

RAFAEL FERREIRA ALFENAS

**PRODUÇÃO DE INÓCULO DE *Cylindrocladium pteridis* EM CONDIÇÕES
CONTROLADAS**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2009

RAFAEL FERREIRA ALFENAS

**PRODUÇÃO DE INÓCULO DE *Cylindrocladium pteridis* EM CONDIÇÕES
CONTROLADAS**

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

APROVADA: 26 de outubro de 2009

Prof. Luiz Antônio Maffia
(Co-orientador)

Prof. Eduardo Seiti Gomide Mizubuti

Profa. Maria Catarina Megumi Kasuya

Dr. Reginaldo Gonçalves Mafía

Prof. Olinto Liparini Pereira
(Orientador)

“NO MEIO DE QUALQUER DIFICULDADE ENCONTRA-SE A
OPORTUNIDADE.”

“A PAZ É A ÚNICA FORMA DE NOS SENTIRMOS REALMENTE HUMANOS.”

Albert Einsten

Aos meus pais Acelino e Rita.

À Gabriela Piccolo Maitan.

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida e pela força nos momentos difíceis

Ao meu pai Acelino Couto Alfenas pelo exemplo, pelo incentivo, pela orientação e pela oportunidade para desenvolver os trabalhos de pesquisa.

À minha mãe Rita de Cássia Ferreira Alfenas pelo apoio e carinho.

Às minhas irmãs Poliane Alfenas-Zerbini, Cristiane Ferreira Alfenas e Tatiane Ferreira Alfenas pelo carinho.

À Gabi pela compreensão, pelo carinho, pelo amor e por ser minha fonte de inspiração

Ao meu grande amigo Marcelo pela convivência, pela confiança e pelo incentivo

À minha família, pelo constante apoio e pelos momentos de alegria.

Aos professores Luiz Antônio Maffia e Olinto Liparini Pereira, pelos ensinamentos transmitidos, inúmeros conselhos, grande amizade e oportunidade de realizar este trabalho.

À Márcia pela grande amizade, plena disponibilidade em todos os momentos e por nunca medir esforços para nos ajudar.

Aos amigos Rodrigo e Edival pela grande amizade.

Ao Douglas Lau, Reginaldo Mafia, Lúcio e Everaldo pela relevante ajuda e pelos ensinamentos.

Aos amigos e funcionários do Laboratório de Patologia Florestal e Genética da Interação Planta-Patógeno, pela amizade e ajuda nos trabalhos.

Aos amigos do curso de mestrado pelas longas jornadas de estudos e pela convivência e amizade.

Aos estudantes de iniciação científica, Rodrigo Galvão e Camila, por não medir esforços para nos ajudar.

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade e pelo suporte para realização do curso de Mestrado.

Aos professores do Departamento de Fitopatologia pelos valiosos ensinamentos.

À CAPES, pela bolsa de Mestrado.

BIOGRAFIA

RAFAEL FERREIRA ALFENAS, nasceu em 14 de junho de 1983, em Viçosa, Minas Gerais.

Em janeiro de 2008, graduou-se em Engenharia Florestal pela Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, Minas Gerais.

Trabalhou durante a graduação como estudante de Iniciação Científica no laboratório de Patologia Florestal e Genética da Interação Planta Patógeno sob a orientação do Prof. Acelino Couto Alfenas.

Em março de 2008, iniciou o Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, em nível de Mestrado, na área de Patologia Florestal, na Universidade Federal de Viçosa, sob orientação do Prof. Olinto Liparini Pereira.

SUMÁRIO

RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	vii
1. INTRODUÇÃO.....	2
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	5
2.1. Material vegetal.....	5
2.2. Obtenção e armazenamento de isolados de <i>Cylindrocladium pteridis</i>	5
2.3. Dinâmica de germinação de conídios <i>in vitro</i>	5
2.4. Germinação de conídios e crescimento do tubo germinativo sob de luz ou escuro em diferentes temperaturas.....	6
2.5. Germinação de conídios e comprimento do tubo <i>in vitro</i> sob diferentes temperaturas.....	7
2.6. Crescimento micelial <i>in vitro</i> sob diferentes temperaturas.....	7
2.7. Esporulação de <i>Cylindrocladium pteridis</i> em meio de cultura.....	7
2.8. Indução de esporulação em cultura sob diferentes temperaturas.....	9
2.9. Período de incubação e severidade da mancha-de-pteridis em eucalipto na presença ou ausência de luz.....	10
2.10. Desfolha causada por <i>Cylindrocladium pteridis</i> sob diferentes temperaturas de incubação.....	10
2.11. Análise estatística.....	11
3. RESULTADOS.....	12
3.1. Dinâmica de germinação de conídios <i>in vitro</i>	12
3.2. Germinação de conídios e crescimento <i>in vitro</i> do tubo germinativo sob luz e escuro.....	13
3.3. Germinação de conídios e comprimento do tubo germinativo <i>in vitro</i> sob diferentes temperaturas.....	14
3.4. Crescimento micelial <i>in vitro</i> sob diferentes temperaturas.....	16
3.5. Indução de esporulação de <i>Cylindrocladium pteridis</i> em diferentes meios de cultura.....	16
3.6. Indução de esporulação em cultura sob diferentes temperaturas.....	17
3.7. Período de incubação e severidade da mancha-de-pteridis em eucalipto na presença ou ausência de luz.....	18
3.8. Desfolha causada por <i>Cylindrocladium pteridis</i> sob diferentes temperaturas.....	19
4. DISCUSSÃO.....	21
5. CONCLUSÕES.....	25
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	26

RESUMO

ALFENAS, Rafael Ferreira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, outubro de 2009.

Produção de inóculo de *Cylindrocladium pteridis* em condições controladas.

Orientador: Olinto Liparini Pereira. Co-orientadores: Acelino Couto Alfenas e Luiz Antônio Maffia

A fim de embasar o cultivo de *Cylindrocladium pteridis* e a inoculação do fungo em condições controladas, avaliou-se neste trabalho a esporulação em cultura, a germinação de conídios, o crescimento micelial e a desfolha causada em eucalipto sob diferentes temperaturas. Em experimentos preliminares, avaliou-se o efeito da luminosidade e o tempo de incubação na germinação de conídios. A presença de luz contínua reduziu significativamente a germinação, obtendo-se maior germinação de conídios no escuro. Ao avaliar a germinação sob diferentes períodos de incubação, observou-se que a germinação de *C. pteridis* é muito rápida, sendo obtido 100% de conídios germinados após 4 h de incubação. Ao avaliar a germinação sob diferentes temperaturas, o ótimo para germinação foi 25 °C (84,6%). O crescimento micelial também variou com a temperatura, e o máximo foi a 25 °C. Objetivando-se solucionar o problema da baixa produção de conídios *in vitro*, avaliaram-se três métodos de esporulação de *C. pteridis* em cultura. Compararam-se três métodos, e com o método de raspagem do micélio aéreo seguido de inundação em água obteve a maior esporulação do fungo nos meios AVDA, MEA, BDA e GAA, após 10 dias de incubação. Obteve-se a maior produção de conídios em BDA, com média de $14,13 \times 10^4$ conídios/mL. Com o meio SNA não houve diferença significativa entre os métodos estudados. Posteriormente, para se estudar o efeito da temperatura na desfolha em eucalipto, inocularam-se plantas que foram mantidas em câmara úmida a 18, 26, 28 e 30 °C. Após 48 h, foram transferidas para casa de vegetação (25±5 °C). A temperatura influenciou significativamente a desfolha em ramos da base da copa aos 50 dias após inoculação, e o maior percentual de desfolha ocorreu a 26 °C.

ABSTRACT

ALFENAS, Rafael Ferreira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, october, 2009.

Production of inoculum of *Cylindrocladium pteridis* under controlled conditions. Adviser: Olinto Liparini Pereira. Co-Advisers: Acelino Couto Alfenas and Luiz Antônio Maffia

To base the cultivation of *Cylindrocladium pteridis* and inoculation of the fungus under controlled conditions, was evaluated in this study sporulation in culture, conidial germination, mycelial growth and defoliation of eucalyptus at different temperatures. In preliminary experiments, we evaluated the effect of light and incubation time on germination of conidia. The presence of continuous light significantly reduced germination, resulting in higher germination of conidia in the dark. In assessing the germination under different incubation periods, it was observed that the germination of *C. pteridis* is very fast, and obtained 100% conidia germinated after 4 h of incubation. In assessing the germination under different temperatures, the optimum for germination was 25 ° C (84.6%). The mycelial growth also varied with temperature, and the maximum was 25 ° C. Aiming to solve the problem of low production of conidia in vitro were evaluated three methods of sporulation of *C. pteridis* in culture. We compared three methods, and the method of scraping the aerial mycelium followed by flood water was the most sporulation in media AVDA, MEA, PDA and GAA, after 10 days of incubation. We obtained the greatest number of conidia on PDA, with an average of 14.13 x 10⁴ conidia / mL. With half SNA was no significant difference between the methods studied. Subsequently, to study the effect of temperature on leaf eucalyptus, is inoculated plants were kept in a moist chamber at 18, 26, 28 and 30 ° C. After 48 h, were transferred to a greenhouse (25 ± 5 ° C). The temperature significantly influenced the leaf classes in the base of the crown 50 days after inoculation, and the highest percentage of defoliation occurred at 26 ° C.

