

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

**MANCHA DE MICOSFERELA EM *Eucalyptus globulus*:
CARACTERÍSTICAS E ASCOGÊNESE DO PATÓGENO, ESTRUTURA
E COMPOSIÇÃO QUÍMICA FOLIAR**

MARTHA MARIA PASSADOR

Tese apresentada à Faculdade de
Ciências Agronômicas da UNESP –
Campus de Botucatu, para obtenção do
título de Doutor em Agronomia
(Proteção de Plantas)

BOTUCATU-SP

Julho - 2011

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

**MANCHA DE MICOSFERELA EM *Eucalyptus globulus*:
CARACTERÍSTICAS E ASCOGÊNESE DO PATÓGENO, ESTRUTURA
E COMPOSIÇÃO QUÍMICA FOLIAR**

MARTHA MARIA PASSADOR

Bióloga

Orientador: Prof. Dr. Edson Luiz Furtado

Tese apresentada à Faculdade de
Ciências Agronômicas da UNESP –
Campus de Botucatu, para obtenção do
título de Doutor em Agronomia
(Proteção de Plantas)

BOTUCATU-SP

Julho - 2011

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

P285m Passador, Martha Maria, 1979-
Mancha de micosferela em *Eucalyptus globulus*: características e ascogênese do patógeno, estrutura e composição química foliar / Martha Maria Passador. - Botucatu : [s.n.], 2011
ix, 125 f. : gráfs., tabs., fots. color.

Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2011
Orientador: Edson Luiz Furtado
Inclui bibliografia

1. *Eucalyptus globulus*. 2. Mancha de micosferela. 3. Anatomia foliar. 4. Ascogênese. 5. Metabólitos secundários. I. Furtado, Edson Luiz. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Campus de Botucatu). Faculdade de Ciências Agrônômicas. III. Título.

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: "MANCHA DE MICOSFERELA EM Eucalyptus globulus: CARACTERÍSTICAS
E ASCOGÊNESE DO PATÓGENO, ESTRUTURA E COMPOSIÇÃO QUÍMICA
FOLIAR"

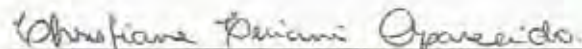
ALUNA: MARTHA MARIA PASSADOR

ORIENTADOR: PROF. DR. EDSON LUIZ FURTADO

Aprovado pela Comissão Examinadora



PROF. DR. EDSON LUIZ FURTADO



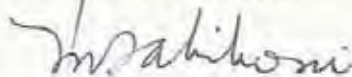
PROFA. DRA. CHRISTIANE CERIANI APARECIDO



PROF. DR. CELSO GARCIA AUER



PROF. DR. ROBERTO ANTONIO RODELLA



PROFA. DRA. MARLI TEIXEIRA DE A. MINHONI

Data da Realização: 25 de maio 2011.

“Escolheste, por asilo, o Altíssimo. Nenhum mal te atingirá, nenhum flagelo chegará à tua tenda, porque aos seus anjos ele mandou que te guardassem em todos os teus caminhos. Eles te sustentarão em suas mãos, para que não tropeces em alguma pedra. Sobre serpente e víbora andarás, calcarás aos pés o leão e o dragão. Pois que se uniu a mim, eu o livrarei; e o protegerei, pois conhece o meu nome. Quando me invocar, eu o atenderei; na tribulação estarei com ele. Hei de livrá-lo e o cobrirei de glória. Será favorecido de longos dias, e mostrar-lhe-ei a minha salvação.”

Salmo 91, 9-16

Ao meu pai, Ozair
À minha mãe, Maria Conceta

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Deus, por sua presença em minha vida e por mais esta oportunidade.

À Faculdade de Ciências agrônômicas – FCA/UNESP – Universidade Estadual Paulista do Campus de Botucatu, pela oportunidade de realizar o Curso de Doutorado, e ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Prof. Dr. Edson Luiz Furtado, Professor da Faculdade de Ciências agrônômicas-UNESP, Botucatu, pela orientação, oportunidade concedida, pelo apoio oferecido durante a realização da Tese, pelas sugestões fornecidas, motivação, ensinamentos, e principalmente pela paciência e pela amizade.

Ao Dr. Mário Barreto Figueiredo (*in memoriam*), do Laboratório de Micologia Fitopatológica, do Instituto Biológico de São Paulo, que devido ao seu apoio e confiança, despertou meu interesse pela pesquisa e admiração pela Micologia. Agradeço pela paciência, incentivo, apoio científico, ensinamentos, generosidade, compreensão e pela amizade.

Ao Prof. Dr. Antonio Carlos Maringoni, Professor da UNESP – Botucatu, coordenador do curso de pós-graduação e a todos os demais Professores e funcionários da UNESP – Botucatu – Departamento de Produção vegetal (DDF), da Biblioteca e da Seção de pós-graduação, pelo apoio que nunca nos faltou.

Ao meu pai Ozair e à minha mãe Maria Conceta pelo exemplo de seriedade, honestidade, perseverança, carinho, amizade e amor que me tem acompanhado, pela luz da busca que acenderam em minha vida, e também pela oportunidade de estudo.

À minha irmã e grande amiga Fabiana e aos meus tios Salete e João pelo incentivo, amor, carinho e colaboração. À minha avó Maria Francisca, ao meu tio Luiz, à minha prima Talita, e todos da minha família que sempre me apoiaram, agradeço sinceramente de coração.

À Dra. Christiane Ceriani Aparecido, Pesquisadora Científica do Instituto Biológico de São Paulo e à Prof. Dra. Sandra Elizabeth de Souza da Universidade Estadual da Bahia, pela amizade, paciência e auxílio sempre presente.

Ao Prof. Dr. Roberto Antonio Rodella do Departamento de Botânica, do Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP, pelo auxílio nos estudos relacionados à

anatomia foliar e análise estatística dos dados obtidos nas análises dos óleos essenciais; também agradeço por todo o apoio e amizade.

Ao Dr. Ricardo Harakava, Pesquisador científico do Instituto Biológico de São Paulo, Laboratório de Bioquímica Fitopatológica e à Dra. Márcia Ortiz Mayo Marques do Laboratório do Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Recursos Genéticos vegetais do Instituto Agrônomo de Campinas pela contribuição para o alcance de alguns objetivos deste estudo.

Às Biólogas e amigas Cristiane de Pieri e Patrícia Rodrigues de Lima pelo carinho, amizade e auxílio em algumas fases dos experimentos.

Ao André Martins, grande amigo desde a graduação, e à Priscila Yokoyama pela longa amizade.

Aos grandes amigos do curso de pós-graduação por toda a ajuda e também pelos momentos de descontração: Julio, Adriana, Monika, Denise, Tatiana, Juan, Edvar e Karina.

Aos colegas de curso Danila, Djanira, Haroldo, Márcia, Alex, Tadeu, Caroline, Paula, Ana Carolina, Willian.

Aos funcionários da FIBRIA Papel e Celulose: Donizete da Costa Dias, Elder Finkenauer e Rodrigo dos Santos, pelo auxílio e envio de material vegetal.

Aos colegas do Instituto Biológico de São Paulo e da Faculdade de Ciências agrônômicas – FCA/UNESP – Universidade Estadual Paulista do Campus de Botucatu, pelo apoio.

Ao Sr. Paulo pela ajuda na casa de vegetação, preparo de solos, irrigação e adubação. Aos técnicos Sra. Fátima, Sr. Domingos, Sr. Norberto pela ajuda concedida.

À equipe da Pós-Graduação e aos funcionários da Biblioteca da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Faculdade de Ciências Agrônômicas de Botucatu.

Aos professores e funcionários do Departamento de Produção Vegetal/Defesa Fitossanitária, pelos ensinamentos e amizade.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desta tese, muito obrigada.

ÍNDICE

1 RESUMO.....	1
2 ABSTRACT.....	3
3 INTRODUÇÃO GERAL.....	5
4 REVISÃO DE LITERATURA.....	7
4.1 O Eucalipto.....	7
4.2 A espécie <i>Eucalyptus globulus</i>	8
4.3 <i>Mycosphaerella</i> sp. e <i>Teratosphaeria</i> sp.	10
4.3 Anatomia foliar.....	17
4.4 Metábolitos Secundários.....	18
CAPÍTULO 1: DIVERSIDADE DE <i>Mycosphaerella</i> spp. E <i>Teratosphaeria</i> spp. ASSOCIADAS EM <i>Eucalyptus globulus</i> EM DIFERENTES LOCAIS.....	23
Resumo.....	23
Abstract.....	23
1 Introdução.....	24
2 Material e métodos.....	26
2.1 Coleta de amostras, diferenciação dos sintomas da doença e isolamento dos agentes causais de mancha de micosferela.....	26
2.2 Estudos moleculares para identificação dos isolados obtidos.....	28
2.3 Crescimento de agentes causais de mancha de micosferela em diferentes temperaturas.....	30
3 Resultados.....	30
3.1 Coleta de amostras, diferenciação dos sintomas da doença e isolamento dos agentes causais de mancha de micosferela.....	30
3.2 Características das espécies isoladas quanto á germinação dos ascósporos e morfologia em meio de cultivo.....	33
3.3 Crescimento de agentes causais de mancha de micosferela em diferentes temperaturas.....	43
3.4 Comparação das sequências obtidas e análise filogenética.....	46
4 Discussão e conclusões.....	48

5 Referências	52
CAPÍTULO 2: ASCOGÊNESE DE <i>Teratosphaeria nubilosa</i> EM MUDAS DE	
<i>Eucalyptus globulus</i>	57
Resumo.....	57
Abstract.....	57
1 Introdução.....	58
2 Material e métodos.....	60
2.1 Obtenção das mudas de <i>Eucalyptus globulus</i>	60
2.2 Obtenção do inóculo.....	60
2.3 Inoculação em mudas de <i>Eucalyptus globulus</i>	61
2.4 Estudos anatômicos em microscopia de luz.....	63
2.5 Isolamento de <i>Teratosphaeria nubilosa</i> a partir de mudas inoculadas....	64
3 Resultados.....	64
3.1 Sintomas e sinais de <i>Teratosphaeria nubilosa</i> em mudas de <i>Eucalyptus globulus</i> e análise em microscopia de luz.....	64
3.2 Isolamento de <i>Teratosphaeria nubilosa</i> a partir de mudas inoculadas...	68
4 Discussão e conclusões.....	68
5 Referências	73
CAPÍTULO 3: ANATOMIA E ULTRA-ESTRUTURA DE FOLHAS JOVENS E	
ADULTAS DE <i>Eucalyptus globulus</i> RELACIONADOS À PATOGÊNESE DE	
<i>Teratosphaeria nubilosa</i>	77
Resumo.....	77
Abstract.....	77
1 Introdução.....	78
2 Material e métodos.....	79
2.1 Material vegetal utilizado.....	79
2.2 Anatomia foliar em microscopia de luz.....	80
2.3 Análise foliar em microscopia eletrônica de varredura.....	80
3 Resultados.....	81
3.1 Identificação do agente causal de mancha de micosferela no material	

vegetal utilizado.....	81
3.2 Anatomia foliar em microscopia de luz.....	81
3.3 Análise foliar em microscopia eletrônica de varredura.....	86
4 Discussão e conclusões.....	89
5 Referências	93
CAPÍTULO 4: COMPONENTES DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE <i>Eucalyptus</i>	
<i>globulus</i> E SUA RELAÇÃO COM A MANCHA DE MICOSFERELA.....	
Resumo.....	97
Abstract.....	98
1 Introdução.....	98
2 Material e métodos.....	101
2.1 Obtenção do óleo essencial de folhas de <i>Eucalyptus globulus</i>	101
2.2 Identificação das substâncias presentes no óleo essencial.....	101
2.3 Análise estatística dos dados obtidos.....	103
3 Resultados.....	102
4 Discussão e conclusões.....	107
5 Referências	119
5 CONCLUSÕES GERAIS.....	112
6 REFERÊNCIAS	113

1. RESUMO

Muitas espécies de eucalipto são cultivadas no mundo todo e muitos patógenos evoluíram ou se adaptaram á cultura, principalmente fungos, desde a fase de viveiro até os plantios adultos. A mancha de micosferela é uma das principais doenças e o *Eucalyptus globulus* uma das espécies mais suscetíveis. O presente estudo foi iniciado a partir de isolamentos monospóricos de espécies fúngicas associadas à mancha de micosferela a partir de folhas e ramos de *E. globulus* provenientes de Bagé-RS, Pedras Altas-RS, Botucatu-SP, Jacareí-SP e Itapeva-SP, que possibilitou a obtenção de 46 isolados, que foram observados quanto à forma de germinação e crescimento micelial. A determinação das espécies deu-se por meio de PCR com primers da região genômica ITS1 e ITS4 e sequenciamento (vide capítulo 1). Como resultado, várias espécies foram encontradas e descritas. Mudanças de *E. globulus* foram inoculadas pelo método da exposição de mudas sadias à folhas com sintomas de *Teratosphaeria nubilosa*, por ejeção de ascósporos, em casa de vegetação. Estas mudas foram avaliadas e folhas com os sintomas do fungo foram coletadas a partir da terceira semana até a décima terceira semana da inoculação. Para realização de cortes e estudos histológicos, que permitiram observar a formação dos pseudotécios desde o seu início três semanas após a

inoculação, as hifas ascógenas dentro do pseudotécio após nove semanas e a formação das ascas e ascósporos após 11 e 13 semanas, respectivamente (vide capítulo 2). Através de estudos anatômicos, verificou-se que as folhas adultas apresentaram menor intensidade dos sintomas, o que pode estar relacionado com a compactação das células do parênquima, enquanto que as folhas jovens apresentam espaços intercelulares no parênquima lacunoso, no parênquima paliádico e na câmara subestomática o que pode ter facilitado a formação do estroma (vide capítulo 3). Óleos essenciais de folhas jovens e adultas, sadias e com mancha de micosferela, foram extraídos por hidrodestilação e analisados por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas. Os dados da composição química e as respectivas porcentagens dos constituintes foram submetidos à análise de agrupamento e análise de componentes principais. A maior porcentagem de α -pineno foi obtida no óleo extraído de folhas adultas sadias. A baixa porcentagem desse composto no óleo extraído de folhas adultas doentes pode indicar que o mesmo seja utilizado pelo fungo para o seu desenvolvimento nestas folhas (vide capítulo 4). Diante dos resultados obtidos foi possível relacionar a composição química dos óleos essenciais de folhas jovens e adultas com a mancha de micosferela.

Palavras-chave: mancha de micosferela, *Eucalyptus globulus*, anatomia foliar, ascogênese, metabólitos secundários, óleos.

***Mycosphaerella* leaf disease on *Eucalyptus globulus*: pathogen characteristics and ascogenesis, foliar structure and chemic composition.** Botucatu, 2011. 131 p. Tese (Doutorado em Agronomia/Proteção de Plantas) – Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista.

Author: MARTHA MARIA PASSADOR

Adviser: EDSON LUIZ FURTADO

2. ABSTRACT

Many *Eucalyptus* species are grown worldwide, and many pathogens have evolved and adapted to the culture. The cultivation of eucalyptus is affected by a number of diseases. Many pathogens occur in several eucalypt species, especially fungi, from the nursery to the planting adults. The *Mycosphaerella* leaf disease is a major disease and *Eucalyptus globulus* one of the most susceptible species. This study consisted of spore isolates of fungal species associated with *Mycosphaerella* leaf disease from leaves and stems of *E. globulus* from Bage-RS, Pedras Altas-RS, Botucatu-SP, Jacareí-SP, Itapeva-SP, which allowed the collection of 46 isolatesm

wich were observed as to the form of germination and mycelial growth. The determination of species was made by PCR from the genomic region with primers ITS1 and ITS4 and sequenced (see Chapter 1). As a result, several species were found and described. Seedlings of *E.globulus* were inoculated by exposure to leaves of healthy seedlings with symptoms of *Teratosphaeria nubilosa*, for ejection of ascospores in the greenhouse. Seedlings were evaluated, and leaves with the symptoms of the fungus were collected from the third week up to thirteenth week of inoculation. To carry out studies and histological sections, which allowed the formation of the pseudothecia from its beginning three weeks after inoculation, the formation of the ascogenous hyphae within pseudothecia after nine weeks, and the formation of asci and ascospores after 11 and 13 weeks, respectively (see Chapter 2). Through anatomical studies, it was found that if the adult leaves had a lower intensity of symptoms, which may be related to compression of the parenchyma cells, while the young leaves have intercellular spaces in the spongy parenchyma, palisade parenchyma and in substomatal chambers facilitating the formation of stroma (see Chapter 3). Essential oils of leaves and young adults, healthy and stain micosferela were extracted by hydrodistillation and analyzed by gas chromatography-mass spectrometry. The data of chemical composition and the respective percentages of the constituents were subjected to cluster analysis and principal component analysis. The highest percentage of α -pinene was obtained in the oil extracted from mature leaves of healthy plants, and a low percentage of this compound in the oil extracted from mature leaves patients, may indicate that this compound is used by the fungus for its development in these leaves (see Chapter 4). With these results it was possible to relate the chemical composition of essential oils from young and mature leaves with *Mycosphaerella* leaf disease.

Keywords: *Mycosphaerella* leaf disease, *Eucalyptus globulus*, leaf anatomy, ascogenesis, secondary metabolites.

3. INTRODUÇÃO GERAL

Muitas espécies de *Eucalyptus* são utilizadas na produção de papel e celulose, sendo o *Eucalyptus globulus* uma das espécies mais apreciadas devido também às suas propriedades e sob o ponto de vista econômico (Cruz, 1965; Florence 1996). Essa e outras espécies utilizadas são susceptíveis a diversos patógenos que durante todo o ano causam quebra na produtividade e consequente redução da lucratividade da cultura. Dentre esses patógenos, estão os causadores de doenças foliares que possuem relação direta com a redução do crescimento e consequente a redução no incremento do volume de madeira produzido (Barber, 2004).

A expansão dos plantios de *Eucalyptus* spp., incluindo a espécie *E. globulus*, cresceu significativamente nas últimas décadas, muitas vezes com materiais que, embora produtivos, não tiveram a sua resistência a doenças e pragas determinada.

O desenvolvimento da silvicultura em busca de novos genótipos de resistência e potencial de rendimento contribuiu para a pressão de seleção sobre os patógenos, acelerando o seu processo evolutivo e a sua diversidade na natureza. Em empresas florestais e/ou ligadas a este setor, uma das maiores preocupações é a ocorrência de doenças tanto, em viveiros como no campo, que promovem, muitas vezes, uma queda acentuada na produção. A

implantação de novas técnicas de manejo e de ciclos sucessivos numa mesma área de plantio têm favorecido o surgimento de várias epidemias, cujos agentes etiológicos encontravam-se endemicamente presentes (Alfenas e Zauza, 2007).

Um dos maiores problemas em viveiros e plantios jovens de *E. globulus*, está relacionado à mancha de micosferela, causada por espécies de fungos pertencentes aos gêneros *Mycosphaerella* e *Teratosphaeria*. Esta doença é considerada uma das mais importantes que ocorrem nessa cultura, sendo *E. globulus* uma das espécies de eucalipto mais suscetíveis (Canergie et al., 1994, 1998).

A mancha de micosferela é uma doença importante na Austrália e em países da África, Europa e. No Brasil, o grau de preocupação com relação à esta doença teve início em 2007, com a primeira constatação de *Teratosphaeria nubilosa* no Rio Grande do Sul, causando grandes danos em plantações de *E. globulus* (Perez et al., 2009).

A presença de agentes causais de mancha de micosferela no Brasil conduz à necessidade de elaboração de formas de controle eficazes, como o desenvolvimento de variedades resistentes, a substituição de plantas suscetíveis por espécies mais resistentes e também, a utilização de híbridos. Para a viabilidade de qualquer alternativa de controle, é necessário o conhecimento do agente causal e do seu desenvolvimento no hospedeiro. Com relação à planta, os mecanismos de defesa estruturais e bioquímicos, bem como a constituição anatômica da folha de eucalipto podem ser estudados e utilizados como grandes aliados no manejo e controle desta e de outras doenças.

Tendo em vista a importância de pesquisas relacionadas com doenças em eucaliptocultura, como a mancha de micosferela, bem como possibilitar um melhor entendimento do patógeno e sua ação no hospedeiro, contribuindo para a elaboração de possíveis formas de controle, monitoramento da doença e identificação das espécies de *Mycosphaerella* e *Teratosphaeria*, este trabalho teve como objetivos: a) Identificar espécies de *Mycosphaerella* e *Teratosphaeria* associadas em plantações de *E. globulus* no sul do Brasil e em outras regiões; b) analisar a anatomia de folhas jovens e adultas de *E. globulus* relacionados à resistência e evolução do patógeno no interior dos tecidos infectados; c) analisar os componentes de óleos essenciais de *E. globulus* e sua relação com *Mycosphaerella* spp. e *Teratosphaeria* spp.

4. REVISÃO DE LITERATURA

4.1 O Eucalipto

A família Myrtaceae caracteriza-se, principalmente, pela presença de cavidades lisígenas secretoras de substâncias oleosas; mesofilo isobilateral a dorsiventral; tricomas simples; estômatos ocorrendo em ambas as superfícies de folhas e presença de cristais (Metcalf e Chalk, 1957). O eucalipto apresenta cavidades secretoras que, na maioria das espécies, são localizadas abaixo da epiderme e distribuídas nos tecidos parenquimáticos, sendo substituídas em algumas espécies, como *Corymbia citriodora*, por emergências secretoras distribuídas em ambas as faces da folha (Accorsi, 1941; Metcalf e Chalk, 1957). A epiderme é revestida por cutina e cera em algumas espécies, como o *Eucalyptus globulus* (Labill) que apresenta cera epicuticular, conferindo coloração azulada em plantas jovens; o mesofilo é isobilateral quando em formação, tornando-se dorsiventral posteriormente (Johnson, 1926).

O gênero *Eucalyptus* foi descrito em 1788 por L'Heritier de Brutelle no "Sertum Anglicum", 18, t.20, publicado em Paris. Espécies dentro deste gênero encontram-se disseminadas por todo o continente Australiano e por diversas ilhas da Oceania, explorando diferentes condições edafoclimáticas (Boland et al., 2006).

O gênero *Eucalyptus* pertence à família Myrtaceae, subdividido taxonomicamente, em oito sub-gêneros informais. O sub-gênero *Symphomyrtus* apresenta a maior parte das espécies cultivadas no mundo, com nove seções, sendo que três destas contém a maioria das espécies, tanto as mais cultivadas quanto as exóticas: Seção *Transversaria* (*Eucalyptus grandis*, *E. saligna*, *E. urophylla*); Seção *Exsertaria* (*E. camaldulensis*, *E. exserta*, *E. tereticornis*); Seção *Maidenaria* (*E. globulus*, *E. viminalis*). Este gênero conta com cerca de 700 espécies descritas, além de muitas subespécies e alguns híbridos naturais (Brooker e Kleining, 1990; Lorenzi e Matos, 2002). Apresenta ampla plasticidade e dispersão mundial, crescendo satisfatoriamente em diferentes situações edafoclimáticas (Santos et al., 2001).

Até o início deste século, o eucalipto foi plantado com a finalidade de ornamentação ou para servir de quebra-ventos, pelo seu extraordinário desenvolvimento (Pereira et al., 2000). Atualmente, espécies de eucalipto são cultivadas para os mais diversos fins, tais como papel, celulose, lenha, carvão, serraria, óleos para indústrias farmacêuticas, mel, ornamentação e quebra-vento, dentre outros. No mundo o eucalipto é a árvore mais plantada, com mais de 17,8 milhões de hectares (Alfenas et al., 2004; Medrado et al., 2005). No Brasil, as florestas comerciais com espécies de *Eucalyptus* expandiram significativamente nas últimas décadas, apresentando atualmente uma área plantada de 4,75 milhões de hectares (ABRAF, 2011).

Apesar da grande quantidade de espécies do gênero *Eucalyptus* descritas, os plantios são restritos a poucas espécies, podendo-se citar, principalmente, *Eucalyptus grandis*, *E. urophylla*, *E. saligna*, *E. camaldulensis*, *E. tereticornis*, *E. globulus*, *E. viminalis*, *E. deglupta*, *E. citriodora*, *E. exserta*, *E. paniculata*, *E. dunnii* e *E. robusta*.

4.2 A espécie *Eucalyptus globulus*

O *E. globulus* foi a primeira espécie de *Eucalyptus* introduzida no Brasil, no início do século XX (Vitti e Brito, 2003), sendo originária da Austrália (Lavrabre, 2001) e Tasmânia (Vitti e Brito, 2003). No século XIX, foi introduzida na Europa como planta ornamental, porém desenvolveu características peculiares que não eram encontradas no seu país de origem (Davis, 1996). É uma espécie que apresenta boa capacidade de produção

podendo chegar a até 2 ciclos de produção vegetativa após a primeira exploração integral (Vitti e Brito, 2003). Adapta-se bem em diversos tipos de solos e em regiões de clima temperado a quente (Zoghbi et al., 2001, citado por Rocha e Santos, 2007).

É a melhor espécie de eucalipto destinada à fabricação e papel e estima-se que existam mais de 2,5 milhões de hectares de área plantada com esta espécie no mundo (Potts et al., 2004, citado por Ferrere et al., 2005). Apresenta grande importância sob o ponto de vista econômico devido às suas propriedades terapêuticas (Cruz, 1965). É uma das espécies mais comumente plantadas no mundo devido à sua rápida taxa de crescimento e da polpa de madeira maciça de boa qualidade (Yang e Fife, 2000).

Esta espécie reproduz-se por sementes, de preferência em regiões de clima temperado quente, adaptando-se bem a diversos tipos de solos ricos em sais minerais (Zoghbi et al., 2001, citado por Rocha e Santos, 2007).

Existem 4 subespécies de *E. globulus*: *E. globulus* subesp. *bicostata*, *E. globulus* subesp. *maideni*, *E. globulus* subesp. *globulus*, *E. globulus* subesp. *pseudoglobulus* (Vitti e Brito, 2003). Seus principais sinônimos populares no Brasil são: árvore-de-febre, gomeiro-azul, eucalipto-limão (Lorenzi e Matos, 2002). Esta espécie caracteriza-se pelo grande porte e madeira dura e resistente, geralmente usada em construções.

Em *E. globulus* ocorre heterofilia muito aparente. As folhas juvenis são sésseis, ovaladas e recobertas por uma camada cerosa de cor azulada, surgindo opostas em caules de secção quadrangular. As folhas das árvores adultas são estreitas, alongadas, falciformes com uma camada cerosa verde acinzentada (particularmente na face abaxial), surgindo alternadamente ao longo de caules arredondados.

Apresenta madeira clara de coloração amarelo-pálido, compacta, rija, muito forte e de grande durabilidade (30 a 50 anos), muito utilizada em construção naval, pilares de pontes e quaisquer obras hidráulicas, marcenaria, lenha e carvão (Correa, 1931).

O avanço das áreas reflorestadas para regiões mais quentes e úmidas, o plantio de espécies mais suscetíveis e a utilização repetitiva de uma mesma área para plantio criaram condições favoráveis à ocorrência de doenças (Junghans, 2000). Algumas doenças vêm sendo constatadas concomitantes ao crescimento do cultivo de eucalipto no Brasil, dentre estas, manchas causadas por espécies de *Mycosphaerella* e *Teratosphaeria*, que promovem grandes perdas econômicas em plantios de *Eucalyptus globulus*.

4.2. *Mycosphaerella* sp. e *Teratosphaeria* sp.

Fungos pertencentes aos gêneros *Mycosphaerella* e *Teratosphaeria* estão dentro do Filo Ascomycota, na Classe Loculoascomycetes, caracterizada pela formação das ascas no interior de lóculos, nos quais as estruturas onde se formam as ascas, e conseqüentemente os ascósporos, são do tipo ascostroma, que se desenvolvem no interior de lóculos. *Mycosphaerella* spp. e *Teratosphaeria* spp. possuem estroma unilocular peritecióide, denominado pseudotécio (Alexopoulos et al., 1996, Putzke e Putzke, 1998). Os pseudotécios são produzidos em um aglomerado de hifas entrelaçadas junto ao substrato próprio bem desenvolvido composto por hifas escuras. Esta é a diferença fundamental no desenvolvimento em loculoascomycetes, porque a estrutura que conterá os ascos está presente antes do início do desenvolvimento dos mesmos, e não ocorre o desenvolvimento do ascoma ao redor dos ascos, como ocorre nos peritécios (Alexopoulos et al., 1996). As hifas podem apresentar coloração marrom a marrom acinzentada (Alexopoulos et al., 1996), características da ordem Capnodiales (Crous, 1998).

Atualmente existem cerca de 90 espécies de fungos dentro dos gêneros *Mycosphaerella* e *Teratosphaeria*, e vários gêneros anamorfos desconhecidos até o presente momento, encontrados em *Eucalyptus* spp. (Crous et al., 2007b).

Quando há condições de umidade favoráveis os ascósporos maduros são liberados dos pseudotécios e dispersados pelo vento, e infectam o hospedeiro por meio da abertura dos estômatos (Park, 1988). Os ascósporos consistem na primeira fonte de inóculo, para a maioria das espécies de *Mycosphaerella* e *Teratosphaeria*, considerando que algumas infectam primeiramente por conídios (Crous, 2007; Park e Keane, 1987). Algumas espécies podem ser diferenciadas umas das outras por meio dos padrões de germinação dos ascósporos (Crous, 1998; Crous et al., 2007a) e quando cultivados em meio de cultura podem apresentar micélio cotonoso ou não, e colorações distintas (Crous, 1998; Maxwell, 2004). Na maioria das espécies, não ocorre formação do pseudotécio em meio de cultura, mesmo que sejam axênicas, estas estruturas são encontradas somente nas manchas em folhas (Park e Keane, 1982a; 1982b).

Após a infecção, os primeiros sintomas da doença podem aparecer em um período de três a quatro semanas em materiais genéticos mais suscetíveis, e seis semanas em folhas adultas ou folhas de espécies mais resistentes (Park et al., 2000). Os sintomas

podem variar de acordo com a espécie do hospedeiro e do patógeno, as manchas podem ser arredondadas ou irregulares com coloração amarelo-pardo a marrom (Crous, 1998). Os pseudotécios formam-se após 8 semanas (Park e Keane, 1987), individualmente abaixo dos estômatos no tecido necrótico; os estômatos fornecem lugar para a formação dos pseudotécios e a distribuição dos estômatos pode refletir a distribuição e a quantidade dos pseudotécios (Beadle, 2000).

Nos pseudotécios se formarão as ascas bitunicadas e sem paráfises, com 8 ascósporos bicelulares, ou tri celulares dependo da espécie (Park et al., 2000), que após 24 horas germinam formando tubos germinativos que se desenvolvem a partir das duas extremidades dos esporos. Os ascósporos são oblíquos, de forma elipsoidal ou fusiforme, hialinos e lisos, apresentam um septo (Crous, 1998), são disseminados pelo vento a partir das lesões nas folhas, a alturas entre 12-15 mm, entretanto, necessitam de 90% de umidade, e temperaturas que variam entre 20°C e 25°C, como por exemplo, para *Teratosphaeria nubilosa* (Cooke) Crous & U. Braun. São esporos altamente adaptados para sobreviverem à desidratação na superfície das folhas; esporos deste fungo podem sobreviver por um período de até 8 semanas, apresentando baixa perda da infectividade.

Uma das principais doenças da cultura do eucalipto é a mancha de micosferela, causada por um complexo de espécies de *Mycosphaerella* e *Teratosphaeria*. Os fungos *T. nubilosa* e *T. cryptica* são considerados os mais importantes em nível mundial (Carnegie e Ades, 2002; Hunter et al., 2009), sendo estas as primeiras espécies que infectam tecidos vivos e sadios do hospedeiro, adquirindo nutrientes para sua fase hemibiotrófica (Hunter et al., 2009; Park e Keane, 1982a; 1982b). Estas duas espécies de *Teratosphaeria* são responsáveis pela doença foliar mais importante para as espécies *Eucalyptus globulus* (Labill) e *Eucalyptus nitens* (Deaneand Maid.) Maid., sendo estas as mais plantadas em regiões temperadas (Hunter et al., 2004).

Segundo Crous (1998) e Crous et al. (2006), outras espécies de *Mycosphaerella* e *Teratosphaeria*, demonstram patogenicidade fraca aparente ou podem atuar como saprófitas no tecido necrótico, seguidas pela infecção de outras espécies patogênicas, insetos ou senescência natural da folha.

Além de *E. globulus*, existem relatos na Austrália de *T. cryptica* associada com *E. marginata* e *E. patens*, (Carnegie et al., 1998). Espécies de agentes causais

de mancha de micosferela foram isoladas de *E. camaldulensis* × *E. urophylla*, *E. tereticornis*, *E. platyphylla*, *E. deanei*, *E. aglomerata*, *E. urophylla*, *E. camaldulensis*, *E. botryoides*, *E. grandiflora*, *Corymbia henryii*, *C. variegata* (Alfenas et al., 2004; Carnegie e Keane, 1994,1998; Carnegie e Ades, 2002; Crous, 1998, 2009; Crous et al., 2000, 2007a, 2007b; Ganapathi, 1979; Hunter et al., 2004). As plantas altamente suscetíveis podem ter o seu rendimento comprometido pela doença, que pode levar até à morte da planta.

No Brasil, surtos epidêmicos de manchas foliares, devido á estes agentes causais eram pouco comuns; até recentemente, foram relatadas apenas quatro espécies, sem muita importância epidemiológica, sendo elas *M. heimii*, *M. parkii*, *M. suttoniae* e *T. suberosa* (Alfenas et al., 2004) em *E. globulus* e *E. nitens*.

Em países, como África do Sul e Austrália, a ocorrência da espécie *T. nubilosa* provocou perdas significativas. Na Austrália, onde as plantações de *Eucalyptus globulus* expandiram rapidamente desde 1990, a incidência desta doença vem aumentando, (Mohammed et al., 2003).

Surtos epidêmicos de mancha de micosferela, principalmente causada por *T. nubilosa* em plantios de eucalipto, apresentam distribuição mundial (Figura 1). Além da Austrália (Park e Keane, 1982a; Carnegie e Keane, 1994, Maxwell et al., 2003; Maxwell, 2004) e Nova Zelândia (Dick & Gadgil, 1983, citados por Hunter, 2004), há relatos na África do Sul (Lundquist & Purnell, 1987), China e Portugal (Hunter et al., 2009, Silva et al., 2008) e Espanha (Crous, 2004). O fungo *T. nubilosa* foi relatado também em alguns países da América do Sul, como Uruguai, Argentina (Crous et al., 2006) e Chile (Ahumada et al., 2003, citado por Mohammed et al., 2003). No Brasil, a primeira constatação de *T. nubilosa* ocorreu no Rio Grande do Sul, causando grandes danos em plantações de *E. globulus* (Perez et al., 2009).

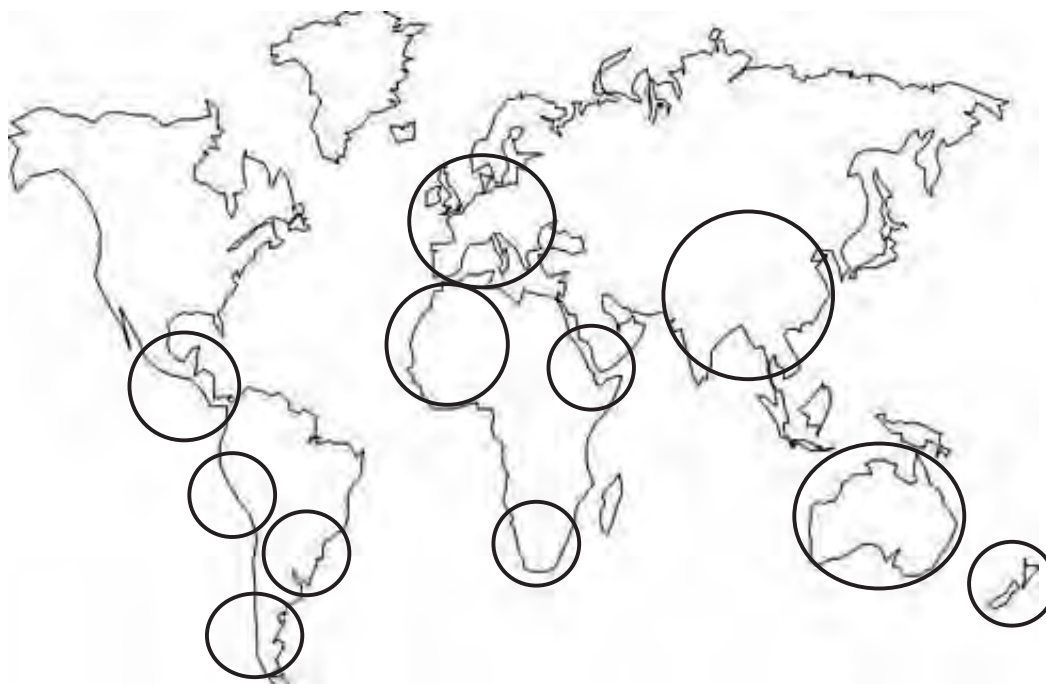


Figura 1: Distribuição espécies de *Mycosphaerella* e *Teratosphaeria*, agentes causais de mancha de micosferela em *Eucalyptus* spp.

