência de “pus bacteriano”, que surge a partir dos tecidos lesionados. A diminuição da área fotossintética da planta, ocasionada por manchas foliares e desfolha precoce, resulta na redução do crescimento, principalmente em viveiros, onde as mudas ficam debilitadas, tornando-se inaptas para o plantio no campo.

Em viveiros, a doença incide mais intensamente em mudas irrigadas por aspersão, cuja lâmina de água sobre a folha favorece a dispersão, a multiplicação e a penetração do patógeno. A ocorrência de água livre na superfície foliar é indispensável à movimentação e penetração de bactérias fitopatogênicas em seus respectivos hospedeiros, uma vez que estas penetram principalmente por aberturas naturais, como os estômatos (Romeiro, 1995; Beattie et al., 1999). Quanto ao efeito da idade dos tecidos observa-se que há variação nos tipos de sintoma na planta; folhas velhas são mais suscetíveis à bacteriose foliar em *Eucalyptus* spp. (Neves et al., 2005).

Apesar da importância dessa doença, pouco se conhece acerca dos efeitos dos fatores do ambiente e da fenologia do hospedeiro sobre os processos iniciais na infecção e desenvolvimento da bacteriose em eucalipto, objeto do presente estudo. A determinação das condições ideais para o estabelecimento da doença é fundamental para subsidiar estudos sobre o patossistema *X. axonopodis*–eucalipto e embasar a determinação de estratégias de controle.

Assim, no presente trabalho estudou-se a influência do período de molhamento foliar, da temperatura e da idade da folha sobre o desenvolvimento da mancha foliar bacteriana causada por *X. axonopodis* em eucalipto.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material vegetal

Em todos os ensaios empregaram-se plantas do clone 1006, híbrido de *E. grandis* x *E. urophylla*, caracterizado previamente como suscetível a *X. axonopodis* (dados não publicados). Mudanças com aproximadamente 60 dias foram transplantadas para vasos com capacidade de 2 L, contendo mistura de solo e esterco de curral, na proporção de 3:1, e esterilizadas com brometo de metila a 80 cc/m³. As plantas foram mantidas em casa de vegetação, adubadas uma vez por semana com 30 mL de solução de Ouro Verde[®] NPK (15:15:20) a 7,5 g/L e inoculadas aproximadamente aos 45 dias após o transplante.

2.2. Preparo do inóculo e inoculação

Nos ensaios foi utilizado o isolado BSC 475 de *X. axonopodis*, obtido de folhas doentes de eucalipto do sul da Bahia (Gonçalves, 2003). Para preparo do inóculo, a bactéria foi semeada em meio de cultura 523 (Kado & Heskett, 1970), em placas de Petri, incubando-se a 28 °C. Após 48 horas adicionou-se solução salina (NaCl 0,85%) às placas e as colônias foram raspadas com o auxílio de uma alça de Drigalsky. A suspensão bacteriana obtida foi ajustada com auxílio de um espectrofotômetro (Beckman BU 640), para OD_{540nm}=0,1, o que equivale à concentração de 1x10⁸ufc/ml.

Exceto quando especificado, as plantas inoculadas foram incubadas por 12 h (36 μmol.m⁻².s⁻¹) em câmara de nevoeiro a 25 °C, e, a seguir, atomizadas com a suspensão bacteriana, com o auxílio de um pulverizador (5 L), munido de um bico do tipo leque n^o 1001 e válvula reguladora de pressão. O inóculo foi aplicado uniformemente em ambas as faces das folhas, sem atingir o ponto de escoamento superficial. Durante a condução dos experimentos, na casa de vegetação a

temperatura mínima variou de 18 a 22 °C, e a máxima, de 25 a 30 °C; na câmara de nevoeiro a temperatura média foi de 25 °C.

2.3. Avaliação da doença

Quantificou-se a porcentagem de área foliar lesionada, por meio de imagens digitalizadas e processadas no programa QUANT (Vale et al., 2003). Exceto quando especificado, avaliaram-se em cada planta seis folhas completamente expandidas.

2.4. Progresso da mancha foliar bacteriana

Foram inoculadas cinco plantas com suspensão bacteriana a 1×10^8 ufc/mL; o preparo do inóculo, a inoculação e avaliação da doença foram feitos como previamente descrito (itens 2.2 e 2.3). Depois de inoculadas, as plantas foram mantidas em câmara de nevoeiro por 24 h, sendo posteriormente transferidas para casa de vegetação. Avaliaram-se a desfolha causada pela doença aos 10, 20, 30 e 40 dias após a inoculação, em todos os ramos da planta, e a severidade em 18 folhas em expansão ou completamente expandidas de três ramos da planta, aos 10 e 20 dias após a inoculação. Empregou-se o delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições, sendo cada unidade experimental constituída por uma planta.

2.5. Distribuição dos sintomas da mancha foliar bacteriana

Para caracterizar o padrão de distribuição dos sintomas da mancha foliar, inocularam-se dez plantas com suspensão bacteriana a 1×10^8 ufc/mL, cujo preparo do inóculo, inoculação e avaliação da doença foram feitos conforme como previamente descrito (itens 2.2 e 2.3). Após as inoculações, as plantas foram mantidas em câmara de nevoeiro por 24 h, sendo posteriormente transferidas para casa de vegetação. A severidade da doença foi avaliada nas folhas 3, 4, 5, 6, 7 e 8, no sentido ápice–base de três ramos da planta (Figura 1), aos 20 dias após a inoculação. Empregou-se o delineamento inteiramente casualizado, com dez repetições por tratamento, sendo cada unidade experimental constituída por uma planta.