Produção de inóculo de *Cylindrocladium pteridis* em condições controladas

**Rafael F. Alfenas, Olinto L. Pereira, Rodrigo G de Freitas, Everaldo A. Lopes,
Luiz A. Maffia & Acelino C. Alfenas**

Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, CEP 36570-000,
Viçosa – MG.

Autor para correspondência: Olinto Liparini Pereira, e-mail: oliparini@ufv.br

ALFENAS, R.F., PEREIRA, O.L., FREITAS, R. G de., LOPES, E.A., MAFFIA, L.A &
ALFENAS, A.C. Produção de inóculo de *Cylindrocladium pteridis* em condições
controladas. Tropical Plant Pathology

1. INTRODUÇÃO

A cultura do eucalipto por apresentar rápido crescimento e boa adaptabilidade a uma grande variedade de condições de clima e de solo, pode suprir de forma sustentável a demanda crescente de produtos de base florestal. Sendo assim, as florestas plantadas podem diminuir a pressão sobre os pequenos remanescentes de florestas nativas que ainda existem (Zobel, 1992, Fonseca et al., 2007).

O setor florestal tem buscado implantar florestas clonais de eucalipto com características silviculturais e tecnológicas superiores, considerando o incremento volumétrico, a resistência a doenças e pragas e o rendimento de celulose (Zobel, 1992). No entanto, a expansão das plantações para regiões de clima quente e úmido, favoráveis à ocorrência de doenças, o plantio monoclonal de genótipos mais produtivos, sem o prévio conhecimento de sua resistência, e os ciclos sucessivos da cultura numa mesma área de plantio, favorecem a ocorrência de várias doenças na cultura (Alfenas et al., 2009). Uma das principais doenças é a mancha foliar e desfolha provocada por *Cylindrocladium pteridis* F.A.Wolf (Ferreira, 1989), pois reduz o incremento volumétrico em condições climáticas favoráveis (Alfenas et al., 2009). A doença foi relatada pela primeira vez no Brasil em 1995, nos estados da Bahia e do Pará, em uma procedência australiana de *Eucalyptus grandis* Smith, acarretando em intensa desfolha do povoamento (Ferreira et al., 1995). Atualmente, a doença está amplamente distribuída, incidindo especialmente em plantios a partir de seis meses até a idade de corte (Alfenas et al., 2009). Os maiores índices de desfolha em eucalipto causada por *C.*

pteridis ocorrem no norte do país, em função das condições de temperatura elevada e períodos prolongados de chuva (Alfenas, 1986).

Cylindrocladium pteridis é caracterizado por apresentar conídios cilíndricos a levemente curvados, com as extremidades arredondadas possuindo predominantemente um septo. O comprimento dos macroconídios varia de 70 a 100µm e a largura de 5 a 6µm. Além disso, uma outra característica marcante da espécie é a presença de uma vesícula clavada a estreitamente elipsoidal, com o diâmetro variando de 4 a 5µm (Crous, 2002). O estágio sexual do gênero *Cylindrocladium* é *Calonectria*, contudo o teleomorfo não tem sido encontrado para todas espécies (Sobers, 1973).

O gênero *Cylindrocladium* possui espécies que são importantes patógenos para espécies florestais como *Eucalyptus*, *Pinus* e *Acacia*, para inúmeras espécies agrônômicas, tais como amendoim, batata, ervilha e soja (Crous & Wingfield, 1993), assim como para algumas espécies ornamentais (Crous et al., 1991). As perdas em virtude de doenças causadas por espécies de *Cylindrocladium pteridis* são relatadas com frequência em diversos países do mundo, como África, Brasil, Camarões, Costa Rica, Índia, Malásia, Cingapura, África do Sul, Venezuela e Estados Unidos (Alfenas, 1986, Crous 2002).

Na maioria das espécies de eucalipto, *C. pteridis* causa manchas inicialmente pequenas, circulares ou alongadas, de coloração cinza-clara progredindo para marrom-clara coalescentes, podendo ocupar todo limbo foliar. Porém, em outras espécies de eucalipto, como *E. cloeziana*, as manchas são grandes e de coloração marrom-arroxeadas (Ferreira & Milani, 2002). Em clones altamente suscetíveis, a mancha ocupa todo o limbo foliar e, conseqüentemente, causa a queda prematura das folhas.

Os danos advindos da desfolha em eucalipto, causada por *C. pteridis*, não tem sido mensurados. Todavia, sabe-se que a desfolha em épocas favoráveis ao

desenvolvimento da doença atinge cerca de 75% ou mais da copa de clones altamente suscetíveis. Provavelmente, este nível de desfolha, especialmente de forma cíclica, pode reduzir o incremento volumétrico. Além disso, com a desfolha, ocorre o aumento da entrada de luz no sub-bosque o que estimula o crescimento de plantas daninhas que são indesejáveis ao manejo da cultura. Como efeito potencial, sabe-se que desrama artificial igual a 75% da copa reduz em 45% o incremento volumétrico de *E. grandis* (Pires, 2000, Pulrolnik et al., 2005). Redução no incremento médio da ordem de 45% pode resultar em prejuízo de 4.788,00 U\$\$/ha aos 7 anos, considerando a produtividade de 40m³/ha/ano e o preço da madeira igual a 38 U\$\$/m³.

Observações de campo e inoculações do patógeno, conduzidas em casa-de-vegetação, indicam a existência de variabilidade quanto à resistência entre espécies, progênies e genótipos de *Eucalyptus* spp., mesmo sob condições favoráveis ao desenvolvimento da doença, o que possibilita a seleção de genótipos resistentes para o plantio em larga escala (Alfenas et al., 2009).

Para selecionar genótipos resistentes e evitar a seleção de plantas suscetíveis escapes à infecção, é necessário efetuar a inoculação sob condições controladas, o que requer grande quantidade de inóculo do patógeno e a determinação prévia das condições favoráveis para o estabelecimento da doença. Estudos sobre a penetração e condições favoráveis à infecção foi realizado por Graça et al., (2009). Todavia, informações a respeito das condições de ambientes ideais para a multiplicação de inóculo de *C. pteridis*, bem como para o pleno desenvolvimento da doença ainda são necessários. Desta forma, o presente trabalho objetivou determinar a temperatura ótima para o cultivo de *C. pteridis in vitro*, avaliar diferentes meios de cultura e métodos para indução de esporulação, avaliar o efeito da temperatura na desfolha de eucalipto bem como o efeito da luz na germinação de conídios e infecção em eucalipto.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material vegetal

Mudas de dois clones híbridos de *E. grandis* x *E. urophylla* (6021 e 9882) produzidas em tubetes, foram transplantadas para vasos de 6 L de capacidade contendo mistura de solo, areia e esterco, na proporção de 3:1:1. As mudas foram mantidas em casa de vegetação por 120 dias, idade considerada ideal para a inoculação (Graça, et al 2009) e, semanalmente, foram adubadas com 50 mL de solução nutritiva preparada com 10 g de nutriente (Ouro verde®)/L.

2.2. Obtenção e armazenamento de isolados de *Cylindrocladium pteridis*

Folhas de eucalipto, contendo manchas causadas por *C. pteridis* foram coletadas em plantio com intensa desfolha provocada pelo patógeno estabelecido na região de Monte Dourado-PA. O isolamento foi realizado de forma direta (Alfenas et al., 2007) e a confirmação da espécie conforme chave de identificação proposta por Crous (2002). Posteriormente, o fungo foi armazenado pelo método Castellani e mantido na Micoteca do Laboratório de Patologia Florestal-Genética da Interação Planta Patógeno, do Departamento de Fitopatologia da UFV com o código CMD22.

2.3. Dinâmica de germinação de conídios *in vitro*

Quatro fragmentos de 1 cm² de papel celofane previamente esterilizados, foram depositados sobre agar-água em placas de Petri. Em cada fragmento depositou-se 25 µl

de uma suspensão de inóculo ajustada para 1×10^4 conídios/mL. A incubação dos esporos foi realizada a 25°C sob 12 h de fotoperíodo ($175 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{seg}$ lâmpadas OSRAM® 20W). Determinou-se, com auxílio de microscópio de luz, o percentual de conídios germinados a cada 30 minutos, por 4,5 horas. Consideraram-se como germinados, os conídios com tubo germinativo diferenciado, independentemente do seu comprimento. Empregou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado com seis repetições por tempo de incubação. Cada placa foi considerada uma unidade experimental em que avaliaram-se 200 conídios.