Segundo Lindquist e Purnell (1987), existem relatos de surtos epidêmicos em plantações de *E. nitens*, o que promoveu um comprometimento de até 32% de área foliar por manchas causadas por estes patógenos, causando desfolha de 35 a 50% em plantas de até três anos de idade, e tendo como consequência uma redução de até 17% no incremento de madeira.

Existe uma grande diversidade de espécies que ocorrem em eucalipto, podendo ser encontradas de forma unitária ou associadas, promovendo sintomas variados dependendo da espécie do hospedeiro e do patógeno. Os danos causados por estes patógenos podem incluir desde manchas necróticas localizadas, desfolha, cancrios nos ramos, morte prematura dos ramos e em alguns casos atrofia e morte da árvore do topo para a base (Smith, 2006). No caso de manchas, estas podem ser arredondadas ou irregulares, de coloração variando de amarelo escuro a marrom escuro. Dependendo da espécie, é possível observarem-se nestas manchas, pseudotécios na face abaxial ou em ambas as faces da folha.

Também é possível ocorrer cancos nas hastes, como por exemplo, *T. cryptica* em *Eucalyptus delegatensis*.

Para o isolamento destes fungos em laboratório, pequenos pedaços das folhas de *E. globulus* contendo os sintomas e sinais dos patógenos são mergulhados em água destilada esterilizada por um período de duas horas. Posteriormente, estes são colocados na face interna de tampas de placas de Petri contendo meio de extrato de malte (MEA – 2%), ficando ali fixados devido à água presente no material. Após 24 horas, a 25°C é possível observarem-se os ascósporos que foram ejetados do material para o meio de cultura, em fase de germinação. A partir dos ascósporos germinados é possível a realização de isolamentos monospóricos em meio de cultura de extrato de malte (MEA – 2%) (Crous, 1998).

Os padrões de germinação dos ascósporos de agentes causais de mancha de micosferela podem apresentar diferenças (Ganapathi, 1979; Park e Keane, 1982a; Crous, 1998). Por exemplo, germinação bipolar em linha reta e com tubo germinativo sem ramificações como *T. nubilosa*; apenas em um dos pólos do esporo, como *Mycosphaerella gregaria*; germinação bipolar com ramificações perpendiculares como *M. lateralis*, ou ramificações diagonais como *M. crystalina*.

Os isolados dos fungos responsáveis pela mancha de micosferela apresentam diferenças quanto à forma de crescimento micelial e coloração, variando entre tons de cinza, marrom e verde escuro, porém com velocidades de crescimento semelhantes, crescendo cerca de dois centímetros em quatro semanas (Crous, 1998, Maxwell, 2004).

Devido a alguns rearranjos taxonômicos, principalmente relacionados à análises filogenéticas (Crous, 2006, 2007b), algumas espécies que estavam dentro do gênero *Mycosphaerella*, foram transferidas para o gênero *Teratosphaeria*, como: *T. molleriana*, *T. nubilosa*, *T. cryptica*, *T. ohnowa*, *T. parva*, *T. africana*. Porém, muitas continuam dentro de *Mycosphaerella*, como: *M. crystalina*, *M. lateralis*, *M. marksii*, *M. gregaria*, *M. parkii*. Apesar destas mudanças nos nomes das espécies dos agentes causais, o nome comum para esta doença não foi alterado; desta forma, a doença mancha de micosferela tem como agentes causais *Mycosphaerella* spp. e *Teratosphaeria* spp. (Crous, et al., 2007a, 2007b; Hunter et al., 2009).

A introdução de espécies de eucalipto em muitos países do Hemisfério Sul no século XX contribuiu consideravelmente para a distribuição geográfica de *T. nubilosa* (Hunter et al., 2009). A primeira constatação deste fungo, identificado anteriormente como

Mycosphaerella molleriana, fora da Austrália, foi no ano de 1950 na África do Sul. Porém Lundquist e Purnell (1987) acreditam que este fungo já poderia estar presente neste país desde 1930. Posteriormente, foi relatado em outros países e, em 1982, já se encontrava amplamente distribuído na Nova Zelândia (Mohamed et al., 2003). A ocorrência deste fungo no Quênia, Tanzânia e Zâmbia foi em 1995 como *Mycosphaerella juvenis* (Crous, 1998), e na Etiópia em 2000 (Hunter et al., 2009). É provável que este fungo tenha chegado à Europa por volta do ano 2001, sendo constatado em *E. globulus* na Espanha (Crous et al, 2004) e em Portugal (Hunter et al., 2009; Silva et al., 2008).

A detecção de espécies de agentes causais de mancha de micosferela no Brasil sugere que estas tenham sido introduzidas por meio de mudas e sementes e assim, também ocorreu a introdução em diferentes localidades no país. Também é possível que a introdução e disseminação tenham ocorrido por meio da dispersão natural de ascósporos pelo vento, sendo este um grande fator responsável pela distribuição destes fungos (Park e Keane, 1982b; Park, 1988; Hunter et al., 2009).

É provável também que estes fungos tenham sido introduzidos no país por meio de esporos dispersos pelo vento ou pelo movimento de sementes e mudas entre Brasil, Uruguai e Argentina. Algumas das espécies *Mycosphaerella* e *Teratosphaeria* isoladas no presente estudo foram recentemente constatadas no Uruguai como *M. lateralis*, *M. marksii*, *T. nubilosa* e *T. ohnowa* e também, *P. norchiensis* (Pérez et al., 2009) e *T. nubilosa* (Pérez et al., 2009; Perez et al., 2009). Além do Uruguai, as fontes de inóculo podem ser provenientes que qualquer país com o qual o Brasil realize importações de materiais.

A forma mais efetiva de controle para esta doença pode estar relacionada com o desenvolvimento de variedades resistentes, ou a substituição de plantas suscetíveis por espécies mais resistentes. Isto tem sido usado em alguns países como África do Sul (Lundquist e Purnell, 1987) e noroeste da Austrália (Mohammed et al., 2003). Esta estratégia também foi utilizada em plantações jovens com *E. delegatensis* e *E. regnans*, na Nova Zelândia, que foram tomadas pela doença, o que conduziu ao uso de espécies mais resistentes, como *E. nitens* (Crous, 2009).

A utilização de híbridos entre espécies resistentes e suscetíveis também é uma alternativa para controle de várias doenças; por exemplo, híbridos de *E. globulus* (suscetível a *T. nubilosa*) e *E. grandis* (tolerante a *T. nubilosa*) (Carnegie e Ades, 2002;

Carnegie et al., 1998; Milgate et al. 2005). Plantas que apresentem transição mais rápida de folhas jovens para adultas também podem ser utilizadas como forma de controle (Hamilton et al., 2010); híbridos de *E. globulus* x *E. grandis* apresentam esta característica, porém alguns testes ainda são necessários para avaliar se carregam alguns genes de suscetibilidade.

Para o sucesso do manejo e controle de epidemias de uma maneira geral, é necessário um entendimento da variabilidade genética e a epidemiologia do agente causal. Isto porque, espécies destes patógenos são morfologicamente parecidas e não necessitam de um hospedeiro específico, e espécies destes fungos podem ocorrer associadas na mesma lesão. Técnicas moleculares têm contribuído significativamente para detectar e diagnosticar doenças e também colaborar para detecções prévias (Arzanlou et al., 2007).

Com o surgimento dos marcadores em nível de DNA, a partir dos anos 70, estes foram sendo incorporados aos trabalhos, e nos dias atuais, são ferramentas importantes para o melhoramento de eucalipto. Os marcadores moleculares têm sido empregados na construção de mapas genéticos, mapeamento de QTLs (Ferreira e Gratapaglia, 1998), estudos de variabilidade genética e certificação de cruzamentos, e também identificação de genes de resistência a doenças (Junghans et al., 2003).

Marcadores moleculares são características de DNA que diferenciam dois ou mais indivíduos e são herdadas geneticamente (Borém, 2001). Os tipos distintos de marcadores moleculares, hoje disponíveis, diferenciam-se pela tecnologia utilizada para revelar variabilidade no de DNA. Assim, os marcadores variam quanto à habilidade de detectar diferenças entre indivíduos, custo, facilidade de uso, consistência e repetibilidade. Os principais tipos de marcadores moleculares podem ser classificados em dois grupos, conforme a metodologia utilizada para identificá-los: hibridização ou amplificação de DNA (Ferreira e Gratapaglia, 1998).

4.3 Anatomia foliar

Algumas características estruturais de defesa já estão presentes mesmo antes do contato do patógeno com a planta; algumas dessas características incluem tecidos constituídos por paredes celulares espessas (Agris, 2005).

Esporos de fungos são capazes de germinar tanto na superfície de plantas suscetíveis como nas resistentes; são os mecanismos de defesa que impedirão a

infecção. Para a ocorrência de uma infecção, os patógenos devem ultrapassar a superfície do hospedeiro, sendo esta a primeira linha de defesa (Pascholati e Leite, 1995). Para ascósporos, de agentes causais de mancha de micoserela, além de a superfície, é necessário que o tubo germinativo produzido por estes esporos penetre no hospedeiro por meio dos ostíolos dos estômatos. Em plantas com esta doença, o número de estômatos e sua localização na folha têm grande influência no processo inicial da infecção, pois, para ocorrência desta, é necessário que os mesmos estejam abertos, e que os ascósporos sejam depositados no local onde os estômatos estão localizados. Desta forma, em folhas jovens de *Eucalyptus* spp., os ascósporos devem ser depositados na face abaxial onde se localizam os estômatos (Park, 1988).

O tempo entre a necrose da célula vegetal e a inibição do crescimento do fungo pode variar dependendo do hospedeiro; em alguns casos, a inibição do fungo ocorre algumas horas antes da necrose; em outros, os processos podem ser simultâneos e também, a inibição pode ocorrer algumas horas após a necrose (Mares, 1979; Maclean e Tommerup, 1979, citados por Marttiello et al., 1997).

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

A penetração direta por alguns patógenos pode ser dificultada pela quantidade de lignina das células epidérmicas, assim como componentes inibidores, como os taninos presentes nas células das plantas antes da infecção, relacionados com a resistência a patógenos (Agrios, 2005, Silva et al., 2005).

Por meio de estudos anatômicos, Prabhpreet et al (2000) constataram um maior índice de parênquima paliádico em genótipos de melão cantaloupe resistentes a míldio causado por *Pseudoperonospora cubensis*. Os autores observaram que as células do parênquima dos genótipos resistentes estavam dispostas de maneira mais compacta, do que os genótipos suscetíveis, impedindo assim a propagação do patógeno no tecido.

Em folhas de cultivares de feijão, Jerba et al. (2002) verificaram materiais resistentes à antracnose por *Colletotrichum lindemuthianum*. O envelhecimento de hifas do fungo devido à maior pilosidade nas folhas, além disso, os autores relataram que

camadas de células paliçádicas com menores espaços intercelulares podem atrasar ou impedir a infecção dificultando a colonização pelo patógeno.

Em brotos de cana de açúcar, o xilema e as fibras esclerenquimáticas podem interromper o avanço do fungo *Ustilago scitaminea*, agente causal de carvão nesta cultura (Gloria et al., 1995).

Sambugaro et al. (2003) através de estudos anatômicos constataram o grau de resistência de clones de seringueira ao *Microcyclus ulei*, agente causal do mal das folhas, nos quais observaram maior espessura da epiderme abaxial e a ausência da fase sexuada do patógeno. Desta forma, não ocorreu formação de tecidos estromáticos, pseudotécios, e conseqüentemente não houve produção de ascósporos.

Smith et al. (2007) relataram a resistência de *Eucalyptus nitens* à *Mycosphaerella* spp., onde folhas jovens de *E. nitens* que apresentaram poucos sintomas da doença, eram mais espessas, com proporção elevada de parênquima paliçádico e espaços intercelulares menores. O *E. globulus*, mais suscetível à infecção, possui mesofilo isobilateral, facilitando o avanço e a evolução do patógeno nos tecido do hospedeiro.

O estudo da anatomia foliar é bastante importante, pois permite uma análise comparativa entre os diferentes hospedeiros em diferentes estádios foliares. Isto possibilita relacionar o nível de resistência com a quantidade de tecidos e outros fatores presentes que possam constituir em barreiras à infecção pelo patógeno, como cera epicuticular, deposição de substâncias (suberina, gomas, resinas, látex, entre outras), presença de substâncias tóxicas e tricomas (Taiz e Zeiger, 1998). Pesquisas relacionadas com a anatomia foliar podem auxiliar na busca de soluções de problemas relacionados com a taxonomia, e também no estudo de determinadas doenças, principalmente doenças economicamente importantes.

4.4 Metábolitos Secundários

As plantas produzem uma grande variedade de compostos orgânicos, conhecidos como metabólitos secundários, produtos secundários ou naturais; estes não tem, geralmente, papel reconhecido nos processos de fotossíntese, respiração, transporte de solutos, translocação e/ou assimilação de nutrientes; são freqüentemente encontrados somente em algumas espécies de plantas ou grupos taxonômicos (Taiz e Zeiger, 1998). São produzidos em

flores, cascas de frutos (denominados cítricos), folhas e pequenos grãos, raízes, cascas da árvore, resinas da casca, sementes (Wolffenbüttel, 2007).

Na natureza, a maioria das plantas é resistente aos diferentes patógenos, e essa resistência pode estar relacionada à existência de substâncias tóxicas aos microrganismos. Algumas destas substâncias são pré-formadas pelo hospedeiro, estando presentes antes mesmo do contato com o patógeno, outras são pós-formadas ou induzidas após o ataque do agente causal da doença (Milner et al, 1991; Pascholati e Leite, 1995; Taiz e Zeiger, 1998).

Muitas plantas contêm misturas de monoterpenos voláteis e sesquiterpenos, chamados óleos essenciais, que dão um odor característico à folhagem. São frequentemente encontrados em pêlos glandulares que se projetam para fora da epiderme e servem para advertir a toxicidade da planta, repelindo potenciais herbívoros, antes do ataque (Rodríguez-Concepción e Boronato, 2002; Milner et al., 1991; El Tamer, 2005).

Os metabólitos secundários das plantas podem ser divididos em três grupos químicos distintos: terpenos, fenóis e compostos contendo nitrogênio. Muitos óleos essenciais de espécies vegetais têm sido usados no controle de doenças, pelas características antimicrobianas de seus compostos, sintetizados no metabolismo secundário da planta. Estes extratos são reconhecidos por seus compostos ativos, como é o caso dos fenólicos, que fazem parte dos óleos essenciais e dos taninos (Nascimento et al., 2000).

Do ponto de vista químico, os das plantas, os extratos são constituídos principalmente de uma mistura de lipídeos chamados terpenos. Os terpenos são hidrocarbonetos; os oxigenados são denominados terpenóides (Sangwan et al., 2001).

Os terpenos ou terpenóides, ou isoprenóides constituem uma ampla classe de produtos secundários, que são ativos contra bactérias, fungos, vírus e protozoários (Cowan, 1999; Taiz e Zeiger, 1998). Originados da via do acetato-mevalonato a partir de uma unidade isopreno. São, em sua maioria, metabólitos secundários que constituem os óleos essenciais das plantas, apresentando uma ampla gama de funções que vão desde mediar processos básicos de interação com outros organismos até aplicações em indústrias, como a cosmética e a farmacêutica (Takita, 2006).

Os monoterpenos e sesquiterpenos são encontrados principalmente nas plantas. Os terpenos de peso molecular mais alto aparecem nas plantas e animais, e muitos

deles desempenham papéis biológicos importantes. O triterpeno lanosterol, por exemplo, é precursor dos hormônios esteróides. Estas substâncias estão presentes nos óleos essenciais de muitas plantas e flores. Tais óleos são muito utilizados como flavorizantes em alimentos, fragrância, na aromaterapia e medicina alternativa (Taiz & Zeiger, 1998; Cowan, 1999).

Possuem também atividades biológicas que permitem grande potencial de uso como herbicidas (Abraham et al., 2003), pesticidas (Burfield e Reekie, 2005), anticarcinogênicos (Mahmoud e Croteau, 2002; El Tamer, 2005), ação repelente sobre herbívoros e servir como atraente de inimigos naturais de fitófagos (Rodríguez-Concepción e Boronato, 2002; Taiz e Zeiger, 1998).

Em milho, imediatamente após o ataque do lepidóptero *Spodoptera littoralis*, há a emissão de mono e sesquiterpenos voláteis, alguns já identificados, que são utilizados por vespas parasitas para localizar larvas do lepidóptero que são seus hospedeiros naturais (Schnee et al., 2002). Os terpenos têm sido muito estudados em coníferas, sendo que diversos terpenos de produção constitutiva e induzíveis pelo sistema de defesa da plantas já foram identificados (Martin et al., 2003).

Os terpenos são ativos contra bactérias, fungos, vírus e protozoários (Cowan, 1999). São classificados de acordo com o número de unidades de cinco carbonos que contêm. Quando produzidos por fungos fitopatogênicos, estas substâncias estão relacionadas com a destruição dos tecidos e provocam lesões nas plantas superiores (Cowan, 1999).

Mais de 22.000 terpenos de plantas têm sido identificados, tais como os esteróis e ubiquinonas, reguladores de crescimento (giberelinas, ABA, brassinosteróides e citocininas), certas fitoalexinas e outros terpenos especializados, essenciais para o crescimento e desenvolvimento normal e na defesa contra patógenos (El Tamer, 2005).

Sob o ponto de vista da sua composição química, qualitativa e quantitativa, os óleos essenciais de eucalipto são misturas, mais ou menos complexas, e variam de acordo com a espécie, genética, tipo e idade da folha, condições ambientais (clima, solo, luz, calor, umidade) e processo de extração. Predominam nesses óleos os hidrocarbonetos terpênicos monocíclicos, derivados do isopreno (Souza, 2008).

Muitas plantas, quando adultas, apresentam certa resistência a determinados patógenos, isto ocorre devido à presença dos metabólitos secundários já totalmente desenvolvidos em células adultas, como compostos taníferos, e também uma

característica marcante às mirtáceas. Os óleos essenciais ocorrem nas cavidades secretoras subepidérmicas, distribuídas em ambas as faces foliares, tendo seu conteúdo típico para cada espécie dentro da família (Donato e Morretes, 2007). Segundo Castro e Machado (2003) os óleos essenciais servem para reduzir herbivoria, repelir insetos entre outros benefícios às plantas.

O termo óleo essencial tem sido utilizado desde a idade média, porém, um termo mais adequado seria o termo óleos voláteis, pois são obtidos por um processo e arraste a vapor (Milner et al., 1991). A composição química do óleo volátil de uma planta é determinada geneticamente, sendo geralmente específica para um determinado órgão, e característica para seu estágio de desenvolvimento (Simões e Spitzer, 1999), mas as condições ambientais e idade da planta são capazes de causar variações significativas.

Muitos estudos têm sido realizados ressaltando a ação de óleos extraídos de plantas no controle de fitopatógenos. Fiori et al. (2000), verificaram inibição completa do crescimento micelial do fungo *Didymella bryoniae*, causador do cancro da haste em melão, mesmo na concentração mais baixa do óleo essencial de *Corymbia citriodora*, resultando na inibição da germinação dos esporos do fungo.

Alguns dos produtos secundários produzidos pelas plantas podem conferir proteção contra uma vasta gama de fitopatógenos e também contra herbívoros, porém, em algumas situações os patógenos podem se mostrar resistentes às barreiras químicas impostas pelas plantas, podendo ser atraídos pelas toxinas produzidas pelas mesmas (Wink, 1987). French (1961) constatou que a taxa de germinação de urediniósporos de *Puccinia graminis* pode ser acelerada na presença de muitos terpenóides e compostos relacionados.

Souza (2008), utilizando três estádios foliares de clones de *Eucalyptus* sp., observou diferenças na porcentagem relativa dos constituintes químicos, presentes nos óleos essenciais, e sua relação com a resistência à ferrugem (*Puccinia psidii*). De acordo com autor, o rendimento foi crescente em relação aos estádios foliares, e quanto aos clones, o altamente suscetível à *P. psidii*, apresentou menor rendimento em comparação aos outros clones. Por meio destes resultados foram identificados dois marcadores bioquímicos de resistência à ferrugem do eucalipto: maiores porcentagens de limoneno em clones resistentes e de γ -terpineno em clones suscetíveis.

Em *E. globulus*, o componente principal do óleo é o 1,8 cineol ou eucaliptol, apresentando concentração média de 80% (Vitti e Brito, 2003). Os óleos essenciais que podem ser extraídos de *E. globulus*, além de fins medicinais, também estão relacionados com certas doenças, como a mancha de micosferela. Estudos relacionados a estes compostos podem colaborar com a busca de formas de controle desta doença, devido á produção do mesmo frente ao patógeno por plantas resistentes e suscetíveis.

Existem trabalhos que relatam as propriedades inseticida e antimicrobiana de óleos extraídos de eucalipto; as folhas têm sido usadas no armazenamento de grãos, pois seus óleos são capazes de inibir o crescimento de outros organismos (Oqunwande et al, 2003).

Os danos provocados por *Mycosphaerella* spp. e *Teratosphaeria* em *Eucalyptus globulus*, afetam de forma significativa o crescimento e rendimento das árvores. A diminuição da capacidade fotossintética devido às lesões necróticas na folhas compromete diretamente o crescimento, sendo significativamente grave em árvores plantadas em solos pobres e em condições desfavoráveis de cultivo.

Em viveiro e plantios jovens a suscetibilidade é maior, pois a infecção se dá através de folhas jovens, que podem se expandir e propagar o patógeno rapidamente. Em se tratando de árvores jovens a sua capacidade de resistir à diminuição da capacidade fotossintética é menor, prejudicando o crescimento e podendo promover a morte da árvore.

Desta forma a importância de estudos relacionados a mancha de micosferela, deve-se ao fato desta doença provocar consideráveis prejuízos ao cultivo de eucalipto, principalmente *E. globulus*. O conhecimento do patógeno e sua relação com o hospedeiro apresentam-se relevantes para o cultivo desta espécie de eucalipto, bem como possíveis formas de evitar a infecção, como componentes voláteis dos óleos essenciais e sua influência sobre os agentes causais.

DIVERSIDADE DE *Mycosphaerella* spp. E *Teratosphaeria* spp. ASSOCIADAS EM *Eucalyptus globulus* EM CINCO DIFERENTES LOCAIS**RESUMO**

Dentre as doenças mais importantes que ocorrem em *Eucalyptus*, destaca-se a mancha de micoserela, causada por *Mycosphaerella* spp. e *Teratosphaeria* spp. Esta doença tem acarretado prejuízos significativos em plantios de eucalipto na região Sul e Sudeste do Brasil e em vários países como Portugal, Espanha, África do Sul e Austrália. As plantas atacadas apresentam-se com manchas necróticas localizadas, desfolha precoce em plantas juvenis, cancos, morte prematura dos ramos e, em alguns casos, pode ocorrer atrofia e morte. Neste estudo foram realizados isolamentos monospóricos a partir de folhas de *E. globulus* provenientes de Bagé-RS, Pedras Altas-RS, Botucatu-SP, Jacareí-SP e Itapeva-SP, através dos quais foi possível a observação das diferentes espécies quanto à forma de germinação dos ascósporos e o crescimento em meio de cultivo. Os isolamentos resultaram na obtenção de 46 isolados, cujas espécies foram também identificadas por meio de PCR com primers ITS1 e ITS4 e sequenciamento destas regiões genômicas. Neste estudo, foi possível identificar seis espécies de *Mycosphaerella* e quatro espécies de *Teratosphaeria* associadas à folhas com sintomas da doença, em plantios de *E. globulus* em diferentes locais no Brasil.

Palavras chave: Mancha foliar, sintomas, germinação e ascósporos, isolamento monospórico.

DIVERSITY OF *Mycosphaerella* spp. AND *Teratosphaeria* spp. ASSOCIATED TO *Eucalyptus globulus* IN FIVE DIFFERENT LOCALITIES**ABSTRACT**

Among the most important diseases that occur in *Eucalyptus*, highlight the *Mycosphaerella* leaf disease caused by *Mycosphaerella* spp. and *Teratosphaeria* spp. This disease causes significant damage in eucalypt plantations in Southern and Southeastern Brazil and several

countries, such as Portugal, Spain, South Africa and Australia. Attacked plants show localized necrotic spots, early defoliation in juvenile plants, canckers and premature death of plants and in some cases atrophy may occur. In this study isolates was performed from leaves of *E. globulus* from Bage,RS, RS-Pedras Altas, Botucatu-SP, Jacareí-SP, Itapeva-SP. From spore isolates could observe the different species on ways to ascospores and growth medium, which resulted in obtaining 46 isolates whose species were also identifies by PCR with primer ITS1 and ITS 4 and sequencing of these genomic regions. Through this study was identified six species of *Mycosphaerella* and four species of *Teratosphaeria* associated with leaf disease symptoms in plantations of *E. globulus* on different locations in Brazil.

Keywords: Leaf spot, symptoms, ascospores germination, monosporic isolation.

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Eucalyptus* pertence à família Myrtaceae, e possui aproximadamente 700 espécies (Lorenzi e Matos, 2002) e apresenta uma plasticidade ampla e dispersão mundial, crescendo satisfatoriamente em diferentes situações edafoclimáticas (Santos et al., 2001). É cultivado para diversos fins, tais como, papel, celulose, lenha, carvão, serraria, óleos para indústrias farmacêuticas, mel, ornamentação e quebra-vento, entre outros. No mundo, o eucalipto é a árvore mais plantada, com mais de 17,8 milhões de hectares (Alfenas et al., 2004).

As florestas comerciais com espécies de *Eucalyptus* no Brasil expandiram significativamente nas últimas décadas, apresentando atualmente uma área plantada de 4,75 milhões de hectares (ABRAF, 2011).

A espécie *Eucalyptus globulus* (Labill) apresenta uma boa capacidade de produção, podendo chegar até dois ciclos de produção vegetativa após a primeira exploração integral, quando então ocorre uma redução de produção (Vitti e Brito, 2003). Fornece madeira clara de coloração amarelo-pálido, compacta, rija, muito forte e de grande durabilidade que recebe bem o verniz, é utilizada também na construção naval, pilares de pontes e quaisquer obras hidráulicas (especialmente em contato com a água salgada), marcenaria, lenha e carvão (Correa, 1931). Também apresenta propriedades medicinais e aromáticas.

Um dos principais transtornos relacionados com a eucaliptocultura é a ocorrência de uma série de doenças e pragas. Dentre as doenças, destaca-se a mancha de micosferela, mancha foliar causada por grande número de espécies de *Mycosphaerella* e *Teratosphaeria* (Crous, 1998; Crous, et al., 2007b). Estes gêneros pertencem ao Filo Ascomycota, e incluem mais de 80 espécies associadas com doenças foliares em *Eucalyptus* spp. em muitos países onde existem plantios comerciais destas árvores (Crous, 1998; Crous, et al., 2004, 2006).

Os sintomas associados a esta doença são variáveis, e diferem entre si dependendo da espécie do hospedeiro e do patógeno. Primeiramente, são observadas manchas necróticas localizadas que reduzem a capacidade fotossintética das folhas, ocasionando desfolha precoce em plantas juvenis (Ganapathi, 1979). Com a evolução da doença podem ocorrer cancos nos ramos, como por exemplo, *Teratosphaeria cryptica* (Cooke) Crous & U. Braun em *Eucalyptus delegatensis*, e morte prematura dos mesmos. Em alguns casos, esta doença pode causar atrofia e morte da árvore (Smith, 2007). As árvores frequentemente têm o seu metabolismo alterado, o que resulta em redução do crescimento; além disso, esta doença pode contribuir para infecções provocadas por patógenos secundários e resultar em prejuízos econômicos consideráveis (Hunter et al., 2004).

Os fungos *T. nubilosa* (Cooke) Crous & U. Braun e *T. cryptica* são considerados os mais importantes em nível mundial (Carnegie e Ades, 2002; Hunter et al., 2009), sendo estas as primeiras espécies a infectarem os tecidos vivos e sadios do hospedeiro, adquirindo nutrientes para sua fase hemibiotrófica (Hunter et al., 2009; Park e Keane, 1982b). Estas duas espécies de *Teratosphaeria* causam a mais importante doença foliar para espécies *E. globulus* e *E. nitens*, sendo estas as espécies de eucalipto mais plantadas em regiões temperadas (Hunter et al, 2004). Com relação a *Eucalyptus globulus* a mancha de micosferela é considerada uma das mais importantes doenças, devido a esta ser uma das espécies de eucalipto mais suscetíveis (Carnegie e Keane, 1998).

Segundo Crous (1998) e Crous et al. (2006), outras espécies de *Mycosphaerella* e *Teratosphaeria*, aparentemente demonstram patogenicidade fraca ou podem atuar como saprófitas no tecido necrótico, seguidas pela infecção de outras espécies patogênicas, insetos ou senescência natural da folha.

De um modo geral, a esta doença foi atribuído o nome mancha de micosfaerela. Crous et al.(2007a) demonstraram que *Mycosphaerella* é polifilética, portanto algumas espécies que ocorrem em *Eucalyptus* foram transferidas para o gênero *Teratosphaeria*. Apesar dos rearranjos taxonômicos relacionados aos agentes causais, o nome comum para esta doença não foi alterado e desta forma, a doença mancha de micosferela tem como agentes causais *Mycosphaerella* spp. e *Teratosphaeria* spp. (Crous et al., 2007a, 2007b; Hunter et al, 2009).

A taxonomia relacionada aos gêneros *Mycosphaerella* e *Teratosphaeria* e a identificação de espécies dentro destes torna-se difícil algumas vezes, principalmente de em função dos hospedeiros, o que era considerado tradicionalmente como fator primário para identificação. Atualmente, características culturais, conexões com teleomorfos, bem como os padrões de germinação dos ascósporos, têm sido características taxonômicas úteis para a classificação destes patógenos (Crous, 1998). Na maioria das espécies, não ocorre formação do pseudotécio em meio de cultura, mesmo que sejam axênicas; sendo estes ascomas encontrados somente no tecido necrótico em folhas (Park e Keane, 1982a; 1982b).

As técnicas baseadas em biologia molecular, com o sequenciamento de DNA de isolados obtidos a partir de espécies de *Eucalyptus* com esta doença, são essenciais para a identificação das espécies de *Mycosphaerella* e *Teratosphaeria* em *Eucalyptus*, e também em outros hospedeiros (Crous et al. 1998, 2001).

Assim este trabalho teve como objetivos verificar, identificar e estudar a diversidade de espécies de *Mycosphaerella* e *Teratosphaeria* em plantios de *Eucalyptus globulus* de cinco diferentes locais, por meio de isolamentos a partir de folhas com sintomas e sinais de agentes causais de mancha de micosferela. Também foi observada a germinação dos ascósporos e realizada a identificação taxonômica e por meio de PCR e sequenciamento da região ITS.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Coleta de amostras, diferenciação dos sintomas da doença e isolamento dos agentes causais de mancha de micosferela

Para o presente estudo foram utilizadas folhas jovens e adultas de *E. globulus* apresentando a doença. Estes materiais foram coletados em cinco locais distintos: dois plantios

na região de Bagé-RS (Fazenda São José: 31°03'57.70''S e 53°44'16.01''O) e Fazenda São José III: 31°5'30'' S e 53°44'10'' O, da empresa FIBRIA Papel e Celulose); Pedras Altas-RS (Fazenda São Luiz: 31°56'42'' S e 52°56'48'' O, da empresa FIBRIA Papel e Celulose). Vale ressaltar que em ambos os casos, os plantios estavam com um ano de idade. Outros locais de coleta foram: Botucatu-SP, (Fazenda Lageado: 22°50'36''S e 48°25'37'' O - Câmpus da FCA-UNESP); Jacareí-SP (Viveiro Jacareí: 23°17'49'' S e 45°54'51'' O, da empresa FIBRIA Papel e Celulose) e Itapeva-SP (Fazenda Karamacy: 23°52'29'' S e 48°53'45'' O, da empresa FIBRIA Papel e Celulose). Quanto aos materiais coletados no estado de São Paulo, eram provenientes de plantios com, respectivamente, três anos, um ano, e dois anos e quatro meses.

Os materiais foliares utilizados para os isolamentos, além de apresentarem os sintomas característicos de *Teratosphaeria nubilosa* e *Mycosphaerella lateralis*, apresentavam também manchas, provavelmente, ocasionadas por outras espécies pertencentes a estes dois gêneros (Figura 1).

Os isolamentos foram realizados de acordo com a metodologia elaborada por Crous (1998), na qual pequenos pedaços de folhas de *E. globulus*, com os sintomas e sinais dos fungos foram mergulhados em água destilada estéril por um período de duas horas, com a finalidade de umedecer os corpos de frutificação e proporcionar a ejeção de ascósporos.

Posteriormente, os materiais foram retirados da água e colocados na face interna de tampas de placas de Petri (90 x 15 mm), tais placas continham meio de extrato de malte (MEA – 2%). Nas tampas os pedaços de folhas ficaram fixados devido à umidade presente nos mesmos. Estas placas foram mantidas em câmara de temperatura controlada (BOD) a 25°C durante 24h, quando já foi possível a observação e estereoscópico dos ascósporos ejetados e germinados no meio de cultura.

A partir dos ascósporos germinados, foi realizado o isolamento monospórico em meio de cultura de extrato de malte (MEA – 2%), verificando-se que apresentavam diferenças quanto à forma de crescimento micelial e coloração. Após a realização de isolamentos monospóricos, as placas de Petri permaneceram em BOD a 25°C no escuro, tendo seu crescimento observado por um período de 30 dias.

Os isolados obtidos nesse estudo foram depositados na coleção de fungos fitopatogênicos “Micoteca Mário Barreto Figueiredo”, no Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Vegetal do Instituto Biológico (IB) de São Paulo-SP.

2.2 Estudos moleculares para identificação dos isolados obtidos

Para o melhor conhecimento dos isolados obtidos, houve a necessidade de identificação molecular, a qual foi desenvolvida no Laboratório de Bioquímica do Instituto Biológico, São Paulo-SP.

Pequenas porções das colônias fúngicas, mantidas em meio V8 acrescido de extrato de malte, foram retiradas para extração do DNA de acordo com o protocolo CTAB (hexadecyl trimethyl ammonium bromide), adaptado de Dellaporta et al., (1983).

O procedimento foi iniciado com a ruptura dos tecidos realizada por meio da maceração do material vegetal, com auxílio de um pistilo e de nitrogênio líquido. Posteriormente, as amostras trituradas foram ressuspensas em 600µL do CTAB tampão de extração [100mM Tris-HCl (pH 8,0), 1,4 M NaCl, 2 mM *Ethylenediaminetetraacetic acid* (EDTA) e 2% de CTAB, solução que facilita a ação das endonucleases.

Para a remoção de proteínas e carboidratos, foram utilizados clorofórmio e álcool isoamílico na proporção de 29:1 v/v; sendo adicionados 600µL de clorofórmio-isoamílico e as amostras centrifugadas a 10.000 rpm, 4°C e 5 min. Após a centrifugação o sobrenadante foi transferido para novo ependorf. Ao sobrenadante retirado foi adicionado 1/10 de CTAB/NaCl o que correspondeu a 40µL uma vez que o volume de sobrenadante retirado foi de 400µL.

Em seguida, as amostras foram novamente centrifugadas a 10.000 rpm, 4°C e 5 min, e novamente foi repetida a purificação com clorofórmio-isoamílico. Após a centrifugação, foram retirados 300 µL do sobrenadante, sendo este volume transferido para um novo tubo ao qual foi adicionado CTAB tampão de precipitação [50 mM Tris Cl (pH 8,0) e 10 mM EDTA (pH 8,0)], na mesma quantidade. As amostras foram colocadas a 65°C, sem agitação, por 30 min, para que o DNA se depositasse no fundo do tubo. Transcorrido o tempo de 30 min, as amostras foram centrifugadas a 4°C, 2.700 rpm, por 5 min, o sobrenadante descartado e foi adicionado 500µL da solução high salt TE [2M de Tris Cl (pH 8,0), 0,5 M de

EDTA (pH 8,0) e 5M NaCl]. A solução high salt TE foi descartada, sendo a seguir, o DNA precipitado com 300µL de isopropanol absoluto, e o isopropanol foi descartado.

Posteriormente, foi realizada uma lavagem com 300µL de etanol 70%, os tubos colocados na centrífuga a 4°C, 13.000 rpm por 5 min. Depois da centrifugação das amostras, o etanol foi descartado cuidadosamente para que o DNA não se desprendesse do fundo do tubo. Após o descarte do etanol, os tubos ependorf foram secos em uma centrífuga a vácuo, por 5 min. Em seguida, realizou-se a ressuspensão do DNA, adicionando-se 50µL de água MiliQ estéril, e os ependorfs contendo o DNA dos isolados foram armazenados em freezer.

Para auxílio nas extrações de DNA quando o protocolo CTAB não possibilitou a extração em determinadas amostras, foi utilizado o Kit de Extração (UltraClean Plant DNA Kit – MoBio).