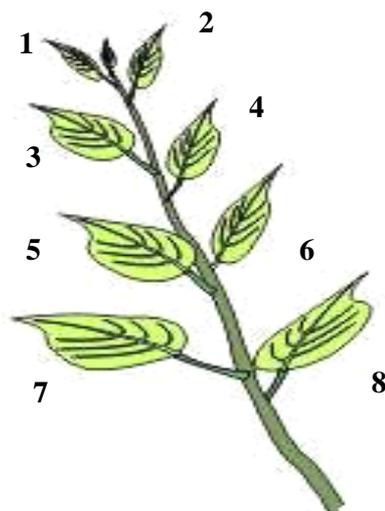


Figura 1 – Representação de ramos de eucalipto, indicando as folhas que foram avaliadas nos ensaios para determinação do efeito da idade foliar na colonização bacteriana e expressão dos sintomas.

2.6. Quantificação e sintomatologia de *Xanthomonas axonopodis* em folhas de eucalipto em diferentes idades

Para quantificar a colonização bacteriana em folhas em diferentes idades com sintomas distintos, empregou-se a técnica de microgota (Romeiro, 2001). Foram inoculadas 90 plantas com suspensão bacteriana a 1×10^8 ufc/mL, preparadas conforme descrito no item 2.2. Depois de inoculadas, as plantas foram mantidas em câmara de nevoeiro por 24 h, sendo posteriormente transferidas para casa de vegetação. Aos 0, 5, 10, 15, 20 e 25 dias após a inoculação, estimou-se o número de colônias bacterianas. Para isso, selecionou-se um ramo, no qual as folhas 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8 abaixo do ápice apresentavam sintomas distintos de infecção bacteriana. Destacou-se uma folha por estágio fenológico, da qual retiraram-se dois discos de 1 cm cada. As folhas foram desinfetadas com álcool 50% durante 30 s, hipoclorito de sódio 2% durante 2 min. e enxaguadas em água estéril. O tecido foliar foi macerado em tubos de microcentrífuga (1,5 ml) contendo 500 μ l de solução salina. Completou-se o volume para 1.000 μ l e foram efetuadas as diluições seriadas a 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} ou 10^{-11} . Semearam-se 5 μ l de cada diluição em meio de cultura 523 em placas de Petri, que foram mantidas em câmara de crescimento a 28 °C. Após oito horas, contou-se o número de colônias em cada diluição.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com três posições de folhas e seis tempos de avaliação, com cinco repetições, sendo cada unidade experimental constituída por uma planta.

2.7. Severidade da mancha foliar bacteriana sob diferentes períodos de câmara úmida

Para avaliar o efeito do molhamento foliar, 48 plantas foram inoculadas com suspensão bacteriana a 1×10^8 ufc/mL, cujo preparo do inóculo, inoculação e avaliação da doença foram feitos como previamente descrito (itens 2.2 e 2.3). Depois da inoculação, as plantas foram mantidas em câmara de nevoeiro sob fotoperíodo de 12 h ($36 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). Após 0, 3, 6, 12, 24, 48 ou 96 h, retiraram-se as plantas, transferindo-as para casa de vegetação, onde permaneceram até o término das avaliações. Plantas testemunhas foram inoculadas e mantidas em casa de vegetação com ausência de molhamento foliar pré e pós-inoculação. Quantificou-se a severidade aos 10, 20 e 30 dias após a inoculação. Foi empregado o delineamento inteiramente casualizado, com sete tempos de câmara úmida e três avaliações ao longo do tempo, com seis repetições por tratamento; cada unidade experimental foi constituída por uma planta.

2.8. Incidência da bacteriose em mudas sob diferentes sistemas de irrigação

Verificou-se o efeito de dois sistemas de irrigação na incidência da mancha foliar bacteriana em mudas de três clones (37219, 37297 e 37423) de *E. globulus*. Para isso, empregaram-se mudas em fase de enraizamento, com aproximadamente 35 dias de idade. O experimento foi realizado em um viveiro comercial coberto; dez bandejas de cada clone foram submetidas à irrigação por aspersão, e outras dez bandejas a um sistema de subirrigação. As avaliações foram realizadas quando as mudas completaram 90 dias. Foi quantificada a incidência (número de plantas doentes em relação ao total da bandeja). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em arranjo fatorial composto por dois tratamentos, três clones e dez repetições, sendo cada bandeja uma unidade experimental.

2.9. Severidade da mancha foliar bacteriana sob diferentes temperaturas

Para avaliar o efeito da temperatura, 24 plantas foram inoculadas com suspensão bacteriana a 1×10^8 ufc/mL; o preparo do inóculo, a inoculação e a avaliação da doença foram feitos como descrito anteriormente (itens 2.2 e 2.3). A seguir, as plantas foram incubadas em câmara de nevoeiro e, após 24 h, transferidas para câmara de crescimento a 18, 22, 26 ou 30°C, sob fotoperíodo de 12 h ($36 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), onde permaneceram até o término das avaliações. A severidade foi quantificada aos 10, 15, 20 e 25 dias após a inoculação. Adotou-se o delineamento inteiramente casualizado, com quatro temperaturas e quatro avaliações ao longo do tempo, com seis repetições; cada unidade experimental foi constituída por uma planta.