2.4. Germinação de conídios e crescimento do tubo germinativo sob de luz ou escuro em diferentes temperaturas

Avaliaram-se a germinação de conídios e o comprimento do tubo germinativo na ausência ou na presença de luz, utilizando-se a metodologia descrita no item 2.3. Para isso, as placas de Petri foram mantidas a 20, 25 e 30 °C sob presença ou ausência de luz. Após 4 h de incubação, os fragmentos de papel celofane foram transferidos para lâminas de microscopia e cobertos com uma gota de lactofenol - azul de algodão para interromper a germinação dos conídios. Determinou-se o número de conídios germinados em relação ao total de 200 conídios por placa. Com o auxílio do software LEICA QWIN STANDART V2.4, avaliou-se o comprimento do tubo germinativo de 40 conídios por repetição, visualizados aleatoriamente no campo microscópico. O delineamento estatístico foi o inteiramente casualizado em arranjo fatorial 2x3 (regime de luz x temperatura) com cinco repetições. Os dados foram analisados por meio de análise de variância e os tratamentos forma comparados utilizando-se o teste de Tukey adotando-se o nível de 5% de probabilidade.

2.5. Germinação de conídios e comprimento do tubo *in vitro* sob diferentes temperaturas

Após depositar alíquotas de 25 µL de suspensão a 1×10^4 conídios/mL em cada um dos três orifícios de lâminas escavadas, elas foram mantidas a 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 ou 40 °C no escuro. Após 4 h, depositou-se uma gota de lactofenol-azul de algodão nas cavidades da lâmina para interromper a germinação dos conídios. Na avaliação contou-se o número de conídios germinados em relação ao total de 250 conídios avaliados por cavidade. Consideraram-se como germinados conídios com tubo germinativo diferenciado, independentemente do seu comprimento. Para avaliar o comprimento do tubo germinativo, foram medidos, aleatoriamente, 40 conídios por repetição, utilizando o software LEICA QWIN STANDART V2.4.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado com seis repetições por temperatura sendo uma lâmina considerada uma unidade experimental.

2.6. Crescimento micelial *in vitro* sob diferentes temperaturas

Discos de 5 mm de diâmetro, retirados das bordas de colônias crescidas em BDA por 10 dias, foram transferidos para meio líquido semi-sintético (Alfenas, 2006) em Erlenmeyers (1 disco/erlenmeyers), e incubou-se a 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 ou 40°C sob fotoperíodo de 12 h e intensidade luminosa de $175 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{seg}$. Após 10 dias, determinou-se a massa micelial. Empregou-se o delineamento inteiramente casualizado com cinco repetições por temperatura.

2.7. Esporulação de *Cylindrocladium pteridis* em meio de cultura

Avaliaram-se os seguintes métodos para induzir esporulação do fungo em meio de cultura: a) raspagem do micélio aéreo, b) cultivo em meio de cultura contendo

fragmentos de folhas de cravo (*Dianthus caryophyllus* L.) e c) sem indução. Para cada um dos métodos, compararam-se cinco meios de cultura: batata-dextrose-ágar (BDA), aveia-dextrose-ágar (AVDA), extrato de malte-ágar (MEA), nutriente-sintético ágar (SNA) e glicose-asparagina-ágar (GAA). O delineamento estatístico foi inteiramente casualizado em arranjo fatorial 3x5 (métodos x meios de cultura) com seis repetições. O ensaio foi executado por duas vezes.

Raspagem do micélio aéreo

Discos de cultura de 5 mm de diâmetro, retirados das bordas de colônias com 15 dias de idade, foram repicados para placas de Petri contendo 25 mL dos diferentes meios de cultura. Após a repicagem, as placas foram mantidas a 25 ± 1 °C, com fotoperíodo de 12 h ($175 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{seg.}$), por 15 dias. Após esse período, visando estimular a produção de conídios, as culturas fúngicas foram submetidas ao estresse físico, por meio da deposição de 20 mL de água destilada estéril sobre a cultura e posterior raspagem da superfície da colônia com o auxílio de um pincel estéril, de modo a remover todo o micélio aéreo existente na porção superior do meio de cultura. A seguir, as colônias foram submersas em 10 mL de água destilada esterilizada durante dois dias. Após esse período, a água foi descartada, o excesso de umidade foi removido com o auxílio de gaze esterilizada, e a cultura foi mantida em condições de laboratório por, aproximadamente, 36 h e, posteriormente, incubada por 12 h a 25 ± 1 °C, com fotoperíodo de 12 h.

Cultivo em meio de cultura contendo fragmentos de folhas de cravo

Dez fragmentos de $0,5 \text{ cm}^2$ de folhas esterilizadas de cravo foram depositados sobre placas de Petri contendo 30 mL de cada um dos meios de cultura previamente

descritos. Posteriormente, discos de cultura de 5 mm de diâmetro, retirados das bordas de colônias com 15 dias de idade foram transferidos para o centro das placas de Petri contendo os fragmentos de folha de cravo. As placas foram mantidas a 25 ± 1 °C, com fotoperíodo de 12 h, por 15 dias.

Sem indução de esporulação

Discos de micélio de 5 mm de diâmetro, retirados das bordas de colônias, foram transferidos para placas de Petri contendo 30 mL de cada meio de cultura. Após a transferência dos discos, as placas foram mantidas a 25 ± 1 °C, com fotoperíodo de 12 h, por 15 dias.

Avaliação e delineamento estatístico

Para quantificar a produção de esporos, prepararam-se suspensões de conídios por meio da adição de 50 mL de água destilada + Tween 20 (0,05%) na superfície da cultura de cada repetições/tratamento. Os conídios foram removidos mediante a raspagem com um pincel esterilizado. Calculou-se a concentração de conídios com o auxílio de câmara de Neubauer.

O experimento foi montado em arranjo fatorial 3 (métodos) x 5 (meios de cultura) no delineamento inteiramente casualizado com seis repetições. Os dados foram analisados por meio de análise de variância e os tratamentos forma comparados utilizando-se o teste de Tukey adotando-se o nível de 5% de probabilidade.

2.8. Indução de esporulação em cultura sob diferentes temperaturas

O melhor método de indução de esporulação foi avaliado a 20, 25 e 30°C sob luz constante, em delineamento inteiramente casualizado em arranjo fatorial 3

(temperaturas) x 5 (meios de cultura), com cinco repetições. A avaliação foi realizada como descrito no item anterior.

2.9. Período de incubação e severidade da mancha-de-pteridis em eucalipto na presença ou ausência de luz

Folhas expandidas do clone 9882 e 6021 foram inoculadas por meio da deposição de 20 gotas/folha de 25 µL da suspensão de 1×10^4 conídios/mL e mantidas sob a presença ou ausência de luz a 26 °C. Avaliou-se o período de incubação e a severidade da doença a cada 6 h. A severidade foi avaliada quantificando-se o número de lesões/folha.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com 10 repetições, sendo uma folha considerada uma unidade experimental.

2.10. Desfolha causada por *Cylindrocladium pteridis* sob diferentes temperaturas de incubação

Avaliou-se a desfolha em mudas do clone 9882 aos 120 dias após o transplante. Nas plantas, atomizou-se suspensão a 1×10^4 conídios/mL. Após a inoculação, mantiveram-se as plantas a 18, 26, 28 e 30 °C, e após 48 h foram transferidas para casa de vegetação (25 ± 5 °C) até a avaliação. Avaliou-se a porcentagem de desfolha em quatro ramos basais, aos 50 dias após a inoculação, segundo a metodologia descrita por Graça et al., (2009).

Empregou-se o delineamento inteiramente casualizado com 10 repetições, sendo uma planta considerada uma unidade experimental.

2.11. Análise estatística

Nas análises estatísticas empregou-se o software *STATISTICA*. Os valores do experimento de esporulação foram submetidos à análise de variância e os tratamentos foram comparados utilizando-se o teste de Tukey adotando-se o nível de 5% de probabilidade.

Os dados dos demais experimentos foram analisados por meio de análise de variância e os modelos de regressão foram escolhidos baseando na significância dos coeficientes de regressão utilizando-se o teste “t” adotando-se o nível de 5% de probabilidade, no coeficiente de determinação e considerando-se tratar de um fenômeno biológico.

3. RESULTADOS

3.1. Dinâmica de germinação de conídios *in vitro*

A equação que melhor explicou a relação entre a germinação (G) e o tempo de incubação (T) foi $G = 114,12 * (1 - \exp^{-0,0076 * T})$ ($R^2 = 0,97\%$). Sendo que a germinação de conídios iniciou 30 minutos após incubação, com 19,6% de conídios germinados e atingiu o máximo, 100%, após 4 h (Figura 1).