Para a reação de PCR, foi preparado um volume final de 20µ. Para cada isolado, sendo todos os reagentes misturados no mesmo ependorf, exceto o DNA que foi posteriormente adicionado. Para o preparo do mix foram utilizados: 0,2 µL do primer ITS1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3') e 0,2 µL do primer ITS4 (5'- TCC TCC GCT TATTGA TAT GC-3'); 4,0 µL do tampão 5x; 0,2 µL de DNTPs; 0,1 µL de Taq; 14,3 µL de água Miliq estéril e 1 µL do DNA de cada amostra. O termociclador foi programado para um ciclo de 94°C por 2 minutos (desnaturação), seguido de 40 ciclos de 94°C por 15 segundos (desnaturação), 54°C por 30 segundos (anelamento), 72°C por 30 segundos (extensão), e um ciclo de 72°C por 4 minutos (extensão final) e na última etapa mantidos a 4°C.

Para a eletroforese, foi utilizado o gel de Agarose na concentração 0,8%. Foram pesados 0,8 gramas de agarose e diluídos em 100 ml de tampão TAE 1X; a solução foi agitada manualmente e aquecida em microondas por aproximadamente 5 min, ou até que a mesma se tornasse translúcida. Em seguida, foi adicionado 1µL de brometo de etídio e, após agitação manual, a solução foi vertida na cuba de eletroforese, com o pente específico para o número de amostras utilizadas, até sua solidificação. O gel com as amostras foi submetido à eletroforese por 30 min.

O sequenciamento foi realizado em sequenciador automático ABI377 existente no Laboratório de Bioquímica do Instituto Biológico de São Paulo-SP. Foi utilizado o gel de poliacrilamida (9g de uréia, 12,5ml de água MilliQ (estéril), 2,5g tampão TBE e 2,5g

de poliacrilamida), e as buscas no BLAST no NCBI GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>) foram conduzidas utilizando as seqüências obtidas nesse estudo.

As seqüências obtidas foram analisadas e editadas no programa MEGA v. 4.1, sendo comparadas com sequencias referentes a espécies de *Mycosphaerella* e *Teratosphaeria* que ocorrem em eucalipto, e que se encontram depositadas no GenBank. Todas as sequencias obtidas nesse estudo foram depositadas no GenBank.

2.3 Crescimento de agentes causais de mancha de micosferela em diferentes temperaturas

Com a finalidade de avaliar o comportamento de algumas das espécies obtidas, foram analisados nove isolados de agentes causais de mancha de micosferela: *Mycosphaerella heimii* (FCA8), *Teratosphaeria nubilosa* (P2 e FCA3), *M. marksii* (BG7, FCA5 e FCA6), *M. lateralis* (P7b, JAC3) e *T. pseudaficana* (ITA9). Também foram utilizados, para comparação, dois dos fungos mitospóricos isolados: *Cladosporium tenuissimum* (ITA8), *Pseudocercospora norchiensis* (FCA2).

Os isolados foram transferidos para placas de Petri de 90 x 15 mm contendo meio MEA e mantidas em câmaras de temperatura controlada (BOD), em quatro temperaturas: 18, 21, 25 e 28°C. Devido ao lento crescimento destes fungos em meio de cultura, este foi medido a cada sete dias durante quatro semanas.

3. RESULTADOS

3.1 Coleta de amostras, diferenciação dos sintomas da doença e isolamento dos agentes causais de mancha de micosferela

As diferentes espécies de *Mycosphaerella* e *Teratosphaeria* foram identificadas por meio de observações, em microscópio óptico, dos padrões de germinação dos ascósporos, sendo tais espécies, relacionadas com os sintomas distintos de mancha de micosferela em *Eucalyptus globulus* (Figura 1). Os fungos *T. nubilosa* e *Mycosphaerella lateralis* Crous e M.J. Wingf., foram as espécies mais encontradas. Todos os isolados obtidos são provenientes de folhas.

Também foi possível observar espécies associadas na mesma folha, bem como no mesmo local em uma mesma folha e presentes na mesma planta. Isto foi observado pela diferença na coloração e forma das manchas, muitas destas manchas unidas umas às outras. Sendo possível notar ainda os limites entre as manchas com coloração e formas distintas, causadas por espécies distintas dos agentes causais, como pode ser observado na Figura 1A-D.

Com relação aos sintomas observados, para certas espécies, estes são bem característicos. As manchas causadas por *T. nubilosa* são arredondadas com bordas bem definidas, de coloração parda, com grande quantidade de pseudotécios dispersos na área da mancha (Figura 1E-I).

As manchas causadas por *M. lateralis* são menores e de coloração marrom (Figura 1E-F). Vale ressaltar que nos materiais utilizados para os isolamentos, manchas causadas por este fungo, foram observadas associadas com *T. nubilosa*, principalmente nos materiais provenientes de Pedras Altas-RS.

Nos materiais provenientes de Itapeva-SP, foi encontrada uma maior diversidade de espécies de agentes causais desta doença, e ainda em associação com outras espécies. Na Figura 1A-D, encontram-se algumas das folhas com manchas causadas por mais de uma espécie. A partir destes materiais, além de *T. nubilosa*, também foi possível o isolamento de: *Teratosphaeria flexuosa* (Crous e M.J. Wingf.) Crous & U. Braun, *Teratosphaeria pseudaficana* (Crous e T.A. Cout.) Crous & U. Braun, *Mycosphaerella communis* Crous e Mansilla, *Mycosphaerella crystallina* Crous & M.J. Wingf., *M. lateralis* e de duas espécies de *Cladosporium*. Nestas manchas com espécies associadas notam-se claramente as delimitações entre os diferentes fungos, principalmente na face adaxial (Figura 1C) onde as diferenças de coloração das manchas são de fácil visualização.

Isolados do fungo *Mycosphaerella heimii* Bouriquet foram obtidos a partir dos materiais coletados em Botucatu-SP, os quais apresentavam manchas alongadas de coloração marrom claro com borda marrom, e pseudotécios pequenos dispersos na área da mancha (Figura 1J-K).

Foram obtidos isolados de *Mycosphaerella gregaria* Carnegie e Keane somente a partir dos materiais provenientes de Bagé-RS, que apresentavam manchas semicirculares ou, também, alongadas dispostas ao longo das margens das folhas, de coloração

marrom claro a marrom mais escuro, com bordas em baixo relevo de cor marrom-arroxeadado, com os pseudotécios agrupados na área da mancha (Figura 1L). A partir destes materiais também foram obtidos isolados de *Teratosphaeria ohnowa* (Crous e M.J. Wingf.) Crous & U. Braun, cujas manchas são semicirculares ou irregulares, de cor marrom, circundadas por uma borda marrom-avermelhada (Figura 1N).

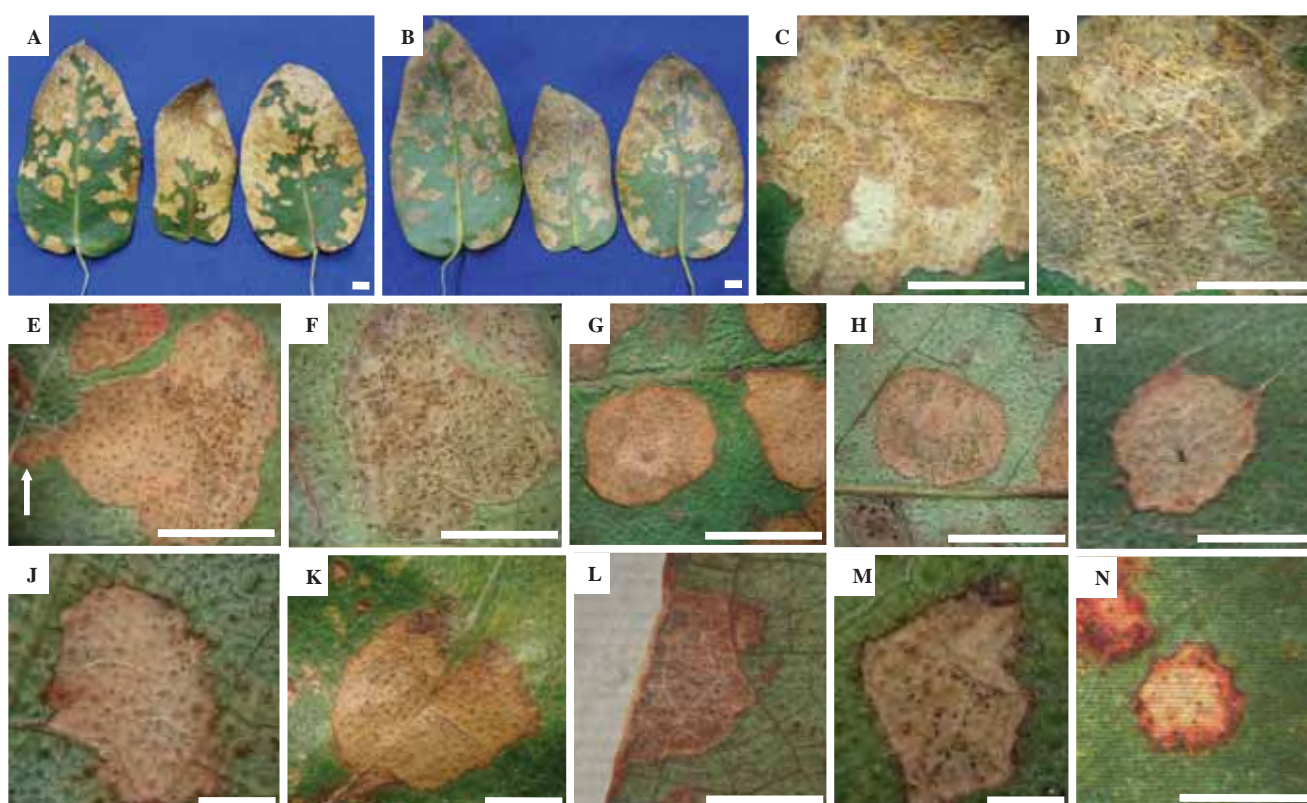


Figura 1. Exemplos de folhas de *Eucalyptus globulus* com manchas de micosferela utilizadas para os isolamentos. A-D: folhas jovens com manchas de espécies de *Teratosphaeria* e *Mycosphaerella* associadas (material proveniente de Itapeva – SP). A-C: face adaxial. B-D: face abaxial. E-F: manchas de *T. nubilosa* associadas com *M. laterallis* causando manchas menores e mais escuras (seta). G: mancha de *T. nubilosa* na face adaxial de folha jovem. H: mancha de *T. nubilosa* na face abaxial de folha jovem. I: mancha de *T. nubilosa* na face adaxial de folha adulta. J-N: sintomas distintos de mancha de micosferela. J-K: mancha de *M. heimii*. L: mancha de *M. gregaria*. M: mancha de *M. marksii*. N: mancha de *T. ohnowa*. Barras: 5 mm

A partir dos materiais provenientes de Bagé-RS e Botucatu-SP, foram obtidos isolados de *Mycosphaerella marksii* Carnegie e Keane. As manchas causadas por este fungo são irregulares, de coloração marrom claro, circundadas por uma borda de cor marrom mais escura do que a própria mancha, com os pseudotécios de cor preta, dispersos na área mancha. Na Figura 1M encontra-se um material proveniente de Botucatu, com mancha causada por este fungo.

3.2 Características das espécies isoladas quanto á germinação dos ascósporos e morfologia em meio de cultivo

A metodologia utilizada para os isolamentos monospóricos (Crous, 1998) possibilitou a identificação parcial das espécies encontradas e também a confirmação de espécies associadas em uma mesma área foliar. Estas observações, em sua maioria corresponderam com os resultados obtidos após sequenciamento do DNA dos isolados.

A partir dos isolamentos realizados, foram obtidos 46 isolados constantes na Tabela 1. Estes isolados inicialmente já haviam sido agrupados de acordo com as características de germinação e a morfologia em meio de cultivo (MEA), como consta na Tabela 2.

Algumas das espécies observadas apresentam padrões de germinação de ascósporos muito característicos comode *T. nubilosa*, com tubos germinativos paralelos ao longo do eixo, e das espécies *M. crystallina* (Figura 2D) e *M. lateralis* (Figura 2B), com tubos germinativos paralelo ao longo do eixo, porém com ramificações laterais. Algumas espécies produzem ascósporos característicos, como de *T. pseudafricana*, espécie esta que foi isoladas apartir de materiais coletados em Itapeva-SP, cujos esporos são escuros, com células arredondadas e tubo germinativo irregular (Figura 2J).

Tabela 1. Isolados obtidos no estudo, provenientes de folhas de *Eucalyptus globulus*, identificados de acordo com as características de germinação, crescimento em meio de cultura e sequenciamento da região com primers ITS1 e ITS4.

Nº	Patógeno	Isolamento	Procedência
BG1, BG2 e BG5	<i>Mycosphaerella marksii</i>		
BG3 e BG13	<i>Mycosphaerella ohnowa</i>	nov/2007	Bagé-RS, Fibria (Faz. São José III, folha jovem)
BG4 e BG14	<i>Mycosphaerella gregaria</i>		
BG7	<i>Mycosphaerella marksii</i>	nov/2007	Bagé-RS, Fibria (Faz. São José III, folha adulta)
BG9, BG10 e BG11	<i>Mycosphaerella marksii</i>	nov/2007	Bagé-RS, Fibria (Faz. São José III, folha jovem)
BG12	<i>Pseudocercospora norchiensis</i>		
SJIII1 e SJIII2	<i>Teratosphaeria nubilosa</i>	dez/2008	Bagé-RS, Fibria (Faz. São José III, folha adulta)
P1a, P2, P7a, P8 e P10	<i>Teratosphaeria nubilosa</i>		
P7b	<i>Mycosphaerella lateralis</i>	mar/2008	Pedras Altas-RS, Fibria (Faz. São Luiz II, folha jovem)
P11	<i>Strelitziana africana</i>		
FCA1	<i>Mycosphaerella heimii</i>	mai/2008	Botucatu - SP, Fazenda Lageado (folha adulta)
FCA8		nov/2008	
FCA2	<i>Pseudocercospora norchiensis</i>	mai/2008	Botucatu - SP, Fazenda Lageado (folha adulta)
FCA3	<i>Teratosphaeria nubilosa</i>	mai/2008	Botucatu - SP, Fazenda Lageado (folhas jovens)
FCA4		Abr/2008	Botucatu - SP, Fazenda Lageado (mudas Fibria Jacaré)
FCA5, FCA6	<i>Mycosphaerella marksii</i>	jun/2008	
FCA7		nov/2008	Botucatu - SP, Fazenda Lageado (folhas jovens)
FCA10	<i>Mycosphaerella lateralis</i>	Ago/2008	
JAC2 e JAC3	<i>Mycosphaerella lateralis</i>	jun/2008	
JAC4	<i>Mycosphaerella communis</i>	Set/2008	Fibria Jacaré – SP (folhas jovens)
JAC8, JAC10, JAC12 e JAC13	<i>Teratosphaeria nubilosa</i>		
ITA3	<i>Cladosporium cladosporioides</i>		
ITA5	<i>Teratosphaeria flexuosa</i>		
ITA7 e ITA 12	<i>Mycosphaerella lateralis</i>	Jul/2009	
ITA8	<i>Cladosporium tenuissimum</i>		
ITA9	<i>Teratosphaeria pseudaficana</i>		Fibria Itapeva – SP (folhas jovens)
ITA14	<i>Mycosphaerella crystallina</i>		
ITA18	<i>Mycosphaerella communis</i>	Mar/2010	
ITA20	<i>Teratosphaeria nubilosa</i>		

Tabela 2. Características das espécies de agentes causais de mancha de micoserela isoladas, com relação aos padrões de germinação de esporos à morfologia e em meio de cultura (MEA), a 25° no escuro. *T.*: *Teratosphaeria*; *M.*: *Mycosphaerella*

Espécies	Germinação dos ascósporos	Cultivo em meio (MEA)
<i>T. nubilosa</i>	Bipolar; tubo germinativo, sem ramificações, cresce ao longo do ascósporo que não se torna escurecido ou distorcido; ocorre estreitamento do septo do esporo	Micélio aéreo, branco no centro da cultura, mudando para verde pálido a acinzentado até as margens, que são irregulares
<i>T. pseudaficana</i>	Bipolar; tubo germinativo irregular, cresce ao longo do ascósporo que se torna escurecido e verrucoso com aumento no volume do esporo	Micélio aéreo, cinza oliva na região central e margens lisas; crescimento irregular
<i>T. ohnowa</i>	Bipolar ou unipolar; tubo germinativo cresce ao longo do esporo que não se torna escurecido; em alguns casos com ramificações partindo do ascósporo	Micélio preto esverdeado com micélio aéreo, porém não muito cotonoso; com margens lisas
<i>T. flexuosa</i>	Bipolar, tubo germinativo sem ramificações e frequentemente curvo; pode ocorrer alargamento de células	Micélio cinza oliváceo, com pouco micélio aéreo, espalhado pelo meio de cultivo, sendo este muito fino nas margens da cultura
<i>M. heimii</i>	Bipolar, um ou mais tubos germinativos curvos ao longo do ascósporo, com ramificação partindo do ascósporo que não se torna escurecido	Micélio aéreo cinza oliváceo
<i>M. marksii</i>	Bipolar; tubo germinativo, sem ramificações, cresce ao longo do ascósporo que não se torna escurecido ou distorcido; ocorre alargamento das células	Micélio plano e aéreo, moderadamente espaçado, verde oliva um pouco acinzentado, podendo ser bem escuro; pode apresentar entre o micélio escuro, algum micélio branco acinzentado; culturas com margem irregular
<i>M. lateralis</i>	Bipolar; tubo germinativo se desenvolve ao longo do ascósporo, apresentando ramificações perpendiculares; observa-se estreitamento no septo do esporo que se torna escurecido	Micélio aéreo verde oliva; cultura com margem irregular
<i>M. gregaria</i>	Bipolar; tubo germinativo ao longo do ascósporo que não se torna escurecido ou distorcido; ocorre estreitamento do septo do esporo	Micélio aéreo cinza claro a cinza escuro, que pode ser rosa acinzentado nas margens da cultura, que são irregulares
<i>M. communis</i>	Bipolar; tubo germinativo sem ramificações e ao longo do ascósporo que tem seu volume aumentado	Micélio aéreo moderadamente espaçado, entrelaçado de coloração castanha; cultura com margem irregular
<i>M. crystallina</i>	Bipolar, tubo germinativo, com ramificações laterais, cresce de ao longo do ascósporo que não se torna escurecido, porém distorcido; ocorre estreitamento do septo do esporo e alargamento das células do ascósporo	Micélio aéreo e cotonoso, espalhado e difundido pelo meio de cultura, cinza oliváceo, mudando para cinza claro nas margens da cultura

Foi possível observar a germinação característica de ascósporos de diferentes espécies, como *Teratosphaeria nubilosa*, e também outras espécies devido aos padrões de germinação distintas. O que comprova que esta doença pode ser ocasionada por uma ou mais espécies dentro destes gêneros, ocorrendo individualmente, ou associadas em uma mesma folha. As análises referentes à morfologia dos sintomas e presença de sinais dos patógenos possibilitaram verificar a presença de diferentes espécies (Figura 2).

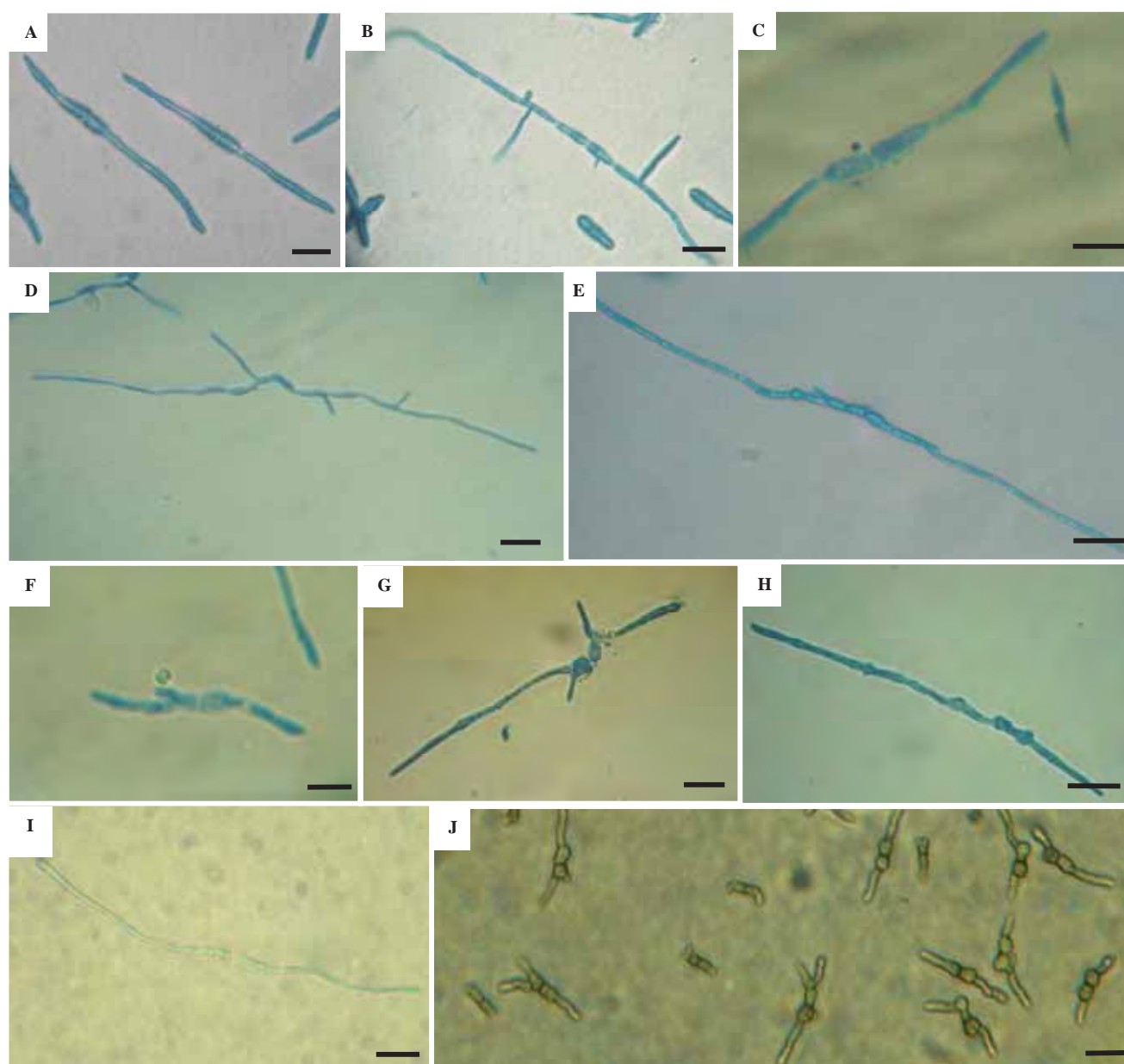


Figura 2. Germinação diferenciada de ascósporos de espécies de agentes causais da mancha de microsferela, observados em meio de extrato de malte (MEA), e utilizados para os isolamentos monospóricos. A: *Teratosphaeria nubilosa*. B: *Mycosphaerella lateralis*. C: *M. communis*. D: *M. crystallina*. E: *M. gregaria*. F: *T. ohnowa*. G: *M. heimii*. H: *M. marksii*. I: *T. flexuosa*. J: *T. pseudoafricana*. Barras: 10 μ m.

Após 30 dias, em BOD a 25°C e no escuro, o crescimento dos isolados foi avaliado quanto ao crescimento e características do micélio.

Conforme as características em meio de cultivo, foram identificadas 13 espécies distintas, apresentadas na Figura 3, sendo 10 pertencentes aos gêneros *Mycosphaerella* e *Teratosphaeria*, agentes causais de mancha de micosferela. Foram também obtidos isolados de outras quatro espécies: *Pseudocercospora norchiensis* Crous, *Strelitziana africana* Arzanlou e Crous, *Cladosporium cladosporioides* (Fresen.) G.A. de Vries e *Cladosporium tenuissimum* Cooke, as quais ser formas anamórficas de alguns dos agentes causais de mancha de micosferela, mas também podem estar presentes no material atuando como saprófitas.

Os isolados de *T. nubilosa* (Figura 3A), apresentaram crescimento lento, com aproximadamente 1,5 cm de diâmetro, com micélio aéreo de coloração branca no centro da cultura mudando para verde pálida a acinzentada à medida que se chega às margens, que são irregulares.

Os isolados de *M. lateralis* (Figura 3B) apresentaram culturas irregulares, com aproximadamente 5,3 de diâmetro, com micélio aéreo abundante, de coloração verde oliva.

Os isolados de *M. communis* (Figura 3C) originaram culturas irregulares, com micélio aéreo moderadamente espaçado, ou seja pouco denso, entrelaçado, de coloração castanha, medindo aproximadamente 3,5 cm de diâmetro.

Os isolados de *M. crystallina* (Figura 3D) formaram culturas com micélio aéreo cotonoso, espalhado e difundido pelo meio de cultura, com coloração cinza oliváceo, mudando para cinza claro nas margens, medindo aproximadamente 3,9 cm de diâmetro.

Os isolados de *M. marksii* (Figura 3E) formaram cultura com margens irregulares, com micélio plano e aéreo, moderadamente espaçado, com coloração verde oliva um pouco acinzentado, podendo ser bem escuro; pode apresentar entre o micélio escuro, algum micélio com coloração branco acinzentado, medindo aproximadamente 2,8 cm de diâmetro.

Os isolados de *M. heimii* (Figura 3F) formaram culturas com cerca de 3,8 cm de diâmetro, com micélio aéreo cinza oliváceo.

Os isolados de *M. gregaria* (Figura 3G) apresentaram crescimento de aproximadamente 3,0 cm de diâmetro; culturas com micélio aéreo de coloração cinza esbranquiçado a cinza escuro, que pode vir a apresentar coloração rosa acinzentado à medida que se aproxima das margens que são irregulares.

As culturas formadas pelos isolados de *T. ohnowa* (Figura 3H) apresentaram micélio preto esverdeado com extenso micélio aéreo, porém não muito cottonoso, com margens lisas e crescimento de aproximadamente 4,0 cm de diâmetro.

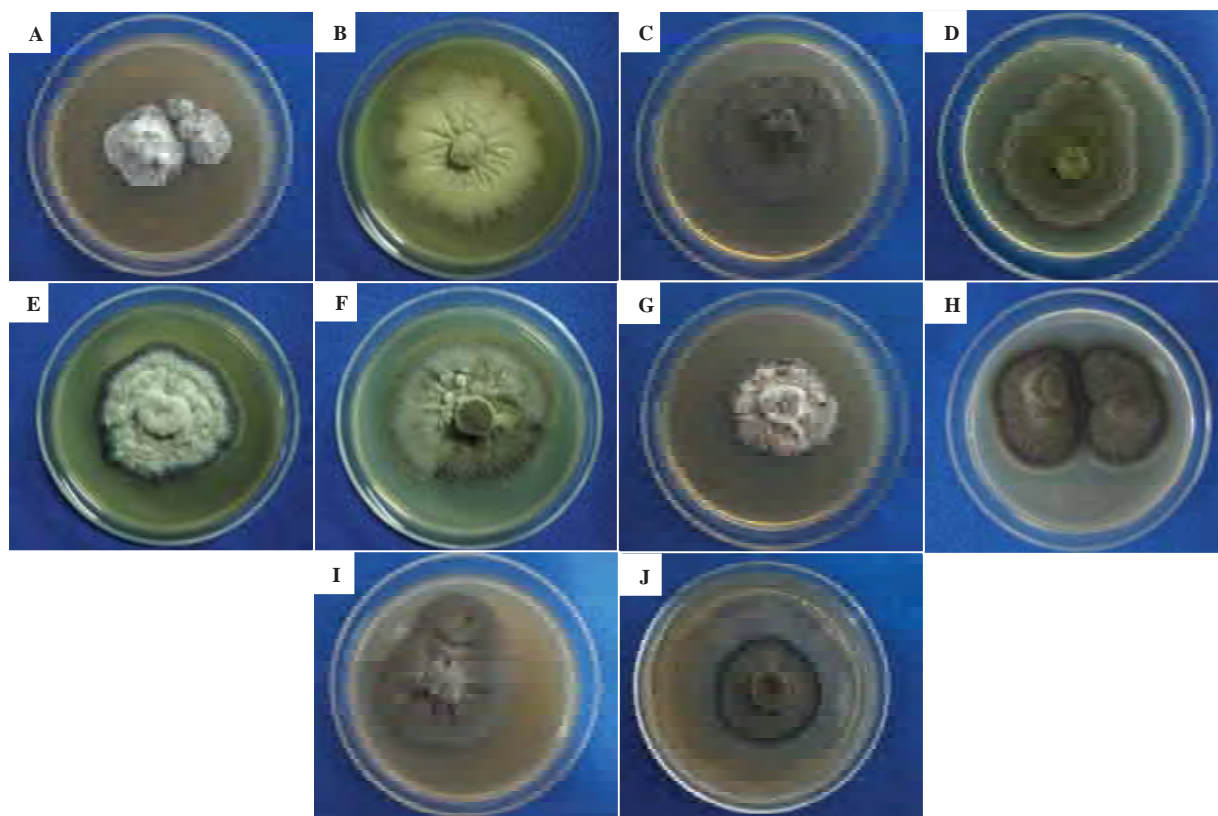


Figura 3. Espécies de agentes causais da mancha de micosferela isolados em meio de extrato de malte (MEA). A: *Teratosphaeria nubilosa*. B: *Mycosphaerella lateralis*. C: *M. communis*. D: *M. crystallina*. E: *M. marksii*. F: *M. heimii*. G: *M. gregaria*. H: *T. ohnowa*. I: *T. flexuosa*. J: *T. pseudaficana*

Os isolados de *T. flexuosa* (Figura 3I) constituíram culturas com micélio cinza oliváceo, com pouco micélio aéreo, espalhado pelo meio de cultura, sendo este muito fino nas margens; crescimento de aproximadamente 2,5 cm de diâmetro.

Os isolados de *T. pseudofrancana* (Figura 3J) apresentaram crescimento irregular de aproximadamente 2,5 a 3,9 cm de diâmetro, com superfície marrom acinzentada e micélio aéreo cinza oliva na região central e margens lisas.

Com relação aos fungos mitospóricos isolados, o fungo *P norchiensis* (Figura 4A), quando cultivado em meio de malte (MEA), apresentou crescimento de aproximadamente 3,5 cm após 30 dias; micélio cinza pálido com tons esverdeados, margens irregulares ou não, de coloração cinza oliváceo. O fungo *S. africana* (Figura 4B) constituiu culturas com micélio cinza oliváceo, aéreo, porém não cotonoso, e margens lisas, crescendo 3,0 cm. O fungo *C. cladosporioides* (Figura 4C) apresentou micélio acinzentado cotonoso e pulverulento, com crescimento de aproximadamente 5,0 cm em 15 dias, e o fungo *C. tenuissimum* (Figura 4D) apresentou micélio marrom esverdeado, com aspecto aveludado a pulverulento, com crescimento de aproximadamente 5,5 cm em 15 dias.

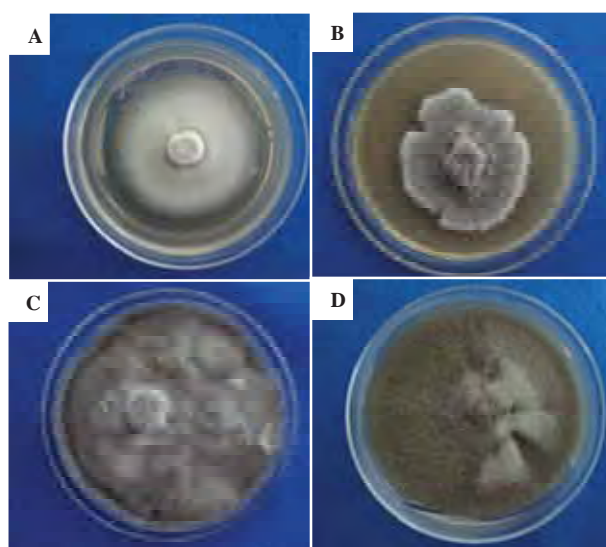


Figura 4. Espécies de agentes fungos mitospóricos isolados em meio de extrato de malte (MEA). A: *Pseudocercospora norchiensis*. B: *Strelitziana africana*. C: *Cladosporium cladosporioides*. D: *C. tenuissimum*.

3.3 Crescimento de agentes causais de mancha de micosferela em diferentes temperaturas

As quatro temperaturas testadas permitiram o crescimento dos isolados utilizados neste estudo, com exceção dos dois isolados de *Teratosphaeria nubilosa*, que não apresentaram crescimento a 28°C. Também nesta temperatura, os isolados de *Mycosphaerella heimii* e *Pseudocercospora norchiensis* apresentaram crescimento significativo, e os demais isolados apresentaram pouco crescimento.

Para o isolado de *M. heimii* (FCA8), a temperatura na qual apresentou melhor crescimento foi 28°C (em média 3,68 cm).

Com relação a dois dos isolados de *M. marksii*, BG7 e FCA6, apresentaram melhor crescimento na temperatura de 25°C, em média com 2,51 cm e 2,8cm, respectivamente, enquanto o outro isolado da mesma espécie, FCA5, apresentou maior crescimento na temperatura de 21°C, em média com 2,64°C.

Os isolados de *M. lateralis*, também apresentaram diferenças quanto à temperatura, para o isolado P7b, a melhor temperatura foi 25°C, crescendo em média 3,47 cm, já para o isolado JAC3 a melhor temperatura foi 18°C crescendo em média 3,08 cm.

Para um dos isolados de *T. nubilosa* (P2) a melhor temperatura para crescimento da cultura foi 21°C média de crescimento de 1,76 cm, ao contrário do outro isolado, FCA3, que apresentou melhor crescimento a 18° em média com 1,52.

O isolado de *T. pseudafricana*, apresentou média de crescimento de 2,95 cm, a 21°C, sendo esta a melhor temperatura para este fungo.

Com relação aos fungos mitospóricos analisados, os isolado de *P. norchiensis*, FCA2, apresentou em média 4,15 cm a 25°C. O isolado de *C. tenuissimum*, ITA8, apresentou em média 4,82 a 18°C, sendo estas as melhores temperaturas de crescimento para estes isolados.

Alguns dos isolados originaram culturas com coloração e micélio diferenciado conforme a temperatura. Na Figura 6 estão dispostas algumas das placas de petri utilizadas neste estudo contendo os fungos avaliados, e na Tabela 3 estão apresentados os resultados das análises estatísticas referente às medições do crescimento dos fungos. As melhores temperaturas de crescimento para cada isolado estão apresentadas na Figura 7.

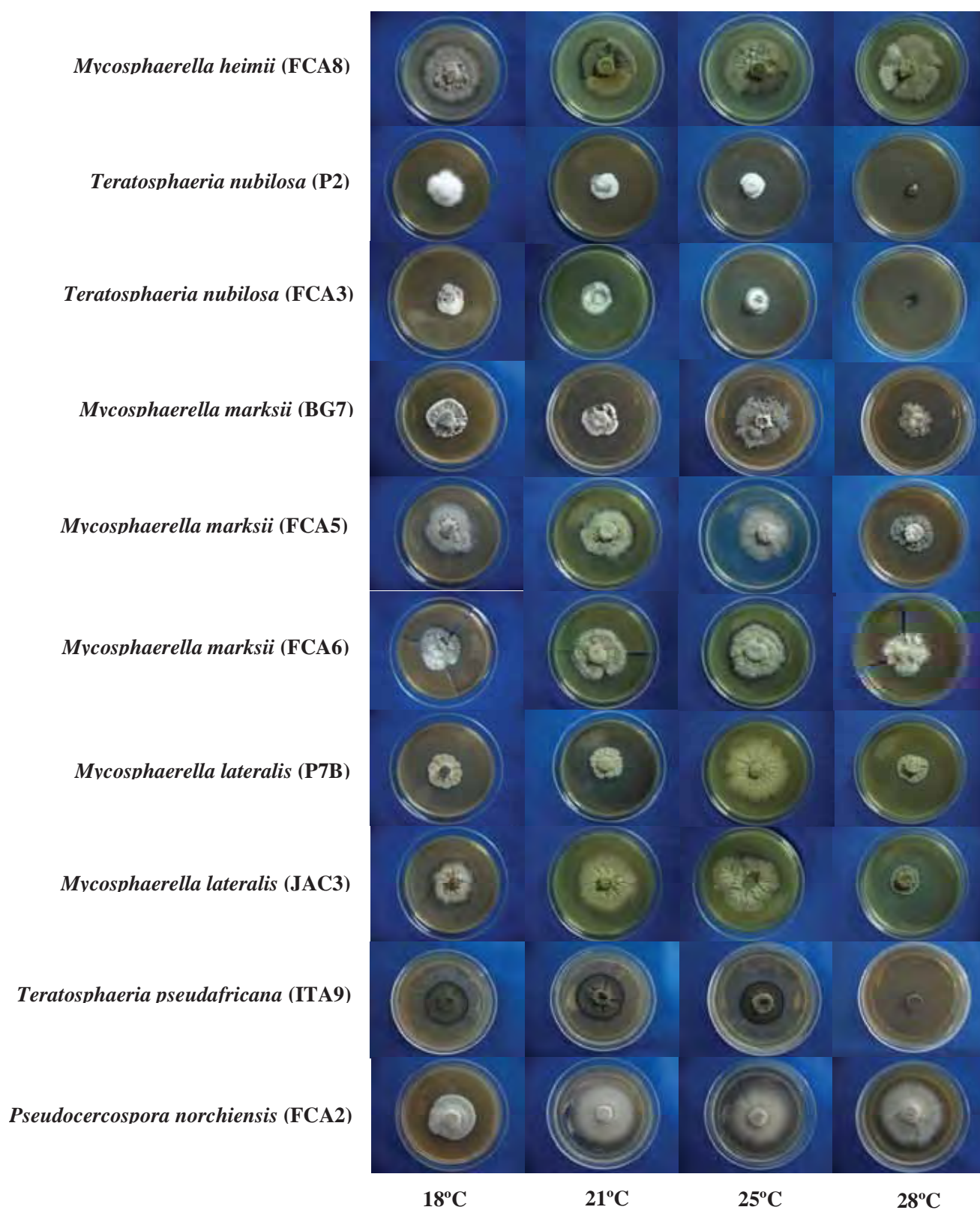


Figura 6. Crescimento de isolados de *M. heimii*, *T. nubilosa*, *M. marksii*, *M. lateralis*, *T. pseudaficana*, *C. tenuissimum*, *P. norchiensis*, nas temperaturas de 18°C, 21°C, 25°C e 28°C.