2.10. Infecção bacteriana em eucalipto sob diferentes combinações de temperatura e tempo de câmara úmida

Para avaliar o efeito do binômio temperatura x molhamento foliar, 80 plantas foram inoculadas com suspensão bacteriana preparada a 1×10^8 ufc/mL; procedeu-se ao preparo do inóculo, à inoculação e à avaliação da doença conforme previamente descrito (itens 2.2 e 2.3). Depois de inoculadas, as plantas foram submetidas às temperaturas de 18, 22, 26 ou 30 °C e aos tempos de câmara de nevoeiro de 3, 6, 12, 24 ou 48 h sob fotoperíodo de 12 h ($36 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). Para cada combinação temperatura x tempo de câmara úmida, as plantas foram envolvidas individualmente com sacos de polietileno sobre uma armação de arame, contendo no seu interior algodão umedecido, e suas paredes foram borrifadas com água. Essa armação foi retirada conforme os tempos de câmara úmida pre-determinados e as plantas transferidas para casa de vegetação, onde permaneceram até o término das avaliações. A severidade foi quantificada aos 20 dias após a inoculação. Empregou-se o delineamento inteiramente casualizado, em arranjo fatorial (4x5), constituído de quatro temperaturas e cinco períodos de molhamento foliar, com quatro repetições, sendo cada unidade experimental constituída por uma planta.

2.11. Análises estatísticas

Os dados obtidos dos experimentos foram submetidos às análises estatísticas com auxílio dos programas SAS V. 9.1 (SAS, The SAS Institute Inc.,

version 6.01, Cary, NC, Estados Unidos) e STATISTICA, version 5. Os valores de severidade e incidência da doença, desfolha e colonização bacteriana foram submetidos à análise de variância (ANOVA). Posteriormente, para os dados de severidade e desfolha realizou-se análise de regressão linear e não-linear, a fim de selecionar os modelos com os melhores ajustes às curvas de progresso de doença, com base na menor soma de quadrados do resíduo (SQR), no quadrado médio do resíduo (QMR) e na ausência de tendências indesejáveis no gráfico de resíduo. O modelo logístico foi o que propiciou o melhor ajuste da curva de progresso da desfolha em função do tempo. Com as médias dos dados de severidade para cada período de câmara úmida, ajustou-se o modelo exponencial negativo e, para cada temperatura testada, ajustou-se o modelo monomolecular.

Os dados originais de colonização bacteriana foram transformados em $\text{Log}_{10}(\text{ufc} + 1)$; como nenhum modelo propiciou o ajuste satisfatório, apresentou-se um gráfico da média de ufc/cm em função do tempo. No experimento de idade da folha, as médias de severidade da doença foram comparadas pelo teste de Fischer LSD a 95%.

3. RESULTADOS

3.1. Progresso da mancha foliar bacteriana

Observou-se aumento significativo ($P < 0,05$) da desfolha com o tempo após a inoculação (d.a.i.). Aos 10 d.a.i. não houve desfolha, enquanto aos 20, 30 e 40 dias após a inoculação a desfolha média foi de 7,0, 22,5 e 27%, respectivamente (Figura 2).

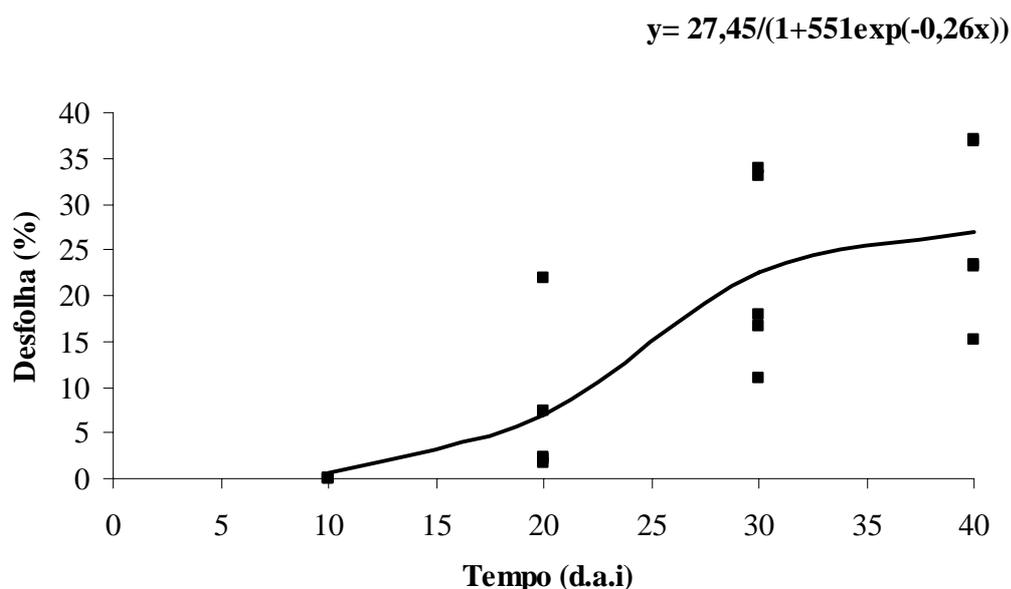


Figura 2 – Progresso da desfolha causada por *Xanthomonas axonopodis* em plantas do clone 1006, híbrido de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*.

3.2. Distribuição dos sintomas da mancha foliar bacteriana

Constatou-se incremento significativo ($P < 0,05$) na severidade da doença com o aumento da idade da folha (Figura 3). A severidade média nas folhas mais velhas (7 e 8), aos 20 dias após a inoculação, foi de 17%, ao passo que em folhas novas (3 e 4) e intermediárias (5 e 6) essa média foi de 0,17 e 1,7%, respectivamente.