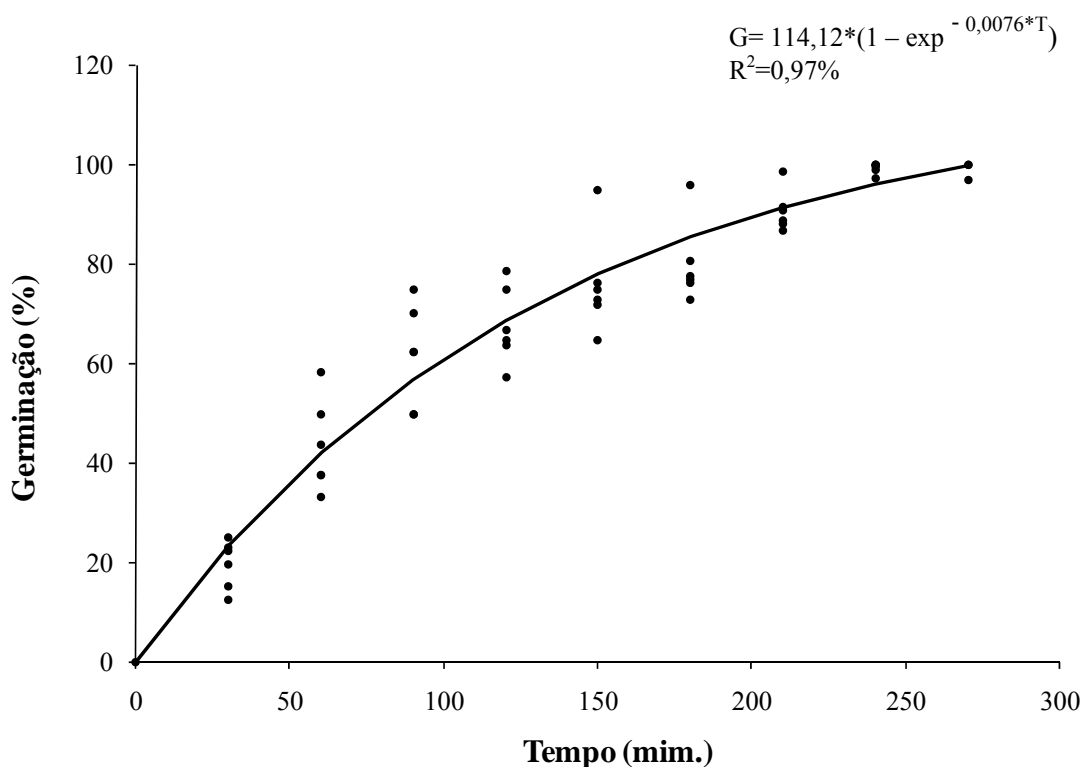


Figura 1: Dinâmica de germinação de conídios de *Cylindrocladium pteridis* ao longo do tempo.

3.2. Germinação de conídios e crescimento *in vitro* do tubo germinativo sob luz e escuro

A interação entre a porcentagem de germinação e o regime de luz foi não significativa ($p = 0,28$). Assim, os fatores foram estudados de forma independente. Observou-se que o maior índice de germinação (85%) foi atingido após 4 h de exposição ao escuro a 25 °C, sendo o menor índice (20,2%) obtido após 4 h de exposição a 20 °C, sob luz contínua (Figura 2). Independentemente do regime de luz testado, o maior percentual de germinação foi a 25 °C.

Similarmente à germinação, a interação foi não significativa ($p = 0,21$). O comprimento do tubo germinativo (Ct), variou com o regime de luminosidade empregado, sendo obtido maior comprimento (100,5 μm) após 4 h de exposição ao escuro, contra 77,5 μm na presença de luz constante (Figura 3).

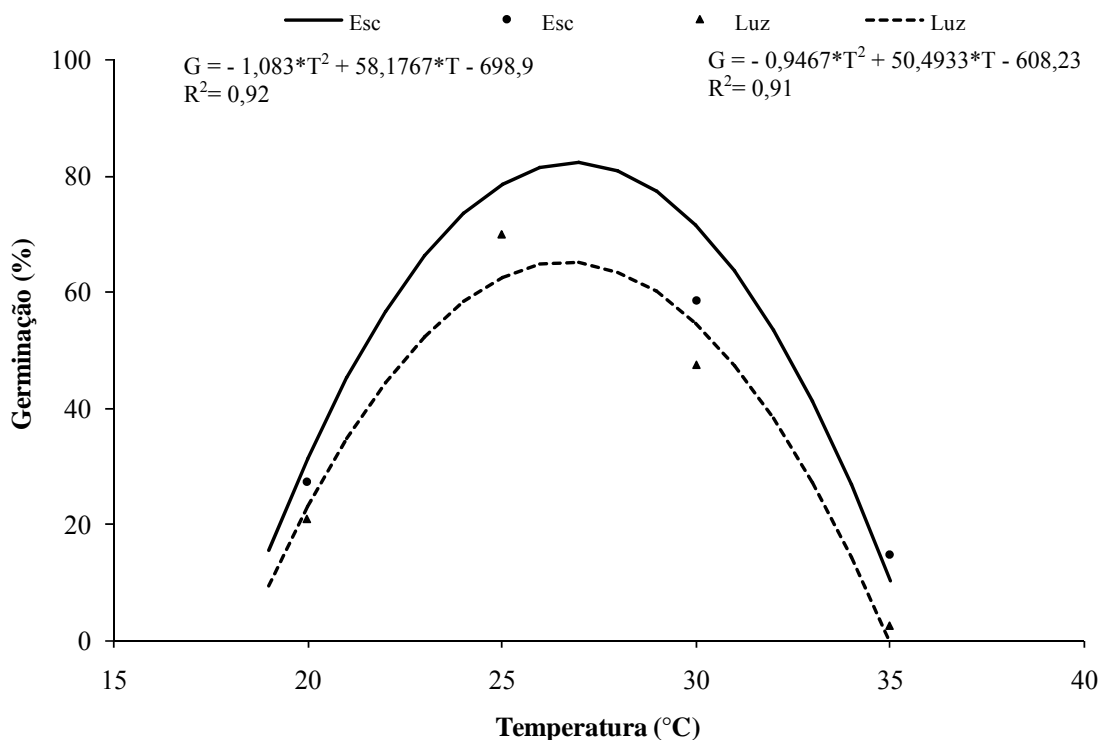


Figura 2: Germinação de conídios de *Cylandrocladium pteridis* em função da temperatura e do regime de luz.

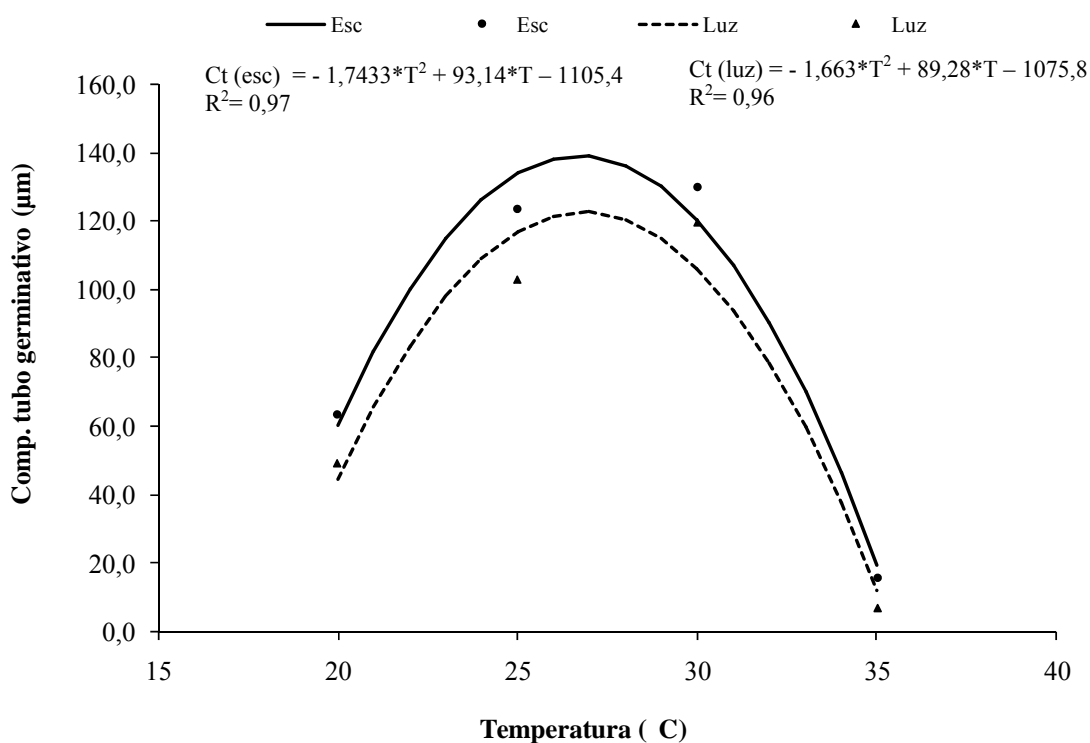


Figura 3: Comprimento do tubo germinativo de conídios de *Cylindrocladium pteridis* em função da temperatura e do regime de luz.