Tabela 3. Crescimento (cm) a cada sete dias de espécies de *Mycosphaerella* e *Teratosphaeria* sob quatro temperaturas: 18°C, 21 °C, 25 °C, 28 °C.

Isolados	Temperaturas			
	18°C	21 °C	25 °C	28 °C
	Crescimento (cm)			
<i>Mycosphaerella heimii</i> (FCA8)	3,27 aA	3,350 abA	3,68 abA	3,58 aA
<i>Teratosphaeria nubilosa</i> (P2)	1,46 eA	1,76 fA	1,43 fA	0,7 fB
<i>Teratosphaeria nubilosa</i> (FCA3)	1,52 eA	1,17 gA	1,17 fA	0,7 fB
<i>Mycosphaerella marksii</i> (BG7)	2,18 cdAB	2,23 defAB	2,51 eA	1,98 cdB
<i>Mycosphaerella marksii</i> (FCA5)	2,51 bcAB	2,64 cdeA	2,52 eAB	2,08 cB
<i>Mycosphaerella marksii</i> (FCA6)	2,15 cdB	2,8 bcdA	3,1 cdA	2,74 ba
<i>Mycosphaerella lateralis</i> (P7B)	1,84 deBC	2,1 efB	3,47 bcA	1,46 deC
<i>Mycosphaerella lateralis</i> (JAC3)	3,08 abA	2,98 bcA	3,04 cdeA	1,45 deB
<i>Teratosphaeria pseudaficana</i> (ITA9)	2,67 bcA	3,01 abcA	2,56 deA	1,31 eB
<i>Pseudocercospora norchiensis</i> (FCA2)	2,57 bcC	3,57 aB	4,15 aA	3,92 aAB

Médias seguidas pela mesma letra, minúscula em cada linha e maiúscula em cada coluna, não diferem entre si (Tukey ao nível de 5%). CV% = 11,76.

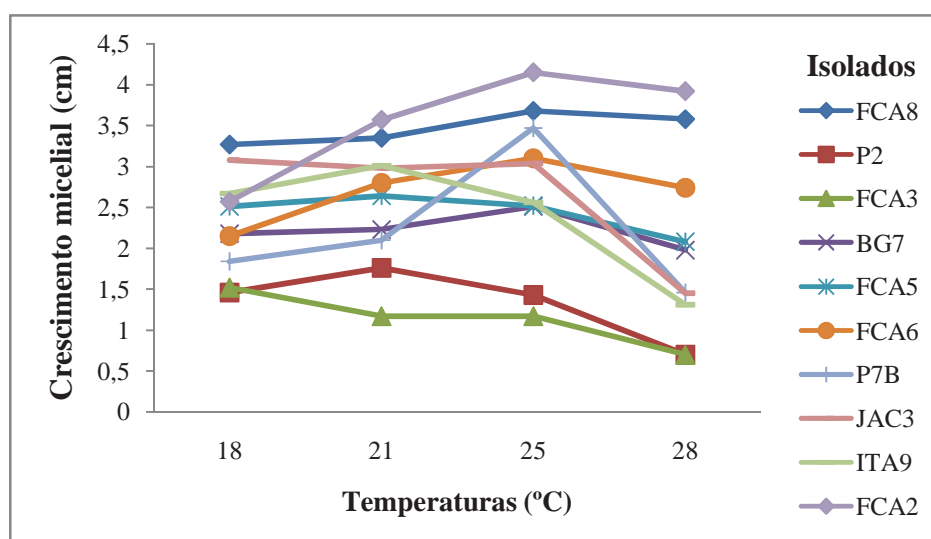


Figura 7: Crescimento (cm) *Mycosphaerella* e *Teratosphaeria* nas temperaturas: 18°C, 21 °C, 25 °C, 28 °C.

3.4 Comparação das sequências obtidas e análise filogenética

Após a reação de PCR, foram obtidos fragmentos com cerca de 500 - 600 pb, para cada isolado, os quais foram submetidos ao sequenciamento.

O alinhamento da região ITS1 consistiu de 13 grupos de sequências, os quais foram comparados com outras sequências de agentes causais de mancha de micosferela depositadas no GenBank, utilizando-se o programa Blast-n. A sequência *Botriosphaeria ribis* utilizada como grupo taxonômico externo (Figura 8).

As análises filogenéticas têm possibilitado para muitos hospedeiros a identificação de um número elevado de espécies desconhecidas. Muitas espécies, morfologicamente similares, ocorrem, no mesmo hospedeiro e assim, a identificação baseada somente na morfologia é muito difícil e, em alguns casos, impossível.

As espécies de fungos pertencentes ao gênero *Teratosphaeria* obtidas foram agrupadas muito próximas na árvore filogenética. Ao contrário, o isolado *St. africana* foi agrupado muito distante dos demais.

As espécies de *Cladosporium* e os isolados de *P. norchiensis* não foram agrupados muito distantes dos agentes causais de mancha de micosferela, indicando que podem estar presentes nos materiais dos quais foram isolados como anamorfos, sendo que *P. norchiensis* já foi relacionado como anamorfo de *Mycosphaerella thailandica* (Crous et al., 2007b).

O sequenciamento da região ITS foi de grande importância para identificação das espécies de agentes causais da doença mancha de micosferela, complementando e confirmando as análises por meio dos sintomas nas folhas, dos padrões de germinação dos ascósporos e da morfologia do micélio em meio de cultura.

Os isolados foram agrupados com relação às espécies, sendo possível observar a diversidade de espécies de agentes causais de mancha de micosferela presente nos locais onde os materiais foram coletados.

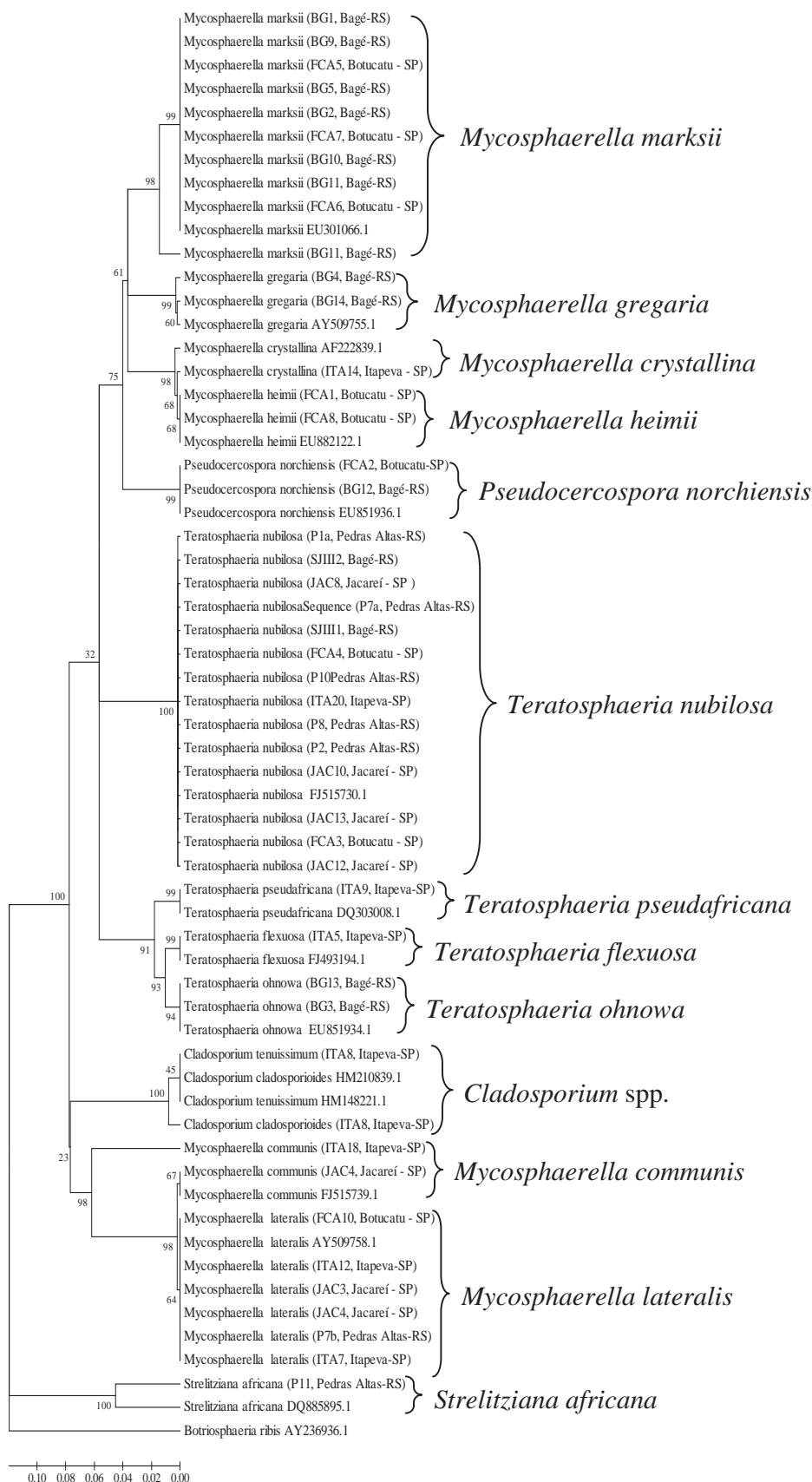


Figura 8. Árvore Filogenética construída pelo método UPGMA a partir do alinhamento da sequência da região ITS dos isolados obtidos e a sequência do fungo *Botriosphaeria ribis* como grupo taxonômico externo, obtida no GenBank.

4. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

No presente estudo, a partir dos padrões de germinação dos ascósporos, já foi possível a separação de algumas das espécies presentes nos materiais utilizados. Tais observações puderam ser complementadas após os isolamentos monospóricos e também com o crescimento destes fungos e sua morfologia em meio de cultura, como textura e coloração do micélio.

Os padrões de germinação dos ascósporos podem ser utilizados para identificações em nível de espécie (Crous, 1998). Em muitas espécies, os esporos tornam-se escuros ou verrucosos durante a germinação (Crous et al., 2000), sendo assim, tais espécies, de fato foram incluídas dentro do gênero *Teratosphaeria*, e não dentro de *Mycosphaerella*, sugerindo uma característica válida em nível de gênero.

As extrações de DNA e o sequenciamento da região ITS contribuíram para complementar a identificação das espécies de fungos causadores de mancha de micosferela. Tais avaliações são de grande importância e necessidade para realização de estudos envolvendo espécies de *Teratosphaeria* e *Mycosphaerella*, pois na maioria das espécies, não ocorre formação do pseudotécio em meio de cultura (Park e Keane, 1982a; 1982b). Desta forma, análises morfológicas associadas às análises moleculares são extremamente viáveis na identificação destes fungos.

Uma grande diversidade de espécies de agentes causais de mancha de micosferela ocorre em plantios de *E. globulus*. Estes fungos podem ser encontrados de forma isolada ou associados em uma mesma planta e, também, em uma mesma folha; sendo as espécies *T. nubilosa* e *T. cryptica* são os agentes causais mais importantes de mancha de micosferela (Carnegie e Ades, 2002; Carnegie, 2007, Hunter et al., 2008).

Existem relatos no Brasil de *M. marksii*, *M. parkii*, *M. heimii*, *T. suberosa*, *T. suttonii* e *T. stramenticola* associadas a *Eucalyptus* spp., até pouco tempo atrás, esses fungos não eram considerados patógenos agressivos, pois não haviam relatos de grandes danos (Alfenas et al., 2004, Crous et al., 2006) até a constatação de *T. nubilosa* na região sul do país (Perez et al., 2009).

Segundo Park e Keane (1982b) e Hunter et al. (2009), duas espécies, *T. nubilosa* e *T. cryptica*, são as primeiras a infectar tecidos jovens e suculentos, adquirindo nutrientes por meio de uma relação hemibiotrófica com a árvore hospedeira. No Brasil, ainda

não existem relatos sobre *T. cryptica*; somente *T. nubilosa* em plantações de *E. globulus* (Perez et al., 2009) já foi constatada.

No presente estudo, as análises das sequências de DNA permitiram um complementar a identificação de espécies responsáveis pela mancha de micosferela nos materiais analisados, bem como de espécies que não estão relacionadas à *Eucalyptus* spp., demonstrando a diversidade existente no limbo foliar. A espécie *T. nubilosa* é considerada o agente causal de uma das principais doenças em *Eucalyptus* spp. e *E. globulus*, a espécie mais suscetível (Canergie et al., 1994, 1998).

Os isolados obtidos no presente estudo demonstram a diversidade de *Mycosphaerella* e *Teratosphaeria* em materiais provenientes de seis locais distintos, nos quais foram encontradas 10 espécies de agentes causais de mancha de micosferela. As identificações foram realizadas a partir de isolamentos, podendo haver mais espécies além das que foram isoladas, devido à ocorrência de espécies associadas. Com relação às espécies isoladas: *M. gregaria*, *T. ohnowa*, *M. heimii*, *M. lateralis*, *M. communis*, *T. flexuosa*, ainda não haviam relatos no Brasil, sendo a primeira constatação das mesmas.

Dos fungos mitosporicos isolados, o fungo *P.norchiensis*, recentemente foi descrito na Itália, causando mancha foliar em *Eucalyptus* sp., sendo relacionado como anamorfo de *M. thailandica* (Crous et al. 2007b). Isolados deste fungo foram identificados a partir de materiais provenientes de Bagé-RS e de Botucatu-SP.

O fungo *S. africana* foi isolado a partir de apenas um dos materiais, ou seja, folhas coletadas em Pelotas-RS. Este fungo foi identificado em 2006 a partir de isolados obtidos de folhas de *Strelizia* sp., coletadas na África por Arzanlou & Crous (2006). Segundo os autores, este fungo é muito semelhante à espécie de *Pseudocercospora*, devido à morfologia e formação dos conídios em ápices de conidióforos a partir do micélio em meio de cultura. Como ainda não há dados relacionados à patogenicidade em *Eucalyptus* spp., este fungo poderia estar presente como saprófita, ou apenas como transeunte, na forma de esporos disseminados pelo vento.

O fungo *C. cladosporioides* é um fungo polífago. Dentre muitas situações, este fungo pode ser encontrado associado a grãos de café em estado de maturação. É entomopatogênico, de ocorrência natural, amplamente usado no controle biológico de diversas espécies de insetos. É considerado um fungo endofítico, presente no interior dos grãos sem

causar danos aos mesmos (Oliveira et al., 2004). Não é um patógeno associado a manchas em espécies de eucalipto; e a obtenção deste isolado pode se devido à presença do mesmo nos materiais, porém sem causar danos, com esporos trazidos de outros locais pelo vento, provavelmente, locais com cafeicultura.

O fungo *C. tenuissimum* é associado à micoparasitismo, assim como muitas espécies dentro desse gênero são encontradas associadas com ferrugens, afetando a esporulação, dispersão dos esporos e até a penetração no hospedeiro (Assante et al., 2004), como por exemplo, o hiperparasitismo de *C. tenuissimum* sobre eciosporos de *Cronartium flaccidum* e *Peridermium pini*, duas ferrugens que ocorrem em *Pinus* sp. (Moricca, 1999), e também sobre urediniósporos de *Melampsora larici-populina*, ferrugem que ocorre em álamo (Heather e Sharma, 1987). Assante et al. (2004) obteve inibição da germinação *in vitro* de urediniósporos de *Uromyces appendiculatus* tratados com suspensão de conídios de *C. tenuissimum*.

As duas espécies do gênero *Cladosporium* identificadas nesse estudo, não estão associadas à mancha de micosferela, porém, sua presença nos materiais dos quais foram realizados os isolamentos, pode estar relacionada à dispersão pelo vento ou também contaminações.

Dentre os fungos que atuam como agentes causais de mancha de micosferela existem muitas diferenças em sua morfologia, e exigências para sobrevivência no ambiente, como por exemplo, a melhor temperatura para o seu crescimento (Ganapathi, 1979; Park e Keane, 1982a; 1982b).

A coloração e disposição do micélio no meio de cultura, bem como a forma e tipo de germinação dos ascósporos e o fato de serem ou não hialinos, são características que podem ser importantes para a identificação de espécies em alguns casos (Crous, 1998; Maxwell et al., 2003; Maxwell, 2004). As temperaturas ideais para crescimento em meio de cultura, também podem auxiliar no entendimento do comportamento do patógeno no ambiente (Park, 1988).

Alguns dos isolados utilizados no estudo relacionado ao crescimento micelial apresentam diferentes temperaturas ideais para desenvolvimento em meio de cultura, como foi avaliado nos isolados de *M. marksii*, *M. lateralis* e *Teratosphaeria nubilosa*. Isto pode ser devido à procedência dos materiais dos quais foram isolados, pois dentre espécies de

Mycosphaerella e *Teratosphaeria* é possível que haja algumas variabilidades genéticas (Crous et al., 2007a; Hunter et al., 2009), resultados das condições climáticas dos locais de onde foram coletados os materiais de *E. globulus*. Isto se aplica para os isolados de *M. lateralis*, sendo um deles proveniente de Jacareí-SP e outro de Pelotas-RS, bem como nos isolados de *T. nubilosa*, alguns provenientes de Botucatu-SP e outros de Pelotas-RS.

Dois dos isolados de *M. marksii*, provenientes de materiais de locais distintos, Bagé-RS e Botucatu-SP, o de Bagé apresentou melhor crescimento a 25°C e de Botucatu-SP apresentou melhor crescimento a 21°C.

Os agentes causais de mancha de micosferela causam sintomas que podem variar de acordo com a espécie do fungo; além disso, apresentam comportamentos diferenciados frente a determinadas temperaturas, como por exemplo *T. nubilosa* que não apresentou crescimento micelial em 28°C, fato que está de acordo com dados relacionados com a primeira constatação deste fungo no sul do Brasil, no inverno de 2007 (Perez et al., 2009) quando as temperaturas estão abaixo de 18°C.

Os resultados obtidos com os isolados de *T. nubilosa* estão de acordo com Park (1988) e Park e Keane (1982b), segundo estes autores a temperatura ótima para o desenvolvimento do fungo é em torno de 20°C e, no presente estudo, as melhores temperaturas para crescimento destes isolados foram 18°C e 21°C.

A presença de agentes causais de mancha de micosferela no Brasil e países próximos conduz à necessidade de elaboração de formas de controle eficazes, que também possam ser aplicadas em conjunto pelos países que tenham prejuízos com esta doença. A forma mais adequada para o controle desta doença seria o desenvolvimento de variedades resistentes ou a substituição de plantas suscetíveis por espécies mais resistentes, como por exemplo, plantações de *E. delegatensis* e *E. regnans* na Nova Zelândia, que foram substituídas por *E. nitens* (Crous, 2009).

Outra alternativa para controle seria a utilização de híbridos entre espécies resistentes e suscetíveis, por exemplo, híbridos de *E. globulus* e *E. grandis*, espécies suscetível e resistente a *T. nubilosa* (Carnegie e Ades, 2002; Carnegie e Keane, 1998; Milgate et al., 2005), porém, estudos envolvendo híbridos requerem ainda muita atenção, para que não se corra o risco de possuírem a característica de suscetibilidade.

Para eficiência no controle, além de técnicas e metodologias suficientemente avançadas como o melhoramento genético, é essencial o conhecimento do ciclo vital do patógeno em todas as suas fases, para que seja possível conter a doença e os prejuízos econômicos relacionados.

No presente estudo, foram identificadas através das características da cultura, germinação de ascósporos e sequenciamento da região ITS, as espécies *T. nubilosa*, *T. pseudafricana*, *T. ohnowa*, *Mycosphaerella heimii*, *M. flexuosa*, *M. marksii*, *M. lateralis*, *M. gregaria*, *M. communis*, *M. crystallina*, agentes causais de mancha de micoserela, em plantações de *E. globulus* nas regiões sul e sudeste do Brasil.

Além do isolamento de 10 espécies dos agentes causais, foi possível observar características distintas entre os isolados obtidos, bem como, o comportamento de cada um nas temperaturas de 18, 21, 25 e 28°C. Diante destes resultados verificou-se que o fungo *T. nubilosa* não apresentou crescimento em 28°C, enquanto que as demais espécies cresceram nesta temperatura.

5. REFERÊNCIAS

- ABRAF. **Anuário estatístico 2011 – Ano Base 2010**. Brasília, DF: ABRAF, 2011. 130 p.
- ALFENAS A.C. et al. **Clonagem e doenças do eucalipto**. 2. ed. Viçosa: UFV, 2004. 442 p.
- ARZANLOU, M.; CROUS, P. *Strelitziana* M. Arzanlou & Crous, gen. nov. **Fungal Planet**, p.8, 2006.
- ASSANTE, G. et al. Histological studies on the mycoparasitism of *Cladosporium tenuissimum* and urediniospores of *Uromyces appendiculatus*. **Mycological Research**, Cambridge, v. 108, n. 2, p. 170-182, mar., 2004.
- BATZER, J. C. et al. Four species of *Zygothiala* (*Schizothyriaceae*, *Capnodiales*) are associated with the sooty blotch and flyspeck complex on apple. **Mycologia**, Lawrence, n. 100, p. 232-244, jan., 2008.

CARNEGIE, A. J. Forest health condition in New South Wales, Australia, 1996–2005. Fungal damage recorded in eucalypt plantations during forest health surveys and their management. **Australasian Plant Pathology**, Toowoomba East, v. 36, n. 3, p. 225-239, mai., 2007.

CARNEGIE A. J.; ADES, P. Added phosphorus is associated with reduced severity of *Mycosphaerella cryptica* in *Eucalyptus globulus*. **Australian Forestry**, Yarralumla, v. 64, n. 4, p. 203-208, dez., 2002.

CARNEGIE, A. J.; KEANE, P. J. Further *Mycosphaerella* species associated with leaf diseases of Eucalyptus. **Mycological Research**, Cambridge, v. 98, n. 4, p. 413-418, abr., 1994.

CARNEGIE, A. J.; KEANE, P. J. *Mycosphaerella vespa* from diseased Eucalyptus leaves in Australia. **Mycological Research**, Cambridge, v.102, n. 10, p.1274-1276, out., 1998.

CORREA, M. P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, v. 2, 1931. 4234 p.

CROUS, P. W. *Mycosphaerella* spp. and their anamorphs associated with leaf spot diseases of *Eucalyptus*. **Mycologia Memoirs**, St. Paul, v. 21, n. 170, 1998. 170 p.

CROUS, P. W. Taxonomy and phylogeny of the genus *Mycosphaerella* and its anamorphs. **Fungal Diversity**, Mae Taeng, v. 38, p. 1-24, out., 2009

CROUS, P. W.; KANG, J. C.; BRAUN, U. A phylogenetic redefinition of anamorph genera in *Mycosphaerella* based on ITS rDNA sequence and morphology. **Mycologia**, Lawrence, v. 93, n. 6, p.1081-1101, nov/dez., 2001.

CROUS, P.W. et al. The genus *Mycosphaerella* and its anamorphs. **Studies in Mycology**, Utrecht, v. 45, p. 107-121, 2000.

CROUS, P. W. et al. Phylogenetic reassessment of *Mycosphaerella* spp. and their anamorphs occurring on *Eucalyptus*. **Studies in Mycology**, Utrecht, v. 50, p. 195-214, 2004.

CROUS, P. W. et al. Phylogenetic reassessment of *Mycosphaerella* spp. and their anamorphs occurring on *Eucalyptus* II. **Studies in Mycology**, Utrecht, v. 55, p. 99-131, 2006.

CROUS, P. W. et al. *Mycosphaerella* is polyphyletic. **Studies in Mycology**, Utrecht, v.58, p.1-32, 2007a.

CROUS, P. W. et al. Foliicolous *Mycosphaerella* spp. and their anamorphs on *Corymbia* and *Eucalyptus*. **Fungal Diversity**, Mae Taeng, v. 26, n. 3, p. 143-185, 2007b.

DELLAPORTA, S. L.; WOODS, J.; HICKS, J. B. A plant DNA miniprep: Version II. **Plant Molecular Biology Reporter**, Athens, v. 1, n. 4, p. 19-21, 1983.

GANAPATHI, A. **Studies of the etiology of the leaf blotch disease of *Eucalyptus* spp. caused by *Mycosphaerella nubilosa* (Cke) Hansf.** 1979. 138 f. Tese (Doutorado)-Univesity of Auckland, New Zeland, 1979.

HEATHER, W. A.; SHARMA, I. K. Physiological specialization in the hyperparasitism of races of *Melampsora larici-populina* by isolates of *Cladosporium tenuissimum*. **European Journal of Forest Pathology**, London, v.17, n. 3, p 185-188, jun., 1987.

HUNTER, G. C. et al. *Mycosphaerella* species causing leaf disease in South African Eucalyptus plantations. **Mycological Research**, Cambridge, v. 108, n. 6, p. 672-681, jun., 2004.

HUNTER, G. C. et al. *Teratosphaeria nubilosa*, a serious leaf disease pathogen of Eucalyptus spp. in native and introduced areas. **Molecular Plant Pathology**, London, v. 10, n. 1, p. 1-14, jan., 2009.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais do Brasil: nativas e exóticas.** Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002. 512 p.

LUNDQUIST, J. E.; PURNELL, R. C. Effects of *Mycosphaerella* leaf spot on growth of *Eucalyptus nitens*. **Plant Disease**, St. Paul, v. 71, n. 3, p. 1025–1029, nov., 1987.

MARIN, D.H. et al. Black Sigatoka: an increasing threatto banana cultivation. **Plant Disease**, St. Paul, v. 87, n. 3 p. 208-222, mar., 2003.

MAXWELL, A. **The taxonomy, phylogeny and impact of *Mycosphaerella* species on Eucalypts in South-Western Australia.** 2004. 231 f. Tese (Doutorado)-School of Biological Sciences and Biotechnology, Murdoch University, Perth, 2004.

MAXWELL, A.; DELL, B.; NEUMEISTER-KEIP, H. G.; HARDY, G. E. S. J. *Mycosphaerella* species associated with *Eucalyptus* in south-western Australia: new species, new records and a key. **Mycological research**, Amsterdam, v. 107, p. 53-63, 2003.

MILGATE, A.W. et al. Genetic variation in *Eucalyptus globulus* for susceptibility to *Mycosphaerella nubilosa* and its association with tree growth. **Australasian Plant Pathology**, Sidney, v. 34, n. 1, p. 11-18, set., 2005.

MOHAMMED, C. et al. *Mycosphaerella* leaf diseases of temperate eucalypts around the southern pacific rim. **New Zealand Journal of Forestry Science**, Rotorua, v. 33, n. 3, p. 362-372, set., 2003.

MORICCA, S.; RAGAZZI, A.; MITCHELSON, K. R. Molecular and conventional detection and identification of *Cladosporium tenuissimum* on two-needle pine rust aeciospores. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 77, n. 2, p. 339-347, ago., 1999.

OLIVEIRA, J. S. et al. Distribuição do fungo *Cladosporium cladosporioides* em regiões produtoras de café na Bahia. **Bahia Agrícola**, Salvador, n. 6, p. 72-75, nov., 2004.

PARK, R. F. Epidemiology of *Mycosphaerella nubilosa* and *M. cryptica* on *Eucalyptus* spp. in south-western Australia. **Transactions of the British Mycological Society**, London, v. 91, n. 2, p. 261-266, 1988.

PARK, R. F.; KEANE, P. J. Three *Mycosphaerella* species from leaf diseases of *Eucalyptus*. **Transactions of the British Mycological Society**, London, v. 79, n. 1, p. 95-100, ago., 1982a.

PARK, R. F.; KEANE, P. J. Leaf diseases of *Eucalyptus* associated with *Mycosphaerella* species. **Transactions of the British Mycological Society**, London, v. 79, n. 1, p. 101-115, ago., 1982b.

PÉREZ, C. A. et al. *Mycosphaerellaceae* and *Teratosphaeriaceae* associated with *Eucalyptus* leaf diseases and stem cankers in Uruguay. **Forest Pathology**, Aberdeen, v. 39, n. 5, p. 349-360, out., 2009.

PEREZ, G. et al. *Mycosphaerella* leaf disease (MLD) outbreak on *Eucalyptus globulus* in Brazil caused by *Teratosphaeria* (*Mycosphaerella*) *nubilosa*. **Phytopathologia Mediterranea**, Firenze, v. 48, n. 2, p. 302-306, 2009.

PRETORIUS, M. C. et al. Phylogeny of some cercosporoid fungi from *Citrus*. **Sydowia**, Innsbruck, v. 55, n. 2, p. 286-305, 2003.

SANTOS, A. F.; AUER, C. G.; GRIGOLETTI JÚNIOR, A. **Doenças do eucalipto no sul do Brasil**: identificação e controle. Circular Técnica. Colombo: Embrapa, Junho, 2001. Disponível em: <<http://www.cnpf.embrapa.br/publica/circtec/edicoes/circ-tec45.pdf>>. Acesso em: 13 ago. 2007.

SILVA, M.; VALENTE, C.; NEVES, L.; MACHADO, H. Evaluation of *Mycosphaerella* impact on eucalypts plantations in Portugal. *Revista de Ciências Agrárias*, Lisboa, v. 31, n. 2, p. 112-118, dez., 2008.

SMITH, A. H. et al. Anatomical and histochemical defence responses induced in juvenile leaves of *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus nitens* by *Mycosphaerella* infection. **Forestry Pathology**, Aberdeen, v. 37, n. 6, p. 361-373, jul., 2007.

VITTI, A. M. S.; BRITO, J. O. Óleo essencial de eucalipto. **Documentos florestais**. Piracicaba, n.17, p. 1-26, 2003. Disponível em: <www.ipef.br/publicacoes/docflorestais/df17.pdf>. Acesso em: 13 jan. 2009.

ASCOGÊNESE DE *Teratosphaeria nubilosa* EM MUDAS DE *Eucalyptus globulus***RESUMO**

O cultivo de eucalipto é acometido por uma série de doenças, principalmente causadas por fungos, desde a fase de viveiro até os plantios adultos. Uma das principais doenças é a mancha de micosferela, sendo *Eucalyptus globulus* uma das espécies mais suscetíveis. Com o objetivo de estudar a ascogênese de *Teratosphaeria nubilosa*, mudas de *E. globulus* foram inoculadas por meio de ejeção de ascósporos de *T. nubilosa* em casa de vegetação, de onde foram coletadas folhas com os sintomas do fungo a partir da terceira semana até a décima quarta semana da inoculação. Por meio dos cortes histológicos destes materiais foi possível acompanhar a formação dos pseudotécios desde o seu início com três semanas após a inoculação, até a décima quarta semana da inoculação, formação das hifas ascógenas dentro de pseudotécio com nove semanas e a formação das ascas e ascósporos com 11 e 13 semanas, respectivamente. O desenvolvimento deste fungo nos tecidos do hospedeiro é lento, com cerca de dois meses para o aparecimento de esporulação.

Palavras chave: Eucalipto, inoculação, acomicota, ascogênese.

ASCOGENESIS OF *Teratosphaeria nubilosa* IN SEEDLINGS OF *Eucalyptus globulus***ABSTRACT**

The cultivation *Eucalyptus* is affected by a number of diseases. Many pathogens occur in several eucalypt species, especially fungi, from the nursery to the adult planting. One of the major diseases is *Mycosphaerella* leaf disease, being one of the *Eucalyptus globulus* the most susceptible specie. With the aim of studying the ascogenesis of *Teratosphaeria nubilosa*, seedlings of *E. globulus* were inoculated by the ejections of ascospores of *T. nubilosa* in greenhouse, where leaves were collected with the symptoms of the fungus symptoms of the fungus from the third week until the fourteenth week of inoculation. By means of histological sections of these materials was possible to monitor the formation of pseudothecia form its

beginning, three weeks after the inoculation. The formation of ascogenous hyphae within the pseudothecia at nine weeks, and the formation of asci and ascospores with 11 and 13 weeks respectively. The development of this fungus in host tissues is slow with about two months for the onset sporulation of the pathogen.

Keywords: Eucalyptus, inoculation, Ascomycota, ascogenesis.

1. INTRODUÇÃO

Um dos maiores problemas em viveiros e plantios jovens de *E. globulus* está relacionado à mancha de micosferela, causada por espécies de fungos dentro gêneros *Teratosphaeria* e *Mycosphaerella*. A referida doença é considerada uma das mais importantes na cultura do eucalipto, e a espécie *E. globulus* uma das espécies mais suscetíveis (Carnegie et al., 1994,1998)

Dentre as espécies responsáveis por esta doença, *Teratosphaeria nubilosa* e *T. cryptica* são consideradas as espécies mais importantes em nível mundial (Carnegie e Ades, 2002; Hunter et al., 2009). Estas espécies são as primeiras a colonizar os tecidos sadios do hospedeiro, adquirindo nutrientes para sua fase hemibiotrófica (Hunter et al., 2009; Park e Keane, 1982a). Segundo Crous (1998) e Crous et al. (2006), outras espécies de *Mycosphaerella* e *Teratosphaeria*, demonstram patogenicidade aparentemente fraca, ou podem atuar como saprófitas no tecido necrótico, seguidas pela infecção de outras espécies patogênicas, insetos ou senescência da folha.

No Brasil, grandes danos ocasionados pela doença mancha de micosferela, foram relatados no ano de 2007, com a primeira constatação de *Teratosphaeria nubilosa* no Rio Grande do Sul, em plantações de *E. globulus* (Perez et al., 2009).

Os danos associados a esta doença, incluem manchas necróticas localizadas nas folhas, desfolhamento, cancos e morte prematura dos ramos e, em alguns casos, atrofia e morte da árvore (Smith, 2006). No caso de manchas, estas podem ser arredondadas ou irregulares, de coloração variando de amarelo escuro à marrom escuro, sendo que o maior dano relacionado com este sintoma é a interferência nos processos fotossintéticos. O grau de inibição da fotossíntese pode ser um indicativo da severidade do patógeno (Guest & Brown, 1997).

Manchas causadas pelo fungo *Teratosphaeria nubilosa* são bastante comuns em plantios de *E. globulus*, tanto em viveiro como em campo e embora possam ocorrer em folhas jovens e adultas, este agente causal é geralmente encontrado em tecidos jovens (Carnegie e Ades, 2002). Ocorre naturalmente apenas na sua forma teleomórfica (Crous et al., 2004), ocasionando manchas de coloração parda, nas quais são observados pseudotécios escuros que podem ser anfígenos, porém predominantemente, são encontrados pseudotécios hipófilos nas lesões (Carnegie e Ades, 2002; Crous et al., 2004).

Estes fungos pertencem à classe Loculoascomycetes, nos quais as estruturas onde se formam as ascas, são do tipo ascostroma, que se desenvolvem no interior de lóculos (Alexopoulos et al., 1996). Os gêneros *Mycosphaerella* e *Teratosphaeria* possuem estroma unilocular peritecióide, denominado pseudotécio.

A infecção por ascósporos de espécies de *Mycosphaerella* e *Teratosphaeria* na superfície das folhas de *Eucalyptus* spp. pode ser direta ou indireta. Na infecção direta, os ascósporos penetram na folhas através da cutícula, demonstrando a habilidade alcançada pelos esporos destes fungos em formar um “peg” de penetração, no final do tubo germinativo. Por meio da pressão de turgor, o “peg” de penetração está apto para perfurar a cutícula e avançar para o interior da folha, onde o mesmo expande-se para formar a vesícula epidermal e, logo depois a hifa de penetração atravessa a célula da epiderme e emerge no espaço intercelular no mesófilo (Hunter et al., 2009).