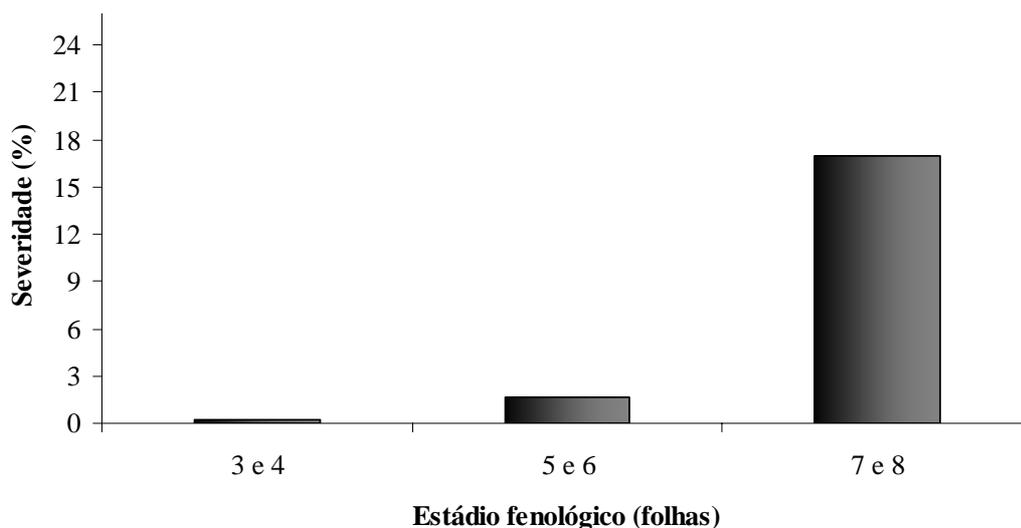


Figura 3 - Severidade da mancha foliar causada por *Xanthomonas axonopodis* em plantas do clone 1006, híbrido de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*, em folhas em diferentes estádios fenológicos (folhas 3, 4, 5, 6, 7 e 8). Médias seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste de Fisher (LSD; $P = 0,05$).

3.3. Quantificação e sintomatologia de *Xanthomonas axonopodis* em folhas de eucalipto em diferentes idades

A idade da folha influenciou significativamente a colonização bacteriana ($P < 0,05$) e a sintomatologia da doença. Houve incremento da população bacteriana com o aumento da idade da folha, atingindo o máximo, $28,7 \times 10^{10}$ ufc/cm, nas folhas 7 e 8 aos 20 dias; já nas folhas mais jovens (3 e 4) e intermediárias (5 e 6) a colonização bacteriana foi de $1,22 \times 10^6$ e $13,4 \times 10^8$ ufc/cm, respectivamente. Observou-se um decréscimo na população bacteriana aos 25 dias após a inoculação (Figura 4). Independentemente do estágio fenológico das folhas, os sintomas da doença inicialmente apresentaram-se como pequenos pontos cloróticos, que evoluíram diferentemente com a idade da folha. Em folhas jovens (3 e 4) as lesões tornaram-se superficiais e secas, de coloração marrom-clara, formando algumas vezes pequenos orifícios e, ocasionalmente, o aborto de lesões. Nas folhas em estágio intermediário (5 e 6) as lesões tornaram-se angulares, de coloração amarronzada, com aspecto ressecado. Nas folhas mais velhas (7 e 8) as lesões apresentaram-se angulares internevurais encharcadas,

localizadas nas bordas do limbo foliar e, ou, dispersas. Com o tempo estas lesões coalesceram, ocorrendo bronzeamento foliar e queda prematura dessas folhas (Figura 5).

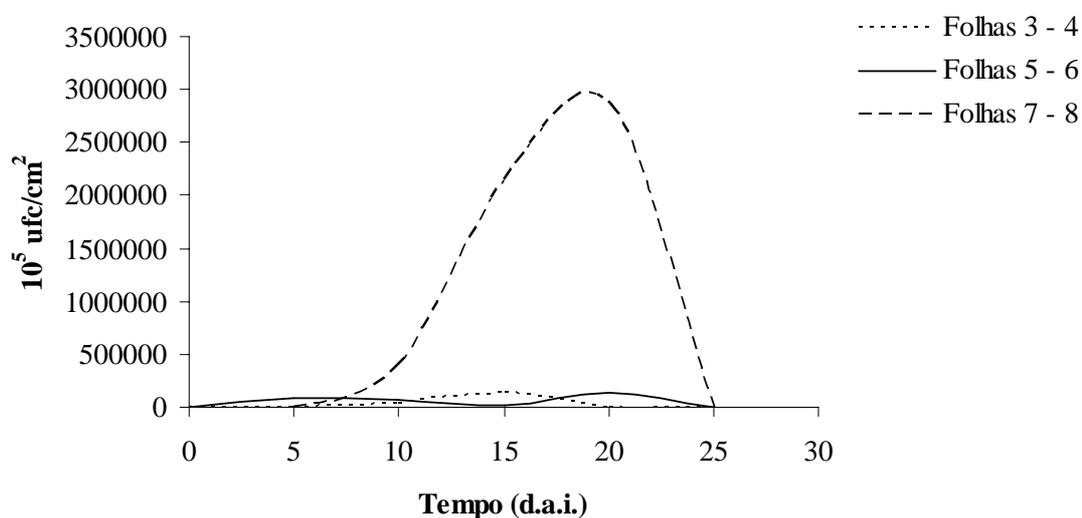


Figura 4 – Colonização bacteriana de *Xanthomonas axonopodis* em folhas em diferentes estádios fenológicos (3, 4, 5, 6, 7 e 8) do clone 1006, híbrido *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*.



Figura 5 – Sintomas causados por *Xanthomonas axonopodis* em folhas do clone 1006, híbrido de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*, em folhas em diferentes estádios fenológicos (folhas 3-4, 5-6, 7-8).

3.4. Severidade da mancha foliar bacteriana sob diferentes períodos de câmara úmida

A duração do tempo de molhamento foliar influenciou significativamente ($P < 0,05$) a severidade da doença em eucalipto, havendo decréscimo na severidade com o aumento do período de câmara úmida, em todas as avaliações realizadas (Figura 6). A severidade média, aos 30 dias após a inoculação, em plantas mantidas por 0 e 3 h em câmara de nevoeiro foi de 12,8 e 6,1%, respectivamente, enquanto naquelas mantidas por 48 e 96 h em câmara úmida a média foi de 4,3 e 3,2%, respectivamente. Plantas testemunhas, mantidas em casa de vegetação na ausência de molhamento foliar pré e pós-inoculação, avaliadas 30 dias após a inoculação, apresentaram severidade média de 1,2%.