3.3. Germinação de conídios e comprimento do tubo germinativo *in vitro* sob diferentes temperaturas

O percentual de germinação de conídios (GC) e o comprimento do tubo germinativo (CT) variaram significativamente com a temperatura (T), sendo a equação para germinação $GC (\%) = -0,27 \cdot T^2 (\text{°C}) + 13,62 \cdot T (\text{°C}) - 77,46$ ($R^2 = 0,81\%$) e para o comprimento do tubo germinativo $CT (\mu\text{m}) = -0,26 \cdot T^2 (\text{°C}) + 13,08 \cdot T (\text{°C}) - 77,24$ ($R^2 = 0,79$) que melhor explicou a relação entre as variáveis estudadas.

A temperatura ótima estimada de germinação foi de 25,2 °C, e a temperatura ótima estimada para o comprimento do tubo germinativo foi de 25,15 °C (Figura 5).

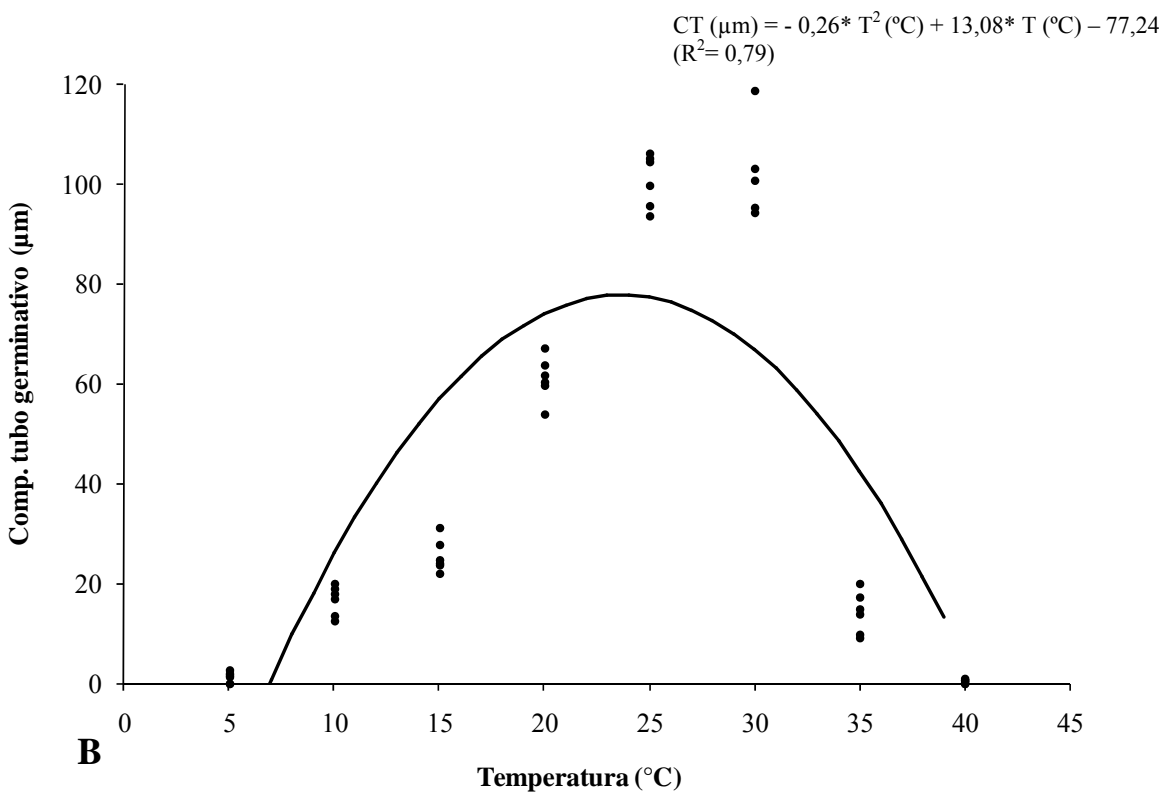
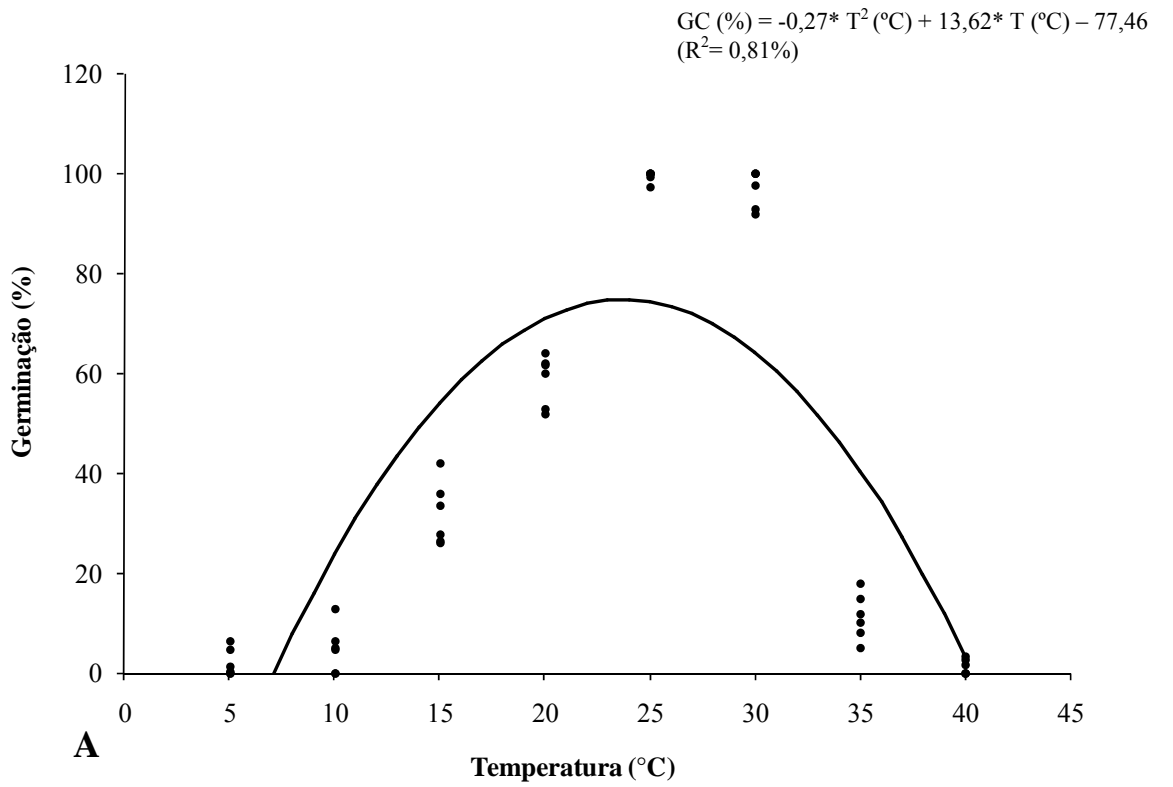


Figura 5: Germinação de conídios e comprimento do tubo germinativo de *Cylindrocladium pteridis* em função da temperatura de incubação. A- Germinação de conídios (%) e B- Comprimento do tubo germinativo (μm).

3.4. Crescimento micelial *in vitro* sob diferentes temperaturas

O crescimento micelial (CM) variou significativamente com a temperatura (T), havendo maior crescimento a 25,43 °C (Figura 6). A 5 o crescimento foi muito baixo e a 40 °C o fungo não cresceu, e quando os erlenmeyers foram transferidos para a temperatura de 25 °C, o fungo retomou seu crescimento.