O fungo *T. nubilosa* emprega uma estratégia de penetração indireta, na qual a infecção ocorre através dos estômatos e os tubos germinativos provenientes dos ascósporos, produzem hifas que se incham nos ostíolos e cavidades estomatais (Park e Keane, 1982b). Quando há condições de umidade favorável, os ascósporos são liberados dos pseudotécios e dispersos pelo vento, atuando como inóculo primário, e infectando o hospedeiro por meio da abertura dos estômatos (Park, 1988a).

Os ascósporos são a primeira fonte de inóculo para a maioria das espécies de *Mycosphaerella* e *Teratosphaeria*; considerando que algumas espécies infectam o hospedeiro primeiramente por conídios (Crous, 2007; Park e Keane, 1987).

Após a infecção, os primeiros sintomas da doença podem aparecer no período de três a quatro semanas em materiais mais suscetíveis, e seis semanas em folhas adultas ou folhas de espécies resistentes (Park et al., 2000).

Os estômatos fornecem lugar para a formação dos pseudotécios, sendo que a distribuição dos estômatos pode refletir a quantidade de pseudotécios (Beadle, 2000), que se formam, individualmente abaixo dos estômatos no tecido necrótico após oito semanas (Park e Keane, 1987). Dentro destas estruturas formar-se-ão as ascas bitunicadas, com oito ascósporos bicelurares (Park et al., 2000).

A ascogênese é um processo de formação que ocorre de maneira um lenta. Um fator que explica o tempo de formação relativamente longo é a própria estrutura do ascoma, cujas paredes são espessas e escuras (Nyio, et al., 1986). Desta forma, oferecendo proteção para os ascos e ascósporos, especialmente em condições adversas de umidade e temperatura, atuam como fontes de inóculo e mantêm a sua viabilidade mesmo que estejam presentes em folhas secas e destacadas das árvores.

Este estudo teve como objetivo descrever, por meio de cortes histológicos, a ascogênese de *T. nubilosa* em mudas de *E. globulus* após inoculação por meio de ejeção de ascósporos, desde os primeiros sintomas até a formação e maturação dos pseudotécios.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção das mudas de *Eucalyptus globulus*

Sementes de *E. globulus* fornecidas pela empresa Fibria Celulose e Papel LTDA, foram plantadas por semeadura direta em tubetes de 30x115mm (50cm³) em substrato (Plantmax[®]) e mantidas em casa de vegetação até a sua utilização.

Quando as plantas atingiram cerca de 10 cm de altura (um mês de idade) foi realizada a inoculação em câmara de temperatura controlada.

2.2 Obtenção do inóculo

Foram selecionadas folhas contendo sintomas com morfologia semelhantes. Assim, foram utilizadas somente folhas com manchas de coloração parda características de *T. nubilosa*. A preparação do material foi realizada de acordo com a metodologia de Crous (1998), ou seja, as folhas de *E. globulus*, contendo os sintomas e sinais dos agentes causais, foram mergulhados em água destilada estéril por um período de 2 horas. Em seguida, foram colocados na face interna de tampas de placas de Petri (90 x 15 mm)

contendo meio de extrato de malte (MEA – 2%), ficando fixados devido à umidade do material que estava em água. As placas de Petri permaneceram por 24 horas em BOD a 25°C no escuro. Após esse período, visando-se a ejeção dos ascósporos e deposição dos mesmo no meio de cultura, foi possível observar a germinação característica de ascósporos de *T. nubilosa*, com padrão bipolar e em linha reta.

A partir destes ascósporos germinados foi possível a realização de isolamentos monospóricos, em meio de cultura de extrato de malte (MEA – 2%). Os isolados apresentaram diferenças quanto à forma de crescimento micelial e coloração, variando entre tons de cinza, e com crescimento de aproximadamente 2 cm em 4 semanas.

Para confirmação da espécie isolada, foram realizados estudos moleculares, para tanto, as culturas fúngicas obtidas foram transferidas para meio V8 acrescido de extrato de malte. Após o crescimento, pequenas porções das culturas foram retiradas para extração do DNA, de acordo com o protocolo CTAB (hexadecyl trimethyl ammonium bromide), adaptado de Dellaporta, et al. (1983).

Para a reação de PCR, os mix foram preparados para um volume final de 20µL. Todos os reagentes foram misturados no mesmo tubo ependorf, exceto o DNA que foi posteriormente adicionado em cada ependorf correspondente ao número de cada amostra. Esta etapa foi realizada utilizando-se: 0,2 µL do primer ITS1 (5' - TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3') e 0,2 µL do primer ITS4 (5' - TCC TCC GCT TATTGA TAT GC-3'), 4,0 µL do tampão 5x, 0,2 µL de DNTPs, 0,1 µL de Taq, 14,3 µL de água Miliq estéril, e 1 µL do DNA de cada amostra. O termociclador foi programado para um ciclo de 94 °C por 2 minutos (desnaturação), seguido de 40 ciclos de 94°C por 15 segundos (desnaturação), 54 °C por 30 segundos (anelamento), 72 °C por 30 segundos (extensão), e um ciclo de 72 °C por 4 minutos (extensão final), e na última etapa mantidos a 4 °C.

2.3 Inoculação em mudas de *Eucalyptus globulus*

Foram utilizadas 30 folhas de *E. globulus* apresentando sintomas e sinais do fungo *T. nubilosa* coletadas de mudas fornecidas pela empresa Fibria Celulose e Papel LTDA, Unidade de Jacareí, e mantidas na casa de vegetação do Laboratório de Patologia Florestal do Departamento de Produção vegetal, do Setor de Defesa Fitossanitária, da Faculdade de Ciências Agrônômicas de Botucatu, UNESP.

As folhas contendo frutificações do patógeno foram preparadas seguindo a metodologia adaptada de Crous (1998), utilizada para os isolamentos, ou seja, o material foliar permaneceu em repouso por duas horas em água destilada estéril. Em seguida, as folhas foram colocadas em uma bandeja para tubetes; as lesões contendo os pseudotécios foram posicionadas nos orifícios da bandeja. A fim de que as folhas permanecessem fixadas foi colocada uma placa de vidro em cima das mesmas, ficando a face abaxial, onde se encontram os pseudotécios, voltada para baixo. Uma bandeja com mudas de *E. globulus* em posição vertical, de forma que as mudas ficassem em posição horizontal, para que os ascósporos liberados caíssem na face abaxial destas (Figura 1), onde estão localizados os estômatos.



Figura 1. A: Mudanças de *E. globulus* dispostas na posição horizontal abaixo de folhas de *E. globulus* contendo estruturas de *T. nubilosa*. B: Folhas de *E. globulus* apresentando sintomas e sinais de mancha de micosferela. C-D: Estrutura disposta como câmara úmida para a inoculação.

O conjunto foi envolvido por um plástico previamente umedecido para montagem de uma câmara úmida, e após o preparo desta, com o auxílio de um borrifador manual, a umidade foi reforçada nas mudas e nas folhas com os sintomas e sinais de *T. nubilosa*. Este procedimento foi realizado em câmara de temperatura controlada mantida a 18 a 21°C e fotoperíodo de 12 horas, durante 72 horas, e após esse período, as plantas foram transferidas para casa de vegetação, onde não havia plantas doentes.

O procedimento da inoculação foi repetido por mais duas vezes para confirmação dos períodos de latência e incubação.

Após três semanas da inoculação foram observados os primeiros sintomas. As amostras foram coletadas até que se observasse a presença de pontuações negras na face abaxial das folhas, ou seja, os pseudotécios, o que ocorreu após 12 a 13 semanas da inoculação.

2.4 Estudos anatômicos em microscopia de luz

Para o estudo anatômico, amostras foliares de *E. globulus* foram fixadas em FAA 50 (formaldeído + ácido acético glacial + álcool 50 %), durante 48 horas, sendo posteriormente conservadas em álcool 70 % de acordo com a metodologia proposta por Johansen (1940). As amostras foliares foram infiltradas em resina glicol-metacrilato, seguindo-se a técnica de Gerrits (1991) e posteriormente, cortadas transversalmente em seções 8 µm de espessura em micrótomo rotatório (LEICA, RM2245).

Após a realização dos cortes disposição em lâminas, estes foram corados com azul de toluidina 0,05% pH 4,7 e fixadas com resina sintética (O'Brien et al., 1964). Estes procedimentos foram realizados no Laboratório de Anatomia Vegetal, do Departamento de Botânica, do Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP. Para cada material foram preparadas quatro lâminas com 10 cortes em cada uma, a fim de se obter resultados mais consistentes.

Os materiais foram observados em microscópio ótico de luz Axioskop 40, marca Zeiss, Câmera Axio Cam MRC acoplado a computador com Sistema de Análise de Imagens (programas Axiovision e Axioviewer), do Laboratório de Anatomia da Madeira, do Departamento de Ciências Florestais, da Faculdade de Ciências Agrônômicas de Botucatu, UNESP, para obtenção de fotomicrografias dos materiais.

2.5 Isolamento de *Teratosphaeria nubilosa* a partir de mudas inoculadas

Além de estudos por meio de cortes histológicos foram realizados isolamentos para confirmação da presença do patógeno nos tecidos do hospedeiro, de acordo com a metodologia adaptada de Crous (1998).

Para tanto, pequenos pedaços das folhas de *E. globulus* contendo os sintomas e sinais dos agentes causais foram imersos em água destilada estéril por um período de 2 horas. Em seguida, foram colocados na face interna de tampas de placas de Petri (90 x 15 mm) contendo meio de extrato de malte (MEA – 2%), permanecendo fixados na tampas da placa devido à redução da tensão superficial proporcionada pela água. As placas foram levadas à câmara de temperatura controlada (BOD), onde permaneceram por 24 horas a 25°C e no escuro. Após, as placas foram observadas primeiramente em estereomicroscópio para constatação da ejeção de ascósporos no meio de cultura; em seguida pequenos pedaços do meio foram transferidos para lâminas, corados com Lactoglicerol, sobrepostos com lamínulas para visualização em microscópio óptico.

Os isolamentos monospóricos foram realizados com o auxílio de uma agulha histológica, em placas de Petri medindo 90 x 15 mm com meio de extrato de malte (MEA), e mantidas em BOD, a 25°C.

3. RESULTADOS

3.1 Sintomas e sinais de *Teratosphaeria nubilosa* em mudas de *Eucalyptus globulus* e análise sob microscopia de luz

As condições de umidade mantidas durante a inoculação e o período de 72 horas após o procedimento foram suficientes para induzir a infecção nas mudas de *E. globulus*, sabe-se que o melhor período para ejeção de esporos é durante o molhamento foliar. Na natureza, é provável que os períodos de molhamento foliar resultem muito mais das chuvas de verão, do que da umidade ocasionada por orvalho. Sendo assim, estas chuvas são efetivas na indução da liberação e dispersão dos ascósporos (Hunter et al., 2009).

Após a inoculação, os primeiros sintomas, caracterizados por lesões de coloração verde pálido e margens arroxeadas, foram observadas a partir de três a quatro semanas da inoculação (Figura 2A-B). Após seis semanas, as manchas tornaram-se amareladas (Figura 2C-D).

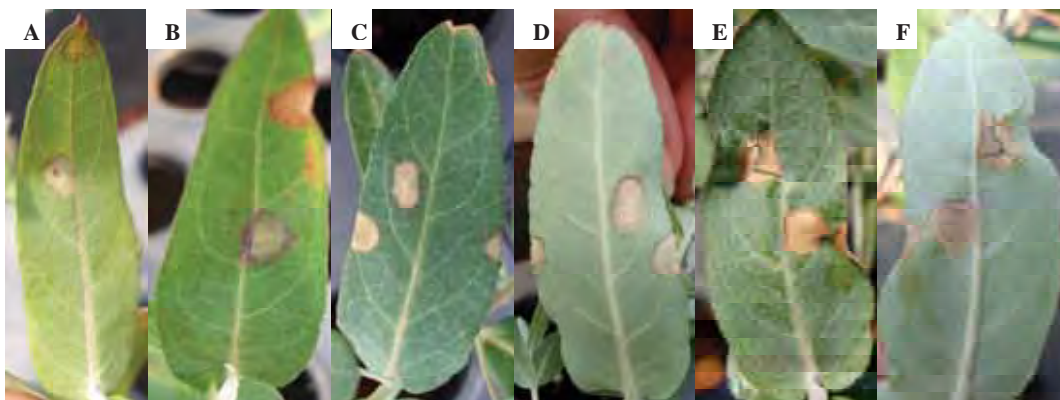


Figura 2. Lesões provocadas por *Teratosphaeria nubilosa* em *E. globulus*. A-B: duas e três semanas após a inoculação. C-D: seis semanas após a inoculação. E-F: 13 semanas após a inoculação.

A formação de pseudotécios iniciou-se a partir da 8ª semana, ou seja, cerca de 60 dias após a inoculação, indicando que o período de incubação da doença corresponde a aproximadamente dois meses. Após 12 a 13 semanas da inoculação foi observada grande quantidade de pseudotécios nas manchas resultantes de presença do fungo (Figura 2E-F).

Frequentemente, as lesões crescem e coalescem formando lesões muito grandes que podem ocupar toda a superfície da área foliar e devido a isso, pode ocorrer a degradação da folha. Com o avanço da doença, as manchas tornam-se amareladas ou com coloração marrom pálido e bordas de cor marrom escura (Crous, 1998; Park e Keane, 1982b).

Os resultados obtidos por meio das inoculações artificiais estão de acordo com Park e Kane (1987). Os autores realizaram inoculações com *T. nubilosa* e *T. cryptica* em casa de vegetação, e observaram a formação de ascomas após quatro a oito semanas do aparecimento dos primeiros sintomas, para ambas as espécies e a formação completa dos pseudotécios, contendo as ascas com os ascósporos, a partir de 12 semanas.

Posteriormente à inoculação, as plantas foram transferidas para casa de vegetação onde foi realizada apenas irrigação manual. Apesar da diminuição da umidade, houve germinação dos ascósporos e a penetração dos mesmos no hospedeiro e, conseqüentemente, o desenvolvimento da doença. Nos cortes histológicos analisados, foram encontrados ascomas e ascos em vários estádios de desenvolvimento (Figura 3).

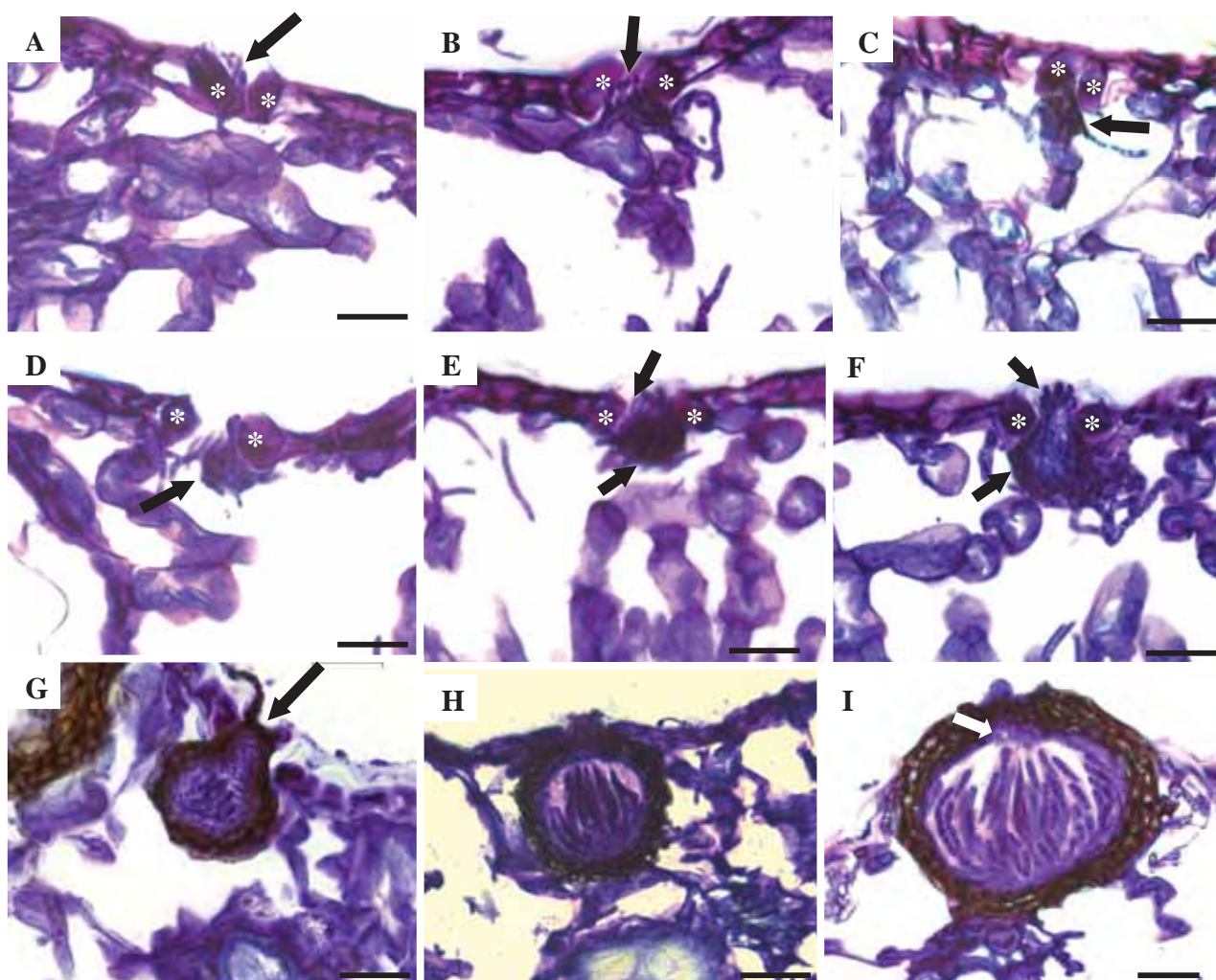


Figura 3. Secção transversal de folhas provenientes de mudas de *Eucalyptus globulus* após a inoculação com *Teratosphaeria nubilosa*. A-C: Após três semanas. D: Após cinco semanas. E: Após sete semanas. F: Após oito semanas; formação do pseudotécio e de seu ostíolo (setas) entre as células-guarda (*). G: Após nove semanas; pseudotécio imaturo com as paredes já delimitadas com início da formação das ascas. H: Após 11 semanas; pseudotécio com ascas e ascósporos imaturos. I: Após 13 semanas; pseudotécio com ascas e ascósporos formados e aptos para liberação no ambiente; presença de perífises (seta). A-B: Hifas de *T. nubilosa* (setas) entre células guarda. C-E: Início de formação de pseudotécios (setas) na câmara subestomática e entre as células-guarda. Células-guarda (*). Barras: 20 μ m. As fotomicrografias foram invertidas para melhor visualização dos corpos de frutificação.

O sucesso na infecção deve-se à resistência dos ascósporos em baixas condições de umidade, Park (1988b) comprovou que esporos de *T. nubilosa* e *T. cryptica* podem suportar até quatro dias de seca após a deposição no hospedeiro. Segundo o autor, os ascósporos liberados por uma breve chuva durante o dia, podem sobreviver até que se forme orvalho e, em poucas horas após a deposição na superfície foliar, estas estruturas germinam em temperatura ótima ao redor de 20°C, formando tubos germinativos que penetrarão no hospedeiro por meio dos estômatos (Park, 1988a; Park e Keane, 1982a).

Nos materiais examinados três semanas após a inoculação foram observadas somente hifas do patógeno em meio ao tecido rompido pela presença do mesmo. Em alguns estômatos da face abaxial da epiderme pertencentes ao mesmo material, foi observada a presença de hifas (Figura 3A-C). Após cinco semanas já foi possível observar formações muito pequenas abaixo das células guarda (Figura 3D).

Após sete semanas da inoculação, foi possível observar formações arredondadas maiores, ainda com a presença de hifas, que cresciam através da abertura dos estômatos (Figura 3E). Em oito semanas após inoculação, observaram-se de estruturas com o formato de ascoma unilocular, o pseudotécio, porém ainda com a presença de hifas na região onde se formará o ostíolo (Figura 3F).

O início da formação das ascas foi observado cerca de oito semanas após a inoculação. Na Figura 3G, nota-se um pseudotécio pequeno e ainda imaturo, porém com as hifas ascógenas bem definidas que darão origem às ascas.

Na Figura 3H, de material coletado em 11 semanas após inoculação, tem-se um pseudotécio completamente formado e, em seu interior é possível visualizar com nitidez as ascas ainda imaturas, ou seja, sem a formação dos ascósporos.

Treze semanas após inoculação, os materiais coletados apresentaram pseudotécios maduros e já com maiores dimensões (Figura 3I). Estas estruturas onde são formadas as ascas e os ascósporos apresentam coloração marrom escuro, são globosas a puntiformes, possuem em média 120µm de diâmetro. No canal ostiolar é possível observar a presença de hifas estéreis denominadas perífises.

Dentro dos pseudotécios foram observadas ascas bitunicadas, elipsoidais, curvadas e fasciculadas, medindo 60 x 17µm, contendo em seu interior os ascósporos (em número de oito em cada) completamente formados, septados, oblíquos,

elipsoidais a ovóides, dispostos um em seguida do outro no interior das ascas (Figura 3I), sem ornamentação (superfície lisa), levemente reduzidos no septo mediano e afinados na extremidade inferior medindo 14 x 3,2 μ m.

3.2 Isolamento de *Teratosphaeria nubilosa* a partir de mudas inoculadas

Além da visualização das estruturas de *T. nubilosa* por meio das análises histológicas, também foram realizados isolamentos para confirmação da presença do patógeno. De acordo com as observações em microscópio óptico, foi constatada a presença de *T. nubilosa* devido à germinação bipolar dos ascósporos com os tubos germinativos crescendo paralelamente ao longo destes esporos.

O crescimento dos isolados obtidos foram observados após 15 dias de crescimento. Após quatro semanas as culturas apresentaram-se com aproximadamente 1,5 cm de diâmetro, com bordas irregulares e micélio aéreo de coloração esbranquiçada no centro da cultura.

À medida que o fungo se desenvolveu no meio, o micélio adquiriu coloração verde pálida à acinzentada na periferia da cultura. Por meio da observação da germinação dos ascósporos, dos isolamentos realizados, do crescimento e da morfologia das culturas obtidas, e também através da técnica de PCR e seqüenciamento, foi comprovado que o fungo utilizado para inoculação e a formação de pseudotécios nas folhas era de fato *T. nubilosa*. Em síntese, as características da germinação dos ascósporos, crescimento e morfologia das culturas obtidas, reforçados com resultados obtidos com a técnica de PCR e sequenciamento, comprovaram o isolado como sendo *T. nubilosa*.

4. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

O presente estudo permitiu observar e avaliar com precisão, por meio dos cortes histológicos, o desenvolvimento de *Teratosphaeria nubilosa* em mudas de *Eucalyptus globulus* inoculadas. A ascogênese foi analisada desde o início da penetração do fungo pelo ostíolo do estômato e início do desenvolvimento do micélio nos espaços intercelulares, até a formação dos pseudotécios nas câmaras subestomáticas, e o desenvolvimento das ascas e ascósporos no interior dos pseudotécios

O início da formação do ascoma está relacionado com um grupo de células, com a fertilização de uma célula denominada ascogônio e, em seguida, de várias etapas de formação e maturação dos ascos e ascósporos (Ganapathi, 1979).

Nos fungos pertencentes à classe Loculoascomycetes, o ascogônio desenvolve-se dentro de um estroma parenquimatoso. Esta é a diferença fundamental no desenvolvimento dos fungos pertencentes a esta classe, pois a estrutura que conterá os ascos está presente antes do início do desenvolvimento dos mesmos e não ocorre o desenvolvimento do ascoma ao redor dos ascos, como ocorre nos peritécios (Alexopoulos et al., 1996). Este tipo de formação foi observado nos cortes histológicos dos materiais analisados, principalmente nas figuras 3A, onde se observa somente as hifas localizadas entre as células guarda dos estômatos e a camada subestomática e na figura 3G, na qual se observa as hifas ascógenas no interior do pseudotécio. Estas estruturas formam-se inseridas no tecido do hospedeiro na face abaxial, em estroma unilocular na câmara subestomática, adentrando através dos ostíolos (Ganapathi, 1979; Park, 1988a; Alexopoulos et al., 1996).

Durante o desenvolvimento do ascoma o estroma amadurece e rompe a superfície do hospedeiro (Ganapathi, 1979), ao final de sua formação, os pseudotécios não se encontram totalmente imersos no tecido do hospedeiro, sendo parcialmente superficiais.

As ascas são formadas em ascomas superficiais nas manchas necróticas localizadas nas folhas, constituídas pelos tecidos mortos devido à presença do fungo. Os pseudotécios são produzidos em um aglomerado de hifas entrelaçadas junto ao substrato próprio, bem desenvolvido, composto por hifas escuras. Tais hifas podem apresentar coloração marrom a marrom acinzentada (Alexopoulos et al., 1996), sendo estas características da ordem Capnodiales (Crous, 1998). Ascomas maduros de alguns fungos pertencentes a esta ordem, como *Mycosphaerella* spp., geralmente possuem paredes espessas com células alongadas impregnadas com a melanina, que constituem as camadas mais externas do pseudotécio (Niyo et al., 1986).

Diferentes tipos de hifas, como paráfises e perífises, podem se formar entre os ascos, dentro do ascoma ou do seu próprio ostíolo, recebendo um nome geral de hamatécio. As paráfises podem ou não estar presentes e, embora o hamatécio ou estruturas hamateciais, possam ser observadas, estas estruturas desaparecem rapidamente durante o desenvolvimento (Putzke e Putzke, 1998). Em pseudotécios completamente formados (figura

3I), o único tipo de tecido hamatecial que se encontra são perífises, constituído por perífises, que são hifas confinadas ao canal ostiolar, não ramificadas e não anastomosadas.

Na natureza, frequentemente, a maturação do ascoma não ocorre ao mesmo tempo da queda de folhas causada pela doença, tanto que o desenvolvimento e amadurecimento do esporo coincidem com o período seguinte, no qual haja condições favoráveis à infecção. Isto ocorre com *T. nubilosa*; porém, o atraso no desenvolvimento do ascoma também se deve ao longo período de incubação do patógeno (Park, 1988a).

A resistência de certas espécies de eucalipto a *Mycosphaerella* spp. e *Teratosphaeria* spp., pode estar relacionada primeiramente aos mecanismos de defesa estruturais pré-formados do hospedeiro, como pilosidade, espessamento da cutícula, número e distribuição dos estômatos e lignificação das paredes celulares, xilema e fibras esclerenquimáticas presentes nas nervuras das folhas. Smith et al. (2007) verificaram que *Eucalyptus nitens*, uma espécie considerada resistente aos agentes causais de mancha de micoserela, possui uma maior proporção de parênquima paliçádico e uma menor quantidade de espaços intercelulares em sua folhas.

Segundo Silva et al. (2005) tecidos parenquimáticos também podem exibir resistência aos patógenos, através da organização e características das células.

Em *E. globulus*, as folhas mais jovens apresentam maior suscetibilidade aos agentes causais da mancha de micoserela.

As folhas jovens de *E. globulus* apresentam mesófilo isobilateral e muitos espaços intercelulares, o que facilita o desenvolvimento do fungo e a formação de seus corpos de frutificação. Ao contrário, as folhas adultas apresentam mesófilo dorsiventral e menor quantidade de espaços intercelulares, dificultando o avanço do fungo no tecido. Folhas, com aproximadamente 46 dias mostram-se mais resistentes e à medida que se tornam adultas, tendem a apresentar certa resistência que tende a aumentar progressivamente (Park, 1988a).

A preferência de espécies de *Mycosphaerella* e *Teratosphaeria* por tecidos jovens deve-se ao fato de folhas adultas apresentarem camadas de células paliçádicas com espaços intercelulares menores o que podem atrasar ou impedir a infecção de algumas espécies de *Mycosphaerella* no hospedeiro, devido à compactação dessas células, o que dificulta a colonização do patógeno (Smith et al., 2007). Além disso, folhas jovens são

bipinadas, facilitando a permanência dos esporos, enquanto que as folhas adultas são fasciculadas, o que não contribui para a adesão e permanência dos esporos.

A resistência de plantas adultas à patógenos pode ser justificada também pela presença de metabólitos secundários desenvolvidos em células adultas, como os compostos taníferos, sendo esta uma característica marcante em mirtáceas. Os óleos essenciais ocorrem nas cavidades secretoras subepidérmicas, distribuídas em ambas as faces foliares, tendo seu conteúdo típico para cada espécie dentro da família (Donato e Morretes, 2007). Segundo Castro e Machado (2003) os óleos essenciais servem para reduzir a herbivoria e repelir insetos, entre outros benefícios que conferem às plantas.

No presente estudo, as folhas utilizadas para realização de cortes histológicos foi observada a presença de grande quantidade de espaços intercelulares, possibilitando o desenvolvimento de *T. nubilosa* bem como dos seus pseudotécios nas câmaras subestomáticas.

Com relação ao cultivo em laboratório, algumas espécies de *Mycosphaerella* e *Teratosphaeria* são relativamente fáceis de serem cultivadas em meios artificiais, porém algumas formam somente conídios ou não produzem esporos sexuais (Alexopoulos et al., 1997). Na maioria das espécies, não ocorre formação do pseudotécio em meio de cultura, mesmo que sejam cultivos axênicos, sendo estas estruturas são encontradas somente nas manchas em folhas (Park e Keane, 1982a; 1982b).

Desta forma, alguns autores descrevem metodologias para inoculação utilizando ascósporos recém-liberados dos pseudotécios nas folhas de eucalipto.

Park (1988a) obteve a suspensão de ascósporos de *Teratosphaeria nubilosa*, a partir de pedaços de folhas lesionadas, contendo os ascomas, mantidas em água destilada por 1 a 2 horas; em seguida, os materiais foram secos e cobertos com uma camada de papel celofane. Posteriormente, o autor retirou o celofane e o lavou com água destilada estéril contendo tween 20, obtendo desta forma uma suspensão que foi padronizada para 5×10^4 esporos ml^{-1} , e aspergida sobre as plantas. Os primeiros sintomas foram observados em folhas jovens após três a quatro semanas da inoculação. O autor também realizou inoculações com outra espécie, *Teratosphaeria cryptica*, cuja suspensão de conídios foi obtida por meio de agitação das folhas com as lesões jovens; sendo em *T. cryptica*, encontra-se grande quantidade de acérvulos contendo os conídios (Park e Keane, 1987).

Esporos produzidos tanto na fase assexuada (conídios) quanto na fase sexuada (ascósporos) são capazes de causar a infecção (Park, 1988a). O fungo *T. cryptica*, permite a realização de inoculações de forma mais simples, pois, além da produção de conídios no hospedeiro, também é capaz de produzi-los em meio de cultura, em isolados obtidos a partir de ascósporos ou conídios (Park et al., 2000)

Smith (2006) inoculou plantas de *E. globulus* com uma suspensão em água, obtida a partir de pedaços de folhas contendo os corpos de frutificação do agente causal de mancha de micoserela, suspensão esta que foi centrifugada a $2800g\ min^{-1}$ por 5 min, e o sobrenadante foi aspergido sobre as plantas. As lesões foram observadas após 74 dias da inoculação.

Muitos trabalhos, relacionados a estes patógenos apresentam algumas dificuldades relacionadas à esporulação para realização de inoculações artificiais, sendo de grande importância a formação do estado anamorfo. Os estádios conidiais de anamorfos de espécies de *Mycosphaerella* e *Teratosphaeria* são variados, algumas espécies produzem conídios em picnídios, outras em acérvulos, outras em conidióforos (Alexopoulos et al., 1997).

Algumas espécies não produzem conídios, como *T. nubilosa*, cujo estado anamorfo ainda é desconhecido (Jackson et al., 2008). Embora tenha sido relacionada a *Uwebraunia juvenis*, esta relação foi considerada duvidosa devido à rara ocorrência de conídios deste fungo em meio de cultura (Crous et al., 2006).

Em muitos estudos relacionados a espécies de *Mycosphaerella*, foram realizadas inoculações por meio de conídios produzidos em meio de cultura como, por exemplo, os agentes causais das doenças sigatoka negra e amarela em bananeiras, *Mycosphaerella fijiensis* e *Mycosphaerella musicola*, respectivamente (Abadie et al., 2008).

Inoculações realizadas por meio de ejeção de esporos diretamente nas folhas do hospedeiro apresentam algumas limitações, ou seja, não possibilitam o conhecimento do inóculo inicial e a padronização da concentração de esporos. Apesar disso, permitem a realização de inoculações mais práticas e rápidas, principalmente quando se necessita analisar a resistência de certos genótipos a determinadas doenças. Muitas formas para inoculação podem ser elaboradas utilizando esporos ejetados diretamente nas plantas, ou em água para constituição de uma suspensão de esporos, visto ao crescimento lento e à dificuldade de esporulação destes fungos em meio de cultura.

5. REFERÊNCIAS

ABADIE, C. et al. Artificial inoculation on plants and banana leaf pieces with *Mycosphaerella* spp., responsible for Sigatoka leaf spot diseases. **Fruits** (CIRAD/EDP Sciences), Chantal Loison, v. 63, p. 319-323, set., 2008.

ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. Introductory mycology. 4. ed. New York: Wiley & Sons, 1996. 869 p.

BEADLE, C. J. Physiology of eucalypts in relation to disease. In: KEANE P. J.; KILE G. A.; PODGER F. D. **Diseases and pathogens of eucalypts**. Melbourne: CSIRO Publishing, 2000. 565 p.

CARNEGIE A. J.; ADES, P. Added phosphorus is associated with reduced severity of *Mycosphaerella cryptica* in *Eucalyptus globulus*. **Australian Forestry**, Yarralumla, v. 64, n. 4, p. 203-208, dez., 2002.

CARNEGIE, A. J.; KEANE, P. J. Further *Mycosphaerella* species associated with leaf diseases of Eucalyptus. **Mycological Research**, Cambridge, v. 98, n. 4, p. 413-418, abr., 1994.

CARNEGIE, A. J.; KEANE, P. J. *Mycosphaerella vespa* from diseased Eucalyptus leaves in Australia. **Mycological Research**, Cambridge, v.102, n. 10, p.1274-1276, out., 1998.

CASTRO, M. M.; MACHADO, S. R. Células e tecidos secretores. p. 179-204. In: APPEZZATO-DAGLÓRIA, B.; CARMELLO-GUERREIRO, S. M. **Anatomia vegetal**. Viçosa: UFV, 2. ed. 2006. 438 p.

CROUS, P. W. *Mycosphaerella* spp. and their anamorphs associated with leaf spot diseases of *Eucalyptus*. **Mycologia Memoirs**, St. Paul, v. 21, n. 170, 1998. 170 p.

CROUS, P. W. et al. Phylogenetic reassessment of *Mycosphaerella* spp. and their anamorphs occurring on *Eucalyptus*. **Studies in Mycology**, Utrecht, v. 50, p. 195-214, 2004.

CROUS, P. W. et al. Phylogenetic reassessment of *Mycosphaerella* spp. and their anamorphs occurring on *Eucalyptus* II. **Studies in Mycology**, Utrecht, v. 55, p. 99-131, 2006.

CROUS, P. W. et al. Foliicolous *Mycosphaerella* spp. and their anamorphs on *Corymbia* and *Eucalyptus*. **Fungal Diversity**, Mae Taeng, v. 26, n. 3, p. 143-185, 2007.

DELLAPORTA, S. L.; WOODS, J.; HICKS, J. B. A plant DNA minipreparation: Version II. **Plant Molecular Biology Reporter**, Athens, v. 1, n. 4, p. 19-21, 1983.

DONATO, A. M.; MORRETES, B. L. Anatomia foliar de *Eugenia brasiliensis* Lam. (Myrtaceae) proveniente de áreas de restinga e de floresta. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, João Pessoa, v. 17, n. 3, p. 426-443, set., 2007.

GANAPATHI, A. **Studies of the etiology of the leaf blotch disease of *Eucalyptus* spp. caused by *Mycosphaerella nubilosa* (Cke) Hansf.** 1979. 138 f. Tese (Doutorado)-Univesity of Auckland, New Zeland, 1979.

GERRITS, P. O. **The application of glycol metacrylate in histotechnology:** some fundamental principles. Leica: Department of Anatomy and Embryology State University Groningen, 1991. 80 p.

GUEST, D.; BROWN, J. Infection processes. In: BROWN, J.F.; OLSEN, H. J.(eds.) **Plant pathogens and plant diseases**. Armidale: NSW, 1997. p. 245-262.

HUNTER, G. C. et al. *Teratosphaeria nubilosa*, a serious leaf disease pathogen of *Eucalyptus* spp. in native and introduced areas. **Molecular Plant Pathology**, London, v. 10, n. 1, p. 1-14, jan., 2009.

JACKSON, S. L. et al. Incidence and new records of *Mycosphaerella* species within a *Eucalyptus globulus* plantation in Western Australia. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 255, n. 12, p. 3931-3937, 2008.