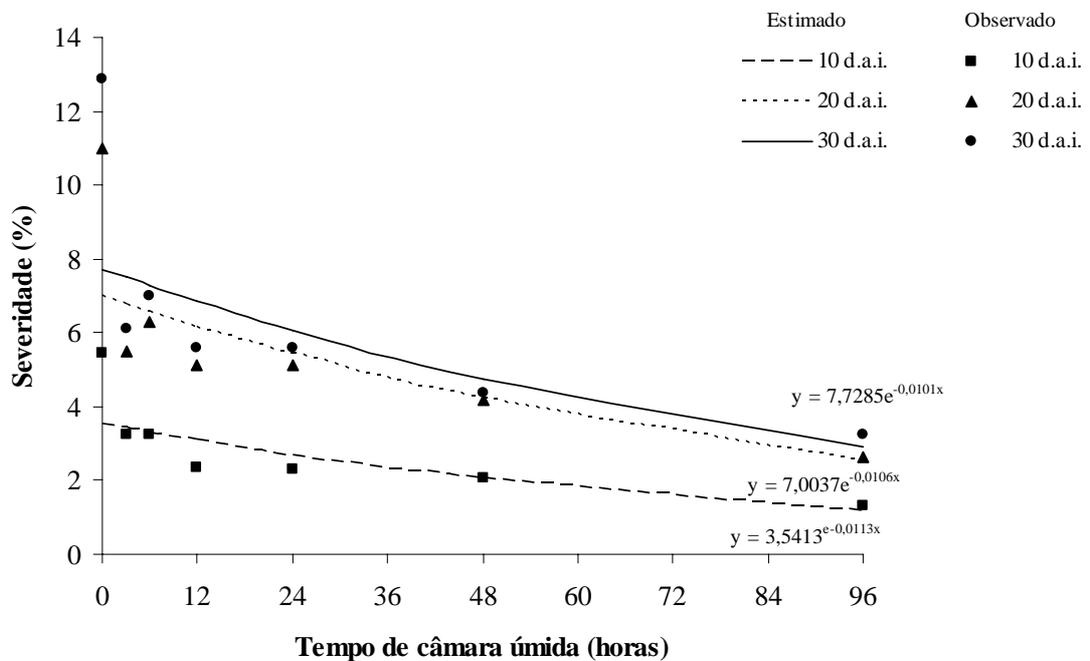


Figura 6 - Severidade da mancha foliar em plantas do clone 1006, híbrido de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*, causada por *Xanthomonas axonopodis* sob diferentes períodos de câmara úmida. Cada ponto representa a média de seis repetições.

3.5. Incidência da bacteriose em mudas sob diferentes sistemas de irrigação

O sistema de irrigação influenciou significativamente ($P < 0,05$) a incidência de *X. axonopodis* nos três clones de eucalipto testados. A incidência foi

maior quando as mudas independentes do clone foram submetidas à irrigação por aspersão (Figura 7).

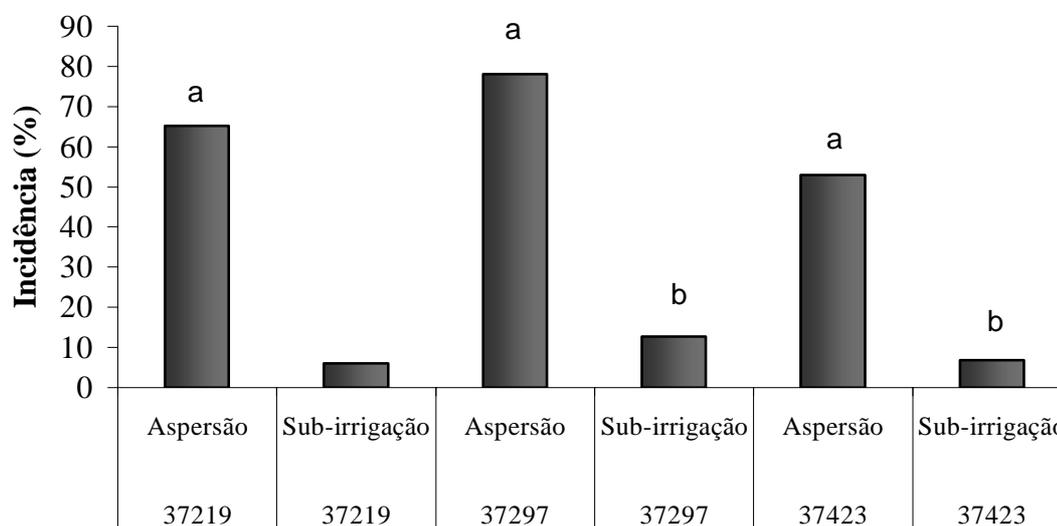


Figura 7 – Incidência da mancha foliar em plantas de três clones de *Eucalyptus globulus*, causada por *Xanthomonas axonopodis* sob diferentes sistemas de irrigação. Médias seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste F da análise de variância ($P = 0,05$).

3.6. Severidade da mancha foliar bacteriana sob diferentes temperaturas

A temperatura influenciou significativamente ($P < 0,05$) a severidade da doença em eucalipto. Exceto a 22°C, a taxa de progresso da doença aumentou com o incremento da temperatura (Figura 8). Nesta temperatura, as plantas exibiram alta incidência de ferrugem, o que pode ter afetado negativamente a infecção bacteriana.