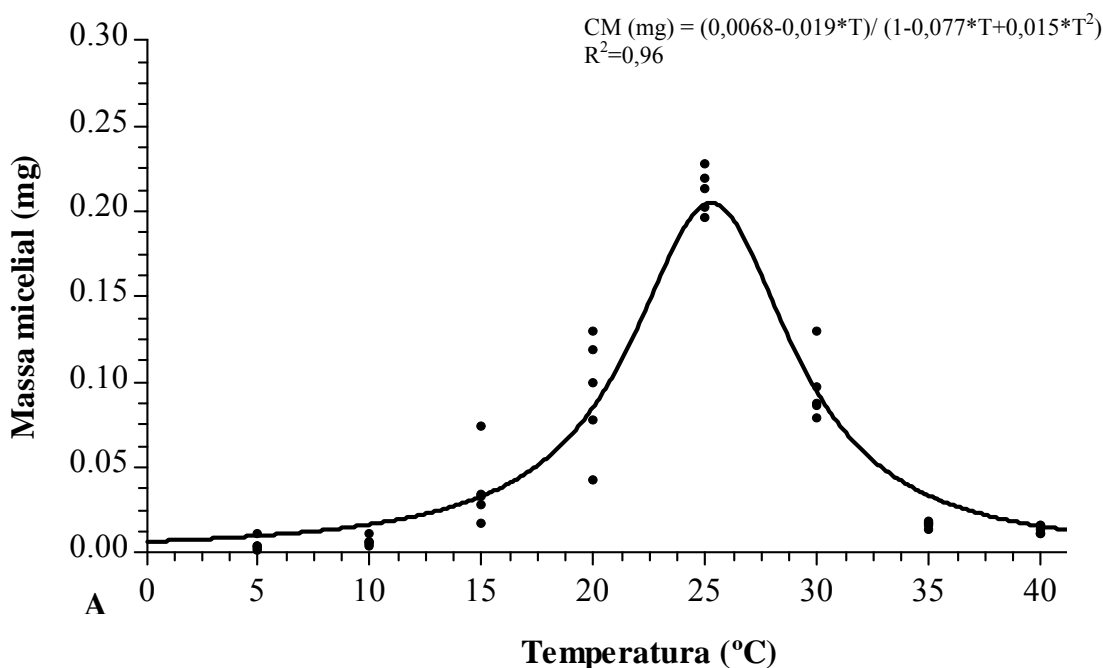


Figura 6: Crescimento micelial de *Cyindrocladium pteridis* após 10 dias de incubação

3.5. Indução de esporulação de *Cyindrocladium pteridis* em diferentes meios de cultura

A interação entre método de indução de esporulação e meio de cultura foi significativa ($p=0,0004$), sendo a raspagem do micélio aéreo o que permitiu maior produção de esporos do fungo nos seguintes meios, AVDA, MEA, BDA e GAA após 10 dias de incubação. A maior concentração de conídios foi obtida em, BDA onde a produção média de conídios foi de $14,13 \times 10^4$ esporos/mL. Para o meio SNA não houve diferença significativa entre os métodos testados (Tabela 1).

Tabela 1: Média da concentração de conídios/mL para os três métodos de indução de esporulação nos diferentes meios de cultura. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula, na linha, e minúscula, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Meio de cultura	Conídios/mL (x 10 ⁴)		
	Raspagem	Folha de cravo	Espontânea
BDA	14,13 Aa	0,063 Ba	0,98 Ba
SNA	0,89 Ac	0,06 Aa	0,02 Aa
MEA	4,37 Abc	0,37 Ba	0,12 Ba
AVDA	3,87 Abc	0,60 Ba	0,32 Ba
GAA	7,73 Ab	0,37 Ba	0,23 Ba

3.6. Indução de esporulação em cultura sob diferentes temperaturas

A interação entre meio de cultura e a temperatura para esporulação não foi significativa ($p > 0,05$). Assim, os fatores foram estudados de forma independente. A maior concentração de conídios foi obtida em GAA a 25 °C onde a produção média de conídios foi de $32,55 \times 10^4$ esporos/mL (Tabela 2)

Tabela 2: Média da concentração de conídios/mL obtida nos diferentes meios de cultura para as três temperaturas testadas. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula, na linha, e minúscula, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Meio de cultura	Conídios/mL (x 10 ⁴)		
	20°C	25°C	30°C
MEA	12,825 Ab	12,2 Ab	17,55 Aab
BDA	9,05 Abc	10,925 Abc	9,425 Ab
SNA	2,525 Ac	4,225 Abc	1,0 Ac
AVDA	4,2 Abc	5,075 Abc	9,05 Ab
GAA	23,325 Aa	32,55 Aa	19,025 Aa

3.7. Período de incubação e severidade da mancha-de-pteridis em eucalipto na presença ou ausência de luz

A interação entre o período incubação e o regime de luz foi significativa ($p=0,003$). Para o clone 9882 foi necessário 24 h de incubação no escuro para que todos os pontos da inoculação nas folhas apresentassem sintomas típicos da doença, enquanto que para o clone 6021 foi necessário 30 h de incubação no escuro. Quando mantidos sob luz contínua, tanto para o clone 9882 quanto para o clone 6021, foi necessário 48 h de incubação para que todos os pontos de inoculação apresentassem sintomas típicos da doença (Figura 4).

O período de incubação variou de acordo com o regime de luz e com o material genético utilizado. Na presença de luz contínua, o aparecimento dos sintomas em 50% das folhas inoculadas foi de 12 h para o clone 9882 e 18 h para o clone 6021. Quando as folhas inoculadas foram mantidas no escuro, o aparecimento dos sintomas em 50% das folhas, foi de 6 h após a inoculação para o clone 9882 e de 12 h para o clone 6021.

Tabela 1: Período de incubação da mancha-de-pteridis na presença ou ausência de luz em clones de *Eucalyptus* sp.

Clone	Regime de Luz	PI ₅₀ (h) ¹
9882	Luz	12
6021	Luz	18
9882	Escuro	6
6021	Escuro	12

¹Período de incubação representado pelo tempo entre a inoculação e o aparecimento dos sintomas em 50% das folhas inoculadas.

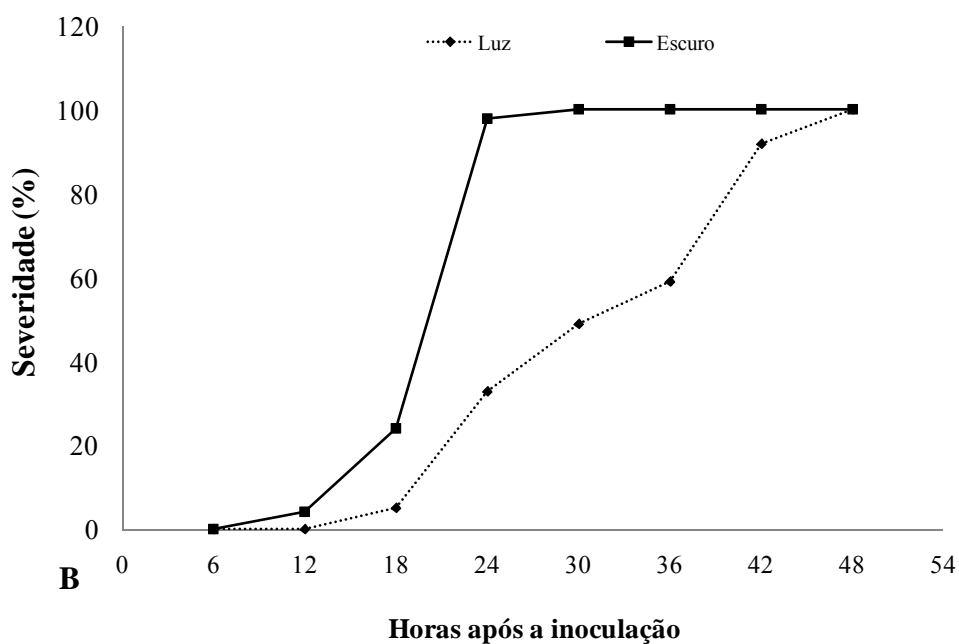
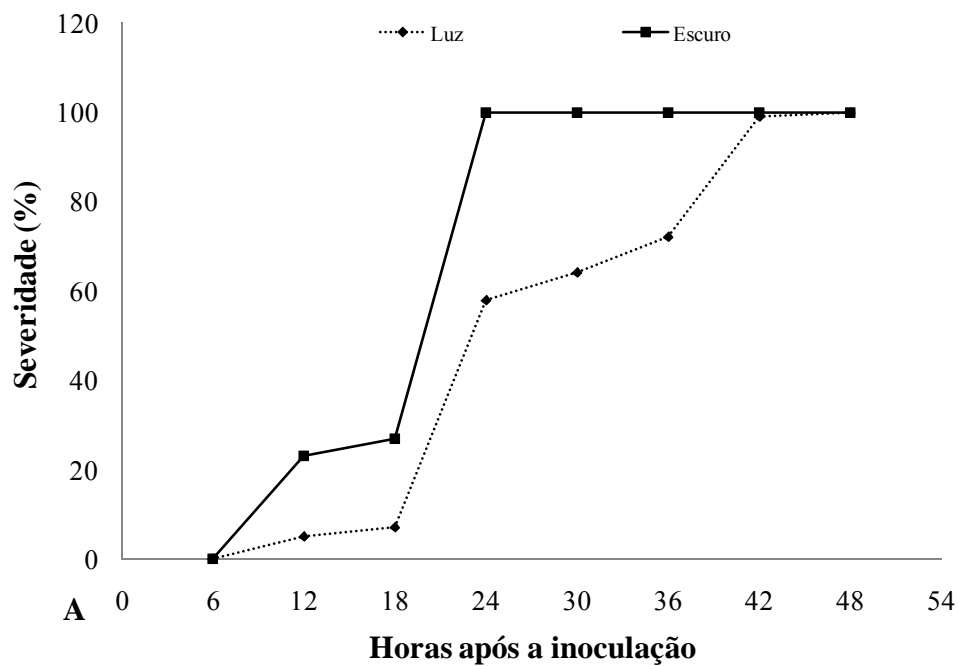


Figura 4: Severidade da mancha-de-pteridis na presença ou ausência de luz em função do tempo de incubação. A- Clone 9882 e B- Clone 6021.