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

NIYO, K. A.; McNABB JR., H. S.; TIFFANY, L. H. Ultrastructure of the ascocarps, asci and ascospores of *Mycosphaerella populorum*. **Mycologia**, Lawrence, v. 78, n. 2, p. 202-212, mar/abr., 1986.

O'BRIEN, T. P.; FEDER, N.; McCULLY, M. E. Polychromatic staining of plant cell walls by Toluidine Blue O. **Protoplasma**, Wien, v. 59, n. 7, p. 367-373, jul., 1964.

PARK, R. F. Effect of certain host, inoculum, and environmental factors on infection of *Eucalyptus* species by two *Mycosphaerella* species. Transactions of the British Mycological Society, London, v. 90, n. 2, p. 221-228, mar., 1988a.

PARK, R. F. Epidemiology of *Mycosphaerella nubilosa* and *M. cryptica* on *Eucalyptus* spp. in south-western Australia. **Transactions of the British Mycological Society**, London, v. 91, n. 2, p. 261-266, 1988b.

PARK, R. F.; KEANE, P. J. Three *Mycosphaerella* species from leaf diseases of *Eucalyptus*. Transactions of the British Mycological Society, London, v. 79, n. 1, p. 95-100, ago., 1982a.

PARK, R. F.; KEANE, P. J. Leaf diseases of *Eucalyptus* associated with *Mycosphaerella* species. Transactions of the British Mycological Society, London, v. 79, n. 1, p. 101-115, ago., 1982b.

PARK, R. F.; KEANE, P. J. Spore productions by *Mycosphaerella* species causing leaf diseases of *Eucalyptus*. Transactions of the British Mycological Society, London, v. 89, n. 4, p. 461-470, dez., 1987.

PARK, R. F. et al. Fungal diseases of Eucalypt foliage. In: KEANE P. J.; KILE G. A.; PODGER F. D. **Diseases and pathogens of eucalypts**. Melbourne: CSIRO Publishing, 2000. 565 p.

PEREZ, G. et al. *Mycosphaerella* leaf disease (MLD) outbreak on *Eucalyptus globulus* in Brazil caused by *Teratosphaeria* (*Mycosphaerella*) *nubilosa*. **Phytopathologia Mediterranea**, Firenze, v. 48, n. 2, p. 302-306, 2009.

PUTZKE, J.; PUTZKE, M. T. L. **Os reinos dos fungos**. Santa Cruz do Sul: EDUNISC, 1998, v. 1. 606 p.

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

SMITH, A. **The development of strategies for the management and research of foliar pathogens on Eucalypt plantations: using *Mycosphaerella* in a case study.** 2006. 215 f. Tese (Doutorado)-School of Agricultural Science, University of Tasmania, Tasmania, 2006.

SMITH, A. H. et al. Anatomical and histochemical defence responses induced in juvenile leaves of *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus nitens* by *Mycosphaerella* infection. **Forestry Pathology**, Aberdeen, v. 37, n. 6, p. 361-373, jul., 2007.

ANATOMIA E ULTRA-ESTRUTURA DE FOLHAS JOVENS E ADULTAS DE *Eucalyptus globulus* RELACIONADOS À PATOGÊNESE DE *Teratosphaeria nubilosa***RESUMO**

O objetivo do presente trabalho foi estudar a anatomia e a ultra-estrutura de folhas jovens e adultas de *Eucalyptus globulus*, relacionados à mancha de micoserela, doença fúngica que ocorre nesta espécie de eucalipto, causada *Teratosphaeria* spp. e *Mycosphaerella* spp. Pesquisas relacionadas com a anatomia foliar podem auxiliar em estudos de determinadas doenças, principalmente aquelas importantes economicamente. As diferenças anatômicas existentes entre folhas jovens e adultas de *E. globulus* podem apresentar relação com a preferência dos agentes causais por tecidos jovens. Folhas adultas com manchas causadas por *T. nubilosa* mostram-se mais resistentes, apresentando os sintomas com menor intensidade, o que pode estar relacionado com a compactação das células do parênquima. As folhas jovens, mais suscetíveis, apresentam espaços intercelulares no parênquima lacunoso, no parênquima paliádico e na câmara subestomática, facilitando a formação do estroma de *T. nubilosa*.

Palavras chave: Anatomia foliar, mancha foliar, resistência.

ANATOMY AND ULTRASTRUCTURE OF YOUNG AND ADULT LEAVES of *Eucalyptus globulus* RELATED WITH *Mycosphaerella* LEAF DISEASE**ABSTRACT**

The objective of this work was to study the anatomy and ultrastructure of *Eucalyptus globulus* leaves related to *Mycosphaerella* leaf disease. Searches related leaf anatomy studies collaborating in some important plant diseases. The anatomical difference between young and adult leaves of *E. globulus* can be related with the preference of causal agent for young tissues. Adult leaves were more resistant with less intensity of the symptoms. Which may be related to compression of the parenchyma cells, while the young leaves, have intercellular spaces in the

spongy parenchyma, palisade parenchyma and in substomatal chambers facilitating the formation of the *T. nubilosa* stroma.

Keywords: Anatomy, leaf spot, resistance.

1. INTRODUÇÃO

Muitos fitopatógenos, principalmente fungos, que têm como hospedeiro o eucalipto, tanto em viveiro como em campo, são responsáveis por inúmeros transtornos e perdas econômicas. Dentre estes patógenos, estão os causadores de doenças foliares, como a mancha de micosferela, causada por várias espécies pertencentes aos gêneros *Mycosphaerella* e *Teratosphaeria*.

Os sintomas dependem da espécie do hospedeiro e do patógeno, e no início, são observadas manchas necróticas foliares localizadas, o que reduz a capacidade fotossintética, causa desfolha precoce em plantas juvenis (Ganapathi, 1979), morte prematura dos ramos e, em alguns casos, atrofia e morte da árvore (Smith, 2007). Devido á esta doença, as árvores frequentemente têm o seu metabolismo alterado, o que reduz o crescimento e contribui para infecções causadas por patógenos secundários (Hunter et al., 2004).

A interação entre patógeno e hospedeiro é uma luta entre dois organismos pela própria sobrevivência, onde o hospedeiro reage ao avanço do patógeno por meio de seus mecanismos de defesa estruturais e bioquímicos (Pascholati e Leite, 1995). O desenvolvimento das condições de plantio, agrícolas ou florestais, em busca de novos genótipos resistentes e de potencial de rendimento, promoveu a uniformização de culturas, e isto contribuiu para a pressão de seleção sobre as populações de patógenos, acelerando o seu processo evolutivo (Agrios, 2005).

A superfície das plantas constitui a primeira linha de defesa contra fitopatógenos, que devem ultrapassá-la para iniciar a infecção (Pascholati e Leite, 1995). Os agentes causais da doença mancha de micosferela, além de ultrapassar as defesas presentes na superfície foliar, necessitam que os tubos germinativos produzidos por seus ascósporos penetrem no hospedeiro por meio dos ostíolos dos estômatos. Nesse caso, o número de estômatos e sua localização na folha interferem muito no processo inicial de infecção, pois para que esta infecção ocorra, é necessário que estas estruturas estejam abertas e, no caso de

infecção em folhas jovens, é necessário que os ascósporos sejam depositados na face abaxial, onde os estômatos estão localizados (Park, 1988).

Os esporos de fungos são capazes de germinar na superfície da folhas tanto de plantas suscetíveis como de resistentes; o que irá impedir a infecção é o mecanismo de defesa que o patógeno irá encontrar à medida que se desenvolve no hospedeiro. O entre tempo a inibição do crescimento do fungo e a necrose da célula da planta e pode variar dependendo do hospedeiro. Em alguns casos, a inibição do fungo ocorre algumas horas antes da necrose, enquanto que em outros estes acontecimentos podem ser simultâneos, mas também a inibição do fungo pode ocorrer algumas horas após a necrose (Mares, 1979; Maclean e Tommerup, 1979; citados por Martiello et al., 2005).

O estudo da anatomia foliar é bastante importante, pois permite uma análise comparativa entre os diferentes hospedeiros em diferentes estádios foliares, possibilitando relacionar o nível de resistência com a complexidade de tecidos presentes, que possam constituir barreiras à infecção pelo patógeno. Pesquisas relacionadas com a anatomia foliar podem auxiliar na busca de soluções de problemas referentes à taxonomia vegetal e também no estudo de doenças. A associação entre a anatomia vegetal e a Fitopatologia é de fundamental importância para o melhor entendimento da patogênese e das reações apresentadas pelo hospedeiro, quando exposto à ação de patógenos, bem como para verificar diferenças estruturais capazes de conferir resistência à planta (Jerba, 2003).

Devido à importância de estudos anatômicos relacionados à colonização do hospedeiro pelo patógeno, sua ação no hospedeiro e formação de estruturas reprodutivas, este trabalho tem como objetivo avaliar a anatomia e a ultra-estrutura de folhas jovens e adultas de *E. globulus*, bem como sua relação com a resistência e dinâmica do patógeno no interior dos tecidos infectados.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal utilizado

Foram utilizadas folhas jovens e adultas, sadias e também apresentando a doença mancha de micosferela com os corpos de frutificação do patógeno (pseudotécios). O material era proveniente de árvores com cerca de dois anos e quatro meses, do plantio

comercial da empresa FIBRIA Papel e Celulose, localizado na cidade de Itapeva-SP (Fazenda Karamacy: 48°53'45" O e 23°52'29" S).

Com relação às folhas doentes, foram selecionadas sintomas com morfologia semelhantes, manchas de coloração parda características, ou seja de de *Teratosphaeria nubilosa*.

2.2 Anatomia foliar em microscopia de luz

Foram retirados fragmentos das folhas coletadas, os quais foram fixados em FAA 50 (formaldeído + ácido acético glacial + álcool 50%), durante 48 horas, sendo posteriormente conservados em álcool 70 % e desidratados em série etílica ascendente (Johansen, 1940).

As amostras foram infiltradas em resina glicol-metacrilato, seguindo-se a técnica de Gerrits (1991), e posteriormente, cortadas transversalmente em segmentos de 8 µm de espessura, em micrótomo rotatório (Leica, RM2245). Os segmentos foram corados com azul de toluidina 0,05% pH 4,7 e as lâminas preparadas em resina sintética (O'Brien et al., 1964). Estes procedimentos foram realizados no Laboratório de Anatomia Vegetal, do Departamento de Botânica, do Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP. Para cada material foliar foram preparadas quatro lâminas com 10 segmentos em cada.

Os materiais foram observados em microscópio ótico de luz Axioskop 40, marca Zeiss, Câmera Axio Cam MRC e computador com o Sistema de Análise de Imagens (programas Axiovision e Axioviewer), do Laboratório de Anatomia da Madeira, do Departamento de Ciências Florestais, da Faculdade de Ciências Agrônômicas de Botucatu, UNESP, para obtenção de fotomicrografias dos materiais.

2.3 Análise foliar em microscopia eletrônica de varredura

Amostras das folhas foram fixadas em glutaraldeído 2,5% até sua utilização. No Laboratório de Microscopia Eletrônica, do Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP, as amostras foram fixadas em tampão fosfato 0,1M pH 7,3 e pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1% em tampão fosfato 0,1M pH 7,3.

Em seguida, as amostras passaram por uma desidratação em série de acetona, sendo submetidos à secagem em ponto crítico e metalização em ouro, para posterior análise em microscópio eletrônico de varredura “Philips SEM 515” (Robards, 1978).

3. RESULTADOS

3.1 Identificação do agente causal de mancha de micosferela no material vegetal utilizado

Nos materiais utilizados, os sintomas ocasionados nas folhas foram identificados como manchas necróticas causadas pelo fungo *Teratosphaeria nubilosa*, pois foram observadas manchas arredondadas, com coloração amarelada ou marrom pálido, e bordas marrom escuro (Figura 1A). Em alguns dos materiais, as manchas estavam coalescidas, constituindo lesões muito grandes ocupando toda a superfície da área foliar (Figura 1B).

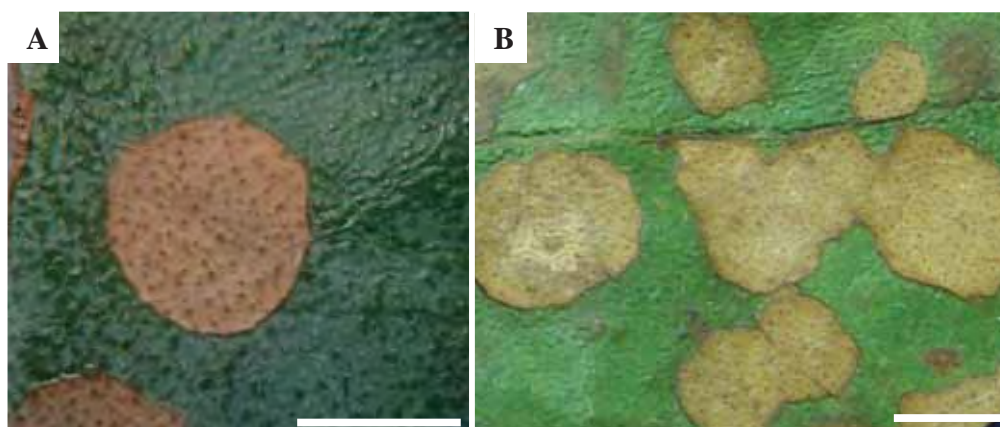


Figura 1. Manchas características de *Teratosphaeria nubilosa* em folhas de *Eucalyptus globulus*. A: mancha isolada em face adaxial. B: manchas coalescidas em face adaxial. Barras: 5mm.

3.2 Anatomia foliar em microscopia de luz

Além de aspectos relacionados com a resistência à mancha de micosferela, as análises histológicas permitiram algumas observações com relação aos agentes causais desta doença. Ao infectarem o hospedeiro, estes fungos avançam em seus tecidos com crescimento intercelular e intracelular, adquirindo nutrientes a partir das células do

hospedeiro. Ocorre a produção de ascas dentro de estromas, que em espécies de *Mycosphaerella* e *Teratosphaeria* são estromas uniloculares peritecióides, denominados pseudotécios.

Nas Figuras 2A-B podem ser observados pseudotécios escuros, puntiformes, globosos, ostiolados, apresentando paredes espessas, maduros, contendo ascas e ascósporos, e com perfíses. Na Figura 2B existem poucos ascósporos, pois provavelmente já tenham sido liberados.

Os pseudotécios são formados em um estrato de hifas entrelaçadas, junto a um substrato próprio bem desenvolvido composto por hifas escuras de coloração marrom acinzentada (Alexopoulos et al., 1996; Putzke & Putzke, 1998). Nas Figuras 2A-D podem ser observadas as hifas escuras e septadas, conectadas às paredes do pseudotécio, indicadas pelos asteriscos. As Figuras 2E-F mostram o micélio crescido no interior do tecido do hospedeiro.

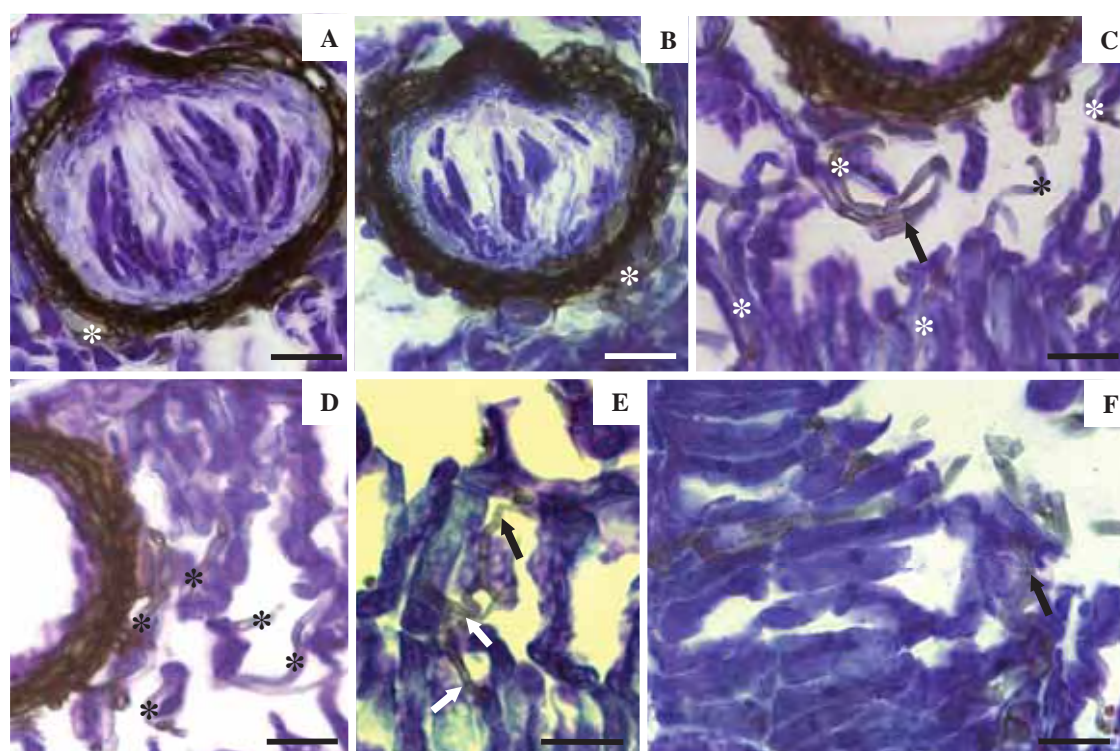


Figura 2. Secção transversal de folhas jovens e adultas de *Eucalyptus globulus* com mancha de micosferela. A-B: Pseudotécios com ascas e ascósporos e micélio constituinte do pseudotécio em folhas adultas. C-D: Micélio constituinte do pseudotécio em folhas jovens. E: Micélio crescido no tecido do hospedeiro em folhas jovens. F: Micélio crescido no tecido do hospedeiro em folhas adultas. (*) Hifas; setas indicam os septos das hifas; Barras = 20 µm.

A intensidade dos sintomas em folhas jovens de *Eucalyptus globulus*, indica o grau de suscetibilidade destas folhas com relação às folhas adultas que apresentavam a doença de forma menos intensa, com manchas em menor quantidade e mais espaçadas pela superfície foliar, porém apresentando pseudotécios, ascas e ascósporos, constituindo também uma importante fonte de inoculo (Park e Keane, 1982a). Na natureza, as folhas jovens caem mais rapidamente que as folhas adultas, devido à intensidade da doença; assim, as folhas adultas permanecem por mais tempo nas árvores, estando mais em contato com o vento e a chuva do que as folhas caídas. Segundo Park e Keane (1987), as folhas velhas, ainda na árvore, são as principais fontes de inóculo, e o longo período de incubação nestas é importante para garantir quantidade suficiente de inóculo para o próximo ciclo epidêmico.

Com relação aos estômatos existentes em *E. globulus*, de acordo com Johnson (1926), os mesmos são classificados como sendo do tipo anomocítico, e ocorrem em ambas as faces nas folhas adultas (Figura 3A), enquanto que nas folhas jovens ocorrem somente na face abaxial (Figura 3E).

Alguns agentes causais de mancha de micosferela, como *Teratosphaeria nubilosa*, somente penetram nas folhas do hospedeiro através dos estômatos (Park e Keane, 1982). Desta forma, nas folhas adultas a penetração deste fungo pode ocorrer em ambas as faces, enquanto que nas jovens, somente na face abaxial, onde os estômatos estão localizados. Os estômatos fornecem o local para a formação dos pseudotécios, e a distribuição destas estruturas pode refletir a distribuição dos estômatos no local onde se encontra a mancha na folha (Beadle, 2000).

Nas folhas adultas ocorre a formação dos pseudotécios em ambas as faces, como pode ser observado na Figura 3B, e nas folhas jovens os pseudotécios são encontrados somente na face abaxial, como mostra a Figura 3F.

Com relação ao desenvolvimento do patógeno nos tecidos do hospedeiro, a compactação das células do mesofilo pode conferir à planta certos graus de resistência, e isto pode ser observado em folhas jovens e adultas, devido às diferenças anatômicas existentes nestes dois materiais.

O mesofilo dorsiventral e a compactação das células do parênquima, nas folhas adultas, dificultam a evolução do fungo (Figura 3A). Nas folhas jovens, os espaços intercelulares e o mesofilo isobilateral possibilitam o desenvolvimento e o avanço do fungo

(Figura 3E). Nos materiais provenientes de folhas jovens, são observados espaços intercelulares no parênquima lacunoso e no paliçádico, onde os estromas do fungo são formados e, conseqüentemente, as ascas dentro destes.

Na Figura 3H observam-se os espaços intercelulares, bem como a sua dimensão. Nestes espaços o fungo pode se desenvolver perfeitamente desde a sua penetração no hospedeiro. Nas folhas adultas, a câmara subestomática é muito pequena e as células ao redor do parênquima são compactadas com pouco espaço para o desenvolvimento do pseudotécio. Esta compactação das células confere certa resistência às folhas adultas, e quando atacadas por *T. nubilosa* ou outros agentes causais desta doença, apresentam-se com manchas pequenas (Park, 1988).

Nas Figuras 3C-D (folhas adultas) e 3G-H (folhas jovens), observa-se a região de intersecção entre tecidos doentes (manchas) e tecidos sadios. Em resposta à presença de patógenos, especialmente fungos e bactérias, como também espécies de *Mycosphaerella*, pode se formar uma periderme necrótica, com origem a partir da atividade do felogênio nos pontos de penetração. Esta camada impede a invasão nos tecidos sadios e interrompe o fluxo de nutrientes para o patógeno e de metabólitos para o hospedeiro.

Em doenças causadas por espécies de *Mycosphaerella* e *Teratosphaeria*, os tecidos mortos podem permanecer na planta originando manchas necróticas (Agrios, 2005). Nas referidas figuras constatam-se as diferenças entre os dois tecidos separados pela camada de cortiça. Na região das manchas, as células estão disformes e desordenadas, bem como as células da epiderme, que parecem ser desintegradas principalmente nos materiais jovens. As cavidades oleíferas estão deformadas e não mais arredondadas como nos tecidos sadios; o limbo foliar mostra-se afinado, com menor espessura, contrastando com os tecidos sadios.

Após a infecção forma-se uma periderme necrótica por divisões anticlinal e periclinal das células do mesofilo (Smith et al., 2007), sendo esta característica observada nos dois materiais, os quais estão indicados pelas setas mostradas nas Figuras 3C-D e 3G-H.

As Figuras 3D e 3H apresentam, em detalhe, as divisões entre tecidos sadios e doentes, separados por uma periderme necrótica, que impede o avanço do fungo para outras regiões no hospedeiro. Nota-se a presença de compostos fenólicos, especialmente na periderme formada em folhas adultas.

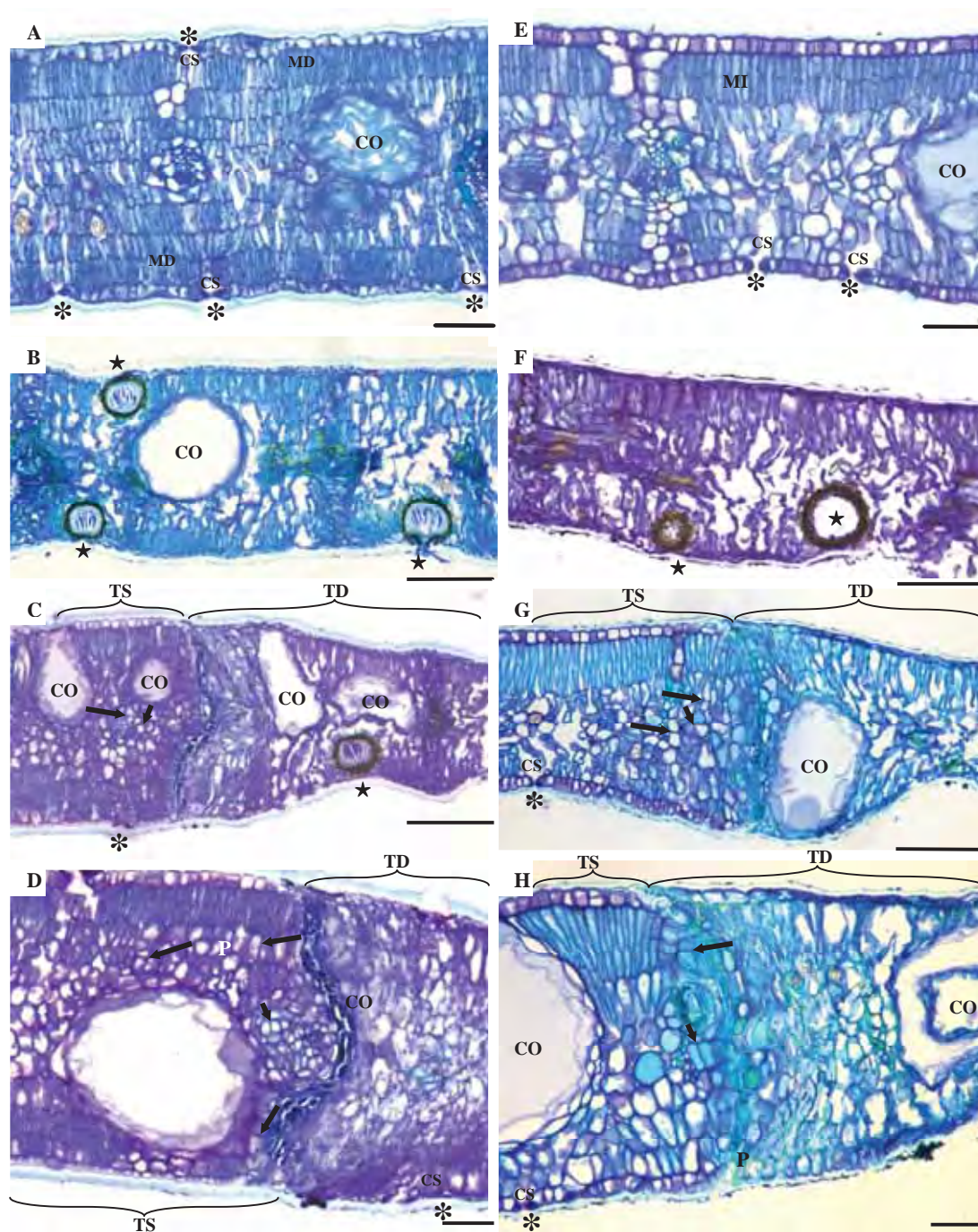


Figura 3. A-D: Secção transversal de folhas adultas de *Eucalyptus globulus*. E-H: Secção transversal de folhas jovens *Eucalyptus globulus*. A e E: Tecido sadio. B e F: Região na mancha de micosferela ocasionada pela presença do patógeno. C e G: Região da intersecção entre tecido sadio e doente. D e H: Detalhe da intersecção. Estômato (*). Câmara Subestomática (CS). Pseudotécio (★). Cavidade Oleífera (CO). Tecido Doente (TD). Tecido Sadio (TS). Periderme (P) localizada na intersecção entre tecido sadio e doente. Mesofilo Isobilateral (MI). Mesofilo Dorsiventral (MD). Setas maiores indicam divisão celular periclinal. Setas menores indicam divisão celular anticlinal. Barras = 100 μ m.

Nos materiais provenientes de folhas adultas com mancha de micosferela, pode ser observada nitidamente uma periderme bem delineada constituída por células compactadas e organizadas entre os tecidos, sadio e doente, como se estivessem separados por uma placa.

Nos materiais provenientes de folhas jovens, a periderme formada, embora seja de fácil visualização, não é tão organizada e nem constituída por células tão compactadas, como nas folhas adultas, que podem ter sido formadas a partir da divisão celular ou aumento de tamanho de outras células.

Estas observações estão de acordo com Smith et al. (2007), que observaram que folhas jovens de *Eucalyptus nitens*, espécie que apresenta resistência à mancha de micosferela, eram mais espessas, com alta proporção de parênquima paliçádico e menores espaços intercelulares, com relação às folhas jovens de *E. globulus*. Em estudos histopatológicos, os autores verificaram o aumento na divisão celular nas folhas resistentes, e também a formação de uma periderme necrótica mais organizada, contínua e lignificada, diferente do que nas procedências suscetíveis. Isto também ocorre com folhas adultas de *E. globulus*, que apresentam mesofilo dorsiventral, fator esse que também confere resistência.

Com relação às cavidades oleíferas, tanto em folhas jovens como em adultas, também foram danificadas pelo fungo, mostrando que os óleos essenciais presentes nos materiais podem conter compostos que exercem alguma função que estimule o fungo, ou seja, utilizados pelo mesmo para o seu desenvolvimento no hospedeiro.

3.3 Análise foliar em microscopia eletrônica de varredura

Por meio de Microscopia Eletrônica de Varredura, foi possível observar algumas diferenças nas superfícies foliares entre os dois materiais analisados.

A quantidade de pseudotécios foi menor nos materiais de folhas adultas em relação aos de folhas jovens.

Na Figura 4A observa-se um pseudotécio imerso no mesofilo dorsiventral, constituído por células bem compactadas, na face abaxial de folhas adulta. Por outro lado, nas Figuras 4G-I, tem-se pseudotécios, ainda com as ascas, imersos no mesofilo isobilateral de folhas jovens, constituído por células menos compactadas e com mais espaços intercelulares.

Na Figura 4G estão ilustrados três pseudotécios com as ascas, havendo uma cavidade oleífera entre os dois primeiros. Detalhes dos pseudotécios são apresentados na Figura 4H, na qual se observa um pseudotécio sem as ascas, onde se pode notar a parede interna muito espessada.

Na Figura 4I há um pseudotécio com as ascas elipsoidais, encurvadas e fasciculadas (Crous, 1998, Crous et al., 2007). Pseudotécios são formados em um estrato de hifas entrelaçadas, e apresentam paredes espessas, muito mais do que as paredes de peritécios (Niyo et al., 1986; Alexopoulos et al., 1997; Putzke & Putzke, 1998). Isto pode ser visualizado na Figura 4I, onde logo abaixo do pseudotécio está a hifa do patógeno (setas).

A superfície de folhas jovens também pode ser um fator relacionado com a suscetibilidade, sendo revestida por cera epicuticular em forma de túbulo, o que lhe confere a coloração azulada. Esta cera (Figuras 4J-K) pode permitir que os ascósporos, quando depositados na face abaxial das folhas jovens, permaneçam aderidos até sua germinação e penetração no hospedeiro, já que estes ascósporos não possuem ornamentação (Figura 4E).

Com relação à superfície das folhas adultas, observa-se a presença de estômatos do tipo anomocítico (Figuras 4B e 4D), ausência de cera epicuticular (Figuras 4B-F) e ocorrência de ascósporos germinados (Figuras 4B-C e 4F).

Na Figura 4D encontra-se um ascósporo em início da fase de germinação, evidenciando um estrangulamento na região do septo, logo na entrada do ostíolo de um estômato. Devido à forma de germinação do ascósporo observado na Figura 4F, conclui-se que o mesmo não é de *Teratosphaeria nubilosa*, pois o tubo germinativo formou-se em apenas um dos pólos do esporo. Entretanto, na Figura 4C observa-se a germinação bipolar do ascósporo, tratando-se, portanto, da espécie *T. nubilosa*.

Abaixo das células-guarda dos estômatos formam-se os pseudotécios individualmente no tecido necrótico (Park et al., 2000), sendo que seus ostíolos ocupam o lugar dos ostíolos dos estômatos. Na Figura 4L é possível observar o ostíolo de um pseudotécio, contendo as ascas, formado na câmara subestomática de um estômato presente em folha jovem.

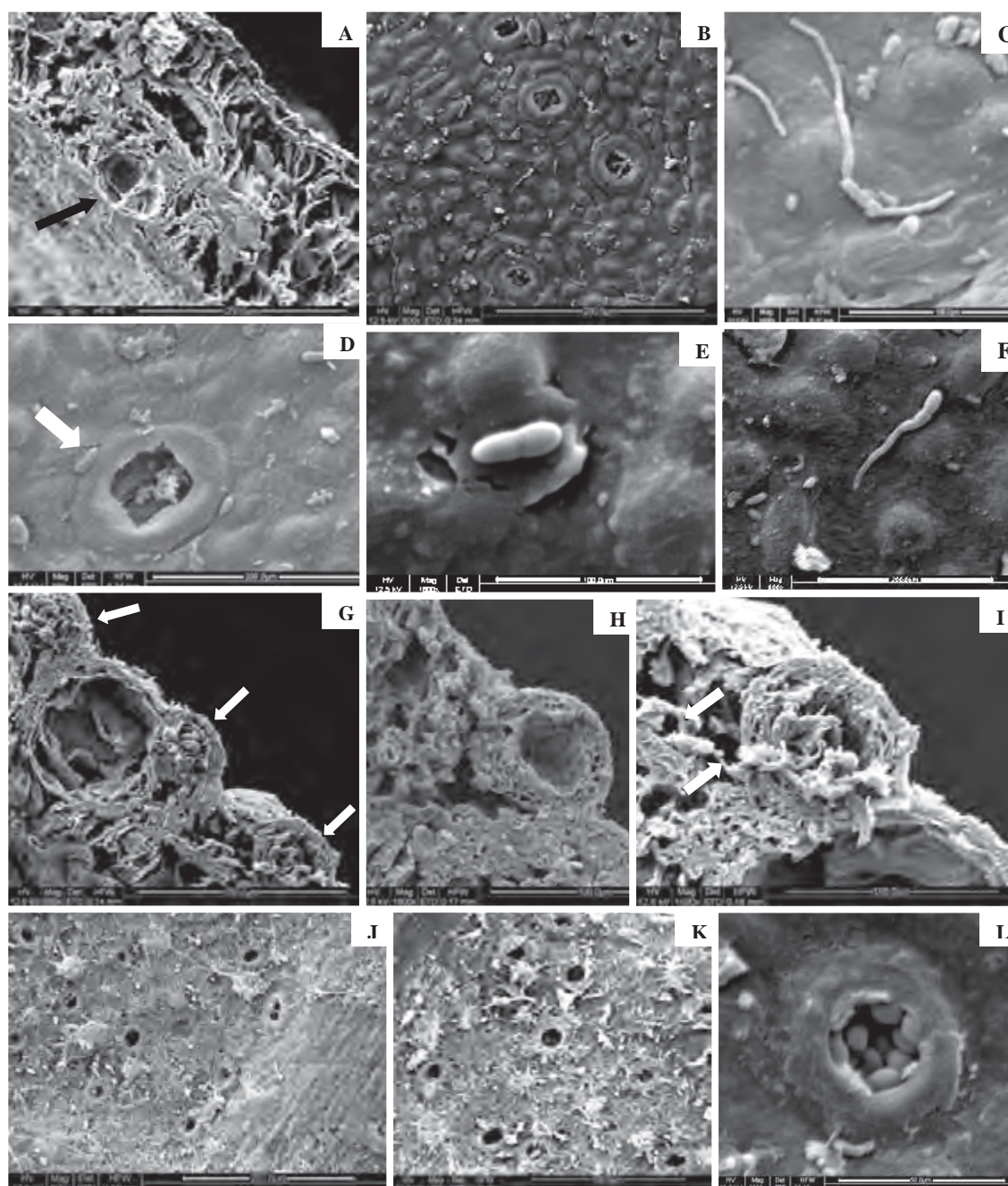


Figura 4. A-F: Secção transversal e superfície de folhas adultas de *Eucalyptus globulus*. A: Secção transversal foliar de tecido com pseudotécio vazio (seta). B: Epiderme da face abaxial apresentando estômatos abertos. C e F: Ascósporos germinados na face abaxial. D: Epiderme apresentando ascósporo em início de fase de germinação (seta), ao lado de um estômato ainda fechado. E: Ascósporo depositado na epiderme. G-L: Secção transversal e superfície de folhas jovens de *Eucalyptus globulus*. G: Secção transversal foliar mostrando três pseudotécios (setas) e uma cavidade oleífera. H: Pseudotécio vazio. I: Pseudotécio contendo ascas. J: Epiderme da face abaxial com estômatos e revestida por cera epicuticular. K: Detalhe de estômato com cera epicuticular e microrganismos da epiderme. L: Pseudotécio contendo ascas, localizado na câmara subestomática. Barras = 200 μm (A,B,D,G,H,J,K); 100 μm (C,F,H,I); 50.0 μm (E,L).

4. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Quando os patógenos vencem as primeiras barreiras existentes na superfície foliar e encontram condições ambientais favoráveis de umidade e temperatura, penetram no do hospedeiro, iniciando-se outro processo de sobrevivência e evolução no patógeno. Dentre as muitas das estruturas que conferem resistência às plantas contra patógenos, os tecidos parenquimáticos também podem representar barreira, através da organização e características de suas células (Silva et al., 2005).

As diferenças na constituição anatômica entre folhas jovens e adultas de *Eucalyptus globulus* contribuem para suscetibilidade ou resistência a certos fitopatógenos, como por exemplo, os que fazem parte do complexo dos fungos causadores da mancha de micosferela.