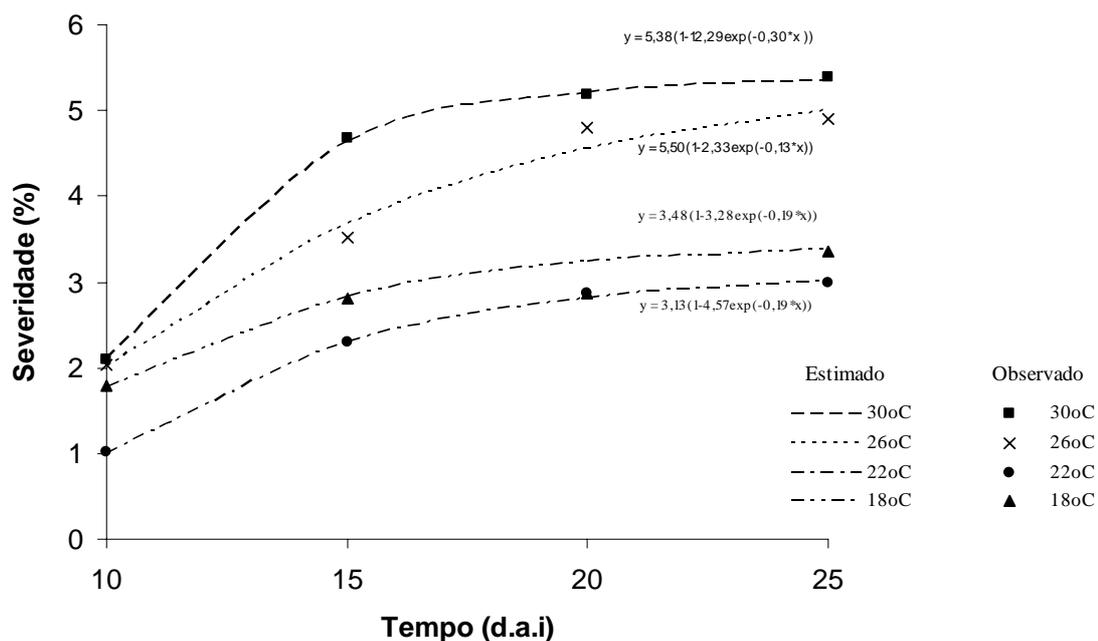


Figura 8 - Severidade da mancha foliar em plantas do clone 1006, híbrido de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*, causada por *Xanthomonas axonopodis* sob diferentes temperaturas. Cada ponto representa a média de seis repetições.

3.7. Infecção bacteriana em eucalipto sob diferentes combinações de temperatura e tempo de câmara úmida

Os sintomas de *X. axonopodis* foram observados em todas as combinações de temperatura-tempo de molhamento foliar. No entanto, os dados de porcentagem de área foliar lesionada não apresentaram normalidade e homogeneidade na distribuição dos erros, o que não atendeu às pressuposições para que fosse realizada a análise de variância. Não obstante, a porcentagem de área foliar lesionada variou em função da temperatura e do tempo de molhamento foliar. A porcentagem de área foliar lesionada foi maior nos períodos de molhamento foliar entre 3 e 6 h, independentemente da temperatura avaliada (Figura 9).

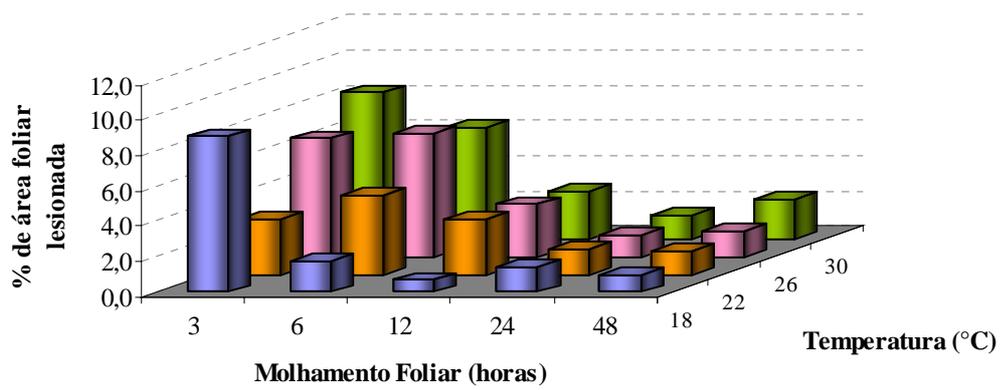


Figura 9 – Severidade da mancha foliar em plantas do clone 1006, híbrido de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*, causada por *Xanthomonas axonopodis* sob diferentes temperaturas e períodos de câmara úmida. Cada ponto representa a média de quatro repetições.

4. DISCUSSÃO

O desenvolvimento da mancha foliar causada por *Xanthomonas axonopodis* em eucalipto foi influenciado pela idade da folha, pelo período de molhamento foliar e pela temperatura.

A porcentagem de desfolha aumentou significativamente com o tempo, tendo o incremento máximo aos 40 d.a.i. A desfolha foi decorrente da elevada severidade da doença, na qual as lesões coalesceram, culminando com bronzeamento foliar e queda prematura das folhas.