3.8. Desfolha causada por *Cylindrocladium pteridis* sob diferentes temperaturas

O percentual de desfolha variou significativamente com a temperatura ($p < 0,05$).

Maior percentual de desfolha foi observado a 26°C, indicando que possivelmente há

uma correlação entre temperatura de germinação e desfolha, pois a temperatura ótima de germinação foi de 25°C. Embora a desfolha a 30°C tenha sido superior a 34%, não se pode inferir sobre o efeito do fungo na desfolha, pois não houve diferença significativa entre o controle não inoculado e o tratamento (Figura 7).

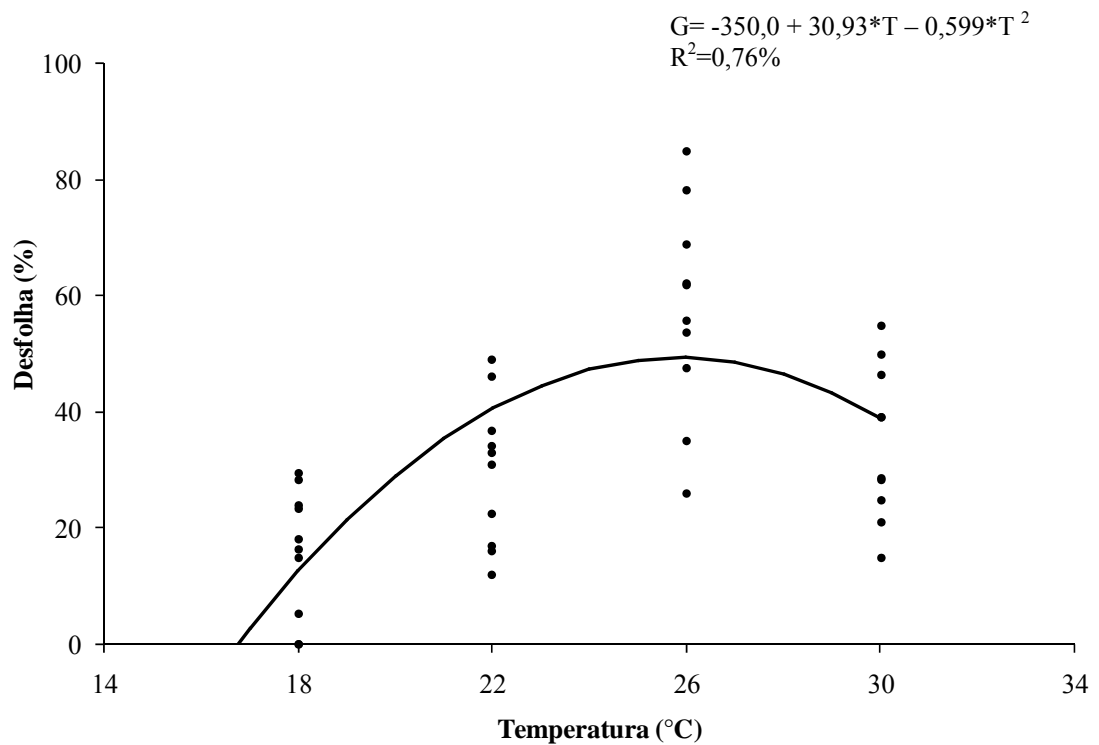


Figura 7: Percentual de desfolha em ramos do terço basal de plantas de eucalipto, aos 50 dias após a inoculação com *Cylindrocladium pteridis*.

4. DISCUSSÃO

A germinação de esporos é considerada uma das etapas mais delicadas do ciclo de vida dos fungos, pois o patógeno está muito vulnerável aos fatores de ambiente, principalmente temperatura e umidade fora da faixa adequada. Além disso, o esporo depende única e exclusivamente de suas próprias reservas nutricionais, pois ainda não estabeleceu uma relação parasitária com o hospedeiro (Mizubuti et al., 2007, Colhoun, 1973). Na natureza, as condições climáticas nem sempre são favoráveis à germinação por períodos prolongados de tempo. Sob condições favoráveis, os esporos começam a germinar e se as condições se tornam desfavoráveis, eles paralisam a germinação. Assim, quanto mais rápido for o processo de germinação dos esporos, maior será a chance de estabelecer uma relação parasitária com o hospedeiro. O tempo necessário para a germinação de conídios *C. pteridis* é pequeno, apenas 4 h de exposição ao escuro é o suficiente para se obter 100% de germinação. Assim, é grande a chance de ocorrer epidemias, pois quando os conídios são disseminados pelo vento ou pela chuva e levados até a superfície da folha de uma planta suscetível, rapidamente os conídios vão germinar e dar início ao processo de infecção.

A presença de luz constante influenciou a germinação e o crescimento do tubo germinativo, contrariamente do observado para *Quambalaria eucalypti* (Andrade et al., 2007) e, similarmente ao observado para outros patógenos, principalmente no grupo das ferrugens (Tapsoba & Wilson, 1997; Ruiz et al., 1989), onde a luz inibe a atividade de enzimas hidrolíticas envolvidas no processo de germinação (Agrios, 2005). Para *C.*

pteridis, a luz não inibiu completamente a germinação e o crescimento do tubo germinativo, mas na ausência de luz, a germinação e o comprimento do tubo germinativo foram significativamente maiores.

A presença de luz contínua influenciou a severidade e o período de incubação, sendo necessário 24 h de incubação no escuro para que 100% das folhas apresentassem os sintomas típicos da doença, enquanto na luz, foi necessário 42 h. Deste modo, manter as plantas inoculadas artificialmente no escuro nas primeiras 24 h após a inoculação, pode ser a melhor alternativa para o pleno desenvolvimento da doença e, conseqüentemente, para expressão máxima do seu nível de resistência.

A germinação de conídios e o crescimento micelial *in vitro* do patógeno variaram com a temperatura de incubação, sendo obtido maior crescimento micelial e maior percentual de conídios germinados, a 25 °C. Alfenas et al. (1979), estudaram o efeito da temperatura no crescimento micelial de 53 culturas de *Cylindrocladium* spp., e observaram que para *C. crotalarie* e *C. ilicicola*, a temperatura ótima de crescimento foi de 26 °C, enquanto para *C. scoparium* foi de 29 °C, indicando a existência de variabilidade no complexo de espécies de *Cylindrocladium*. Em um trabalho similar realizado por Aparecido et al. (2008), concluiu-se que a temperatura variou com a espécie de *Cylindrocladium* utilizada, mas a temperatura ótima foi de 25 °C para todas as espécies, corroborando os resultados do presente trabalho. No entanto, neste mesmo trabalho de Aparecido et al. (2008), concluiu-se que a temperatura de 35°C foi letal para todas espécies estudadas, ao contrário do observado para o isolado de *C. pteridis* utilizado no presente trabalho. Após permanecer por 10 dias a 35°C, as colônias foram transferidas para a temperatura de 25 °C, e o fungo retomou seu crescimento. Esses resultados foram corroborados nos testes de germinação de conídios *in vitro* sob

diferentes temperaturas, onde o percentual de germinação de conídios a 35 °C foi de 20% após 4 h de incubação na ausência de luz.