A cutícula, o número de estômatos e tricomas por área na epiderme são fatores importantes para definir o nível de resistência a patógenos, em algumas espécies vegetais (Medeiros et. al., 2003; Agrios, 2005). Cutículas mais espessas dificultam o processo de penetração de patógenos que atuam por via direta, contribuindo para a defesa da planta e para sua resistência (Pascholati e Leite, 1995; Agrios, 2005; Silva et al., 2005), como por exemplo, alguns agentes causais de ferrugens, que além de penetrarem pela cutícula também podem penetrar por meio dos estômatos. O fungo *Teratosphaeria nubilosa*, como as ferrugens, também tem como porta de entrada, os estômatos dos hospedeiro.

A composição química, a quantidade e a estrutura das ceras epicuticulares de folhas estão relacionadas a muitos fatores, variam entre espécies (Baker e Hunt, 1981), e também podem conferir resistência ou então auxiliar o patógeno, já observado em folhas jovens de *E. globulus*, com maior suscetibilidade à mancha de micosferela, que possuem grande quantidade de cera epicuticular. Tendo em vista a suscetibilidade destas folhas, a cera, além de não impedir a germinação e a penetração do fungo pelos estômatos, podem contribuir para a adesão dos ascósporos na superfície abaxial das folhas.

Assim, a cutícula pode ser considerada tanto uma estrutura de resistência, quanto um fator que pode promover a doença. Possivelmente, o processo de adesão ocorra com mais facilidade em superfícies hidrofóbicas, e esta característica estaria relacionada às ceras presentes na superfície do hospedeiro (Pascholati e Leite, 1995).

Em uma única planta, as folhas variam relativamente quanto aos estômatos, dependendo de sua forma e posição no ramo, como ocorre em *Eucalyptus globulus*, ou seja, cujas estruturas estão localizadas na face abaxial em folhas jovens, enquanto que em folhas adultas localizam-se em ambas as faces (Park, 1988).

Os estômatos representam a porta de entrada e escoamento de gases da fotossíntese, mas também servem de porta de entrada para microrganismos; apesar disso, podem também colaborar para a resistência. Estômatos que se abrem tardiamente durante o dia podem proporcionar resistência a certos fungos, pois os esporos que germinam à noite são dessecados pela evaporação da umidade, antes da abertura dos estômatos. Por exemplo, como ocorre com o agente causal da ferrugem do colmo do trigo, *Puccinia graminis*, que não penetra no hospedeiro no escuro, devido às concentrações elevadas de CO₂ liberado pela planta nestas condições.

Variedades de trigo cujos estômatos se abrem mais tarde podem mostrar-se resistentes, isto porque os urediniosporos germinados no período de orvalho noturno sofrem dessecação antes que os estômatos se abram. Outro fator relacionado aos estômatos, a morfologia da crista cuticular, peculiar em algumas espécies, está relacionada com a resistência, impedindo a entrada de bactérias (Pascholati e Leite, 1995; Agrios, 1997; Trujillo et al., 1997; Silva-Acuña et al., 1998).

Os tecidos parenquimáticos podem exibir resistência aos patógenos, devido à organização e às características das células. A resistência a fitopatógenos, relacionada às características estruturais das folhas, foi constatada por muitos autores em diversas espécies de plantas. Em folhas de aipo, Edwards et al. (1999) verificaram que materiais resistentes a *Septoria apiicola* apresentavam maior fração de parênquima paliçádico e cavidades oleíferas.

Jerba et al. (2002) verificaram, em folhas de cultivares de feijão resistentes à antracnose, o envelhecimento de hifas do fungo devido à maior pilosidade nas folhas; além disso, relataram que camadas de células paliçádicas com menores espaços intercelulares podem atrasar ou impedir a infecção, dificultando a colonização pelo patógeno.

Sambugaro et al. (2003), em estudos anatômicos, constataram diferentes graus de resistência de clones de seringueira ao *Microcyclus ulei*, agente causal do mal das folhas. Os autores observaram maior espessura da epiderme abaxial e ausência da fase sexuada

do patógeno, não ocorrendo assim, formação de tecidos estromáticos, pseudotécios e, conseqüentemente, não houve produção de ascósporos.

A mancha de micosferela é considerada uma das principais doenças da cultura do eucalipto, sendo causada por um complexo de espécies de *Mycosphaerella* e *Teratosphaeria*, sendo as espécies *T. nubilosa* e *T. cryptica* são as mais importantes em nível mundial (Carnegie e Ades, 2002; Hunter et al., 2009). Os ascósporos, quando liberados, são removidos da fonte de inóculo e depositados sobre a planta hospedeira, iniciando o processo de infecção, penetração e estabelecimento das relações parasitárias entre fungo e planta (Amorim, 1995). No caso de *T. nubilosa*, os estômatos são extremamente importantes, pois são as portas de entrada para este fungo no hospedeiro (Park, 1988).

Os tecidos parenquimáticos de eucalipto de espécies ou idades diferentes podem conferir resistência a alguns patógenos, dentre estes, os agentes causais de mancha de micosferela. As folhas adultas de *E. globulus* apresentam quadros menos severos da doença, fato este que está relacionado com a presença de mesofilo dorsiventral, com células do parênquima paliçádico mais compactadas, menos espaços intercelulares e pouco parênquima lacunoso. As folhas jovens, que são consideradas mais suscetíveis, apresentam mesofilo isobilateral, com parênquima paliçádico composto por uma a duas camadas de células voltadas para a superfície adaxial da folha, enquanto que o parênquima lacunoso, com espaços intercelulares, está voltado para a superfície abaxial.

Dentro do gênero *Eucalyptus*, a resistência à mancha de micosferela pode ser constatada não somente entre espécies diferentes, mas também em espécies de idades diferentes (Smith et al., 2007), devido à maior densidade de parênquima paliçádico em folhas adultas, como em *E. globulus*.

A resistência a algumas fitopatologias, que tanto se busca, pode estar na própria estrutura da planta. A maior proporção de parênquima paliçádico e menor de parênquima lacunoso nas folhas, bem como a menor espessura da epiderme abaxial, podem conferir resistência à planta. Na eucaliptocultura, a ocorrência de doenças ocasiona grandes prejuízos econômicos.

Ainda não foram estabelecidas muitas formas de controle para a mancha de micosferela, principalmente em plantios com densidade de plantas elevada, sendo a forma mais efetiva, o desenvolvimento de variedades resistentes ou a substituição de plantas

suscetíveis por espécies mais resistentes. Isto tem sido usado em alguns países como a África do Sul (Lundquist e Purnell, 1987) e o noroeste da Austrália (Mohammed et al., 2003).

Plantações jovens com *E. delegatensis* e *E. regnans*, localizadas na Nova Zelândia, foram tomadas pela doença, conduzindo ao uso de espécies mais resistentes, como *E. nitens* (Crous, 2009). A utilização de híbridos entre espécies resistentes e suscetíveis também é uma alternativa para o controle de várias doenças. Como exemplo podem ser citados híbridos de *E. globulus*, suscetíveis a *T. nubilosa*, com *E. grandis*, tolerantes a *T. nubilosa* (Carnegie e Ades, 2002; Carnegie et al., 1998; Milgate et al., 2005).

Plantas que apresentem transição mais rápida de folhas jovens para adultas também podem ser utilizadas como forma de controle (Hamilton et al., 2010). Híbridos de *E. globulus* com *E. grandis* apresentam esta característica, porém alguns testes ainda são necessários para avaliar se possuem alguns genes de suscetibilidade à doença.

Técnicas de melhoramento genético são bastante importantes para o controle de mancha de micoserela, principalmente em plantios de *E. globulus*, nos quais acarreta grandes prejuízos. Em viveiros, apesar de ser uma doença severa, o controle com produtos químicos torna-se mais fácil, porém, o uso destes produtos não é a melhor solução. Fatores de algumas espécies como *Teratosphaeria nubilosa*, como a penetração exclusivamente por aberturas estomáticas, podem ser levados em consideração para o desenvolvimento plantas por melhoramento genético. Por exemplo, o atraso na abertura dos estômatos pode contribuir para resistência, pois os ascósporos germinados na superfície do hospedeiro durante o período noturno não encontrariam os estômatos abertos e dessecariam, evitando a entrada do patógeno e, conseqüentemente, a infecção do hospedeiro.

Para o desenvolvimento de estudos nesta área, torna-se necessário o conhecimento dos patógenos, seu habitat e exigências para sua sobrevivência, não somente para espécies de *Mycosphaerella* e *Teratosphaeria*, como também para agentes causais de muitas doenças. Assim sendo, a partir destes estudos poderão ser desenvolvidas soluções eficazes e menos agressivas ao meio.

As análises dos materiais utilizados confirmaram que a maior proporção de parênquima paliçádico, a compactação das células parenquimáticas e os menores espaços intercelulares conferem resistência à planta contra fitopatógenos, devido à maior dificuldade de colonização dos patógenos (Jerba, 2003; Silva et al., 2005; Smith et al., 2007).

5. REFERÊNCIAS

- AGRIOS, G. N. How plants defend themselves against pathogens. p. 208-248. In: _____. **Plant Pathology**. 4. ed. San Diego: Academic Press, 2005. 952 p.
- ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. Introductory mycology. 4. ed. New York: Wiley & Sons, 1996. 869 p.
- AMORIM, L. Disseminação. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Orgs.). Manual de fitopatologia: princípios e conceitos. 3. ed. São Paulo: Ceres, 1995. v. 1, p. 226-293.
- BAKER, E. A.; HUNT, G. M. Developmental changes in leaf epicuticular waxes in relation to foliar penetration. **New Phytologist**, Lancaster, v. 88, p. 731-747, ago., 1981.
- BEADLE, C. J. Physiology of eucalypts in relation to disease. In: KEANE P. J.; KILE G. A.; PODGER F. D. **Diseases and pathogens of eucalypts**. Melbourne: CSIRO Publishing, 2000. 565 p.
- CARNEGIE, A. J.; KEANE, P. J. *Mycosphaerella vespa* from diseased Eucalyptus leaves in Australia. **Mycological Research**, Cambridge, v.102, n. 10, p.1274-1276, out., 1998.
- CARNEGIE A. J.; ADES, P. Added phosphorus is associated with reduced severity of *Mycosphaerella cryptica* in *Eucalyptus globulus*. **Australian Forestry**, Yarralumla, v. 64, n. 4, p. 203-208, dez., 2002.
- CROUS, P. W. *Mycosphaerella* spp. and their anamorphs associated with leaf spot diseases of *Eucalyptus*. **Mycologia Memoirs**, St. Paul, v. 21, n. 170, 1998. 170 p.
- CROUS, P. W. Taxonomy and phylogeny of the genus *Mycosphaerella* and its anamorphs. **Fungal Diversity**, Mae Taeng, v. 38, p. 1-24, out., 2009
- CROUS, P. W. et al. *Mycosphaerella* is polyphyletic. **Studies in Mycology**, Utrecht, v.58, p.1-32, 2007.
- EDWARDS, S.J.; ISAAC, S.; COLLIN, H.A.; CLIPSON, N.J. Stereological analysis of celery leaves infected by *Septoria apiicola*. **Mycological Research**. v. 103, p.750-756, 1999.

GANAPATHI, A. **Studies of the etiology of the leaf blotch disease of *Eucalyptus* spp. caused by *Mycosphaerella nubilosa* (Cke) Hansf.** 1979. 138 f. Tese (Doutorado)-University of Auckland, New Zeland, 1979.

GERRITS, P. O. **The application of glycol metacrylate in histotechnology: some fundamental principles.** Leica: Department of Anatomy and Embryology State University Groningen, 1991. 80 p.

HAMILTON, M. et al. Early phase change may protect against *Mycosphaerella* leaf disease. Disponível em: <<http://www.crcforestry.com.au/view/index.aspx?id=66157>>. Acesso em: 01 jan. 2010

HUNTER, G. C. et al. *Mycosphaerella* species causing leaf disease in South African Eucalyptus plantations. **Mycological Research**, Cambridge, v. 108, n. 6, p. 672-681, jun., 2004.

HUNTER, G. C. et al. *Teratosphaeria nubilosa*, a serious leaf disease pathogen of Eucalyptus spp. in native and introduced areas. **Molecular Plant Pathology**, London, v. 10, n. 1, p. 1-14, jan., 2009.

JERBA, V. F. **Anatomia e ultra-estrutura foliar de cultivares de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) e sua relação com a resistência à antracnose.** 2003. 108 f. Tese (Doutorado em Agronomia/Proteção de Plantas)-Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2003.

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

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

LUNDQUIST, J. E.; PURNELL, R. C. Effects of *Mycosphaerella* leaf spot on growth of *Eucalyptus nitens*. **Plant Disease**, St. Paul, v. 71, n. 3, p. 1025-1029, nov., 1987.

MARTIELLO, R. R.; BARBIERI, R.L; CARVALHO, F. I. F. Resistência de plantas a moléstias fúngicas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 27, n. 1, p. 161-168, jan/mar., 1997.

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

MILGATE, A.W. et al. Genetic variation in *Eucalyptus globulus* for susceptibility to *Mycosphaerella nubilosa* and its association with tree growth. **Australasian Plant Pathology**, Sidney, v. 34, n. 1, p. 11–18, set., 2005.

MOHAMMED, C. et al. *Mycosphaerella* leaf diseases of temperate eucalypts around the southern pacific rim. **New Zealand Journal of Forestry Science**, Rotorua, v. 33, n. 3, p. 362-372, set., 2003.

NIYO, K. A.; McNABB JR., H. S.; TIFFANY, L. H. Ultrastructure of the ascocarps, asci and ascospores of *Mycosphaerella populorum*. **Mycologia**, Lawrence, v. 78, n. 2, p. 202-212, mar/abr., 1986.

O'BRIEN, T. P.; FEDER, N.; McCULLY, M. E. Polychromatic staining of plant cell walls by Toluidine Blue O. **Protoplasma**, Wien, v. 59, n. 7, p. 367-373, jul., 1964.

PARK, R. F. Effect of certain host, inoculum, and environmental factors on infection of *Eucalyptus* species by two *Mycosphaerella* species. Transactions of the British Mycological Society, London, v. 90, n. 2, p. 221-228, mar., 1988.

PARK, R. F.; KEANE, P. J. Three *Mycosphaerella* species from leaf diseases of *Eucalyptus*. Transactions of the British Mycological Society, London, v. 79, n. 1, p. 95-100, ago., 1982a.

PARK, R. F.; KEANE, P. J. Spore productions by *Mycosphaerella* species causing leaf diseases of *Eucalyptus*. Transactions of the British Mycological Society, London, v. 89, n. 4, p. 461-470, dez., 1987.

PARK, R. F. et al. Fungal diseases of Eucalypt foliage. In: KEANE P. J.; KILE G. A.; PODGER F. D. **Diseases and pathogens of eucalypts**. Melbourne: CSIRO Publishing, 2000. 565 p.

PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B. Hospedeiro: mecanismos de resistência. p. 417-453. In: BERGAMIM FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v. 1. 919 p.

PUTZKE, J.; PUTZKE, M. T. L. **Os reinos dos fungos**. Santa Cruz do Sul: EDUNISC, 1998, v. 1. 606 p.

ROBARDS, A. W. An introduction to techniques for scanning electron microscopy of plant cell. p. 343-444. In: HALL, G. L. **Electron microscopy and cytochemistry of plant cells**. New York: Elsevier, 1978. 456 p.

SAMBUGARO, R. **Caracterização anatômica foliar de clones de seringueira (*Hevea spp.*) visando resistência ao *Microcyclus ulei***. 2003. 61 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Proteção de Plantas)-Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2003.

SILVA-ACUÑA, R.; SILVA-ACUÑA, A.; ZAMBOLIM, L. Stomatic index in genetic materials of coffee tree resistant or susceptible to rust. **Bioagro**, Viçosa, v. 10, n. 2, p. 57-61, 1998.

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

SMITH, A. H. et al. Anatomical and histochemical defence responses induced in juvenile leaves of *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus nitens* by *Mycosphaerella infection*. **Forestry Pathology**, Aberdeen, v. 37, n. 6, p. 361-373, jul., 2007.

TRUJILLO, I.; HERMOSO, L.; GARCIA, E. Structural characterization of banana clones: resistant and non resistant to yellow Sigatoka disease. **Anales de Botânica Agrícola**, Caracas, v. 4, p. 59-62. 1997.

COMPONENTES DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Eucalyptus globulus* E SUA RELAÇÃO COM A MANCHA DE MICOSFERELA

RESUMO

Além de propriedades medicinais, certos metabólitos secundários produzidos pelas plantas apresentam relações com fitopatógenos. Alguns podem atuar como barreiras bioquímicas, como também estimular a germinação e o avanço de microrganismos nos tecidos vegetais. A presença de fitopatógenos e a idade do hospedeiro podem influenciar a formação e a constituição dos óleos essenciais. Folhas de *Eucalyptus globulus* com sintomas e sinais de mancha de micosferela, causada por *Mycosphaerella* spp. e *Teratosphaeria* spp., apresentam algumas diferenças significativas nos componentes químicos de seus óleos essenciais. Assim, óleos essenciais de folhas jovens e adultas, sadias e com mancha de micosferela, foram extraídos por hidrodestilação e analisados por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa. Os dados da composição química e as respectivas porcentagens dos constituintes foram submetidos à análise de agrupamento e análise de componentes principais. O presente estudo possibilitou a distinção dos materiais analisados. A maior porcentagem de α -pineno no óleo extraído de folhas adultas sadias pode indicar que este composto seja utilizado pelo fungo para o seu desenvolvimento nestas folhas, fato que explica a baixa porcentagem desse composto no óleo extraído de folhas adultas doentes. Diante dos resultados obtidos, foi possível relacionar a composição química de óleos essenciais de folhas jovens e adultas, com a mancha de micosferela.

Palavras chave: metabólitos secundários, *Eucalyptus globulus*, mancha de micosferela.

VOLATILES COMPONENTS OF ESSENTIAL OILS OF *Eucalyptus globulus* RELATED WITH *Mycosphaerella* LEAF DISEASE

ABSTRACT

Besides medicinal properties, certain secondary metabolites produced by plants have relations with pathogens. Some may act as biochemical barriers, but also stimulate germination and the advancement of micro-organisms in plant tissues. The presence of pathogens and host age may influence the formation and composition of essential oils. Leaves of *Eucalyptus globulus* with the disease micosferela spot caused by *Mycosphaerella* spp. and *Teratosphaeria* spp., in their essential oils have significant differences in their chemical components. Essential oils of healthy young and old leaves and with micosferela leaf spot were extracted by hydrodistillation and analyzed by gas chromatography-mass spectrometry. The data of chemical composition and the respective percentages of the constituents were subjected to cluster analysis and principal components analyzed. The highest percentage of α -pinene in the oil extracted from healthy mature leaves may indicate that this compound is used by the fungus for its development in these leaves, which explains the low percentage of this compound in the oil extracted from old leaves with micosferela leaf. Given these results it was possible to relate the chemical composition of essential oils from leaves of young and old with the stain of micosferela.

Keywords: Secondary metabolites, *Eucalyptus globulus*, *Mycosphaerella* leaf disease.

1. INTRODUÇÃO

O setor florestal tem grande importância econômica no Brasil. As áreas de florestas plantadas vêm crescendo cerca de 2 a 3% ao ano, de modo a atender à crescente demanda de madeira para os diversos segmentos. As áreas plantadas com espécies não nativas chegam a 6 milhões de hectares, sendo 3,5 milhões de hectares plantados com espécies de eucalipto (ABRAF, 2011).

Dentre as espécies de eucalipto plantadas, destaca-se o *Eucalyptus globulus* considerada a melhor espécie madeireira destinada à fabricação de papel; estima-se

que haja mais de 2,5 milhões de hectares plantados com esta espécie no mundo (Potts et al., 2004, citado por Ferrere et al., 2005).

A expansão significativa de plantios de *Eucalyptus* spp., incluindo a espécie *E. globulus*, nas últimas décadas, foi favorecida pela adaptação das espécies às diferentes condições climáticas. Porém plantios sucessivos e densos permitem a formação de um microclima favorável para a ocorrência de doenças e pragas, responsáveis por incontáveis prejuízos econômicos.

Muitos patógenos ocorrem em várias espécies de eucalipto, principalmente fungos, desde a fase de viveiro até os plantios adultos; geralmente os danos são observados nas plantações, nos mais variados locais, espécies e épocas do ano. Existem muitos fungos capazes de causar doenças em *Eucalyptus* spp., tanto no tronco e hastes como o cancro, causado por *Cryphonectria cubensis*, em ramos e folhas como a ferrugem causada por *Puccinia psidii*, e a mancha foliar de micosferela causada por espécies pertencentes aos gêneros *Mycosphaerella* e *Teratosphaeria*, sendo esta doença considerada uma das principais, especialmente para *E. globulus* e *E. dunnii* (Canergie et al., 1994, 1998).

A espécie *E. globulus* apresenta grande importância econômica para a indústria de papel de fibra curta, cujas pastas são consideradas de primeira qualidade (Santos et al., 2004). As fibras apresentam maior resistência intrínseca e com potencial para produzir papéis mais resistentes, embora com maiores custos de energia e refinação. No mercado mundial, esta espécie ocupa um lugar de destaque na produção de papel principalmente para impressão e escrita (Santos et al., 2001). A sua madeira de coloração amarelo-pálido é compacta, rija, muito forte e de grande durabilidade, sendo muito utilizada em construção naval, pilares de pontes e em quaisquer obras hidráulicas, também marcenaria, lenha e carvão (Correa, 1931).

Além destas utilidades, esta espécie também apresenta importantes propriedades medicinais, devido à presença de óleos essenciais, sendo utilizados para dores ciáticas, reumatismo, gota, nevralgia e sinusite (Zoghbi et al., 2001, citado por Rocha e Santos, 2007).

Na família Myrtaceae, uma das principais características é a presença de pontos translúcidos nas folhas que correspondem às cavidades secretoras de óleos

essenciais, presentes abaixo da epiderme e distribuídas ao longo dos tecidos parenquimáticos (Johnson, 1926; Accorsi, 1941; Castro e Machado, 2006).

Os óleos essenciais são definidos pela ISO (International Standard Organization) como produtos obtidos de partes de plantas por meio de destilação por arraste de vapor d'água. São os óleos que apresentam como componente principal, o cineol, em quantidade mínima de 70% (Rocha e Santos, 2007). Podem ser produzidos em estruturas secretoras especializadas, como pêlos glandulares, células parenquimáticas diferenciadas e cavidades oleíferas (Castro e Machado, 2006; Fahn, 1979; Simões e Spitzer, 2004).

Óleos essenciais e fenóis podem ser importantes na proteção de plantas contra fatores abióticos e também bióticos, podendo inibir a ação de fungos, bactérias, vírus, insetos e/ou exercendo efeito alelopático (Bennett e Wallsgrove, 1994). Existem muitos relatos do uso de óleos extraídos de eucalipto contra fitopatógenos. Salgado et al. (2003) observaram acentuada ação fungitóxica do óleo essencial de *Eucalyptus urophylla* sobre *Fusarium oxysporum*, *Bipolaris sorokiniana* e *Botrytis cinerea*, devido à presença do globulol, composto presente em maior quantidade nesse óleo. Carvalho et al. (2009), utilizando óleo essencial de *Corymbia citriodora* (*E. citriodora*), obtiveram inibição do crescimento de *Aspergillus flavus* em 56% e uma atividade fungistática para este fungo utilizando óleo essencial de *E. globulus*.

Alguns dos produtos secundários produzidos pelas plantas podem conferir proteção contra uma vasta gama de fitopatógenos e, também, contra herbívoros, porém, em algumas situações, os patógenos podem se mostrar resistentes às barreiras químicas impostas pelas plantas, podendo ser até atraídos pelas toxinas produzidas pelas mesmas (Wink, 1987). French (1961) constatou que a taxa de germinação de urediniósporos de *Puccinia graminis* pode ser acelerada na presença de muitos terpenóides e compostos relacionados.

Desta forma, o presente trabalho teve por objetivo analisar os componentes dos óleos essenciais de *E. globulus* e sua relação com *Mycosphaerella* spp. e *Teratosphaeria* spp., agentes causais da mancha de micosferela do eucalipto.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção do óleo essencial a partir de folhas de *Eucalyptus globulus*

Para a obtenção do óleo essencial, foram utilizadas folhas jovens e adultas de *Eucalyptus globulus* jovens e adultas, sadias e com mancha de micoserela. As amostras foram coletadas em março de 2009 em um plantio com um ano de idade, próximo à cidade de Bagé, no Estado do Rio Grande do Sul (Fazenda São José III: 53°44'10" O e 31°5'30" S), pertencente à empresa FIBRIA Celulose e Papel S.A.

A extração do óleo essencial foi efetuada no Laboratório de Plantas Medicinais da Faculdade de Ciências Agrônomicas, do Setor de Horticultura – UNESP, por meio de hidrodestilação em aparelho Clevenger (Figura 1), por um período de cerca de 3 horas para cada material. Para isso, folhas secas em estufa, foram picadas, pesadas e colocadas em balões de vidro de 2000 mL com água destilada.



Figura 1. A: Sistema Clevenger do Laboratório de Plantas Medicinais, da Faculdade de Ciências Agrônomicas de Botucatu, do Setor de Horticultura – UNESP.

2.2 Identificação das substâncias presentes no óleo essencial

O procedimento para a separação, quantificação e identificação das substâncias presentes no óleo foram realizadas no Laboratório do Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Recursos Genéticos Vegetais, do Instituto Agrônomo de Campinas, em cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas (CG-EM, Shimadzu, QP-5000),

operando por impacto de elétrons (70eV) (Figura1B). Coluna capilar: OV-5 (Ohio Valley Specialty Chemical, Inc.; 30,0 m x 0,25 mm x 0,25 μ m).

O óleo essencial de cada amostra (1 μ L) foi solubilizado em acetato de etila (1mL) 1 μ L dessa solução foi injetado na coluna capilar a uma programação de temperatura de 60°C a 240° C, a 3°C/min (Injetor: 220 °C, Detector: 230 °C; gás de arraste: hélio, Vazão: 1,0 mL/min.; Split: 1/20).

A identificação das substâncias foi efetuada através da comparação dos seus espectros de massa com o banco de dados do sistema CG-EM (Nist. 62 lib.) e índice de retenção de Kovats (Adams, 1995). Os índices de Kovats, são padrões de comparação entre as substâncias identificadas e um padrão de comparação, geralmente utilizados para análises cromatograficas gasosas. Os índices de retenção das substâncias foram obtidos pela co-injeção do óleo essencial com uma mistura padrão de hidrocarbonetos (C₉-C₂₄), aplicando-se a equação de Van den Dool & Kratz (1963).

2.3 Análise estatística dos dados obtidos

Após a caracterização da composição dos óleos essenciais, os dados em porcentagens foram submetidos a testes estatísticos multivariados de análise de agrupamento e de análise dos componentes principais (Sneath e Sokal, 1973), com a finalidade de relacionar a composição dos óleos essenciais com a intensidade dos sintomas da mancha de micoserela presentes em folhas jovens e adultas de *E. globulus*.

3. RESULTADOS

A análise da composição química dos óleos essenciais de folhas de *Eucalyptus globulus*, jovens e adultas, sadias e com mancha de micoserela, mostrou que as substâncias de maior quantidade nos óleos essenciais são monoterpenos; o restante são sesquiterpenos. As porcentagens das principais substâncias presentes em cada amostra foliar de *E. globulus* são apresentadas na Tabela 1. A maior quantidade de compostos foi encontrada no óleo extraído de folhas jovens sadias de *E. globulus*, totalizando nove substâncias; uma dessas substâncias identificadas, o mirceno e γ terpineno, não foi encontrada no outro óleo dos demais materiais foliares analisados.

Por outro lado, observa-se também que no óleo extraído de folhas adultas com mancha de micosferela, foram encontradas oito substâncias, sendo que uma dessas, a pinocarvona, só foi encontrada neste material.

As substâncias comuns a todos os óleos essenciais foram: o α -pineno (13,95-18,84%), o orto-cimeno (0,45-1,10%), o 1,8-cineol (76,68-83,06%), o α -terpineol (0,52-0,96%) e o espatulenol (0,52-1,58%).

Com relação aos valores do índice de Kovats das substâncias analisadas, estes se aproximaram dos valores encontrados na literatura (Tabela 1).

Tabela 1. Composição química (%) e rendimento (%) do óleo essencial de folhas de *Eucalyptus globulus* jovens e adultas, sadias e com mancha de micosferela. IKexp.: Índice de Kovats experimental. IK lit.: Índice de Kovats da literatura (Adams, 1995).

Substâncias	Folhas Jovens		Folhas Adultas		IK	
	Sadias	Com manchas	Sadias	Com manchas	Exp.	Lit.
α -pineno	14,21	15,98	18,84	13,95	932	939
β -pineno	0,77	-	0,59	0,29	974	979
mirceno	0,64	-	-	-	991	990
orto-cimeno	1,1	0,79	0,85	0,45	1020	1022
1,8 cineol	78,34	81,27	76,68	83,06	1028	1033
γ -terpineno	1,06	-	-	-	1055	1062
α -terpineol	0,96	0,83	0,55	0,52	1186	1189
aromadendreno	1,18	-	0,90	0,51	1436	1439
espatulenol	1,28	1,13	1,58	0,52	1579	1576
pinocarvona	-	-	-	0,33	1156	1164
Rendimento (%)	1,90	1,58	2,67	2,31		

Com relação aos rendimentos dos óleos essenciais extraídos dos quatro materiais estudados, observou-se que o óleo extraído de folhas adultas sadias apresentou maior rendimento (2,67%), em comparação aos outros materiais, seguido dos óleos de folhas adultas com mancha de micosferela (2,31%). O menor rendimento foi observado no óleo extraído de folhas jovens com mancha de micosferela (1,58%), além do menor número de substâncias presentes no mesmo. O óleo extraído de folhas jovens sadias apresentou rendimento maior (1,90%), quando comparado com o óleo de folhas jovens doentes (Tabela1).

Para a realização dos testes estatísticos multivariados de análise de agrupamento e de análise dos componentes principais, foram consideradas somente as substâncias α -pineno, orto-cimeno, 1,8 cineol, α -terpineol e espatulenol, substâncias essas presentes nas composições químicas das quatro amostras foliares estudadas, ou seja, folhas jovens e adultas de *E. globulus*, sadias e com mancha de micosferela.

Por meio do dendrograma, resultante da Análise de Agrupamento (Figura 2), foi possível discriminar os tratamentos em dois grupos diferentes, considerando-se o nível de 0,24 na escala de distância de similaridade. O grupo I (GI) foi constituído por dois subgrupos, sendo um composto pelas folhas jovens sadias e jovens com mancha de micosferela, e o outro pelas folhas adultas sadias. O grupo II (GII) foi constituído somente pelas folhas adultas com mancha de micosferela.

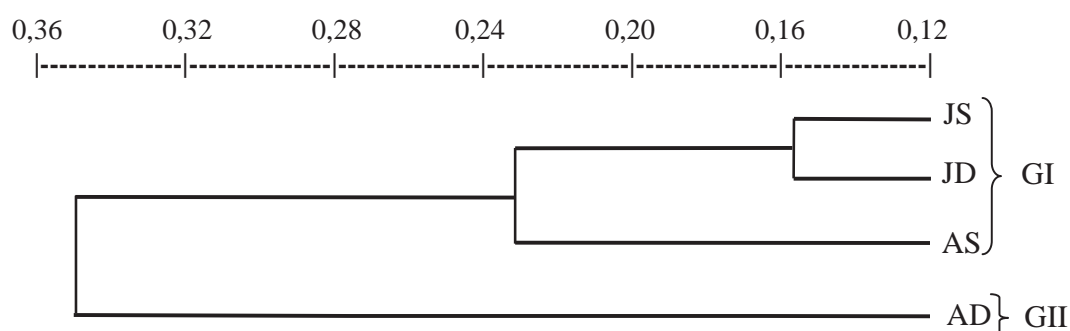


Figura 2: Dendrograma resultante da Análise de Agrupamento das cinco substâncias químicas dos óleos essenciais, utilizando-se a Distância Euclidiana Média, entre os quatro materiais de folhas de *Eucalyptus globulus*. JS: folhas jovens sadias. JD: folhas jovens doentes (com mancha de micosferela). AS: folhas adultas sadias. AD: folhas adultas doentes (com mancha de micosferela).

Com relação às substâncias presentes nos óleos essenciais, observa-se pelo dendrograma da Análise de Agrupamento (Figura 2) a diferenciação entre folhas adultas doentes e os demais materiais foliares analisados. É possível inferir que alguma substância, como o α -pineno, presente em porcentagem significativa em folhas adultas sadias, possa ser utilizada pelo fungo para seu desenvolvimento no hospedeiro, sendo consumido conforme a

evolução da doença, o que explicaria a sua baixa porcentagem em folhas adultas doentes (Tabela 1).

Na Tabela 2 são apresentados os coeficientes de correlação entre as cinco substâncias presentes nos óleos extraídos de folhas jovens e adultas de *E. globulus*, sadias e com mancha de micosferela, e os dois primeiros componentes principais (Y_1 e Y_2). No conjunto, estes componentes foram responsáveis por 98,39% da informação (variância) acumulada pelos caracteres avaliados, ou seja, as substâncias presentes nos óleos, constituindo-se em indicadores eficientes de dissimilaridade.

Tabela 2: Coeficientes de correlação entre as cinco substâncias presentes nos óleos extraídos de folhas de jovens e adultas de *E. globulus*, sadias e com mancha de micosferela, e os dois primeiros componentes principais (Y_1 e Y_2).

Substâncias	Y_1	Y_2
α-pineno	0,4063	0,8821
orto-cimeno	0,9680	-0,2072
1,8 cineol	-0,8373	-0,4532
α-terpineol	0,6553	-0,7403
espatulenol	0,9050	0,4244
% informação retida	71,15	27,24
%informação acumulada	71,15	98,39

Por meio da Tabela 2, verifica-se que o componente Y_1 , com informação retida de 71,15%, apresentou coeficientes de correlação elevados para as substâncias orto-cimeno e espatulenol, as quais evidenciam poder discriminatório elevado. Para o segundo componente principal (Y_2), a informação retida foi de 27,24%, cujo valor é considerado baixo e, portanto, apenas o coeficiente de correlação da substância α -pineno apresentou maior valor, indicando poder de discriminação satisfatório.

A dispersão gráfica (Figura 3), resultante da Análise de Componentes Principais, também mostrou a formação de dois grupos. Um grupo formado pelas folhas jovens sadias e doentes, e adultas sadias, e outro grupo formado somente pelas folhas adultas doentes, revelando haver boa concordância entre esses resultados e os obtidos na Análise de Agrupamento (Figura 2).

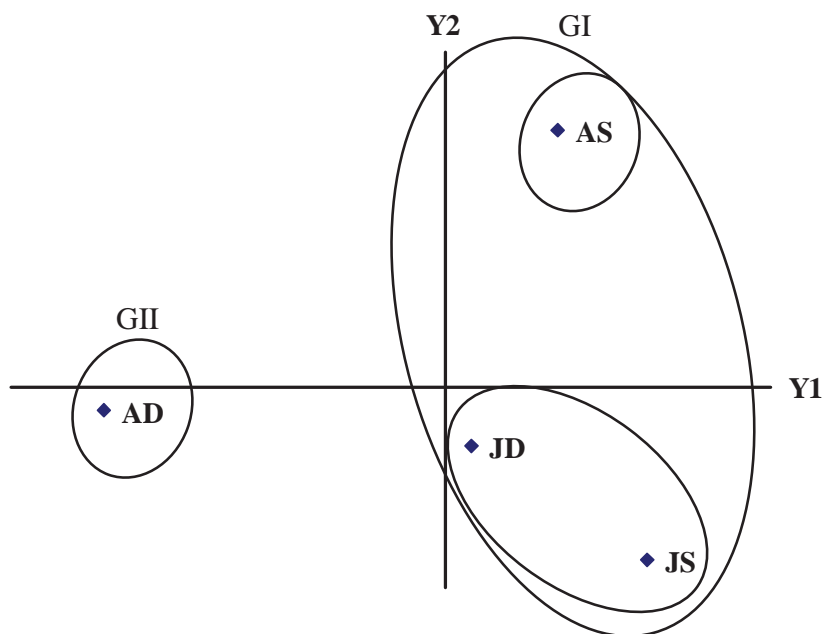


Figura 3: Dispersão gráfica dos quatro materiais de folhas de *E. globulus* (jovens e adultas, sadias e com mancha de micoserela), utilizando-se os dois primeiros componentes principais (Y_1 e Y_2), para o conjunto das cinco substâncias químicas presentes na composição dos óleos essenciais. JS: folhas jovens sadias. JD: folhas jovens doentes (com mancha de micoserela). AS: folhas adultas sadias. AD: folhas adultas doentes (com mancha de micoserela).

A análise conjunta do componente principal Y_1 (Tabela 2) e da dispersão gráfica (Figura 3), mostrou que nos óleos extraídos de folhas jovens, sadias e doentes, e adultas sadias, foram constatadas maiores porcentagens das substâncias orto-cimeno, α -terpineol e espatulenol, e menores valores da substância 1,8-cineol, em relação aos teores presentes nas folhas adultas doentes.