A idade da folha afetou significativamente a colonização e o desenvolvimento dos sintomas causados por *X. axonopodis*. Aos 20 dias após a inoculação, folhas mais velhas apresentaram maior porcentagem de área foliar lesionada e colonização bacteriana (ufc/cm). Aos 25 dias após a inoculação, houve decréscimo na população bacteriana para os três estádios fenológicos, provavelmente em consequência da intensa queda das folhas que exibiam maior severidade da doença, uma vez que neste experimento utilizaram-se amostras destrutivas para cada tempo avaliado. O efeito da idade da folha na severidade de doenças tem sido estudado em outros patossistemas. Diferentemente dos resultados encontrados neste estudo, Stall et al. (1982) e Gottwald & Graham (1992) verificaram que folhas jovens de *Citrus* sp. foram mais suscetíveis ao cancro cítrico, causado por *X. axonopodis* pv. *citri*. De forma analógica no patossistema *Erwinia amylovora* x maçã, a resistência à infecção aumenta com a idade da folha (Crosse et al., 1972). Silva (2007) observou que o aumento da densidade estomática foi acompanhado por aumento na severidade de *X. axonopodis* em plantas de eucalipto. O autor constatou que folhas jovens geralmente não apresentaram infecção, sendo coerente com a baixa densidade estomática encontrada e estando de acordo com os resultados observados neste trabalho.

Entretanto, outros fatores também podem estar relacionados à suscetibilidade da folha ao patógeno. A menor severidade da doença em folhas jovens de eucalipto pode ser explicada pelo maior acúmulo de ceras, que dificulta o molhamento foliar e conseqüentemente, a infecção, uma vez que a bactéria requer água para disseminação, multiplicação e penetração nos tecidos do hospedeiro. Para Graham (1992), características das folhas que exercem influência na infiltração da água e no encharcamento do tecido foliar são as mais importantes para o sucesso da infecção do patógeno.

A sintomatologia distinta observada nos diferentes estádios fenológicos das folhas na planta pode ser afetada por eventos pós-infecciosos. A quantidade e o tipo de compostos fenólicos que ocorrem em folhas em diferentes idades podem inibir a multiplicação bacteriana. Contudo, ainda não se conhecem os mecanismos envolvidos na patogênese de eucalipto-*X. axonopodis*; dessa forma, não há até o momento explicações conclusivas para esse fenômeno. Os resultados encontrados neste trabalho coincidem com observações de campo, em que folhas do terço basal das plantas, ou folhas mais velhas de um mesmo ramo, são mais suscetíveis em relação ao terço apical ou folhas mais jovens.

O molhamento foliar é fundamental para ocorrência de doenças bacterianas em plantas (Hirano & Upper, 1983). De acordo com essa premissa, constatou-se baixa severidade da doença em plantas que não foram mantidas sob molhamento foliar pré-inoculação, o que indica a necessidade de uma lâmina de água na superfície foliar para o estabelecimento da bacteriose em eucalipto. Entretanto, observou-se menor severidade da enfermidade com o aumento do período de molhamento foliar pós-inoculação. Neste patossistema, o molhamento foliar pré-inoculação é mais importante que o pós-inoculação. Resultados similares foram encontrados por Fukui et al. (1999) trabalhando com *X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae* x antúrio. Estes autores concluíram que para essa interação a água livre é fundamental apenas no estágio de penetração do patógeno nas folhas, e não após a infecção e colonização da bactéria na folha. Estudos em outros patossistemas demonstraram que períodos mais longos de molhamento foliar favorecem o aumento da severidade da doença (Zerh et al., 1996; Pria et al., 2006).

A relação inversa entre molhamento foliar pós-inoculação e severidade da doença para o patossistema *X. axonopodis* x eucalipto pode ser explicada pela

rapidez de penetração da bactéria em condições favoráveis e pela subsequente lavagem do inóculo com o aumento da duração de molhamento foliar, resultando, assim, em menor infecção do patógeno. O sistema de irrigação utilizado no viveiro comercial contribuiu enormemente para a incidência da mancha foliar bacteriana. A irrigação por aspersão, além de permitir a formação de uma lâmina de água sobre a folha, favorecendo o início da infecção e o progresso da doença, influencia também a disseminação do patógeno, por meio do respingo de gotas contendo células bacterianas.

O aumento da temperatura provocou incremento na porcentagem de área foliar lesionada causada por *X. axonopodis* em eucalipto. A faixa ótima de temperatura para o desenvolvimento da doença situa-se entre 26 e 30 °C. Temperaturas abaixo dessa faixa retardaram o desenvolvimento da doença. A 22 °C observou-se menor porcentagem de área foliar lesionada que a 18 °C, fato este que pode ser explicado pela alta incidência de ferrugem (*Puccinia psidii*) nas plantas. Observou-se que as pústulas de *P. psidii* se sobrepunham às lesões causadas por *X. axonopodis*. Em estudos similares foi observado que a severidade dos sintomas causados por bacterioses aumenta no sentido das maiores temperaturas (Zerh et al., 1996; Fukui et al., 1999; Pria et al., 2006). A maior intensidade de *X. axonopodis* em plantas de eucalipto em temperaturas elevadas correlaciona-se com observações *in vitro* (dados não publicados), sugerindo que o metabolismo da bactéria é acelerado em temperaturas elevadas, decrescendo significativamente nas mais baixas. Os resultados deste trabalho coincidem com observações realizadas em viveiros florestais, em que a maior severidade da bacteriose ocorre em épocas mais quentes do ano.

5. CONCLUSÕES

Segundo resultados deste trabalho, concluiu-se que:

- ✓ Considerando que a maior severidade da doença é observada aos 20 dias após a inoculação (d.a.i.) e a desfolha aos 30 d.a.i., recomenda-se que as avaliações de efeitos de tratamentos e genótipos quanto a *X. axonopodis* sejam realizadas nesses tempos.
- ✓ Folhas mais velhas de eucalipto (7 e 8) são mais suscetíveis a *X. axonopodis*, pois nelas ocorrem maior colonização bacteriana e maior severidade da doença lesionada.
- ✓ O molhamento foliar pré-inoculação é fundamental para o desenvolvimento da doença.
- ✓ Quanto maior o período de câmara úmida pós-inoculação, menor a severidade da doença em eucalipto.
- ✓ Na faixa de temperatura testada, a temperatura ótima para o desenvolvimento da doença foi entre 26 e 30 °C.

6. REFÊRENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALFENAS, A. C. Bacterioses na eucaliptocultura. **9ª Reunião Técnica Profet: Avanços da Pesquisa na Proteção Florestal**. Aracruz, E.S. IPEF. 1- 4.2006.

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

ALFENAS, A.C.; GONÇALVES, R. C.; OLIVEIRA, J. R.; SILVA, I. T.; ODA, S.& ASSIS, T.F Mancha foliar e desfolha de *Eucalyptus urophylla* x *E. maidenii*, causadas por fitobactérias. **Fitopatologia Brasileira** 26:294-294. 2001.

BEATTIE, G. A. & LINDOW, S. E. Bacterial colonization of leaves: A spectrum of strategies. Mini Review. **Phytopathology** 89(5):353-359.1999.

CROSSE, J.E.; GOODMAN, R. N. & SHAFFER JUNIOR, W. H. Leaf damage as a predisposing factor in the infection of apple shoots by *Erwinia amylovora*. **Phytopathology** 62:176-182.1972.

FERREIRA, F. A. & MILANI, D. **Diagnose visual e controle das doenças abióticas e bióticas do eucalipto no Brasil**. Mogi Guaçú, SP. International Paper. 2002.

FUKUI, R.; FUKUI, H. & ALVAREZ, A. M. Effect of temperature on the incubation period and leaf colonization in bacterial blight of *Anthurim*. **Phytopathology** 89(11):1007-1014.1999.

GONÇALVES, R. C.; ALFENAS, A. C.; OLIVEIRA, J. R.; SILVA, I. T.; ODA, S.; ASSIS, T. F. & TONON, A. Mancha foliar e seca de ponteiros do eucalipto causada por fitobactérias, no Brasil e na Argentina. **Fitopatologia Brasileira**, 26: 294. 2001. (Abstract).

GONÇALVES, R.C. **Etiologia da mancha bacteriana do eucalipto no Brasil**. Viçosa, UFV, 2003.94. (Tese DS)

GRAHAM, J. H.; GOTTWALD, T. R. RILEY, T. D. & ACHOR, D. Penetration through leaf stomata and strains of *Xanthomonas campestris* in citrus cultivars varying in susceptibility to bacterial diseases. **Phytopathology** 82(11):1319–1325.1992.

GOTTWALD, T. R. & GRAHAM, J. H. A device for precise and nondisruptive stomatal inoculation of leaf tissue with bacterial pathogens. **Phytopathology** 82(9):930–935.1992.

HIRANO, S. S. & UPPER, C. D. Ecology and epidemiology of foliar bacterial plant pathogens. **Annual Review of Phytopathology** 21:243-270.1983.

KADO, E. I. & HESKETT, M. G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. **Phytopathology** 60:969-976.1970.

MASCHIO, L. M. A.; ANDRADE, F. M.; LEITE, M. S. P.; BELLOTE, F. J.; FERREIRA, C. A.; IEDE, E. T.; NARDELI, A. M. B.; AUER, C. G., GRIGOLLETI, A. & WIECHETEK, M. Seca dos ponteiros do eucalipto em Arapoti-PR. **Anais da Conferência IUFRO de Silvicultura e Melhoramento de eucaliptos**. Salvador – BA. 3:353-359.1997.

NEVES, D. A.; LAU, D.; SILVA, R. R.; ROSADO, C. C. G. & ALFENAS, A. C. Componentes da resistência a *Xanthomonas axonopodis* em genótipos de *Eucalyptus*. In: **XXXVIII Congresso Brasileiro de Fitopatologia**. Brasília,DF. **Fitopatologia Brasileira**.30:S58.2005.

POMELLA, A. W. V.; ROMEIRO, R. S.; FERREIRA, F. A. & OLIVEIRA, J. R. Lesões foliares em viveiro de eucalipto incitadas por uma espécie fluorescente de *Pseudomonas*. **Fitopatologia Brasileira** 20:374.1995.

PRIA, M.D.; CHRISTIANO, R. C. S.; FURTADO, E. L.; AMORIM, L. & BERGAMIN FILHO, A. Effects of temperature and leaf wetness duration on infection of sweet oranges by Asiatic citrus canker. **Plant Pathology** 55:657-663. 2006.

REIS, A. V.; SOUZA, R. M.; CASTRO, H. A.; CARDOSO, M. A. F. C. & KOBAYASTI, L. Uma nova bacteriose em mudas de eucalipto incitada por *Xanthomonas campestris*. **Fitopatologia Brasileira** 21:342.1996.

ROMEIRO, R. S. **Bactérias fitopatogênicas**. Viçosa, Imprensa Universitária-UFV.283.1995.

STALL, R. E.; MARCO, G. M. & CANTEROS DE ECHENIQUE, B. I. Importance of mesophyll in mature leaf resistance to canker of citrus. **Phytopathology** 72(8):1097-1100.1982.

TRUMAN, R. Die-back of *Eucalyptus citriodora* caused by *Xanthomonas eucalypti*. **Phytopathology** 64:143-144.1974.

VALE, F. X. R.; FERNANDES FILHO, E. I. & LIBERATO, J. R. QUANT: A software plant disease severity assessment. **8th International Congress of Plant Pathology**, Christchurch New Zealand.105.2003.

ZEHR, E.; SHEPARD, D. P. & BRIDGES, W. C. Bacterial spot of peach as influenced by water congestion, leaf, wetness duration, and temperature. **Plant Disease** 80:339-341.1996.