Após estudar a influência da temperatura na germinação e no crescimento micelial *in vitro*, buscou-se neste trabalho avaliar a influência da temperatura na desfolha de eucalipto, pois sob condições naturais, a temperatura, a luz e a umidade oscilam diuturnamente, mas quando constantes, sob condições controladas, permitem avaliar com maior precisão seus efeitos sobre a biologia do patógeno. Os resultados deste trabalho permitem concluir que a infecção de *C. pteridis* é significativamente influenciada pela temperatura, sendo a temperatura ótima estimada para desfolha de 26°C. Assim, as plantas recém inoculadas devem ser incubadas a 28°C em nevoeiro nas primeiras 48 h oferecendo maior nível de confiabilidade para a seleção de materiais genéticos resistentes. Ao avaliar o impacto da desfolha em eucalipto de *Cylindrocladium* na região de Tucuruí-PA, Krüger et al. (1990) observaram que o pico da doença ocorria na época do ano em que a temperatura média era de 27,4 °C, próxima da temperatura estimada obtida no presente trabalho, mostrando a importância da temperatura na epidemiologia da enfermidade. Em Monte Dourado-PA, a temperatura e precipitação média anual são de 26,5 °C e 2.368 mm respectivamente, ideais para o desenvolvimento *C. pteridis*. Assim, nesta região onde as plantações de eucalipto ocupam aproximadamente 55.000 ha, uma das formas mais eficientes para minimizar os efeitos negativos da desfolha, é efetuar o plantio de materiais genéticos resistentes.

Para avaliação massal de plantas resistentes é necessário uma grande quantidade de conídios e isso pode ser limitante dependendo das condições de cultivo do fungo. Neste trabalho, dentre os métodos testados para estimular a esporulação do fungo, o de raspagem do micélio aéreo seguido pela inundação em água foi o que proporcionou maior produção de esporos, devido, provavelmente ao estresse a que o fungo foi

submetido. Além disso, o meio de cultura influenciou a esporulação, possivelmente devido às diferenças entre as fontes de carbono e nitrogênio, nos meios testados. Hunter & Barnett (1978) estudaram a esporulação de várias espécies de *Cylindrocladium* em cultura e observaram que os meios de cultura contendo fontes orgânicas de N eram mais favoráveis à esporulação quando comparados com fontes inorgânicas. O meio SNA é adequado para estudos taxonômicos, pois os caracteres morfológicos (formato e dimensões da vesícula e o tamanho e número de septos dos conídios) permanecem relativamente estáveis, entretanto não é um meio adequado para ser utilizado quando se deseja grandes quantidades de conídios. Segundo Crous et al. (1992), a distinção de espécies taxonomicamente próximas baseada em características morfológicas torna-se às vezes duvidosa, uma vez que variações quanto ao número de septos, dimensões de conídios e formato da vesícula têm sido encontradas em função do substrato e da idade da cultura, o que pode resultar identificações incorretas. No entanto, é um critério seguro e eficaz quando examinado sob condições padronizadas.

Essas informações são indispensáveis para estudos com a epidemiologia da doença e, principalmente, para subsidiar a seleção de genótipos de *Eucalyptus* spp. resistentes à mancha-de-pteridis.

5. CONCLUSÕES

Com os resultados do presente trabalho, conclui-se que:

- 1- A germinação de conídios de *Cylindrocladium pteridis* inicia-se aos 30 minutos de incubação, com o máximo 4 h após exposição na ausência de luz.
- 2- É necessário 24 h de exposição ao escuro após a inoculação para se obter 100% de folhas com lesão.
- 3- A temperatura ótima estimada para o crescimento micelial e germinação de conídios *in vitro* é 25 °C.
- 4- Obteve-se maior esporulação com o método de raspagem do micélio aéreo seguida da inundação em água, independentemente do meio de cultura utilizado.
- 5- A desfolha em eucalipto causada por *C. pteridis* foi maior a 26 °C.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agrios GN (2005) Plant Pathology. 5th Ed. Amsterdam. Elsevier Academic Press.
- Alfenas, AC, Matsuoka AK, Ferreira FA, Hodges CS (1979) Identificação, características culturais e patogenicidade de três espécies de *Cylindrocladium*, isoladas de manchas de folha de *Eucalyptus* spp. Fitopatologia Brasileira 4:445-459.
- Alfenas, AC (1986) Fungos do gênero *Cylindrocladium* como patógenos florestais, no Brasil. Fitopatologia Brasileira 11:275-277.
- Alfenas, AC (ed.) (2006) Eletroforese e marcadores bioquímicos em plantas e microrganismos. 2^a. Ed. Viçosa: Editora UFV.
- Alfenas, AC, Ferreira, FA, Mafia, RG, Gonçalves, RC (2007) Métodos em fitopatologia. Viçosa: Editora UFV.
- Alfenas, AC, Zauza, EAV, Mafia, RG, Assis, TF (2009) Clonagem e doenças do eucalipto. 2^a. Ed. Viçosa: Editora UFV.
- Andrade, GCG, Alfenas, AC, Mafia RG, Zauza, EAV, Couto, MMF, Maffia, LA (2007) Características culturais e severidade da mancha foliar de *Quambalaria eucalypti* sob diferentes regimes de temperatura, luz e período de molhamento foliar. Fitopatologia Brasileira 32: 329-334.
- Aparecido, CC, Furtado, EL, Figueiredo, MB. (2008) Caracterização morfofisiológica de isolados do gênero *Cylindrocladium*. Summa Phytopathologica 1:38-47.
- Colhoun, J. (1973) Effects of environmental factors on plant disease. Annual Review of Phytopathology 11:343-364.
- Crous, PW, Phillips AJL, Wingfield, MJ (1991) The genera *Cylindrocladium* and *Cylindrocladiella* in South Africa, with special reference to forestry nurseries. South African Forestry Journal 157: 69-85.
- Crous, PW, Phillips AJL, Wingfield, MJ (1992) Effects of cultural conditions on vesicle and conidium morphology in species of *Cylindrocladium* and *Cylindrocladiella*. Mycologia 84 (4): 497-504.
- Crous, PW, Wingfield MJ (1993) *Calonectria gracilis*. IMI descriptions of Fungi and Bacteria. Mycopathologia 122: 47-48.

Crous, PW (2002). Taxonomy and pathology of *Cylindrocladium* (*Calonectria*) and allied genera. American Phytopathological Society.

Dias, MD, Pozza, EA, Abreu, MS, Miranda, EO (2005) Efeito da temperatura no crescimento micelial, produção e germinação de conídios de *Colletotrichum* spp. isolados de *Coffea arabica* L. Ciência Agrotecnologia (29) 3:545-552.

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

Ferreira, FA, Alfenas AC, Moreira, AM, Demuner, NL (1995) Mancha-de-pteridis: Doença foliar de eucalipto em áreas tropicais brasileiras. Fitopatologia Brasileira 20:107-110.

Ferreira, FA, Milani, D (2002) Diagnóstico visual e controle das doenças abióticas e bióticas do eucalipto no Brasil. International Paper.

Fonseca, SM da, Alfenas, AC, Alfenas, RF, Barros, NF de., Leite, FP (2007) Cultura do eucalipto em áreas montanhosas. Viçosa: Sociedade de Investigações Florestais.

Graça, RN, Alfenas, AC, Maffia, LA, Titon, M, Alfenas, RF., Lau, D, Rocabado, JMA (2009) Factors influencing infection of eucalypts by *Cylindrocladium pteridis*. Plant Pathology 58:1-11.

Hunter, BB, Barnett, HL (1978) Growth and sporulation of species and isolates of *Cylindrocladium* in culture. Mycologia 70:614-635.

Krügner, TL, Guerrini IA, Auer CG (1990) Surto epidêmico da mancha foliar causada por *Cylindrocladium* spp e sua relação com o crescimento de espécies/procedências de *Eucalyptus* na região de Tucuruí, PA. IPEF 43/44:74-78.

Mizubuti, ESG, Maffia, LA (2007) Introdução à fitopatologia. Viçosa: Editora UFV.

Pires, BM (2000) Efeito da desrama artificial no crescimento e na qualidade da madeira de *Eucalyptus grandis* para serraria. Engenharia Florestal. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa. Mestrado: 91.

Pulrolnik, K, Reis, GG dos, Reis, MdasGF, Monte, MA, Fontan, IdaCI (2005) Crescimento de plantas de clones de *Eucalyptus grandis* [Hill ex Maiden] submetidas a diferentes tratamentos de desrama artificial, na região do cerrado. Revista Árvore 29 (4):495-505.

Ruiz, RAR, Alfenas, AC, Ferreira, FA, Vale, FXR (1989) Influência da temperatura, do tempo de molhamento foliar, fotoperíodo e da intensidade de luz sobre a infecção de *Puccinia psidii* em eucalipto. Fitopatologia Brasileira 14:51-57.

Sobers, EK (1973). The *Calonectria* state of *Cylindrocladium scoparium*." Phytopathology 63: 448.

Tapsoba, H, Wilson, JP (1997) Effects of temperature and light on germination of urediniospores of the pearl millet rust pathogen, *Puccinia substriata* var. *indica*. Plant Disease 81:1049-1052.

Vale, FXR, Fernandes Filho, EI, Liberato, JR (2003) QUANT. A software plant disease severity assessment. 8th International Congress of Plant Pathology, Christchurch New Zealand.

Zobel, BB (1992) Vegetative propagation in production forestry: rooted cutting use has been very successful for some species. Journal of Forestry 90 (4):29-34.