Analisando-se o segundo componente principal Y_2 (Tabela 2) associado ao gráfico da dispersão gráfica (Figura 3), constatou-se que nos óleos extraídos de folhas adultas sadias a substância α -pineno apresentou maior porcentagem, em relação às folhas jovens sadias e doentes, e folhas adultas doentes, sendo que nesses materiais foliares o teor da referida substância não apresentou variação significativa.

4. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

O conhecimento da resistência de folhas adultas de *Eucalyptus globulus* à mancha de micosferela mostra uma alternativa para futuros métodos de controle, tanto em *E. globulus* como em outras espécies de eucalipto, nos quais essa doença ocorra. Formas de resistência em outras espécies já foram comprovadas, como a diferença anatômica entre *E. nitens* e *E. globulus*, sendo que o primeiro apresenta poucos espaços intercelulares, impedindo o desenvolvimento do fungo (Smith, 2007).

Os óleos essenciais de eucalipto podem apresentar relações diretas com doenças que ocorrem nesta cultura. Souza (2008), utilizando três estádios foliares de clones de *Eucalyptus urograndis*, observou diferenças na porcentagem relativa de constituintes químicos presentes nos óleos essenciais e sua relação com a resistência à ferrugem causada pelo fungo *Puccinia psidii*. De acordo com esse autor, o rendimento foi crescente em relação aos estádios foliares, o clone altamente suscetível à *P. psidii* apresentou menor rendimento em comparação aos outros clones. Por meio destes resultados foram identificados dois marcadores bioquímicos de resistência à ferrugem do eucalipto: maior porcentagem de limoneno em clones resistentes e maior porcentagem de γ -terpineno em clones suscetíveis.

O componente principal de óleo extraído de *E. globulus* é o 1,8 cineol ou eucaliptol, apresentando concentração média de 80% (Vitti e Brito, 2003). Os óleos essenciais que podem ser extraídos de *E. globulus*, compostos por monoterpenos e sesquiterpenos (Barton et al., 1989), além de fins medicinais, também podem estar relacionados com certas doenças, como a mancha de micosferela.

Estudos envolvendo estes compostos podem colaborar para o controle desta doença, devido à produção do mesmo por plantas resistentes e suscetíveis.

Alguns compostos voláteis podem estar presentes nos óleos essenciais, a importância de tais compostos deve-se aos papéis que desempenham nos processos evolutivos, na defesa contra predadores e na comunicação bioquímica intra-espécies (Duradeva et al., 2004). A maior porcentagem de α -pineno presente no óleo extraído de folhas adultas sadias pode indicar que este composto seja utilizado pelo fungo para o seu desenvolvimento nestas folhas, fato que explica a baixa porcentagem dessa substância no óleo extraído de folhas adultas doentes. Nas folhas jovens a presença desse composto foi

indiferente, pois entre sadias e doentes não houve diferenças, tanto que puderam ser agrupadas.

Na situação do presente estudo foi constatado que os óleos essenciais, ou óleos voláteis, presentes nos materiais utilizados não tiveram função de controle, sugerindo que algumas das substâncias presentes, poderiam ser utilizadas pelo fungo conforme o progresso da doença, devido à presença do α -pineno e também pelo maior rendimento em óleos extraídos de folhas adultas sadias. Sendo este composto um monoterpene, pode ter sua cadeia quebrada mais facilmente (Taiz e Zeiger, 1998).

Com relação às folhas jovens, não houve diferenciação pela análise dos componentes principais, bem como o composto α -pineno não foi significativo nos óleos extraídos desses materiais.

A espécie de eucalipto estudada, *E. globulus*, apresenta dimorfismo foliar muito aparente, ou seja, as folhas jovens são sésseis, ovaladas e recobertas por uma camada cerosa de cor azulada, com filotaxia oposta, inseridas ao longo de caules de secção quadrangular. As folhas adultas são estreitas, falciformes (alongadas e contorcidas em forma de foice), com superfície verde acinzentada, principalmente na face abaxial, inseridas em pares alternados ao longo de caules arredondados.

A intensidade dos sintomas ocasionados pela mancha de micoserela é menor em folhas adultas. Além da filotaxia, algumas substâncias químicas sintetizadas pelas plantas podem estar envolvidas com a doença, podendo facilitar ou impedir o desenvolvimento do patógeno nos seus tecidos (Wink, 1988).

Nos óleos extraídos de folhas jovens e adultas sadias e folhas adultas com a doença foram identificadas as substâncias β -pineno e aromadendreno, que não estavam presentes no óleo extraído de folhas jovens com a doença. Estas diferenças indicam que estas substâncias podem ser utilizadas para o desenvolvimento e avanço do fungo nos tecidos jovens, sendo mais consumida pelo mesmo nestas condições.

Além disso, diferenças com relação à anatomia foliar e composição química podem facilitar ou dificultar o desenvolvimento e estabelecimento de patógenos nas plantas hospedeiras. As folhas adultas de *E. globulus* não só diferem morfológicamente das folhas jovens, mas também diferem pela composição química, fato este que pode estar relacionado com a resistência.

Diante dos resultados obtivos, foi possível concluir que os óleos extraídos de folhas adultas sadias apresentaram diferenças na composição com relação aos óleos extraídos de folhas jovens sadias e doentes, e também folhas jovens e adultas com mancha de micosferela, principalmente pela maior porcentagem de α -pineno.

5. REFERÊNCIAS

ABRAF. **Anuário estatístico 2011 – Ano Base 2010**. Brasília, DF: ABRAF, 2011. 130 p.

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

ADAMS, R. P. **Identification of essential oil compenets by cromatography / mass spectrocopy**. 4. ed. Carol Stream: *Allured Publishing Corporation*, 2001. 804 p.

BARTON, A.; TJANDRA, J.; NICHOLAS, P. G. Chemical Evaluation of volatile oils in *Eucalyptus* Species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, DC, v. 37, p. 1253-1257, set., 1989.

BENNETT, R. N.; WALLSGROVE, R. M. Secondary metabolites in plant defense mechanisms. *New Phytologist*, Lancaster, v. 127, p. 617-633, ago., 1994.

CARNEGIE, A. J.; KEANE, P. J. Further *Mycosphaerella* species associated with leaf diseases of Eucalyptus. **Mycological Research**, Cambridge, v. 98, n. 4, p. 413-418, abr., 1994.

CARNEGIE, A. J.; KEANE, P. J. *Mycosphaerella vespa* from diseased Eucalyptus leaves in Australia. **Mycological Research**, Cambridge, v.102, n. 10, p.1274-1276, out., 1998.

CARVALHO, C. A.; MATTA, S. L. P.; MELO, F. C. S. A.; ANDRADE, D. C. F.; CARVALHO, C. A. et al. Cipó-cravo (*Tynnanthus fasciculatus* Miers – Bignoniaceae): estudo fitoquímico e toxicológico envolvendo *Artemia salina*. **Revista Eletrônica de Farmácia**, Goiás, v. 6, n. 1, p. 51-58, fev. 2009. Disponível em: <<http://www.revistas.ufg.br/index.php/REF/article/view/5861/4561>>. Acesso em: 22 mar. 2010.

CASTRO, M. M.; MACHADO, S. R. Células e tecidos secretores. p. 179-204. In: APPEZZATO-DAGLÓRIA, B.; CARMELLO-GUERREIRO, S. M. **Anatomia vegetal**. Viçosa: UFV, 2. ed. 2006. 438 p.

CORREA, M. P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, v. 2, 1931. 4234 p.

DURADEVA, N.; PICHERSKY, E. Biochemical and Molecular Genetic Aspects of Floral Scents. **Plant Physiology**, Rockville, v. 122, n. 3, p. 627-633, mar., 2000.

FAHN, A. *Secretory tissues in plants*. London: Academic Press, 1979. 302 p.

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

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

ROCHA, M. E. N.; SANTOS, C. L. O uso comercial e popular do eucalipto *Eucalyptus globulus* Labill- Myrtaceae. **Saúde & Ambiente em Revista**, Duque de Caxias, v. 2, n. 2, p. 23-34, jul/dez., 2007.

SALGADO, A. P. S. P. et al. Avaliação da atividade fungitóxica de óleos essenciais de folhas de *Eucalyptus* sobre *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea* e *Bipolaris sorokiniana*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 2, p. 249-254, mar/abr., 2003.

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

ROCHA, M. E. N.; SANTOS, C. L. O uso comercial e popular do eucalipto *Eucalyptus globulus* Labill- Myrtaceae. **Saúde & Ambiente em Revista**, Duque de Caxias, v. 2, n. 2, p. 23-34, jul/dez., 2007.

SALGADO, A. P. S. P. et al. Avaliação da atividade fungitóxica de óleos essenciais de folhas de *Eucalyptus* sobre *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea* e *Bipolaris sorokiniana*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 2, p. 249-254, mar/abr., 2003.

SMITH, A. H. et al. Anatomical and histochemical defence responses induced in juvenile leaves of *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus nitens* by *Mycosphaerella* infection. **Forestry Pathology**, Aberdeen, v. 37, n. 6, p. 361-373, jul., 2007.

SNEATH, P. H. A.; SOKAL, R. R. **Numerical taxonomy**. San Francisco: W. H. Freeman, 1973. 573 p.

SOUZA, R. R. S. **Caracterização anatômica quantitativa e composição de óleos essenciais em três estádios foliares de clones de eucalipto e sua relação com a ferrugem**. 2008. 104 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Proteção de Plantas)- Faculdade de Ciências Agrônomicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2008.

TAIZ, I.; ZEIGER, E. Metabólicos secundários e defesa vegetal. p.309–332. In: TAIZ, I.; ZEIGER, E. (eds.). **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 722 p.

VAN DEN DOOL, H.; KRATZ, D. J. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. **Journal of Chromatography**, Amsterdam, v. 11, p. 463-471, ago., 1963.

VITTI, A. M. S.; BRITO, J. O. Óleo essencial de eucalipto. **Documentos florestais**. Piracicaba, n.17, p. 1-26, 2003. Disponível em: <www.ipef.br/publicacoes/docflorestais/df17.pdf>. Acesso em: 13 jan. 2009.

WINK, M. Physiology of the accumulation of secondary metabolites with special reference to alkaloids. In: SCHELL, J.; VASIL, I. K. (Eds.). *Cell culture and somatic cell: genetics of plants*. New York: Academic Press, 1988. p. 17-42.

5. CONCLUSÕES GERAIS

- Foram identificadas através das características da cultura, germinação de ascósporos e sequenciamento da região ITS, as espécies *Teratosphaeria nubilosa*, *T. pseudaficana*, *T. ohnowa*, *Mycosphaerella heimii*, *M. flexuosa*, *M. marksii*, *M. lateralis*, *M. gregaria*, *M. communis*, *M. crystallina*, agentes causais de mancha de micoserela, em plantações de *Eucalyptus globulus* nas regiões sul e sudeste do Brasil (Capítulo 1).
- O fungo *T. nubilosa* não apresentou crescimento em 28°C, enquanto que as demais espécies cresceram nesta temperatura (Capítulo 1).
- Testes de inoculação com *T. nubilosa* em mudas de *E. globulus* permitiu acompanhar a patogênese com o início da penetração do fungo pelo ostíolo do estômato, o desenvolvimento do micélio nos espaços intercelulares, a formação dos pseudotécios nas câmaras subestomáticas e a formação das ascas e ascósporos (Capítulo 2).
- Através dos estudos anatômicos verificou-se que folhas adultas de *E. globulus* apresentam maior compactação das células parenquimáticas, enquanto as folhas jovens apresentam espaços intercelulares, facilitando formação do estroma (Capítulo 3).
- Óleos extraídos de folhas adultas sadias apresentaram diferenças na composição com relação aos óleos extraídos de folhas jovens sadias e doentes, e também folhas jovens e adultas com mancha de micoserela, principalmente pela maior porcentagem de α -pineno (Capítulo 4).

6. REFERÊNCIAS

ABADIE, C. et al. Artificial inoculation on plants and banana leaf pieces with *Mycosphaerella* spp., responsible for Sigatoka leaf spot diseases. **Fruits** (CIRAD/EDP Sciences), Chantal Loison, v. 63, p. 319-323, set., 2008.

ABRAF. **Anuário estatístico 2011 – Ano Base 2010**. Brasília, DF: ABRAF, 2011. 130 p.

ABRAHIM, D. et al. Effects of α -pinene on the mitochondrial respiration of maize seedlings. **Plant Physiology and Biochemistry**, Lancaster, v. 41, p. 985-991, nov., 2003.

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

ADAMS, R. P. **Identification of essential oil compenets by cromatography / mass spectrocopy**. 4. ed. Carol Stream: *Allured Publishing Corporation*, 2001. 804 p.

AGRIOS, G. N. How plants defend themselves against pathogens. p. 208-248. In: _____. **Plant Pathology**. 4. ed. San Diego: Academic Press, 2005. 952 p.

AHUMADA, R. et al. Molecular and morphological identification of *Mycosphaerella* species associated with Eucalyptus leaf diseases in Chile. INTERNATIONAL CONGRESS OF PLANT PATHOLOGY, 8. 2003, Christchurch. **Abstracts...** Christchurch: 2003. p. 153-153.

ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. **Introductory mycology**. 4. ed. New York: Wiley & Sons, 1996. 869 p.

ALFENAS A.C. et al. **Clonagem e doenças do eucalipto**. 2. ed. Viçosa: UFV, 2004. 442 p.

AMORIM, L. Disseminação. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Orgs.). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 3. ed. São Paulo: Ceres, 1995. v. 1, p. 226-293.

ANGELI, A. **Indicações para escolha de espécies de *Eucalyptus***. Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais-IPEF, 2005. Disponível em:
<<http://www.ipef.br/identificacao/eucalyptus/indicacoes.asp>>. Acesso em: 18 jul. 2009

ARZANLOU, M.; CROUS, P. *Strelitziana* M. Arzanlou & Crous, gen. nov. **Fungal planet**, Utrecht, v. 1, p. 8, 2006. Disponível em:
<http://www.fungalplanet.org/content/pdf-files/fp_art-008_14-08-06.pdf>. Disponível em: 25 ago. 2008.

ASSANTE, G. et al. Hystological studies on the mycoparasitism of *Cladosporium tenuissimum* and urediniospores of *Uromyces appendiculatus*. **Mycological Research**, Cambridge, v. 108, n. 2, p. 170-182, mar., 2004.

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

BARBER, P. Forest pathology: the threat of disease to plantation forests in Indonesia. **Plant Pathology Journal**, Murdoch, v. 3, n. 2, p. 97-104, 2004.

BARTON, A.; TJANDRA, J.; NICHOLAS, P. G. Chemical Evaluation of volatile oils in *Eucalyptus* Species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, DC, v. 37, p. 1253-1257, set., 1989.

BATZER, J. C. et al. Four species of *Zygophiala* (*Schizothyriaceae*, *Capnodiales*) are associated with the sooty blotch and flyspeck complex on apple. **Mycologia**, Lawrence, n. 100, p. 232-244, jan., 2008.

BEADLE, C. J. Physiology of eucalypts in relation to disease. In: KEANE P. J.; KILE G. A.; PODGER F. D. **Diseases and pathogens of eucalypts**. Melbourne: CSIRO Publishing, 2000. 565 p.

BENNETT, R. N.; WALLSGROVE, R. M. Secondary metabolites in plant defense mechanisms. **New Phytologist**, Lancaster, v. 127, p. 617-633, ago., 1994.

BOLAND, D. J. et al. Forest trees of Australia. Melbourne: CSIRO Publishing, 5. ed. 2006. 768 p.

BORÉM, A. **Melhoramento de plantas**. Viçosa: UFV, 2001. 499 p.

BROOKER, M. I. H.; KLEING, D. A. **A field guide to eucalyptus**. South Eastern Austrália. Melbourne: Inkata Press, 1990. v. 2, 299 p.

BURFIELD, T.; REEKIE, S. L. Mosquitoes, malaria and essential oils. **The International Journal of Aromatherapy**, Michigan, v. 15, n. 1, p. 30-41, fev., 2005.

CARNEGIE, A. J. Forest health condition in New South Wales, Australia, 1996–2005. Fungal damage recorded in eucalypt plantations during forest health surveys and their management. **Australasian Plant Pathology**, Toowoomba East, v. 36, n. 3, p. 225-239, mai., 2007.

CARNEGIE A. J.; ADES, P. Added phosphorus is associated with reduced severity of *Mycosphaerella cryptica* in *Eucalyptus globulus*. **Australian Forestry**, Yarralumla, v. 64, n. 4, p. 203-208, dez., 2002.

CARNEGIE, A. J.; KEANE, P. J. Further *Mycosphaerella* species associated with leaf diseases of Eucalyptus. **Mycological Research**, Cambridge, v. 98, n. 4, p. 413-418, abr., 1994.

CARNEGIE, A. J.; KEANE, P. J. *Mycosphaerella vespa* from diseased Eucalyptus leaves in Australia. **Mycological Research**, Cambridge, v.102, n. 10, p.1274-1276, out., 1998.

CARVALHO, C. A. et al. Cipó-cravo (*Tynnanthus fasciculatus* Miers – Bignoniaceae): estudo fitoquímico e toxicológico envolvendo *Artemia salina*. **Revista Eletrônica de Farmácia**, Goiás, v. 6, n. 1, p. 51-58, fev. 2009. Disponível em: <<http://www.revistas.ufg.br/index.php/REF/article/view/5861/4561>>. Acesso em: 22 mar. 2010.

CASTRO, M. M.; MACHADO, S. R. Células e tecidos secretores. p. 179-204. In: APPEZZATO-DAGLÓRIA, B.; CARMELLO-GUERREIRO, S. M. **Anatomia vegetal**. Viçosa: UFV, 2. ed. 2006. 438 p.

CORREA, M. P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, v. 2, 1931. 4234 p.

COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 12, n. 4, p. 564-582, out., 1999.

CROUS, P. W. *Mycosphaerella* spp. and their anamorphs associated with leaf spot diseases of *Eucalyptus*. **Mycologia Memoirs**, St. Paul, v. 21, n. 170, 1998. 170 p.

CROUS, P. W. Taxonomy and phylogeny of the genus *Mycosphaerella* and its anamorphs. **Fungal Diversity**, Mae Taeng, v. 38, p. 1-24, out., 2009

CROUS, P. W.; KANG, J. C.; BRAUN, U. A phylogenetic redefinition of anamorph genera in *Mycosphaerella* based on ITS rDNA sequence and morphology. **Mycologia**, Lawrence, v. 93, n. 6, p.1081-1101, nov/dez., 2001.

CROUS, P.W. et al. The genus *Mycosphaerella* and its anamorphs. **Studies in Mycology**, Utrecht, v. 45, p. 107-121, 2000.

CROUS, P. W. et al. Phylogenetic reassessment of *Mycosphaerella* spp. and their anamorphs occurring on *Eucalyptus*. **Studies in Mycology**, Utrecht, v. 50, p. 195-214, 2004.

CROUS, P. W. et al. Phylogenetic reassessment of *Mycosphaerella* spp. and their anamorphs occurring on *Eucalyptus* II. **Studies in Mycology**, Utrecht, v. 55, p. 99-131, 2006.

CROUS, P. W. et al. *Mycosphaerella* is polyphyletic. **Studies in Mycology**, Utrecht, v.58, p.1-32, 2007a.

CROUS, P. W. et al. Follicolous *Mycosphaerella* spp. and their anamorphs on *Corymbia* and *Eucalyptus*. **Fungal Diversity**, Mae Taeng, v. 26, n. 3, p. 143-185, 2007b.

CRUZ, G. L. **Livro verde das plantas medicinais e industriais do Brasil**. Belo Horizonte: [s.n]. 1965. p. 462-463.

DAVIS, P. **Aromaterapia**. São Paulo: Martins Fontes, 1996. p. 104-182.

DELLAPORTA, S. L.; WOODS, J.; HICKS, J. B. A plant DNA minipreparation: Version II. **Plant Molecular Biology Reporter**, Athens, v. 1, n. 4, p. 19-21, 1983.

DICK, M. A.; GADGIL, P. D. Eucalyptus leaf spots. Forest Research Intitute. **Forest Pathology in New Zealand**. Rotorua, v. 99, n. 7, p. 1-8, 1983.

DONATO, A. M.; MORRETES, B. L. Anatomia foliar de *Eugenia brasiliensis* Lam. (Myrtaceae) proveniente de áreas de restinga e de floresta. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, João Pessoa, v. 17, n. 3, p. 426-443, set., 2007.

DURADEVA, N.; PICHERSKY, E. Biochemical and Molecular Genetic Aspects of Floral Scents. **Plant Physiology**, Rockville, v. 122, n. 3, p. 627-633, mar., 2000.

EDWARDS, S. J. et al. Stereological analysis of celery leaves infected by *Septoria apiicola*. **Mycological Research**, Cambridge, v. 103, n. 6, p. 750-756, jun., 1999.

EL TAMER, M. K. Molecular regulation of plant monoterpene biosynthesis in relation to fragrance. 2005. Disponível em: <<http://www.gcw.nl/dissertations/3314/dis3314.pdf> em>. Acesso em: 25 dez. 2008.

FAHN, A. Secretory tissues in plants. London: Academic Press, 1979. 302 p.

FERRERE, P. et al. Efecto de la densidad de plantación sobre el crecimiento de *Eucalyptus globulus* en un ensayo Nelder modificado. **Investigación agraria. Sistemas y recursos forestales**, Madrid, v. 14, n. 2, p. 174-184, abr., 2005.

FERREIRA, M. E.; GRATAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares e análise genética**. Brasília: Embrapa, 1998. 220 p.

FIORI, A. C. G. et al. Antifungal activity of leaf extracts and essential oils of some medicinal plants against *Didymella bryoniae*. **Journal of Phytopathology**, New York, v. 148, n. 7, p. 483-487, 2000.

FLORENCE, R. G. **Ecology and silviculture of eucalypt forests**. Melbourne: CSIRO Publishing, 1996. 413 p.

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

GANAPATHI, A. **Studies of the etiology of the leaf blotch disease of *Eucalyptus* spp. caused by *Mycosphaerella nubilosa* (Cke) Hansf.** 1979. 138 f. Tese (Doutorado)-University of Auckland, New Zealand, 1979.

GERRITS, P. O. **The application of glycol metacrylate in histotechnology:** some fundamental principles. Leica: Department of Anatomy and Embryology State University Groningen, 1991. 80 p.

GLORIA, B. A.; ALBERNAS, M.C. C.; AMORIM, L. Structural characteristics of bud sugarcane cultivars of different levels for resistance to smut. **Journal of Plant Diseases and Protection**, Ulmer, v. 102, n. 5, p. 502-508, 1995.

GUEST, D.; BROWN, J. Infection processes. In: BROWN, J.F.; OLSEN, H. J.(eds.) **Plant pathogens and plant diseases**. Armidale: NSW, 1997. p. 245-262.

HAMILTON, M. et al. Early phase change may protect against *Mycosphaerella* leaf disease. Disponível em:
<<http://www.crcforestry.com.au/view/index.aspx?id=66157>>. Acesso em: 01 jan. 2010

HEATHER, W. A.; SHARMA, I. K. Physiological specialization in the hyperparasitism of races of *Melampsora larici-populina* by isolates of *Cladosporium tenuissimum*. **European Journal of Forest Pathology**, London, v.17, n. 3, p 185-188, jun., 1987.

HUNTER, G. C. et al. *Mycosphaerella* species causing leaf disease in South African Eucalyptus plantations. **Mycological Research**, Cambridge, v. 108, n. 6, p. 672-681, jun., 2004.

HUNTER, G. C. et al. *Teratosphaeria nubilosa*, a serious leaf disease pathogen of Eucalyptus spp. in native and introduced areas. **Molecular Plant Pathology**, London, v. 10, n. 1, p. 1-14, jan., 2009.

JACKSON, S. L. et al. Incidence and new records of *Mycosphaerella* species within a *Eucalyptus globulus* plantation in Western Australia. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 255, n. 12, p. 3931-3937, 2008.

JERBA, V. F. **Anatomia e ultra-estrutura foliar de cultivares de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) e sua relação com a resistência à antracnose**. 2003. 108 f. Tese (Doutorado em Agronomia/Proteção de Plantas)-Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2003.

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

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

JUNGHANS, D. T. ; ALFENAS, A. C.; MAFFIA, L. A. Escala de notas para quantificação da ferrugem em *Eucalyptus*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 28, n. 2, p. 184-188, mar/abr., 2003.

KEELING, C. I.; WEISSHAAR, S.; LIN, R. P. C. Functional plasticity of paralogous diterpene synthases involved in conifer defense. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Pullman, v. 105, n. 3, p. 1085-1090, dez., 2008.

LAVABRE, M. **Aromaterapia: a cura pelos óleos essenciais**. 5. ed. Rio de Janeiro: Nova Era, 2001. p. 18-89.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais do Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002. 512 p.

LUNDQUIST, J. E.; PURNELL, R. C. Effects of *Mycosphaerella* leaf spot on growth of *Eucalyptus nitens*. **Plant Disease**, St. Paul, v. 71, n. 3, p. 1025-1029, nov., 1987.

MARIN, D.H. et al. Black Sigatoka: an increasing threat to banana cultivation. **Plant Disease**, St. Paul, v. 87, n. 3 p. 208-222, mar., 2003.

MARTIELLO, R. R.; BARBIERI, R.L; CARVALHO, F. I. F. Resistência de plantas a moléstias fúngicas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 27, n. 1, p. 161-168, jan/mar., 1997.

MARTIN, D. M.; GERSHENSON, J.; BOHLMENN, J. Induction of volatile terpene by biosynthesis and diurnal emission by methyl jasmonate in foliage of norway spruce. **Plant Physiology**, Melbourne, v. 132, n. 4, p. 1586-1599, mar., 2003.

MAXWELL, A. **The taxonomy, phylogeny and impact of *Mycosphaerella* species on Eucalypts in South-Western Australia**. 2004. 231 f. Tese (Doutorado)-School of Biological Sciences and Biotechnology, Murdoch University, Perth, 2004.

MAXWELL, A.; DELL, B.; NEUMEISTER-KEIP, H. G; HARDY, G. E. S. J. *Mycosphaerella* species associated with *Eucalyptus* in south-western Australia: new species, new records and a key. **Mycological research**, Amsterdam, v. 107, p. 53-63, 2003.

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

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

MICHEREFF, S. J. et al. Elaboração e validação de escala diagramática para a cercosporiose do pimentão. *Summa Phytopathologica*, Botucatu, v. 32, n. 3, jul/set., 2006.

MILGATE, A.W. et al. Genetic variation in *Eucalyptus globulus* for susceptibility to *Mycosphaerella nubilosa* and its association with tree growth. **Australasian Plant Pathology**, Sidney, v. 34, n. 1, p. 11-18, set., 2005.

MILNER, C. P. et al. Supercritical CO₂ extraction of the essential oils of Eucalypts: A comparison with other methods. In: LINSKENS, H.F.; JACKSON, J.F. (Eds.). *Modern methods of plant analysis*. Berlin: Springer, 1991. p. 159-173.

- MOHAMMED, C. et al. *Mycosphaerella* leaf diseases of temperate eucalypts around the southern pacific rim. **New Zealand Journal of Forestry Science**, Rotorua, v. 33, n. 3, p. 362-372, set., 2003.
- MORICCA, S.; RAGAZZI, A.; MITCHELSON, K. R. Molecular and conventional detection and identification of *Cladosporium tenuissimum* on two-needle pine rust aeciospores. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 77, n. 2, p. 339-347, ago., 1999.
- NASCIMENTO, G. G. F. et al. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 31, n. 2, p. 247-256, nov., 2000.
- NIYO, K. A.; McNABB JR., H. S.; TIFFANY, L. H. Ultrastructure of the ascocarps, asci and ascospores of *Mycosphaerella populorum*. **Mycologia**, Lawrence, v. 78, n. 2, p. 202-212, mar/abr., 1986.
- O'BRIEN, T. P.; FEDER, N.; McCULLY, M. E. Polychromatic staining of plant cell walls by Toluidine Blue O. **Protoplasma**, Wien, v. 59, n. 7, p. 367-373, jul., 1964.
- OLIVEIRA, J. S. et al. Distribuição do fungo *Cladosporium cladosporioides* em regiões produtoras de café na Bahia. *Bahia Agrícola*, Salvador, n. 6, p. 72-75, nov., 2004.
- OQUNWANDE. I. A. et al. Chemical composition of the essential oils from the leaves of three *Eucalyptus* species growing in Nigeria. **Journal of Essential Oil Research**, Messina, set/out. 2003. Disponível em: <http://findarticles.com/p/articles/mi_qa4091/is_200309/ai_n9288724/>. Acesso em: 12 jun. 2008.
- PARK, R. F. Effect of certain host, inoculum, and environmental factors on infection of *Eucalyptus* species by two *Mycosphaerella* species. *Transactions of the British Mycological Society*, London, v. 90, n. 2, p. 221-228, mar., 1988a.
- PARK, R. F. Epidemiology of *Mycosphaerella nubilosa* and *M. cryptica* on *Eucalyptus* spp. in south-western Australia. **Transactions of the British Mycological Society**, London, v. 91, n. 2, p. 261-266, 1988b.

- PARK, R. F.; KEANE, P. J. Three *Mycosphaerella* species from leaf diseases of *Eucalyptus*. Transactions of the British Mycological Society, London, v. 79, n. 1, p. 95-100, ago., 1982a.
- PARK, R. F.; KEANE, P. J. Leaf diseases of *Eucalyptus* associated with *Mycosphaerella* species. Transactions of the British Mycological Society, London, v. 79, n. 1, p. 101-115, ago., 1982b.
- PARK, R. F.; KEANE, P. J. Spore productions by *Mycosphaerella* species causing leaf diseases of *Eucalyptus*. Transactions of the British Mycological Society, London, v. 89, n. 4, p. 461-470, dez., 1987.
- PARK, R. F. et al. Fungal diseases of Eucalypt foliage. In: KEANE P. J.; KILE G. A.; PODGER F. D. **Diseases and pathogens of eucalypts**. Melbourne: CSIRO Publishing, 2000. 565 p.
- PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B. Hospedeiro: mecanismos de resistência. p. 417-453. In: BERGAMIM FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v. 1. 919 p.
- PÉREZ, C. A. et al. Mycosphaerellaceae and Teratosphaeriaceae associated with *Eucalyptus* leaf diseases and stem cankers in Uruguay. **Forest Pathology**, Aberdeen, v. 39, n. 5, p. 349-360, out., 2009.
- PEREZ, G. et al. *Mycosphaerella* leaf disease (MLD) outbreak on *Eucalyptus globulus* in Brazil caused by *Teratosphaeria (Mycosphaerella) nubilosa*. **Phytopathologia Mediterranea**, Firenze, v. 48, n. 2, p. 302-306, 2009.
- PRABHPREET I.; DHILLON, M.; SINGH, P. P. Mesophyll characteristics of muskmelon leaf in relation to resistance/susceptibility to downy mildew. **Plant Disease Research**, Lamberton, v. 15, n. 1, p. 18-23, 2000.
- PRETORIUS, M. C. et al. Phylogeny of some cercosporoid fungi from *Citrus*. **Sydowia**, Innsbruck, v. 55, n. 2, p. 286-305, 2003.

POTTS, B. et al. Exploration of the *Eucalyptus globulus* gene pool. In: CONFERENCE EUCALYPTUS IN A CHANGING WORLD. 2004, Aveiro. **Abstracts...** Aveiro: IUFRO, 2004. p. 46-61.

PUTZKE, J.; PUTZKE, M. T. L. **Os reinos dos fungos**. Santa Cruz do Sul: EDUNISC, 1998, v. 1. 606 p.

ROBARDS, A. W. An introduction to techniques for scanning electron microscopy of plant cell. p. 343-444. In: HALL, G. L. **Electron microscopy and cytochemistry of plant cells**. New York: Elsevier, 1978. 456 p.

ROCHA, M. E. N.; SANTOS, C. L. O uso comercial e popular do eucalipto *Eucalyptus globulus* Labill- Myrtaceae. **Saúde & Ambiente em Revista**, Duque de Caxias, v. 2, n. 2, p. 23-34, jul/dez., 2007.

RODRIGUEZ-CONCEPCIÓN, M.; BORONATO, A. Elucidation of the methylerytritol phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria and plastids. A metabolic milestone achieved through genomics. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 130, n. 3, p. 1079-1089, 2002.

SALGADO, A. P. S. P. et al. Avaliação da atividade fungitóxica de óleos essenciais de folhas de *Eucalyptus* sobre *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea* e *Bipolaris sorokiniana*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 2, p. 249-254, mar/abr., 2003.

SAMBUGARO, R. **Caracterização anatômica foliar de clones de seringueira (*Hevea spp.*) visando resistência ao *Microcyclus ulei***. 2003. 61 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Proteção de Plantas)-Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2003.

SANGWAN, N. S. et al. Regulation of essential oil production in plants. **Plant Growth Regulation**, Pietermaritzburg, v. 34, n. 1, p. 3-21, 2001.

SANTOS, R. I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. p. 403-434 In: SIMÕES, C.M.O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre: UFRGS, 2004. 827 p.

SANTOS, A. F.; AUER, C. G.; GRIGOLETTI JÚNIOR, A. **Doenças do eucalipto no sul do Brasil: identificação e controle.** Circular Técnica. Colombo: Embrapa, Junho, 2001. Disponível em: <<http://www.cnpf.embrapa.br/publica/circtec/edicoes/circ-tec45.pdf>>. Acesso em: 13 ago. 2007.

SCHNEE, C. et al. The maize gene synthase 1 encodes a sesquiterpene synthase catalyzing the formation of (E)-farneses, (E)-nerolidol, and (E,E)-farnesol after herbivore damage. **Plant Physiology**, Rockville, v. 130, p. 2049-2060, ago., 2002.

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

SILVA, M.; VALENTE, C.; NEVES, L.; MACHADO, H. Evaluation of *Mycosphaerella* impact on eucalypts plantations in Portugal. *Revista de Ciências Agrárias*, Lisboa, v. 31, n. 2, p. 112-118, dez., 2008.

SILVA-ACUÑA, R.; SILVA-ACUÑA, A.; ZAMBOLIM, L. Stomatic index in genetic materials of coffee tree resistant or susceptible to rust. **Bioagro**, Viçosa, v. 10, n. 2, p. 57-61, 1998.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** 5. ed. Porto Alegre: UFRGS, 2004. p. 467-496.

SMITH, A. **The development of strategies for the management and research of foliar pathogens on Eucalypt plantations: using *Mycosphaerella* in a case study.** 2006. 215 f. Tese (Doutorado)-School of Agricultural Science, University of Tasmania, Tasmania, 2006.

SMITH, A. H. et al. Anatomical and histochemical defence responses induced in juvenile leaves of *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus nitens* by *Mycosphaerella* infection. **Forestry Pathology**, Aberdeen, v. 37, n. 6, p. 361-373, jul., 2007.

SNEATH, P. H. A.; SOKAL, R. R. **Numerical taxonomy.** San Francisco: W. H. Freeman, 1973. 573 p.

SOUZA, R. R. S. **Caracterização anatômica quantitativa e composição de óleos essenciais em três estádios foliares de clones de eucalipto e sua relação com a ferrugem.** 2008. 104 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Proteção de Plantas)-Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2008.

TAKITA, M. A. A síntese de terpenos e a qualidade do futuro. 2006. Disponível em: <<http://www.centrodecitricultura.br/informativos/2007/julho.pdf>>. Acesso em: 25 dez. 2008.

TAIZ, I.; ZEIGER, E. Metabólicos secundários e defesa vegetal. p.309–332. In: TAIZ, I.; ZEIGER, E. (eds.). **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 722 p.

TRUJILLO, I.; HERMOSO, L.; GARCIA, E. Structural characterization of banana clones: resistant and non resistant to yellow Sigatoka disease. **Anales de Botânica Agrícola**, Caracas, v. 4, p. 59-62. 1997.

VAN DEN DOOL, H.; KRATZ, D. J. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. **Journal of Chromatography**, Amsterdam, v. 11, p. 463-471, ago., 1963.

VITTI, A. M. S.; BRITO, J. O. Óleo essencial de eucalipto. **Documentos florestais**. Piracicaba, n.17, p. 1-26, 2003. Disponível em: <www.ipef.br/publicacoes/docflorestais/df17.pdf>. Acesso em: 13 jan. 2009.

WINK, M. Physiology of the accumulation of secondary metabolites with special reference to alkaloids. In: SCHELL, J.; VASIL, I. K. (Eds.). Cell culture and somatic cell: genetics of plants. New York: Academic Press, 1988. p. 17-42.

WOLFFENBÜTTEL, A. N. Óleos essenciais. Informativo Conselho Regional de Química-V. n. 105, p. 6-7, 2007. Disponível em: <http://www.oleoessencial.com.br/artigo_Adriana.pdf>. Acesso em: 25 mar. 2009.

YANG, J. L.; FIFE, D. Wood properties of three provenances of plantation-grown *Eucalyptus globules* Labill. Growth strain. In: INTERNATIONAL UNION OF FOREST RESEARCH ORGANIZATIONS, 1., 2000. Vienna. Abstracts... Vienna, 2000. p. 301-309.