

NILMARA PEREIRA CAIRES

**INTERAÇÃO *Erwinia psidii* - *Eucalyptus* spp.: INFECÇÃO, ALTERAÇÕES
FISIOLÓGICAS E FONTES DE RESISTÊNCIA**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2017

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

T

C136i
2017 Caires, Nilmara Pereira, 1987-
Interação *Erwinia psidii* - *Eucalyptus* spp. : infecção, alterações fisiológicas e fontes de resistência / Nilmara Pereira Caires. - Viçosa, MG, 2017.
ix, 58f. : il. ; 29 cm.

Orientador: Acelino Couto Alfenas.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Eucalipto - Doenças e pragas. 2. *Erwinia psidii*. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Fitopatologia. Programa de Pós-graduação em Fitopatologia. II. Título.

CDD 22 ed. 634.973766

NILMARA PEREIRA CAIRES

INTERAÇÃO *Erwinia psidii* - *Eucalyptus* spp.: INFECÇÃO, ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS E FONTES DE RESISTÊNCIA

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

APROVADA: 21 de julho de 2017.



Jorge Luis Badel Pacheco



Adriano Nunes Nesi



Daniele Aparecida Alvarenga Arriel



Carlos Eduardo Aucique Pérez



Acelino Couto Alfenas
(Orientador)

À minha família, em especial aos meus sobrinhos e avós.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À toda a minha família, especialmente aos meus pais, Nilton e Rita, às minhas irmãs Camila e Juliana, e aos meus sobrinhos.

À Universidade Federal de Viçosa, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia.

À FAPEMIG, CMPC Celulose Riograndense e FIBRIA pelo apoio financeiro para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao professor Acelino Couto Alfenas pela oportunidade, confiança, orientação e pelos ensinamentos profissionais e pessoais, e principalmente, por ser um exemplo amor à profissão.

À Clonar Resistencia à Doenças Florestais e a todos os funcionários pela disponibilização de espaço físico e ajuda durante os experimentos.

Aos professores Fabrício de Ávila Rodrigues e Adriano Nunes Nesi pela coorientação e ensinamentos em Fisiologia Vegetal e ao professor Gleiber Furtado pela orientação na fase inicial do doutorado.

Ao professor Fabricio por atuar além da sala de aula, transferindo amor ao que faz e contribuindo significativamente para a minha formação.

Ao Dr. Lúcio Mauro da Silva Guimarães pela coorientação, infinita paciência, incentivo e por acompanhar todas as etapas deste trabalho.

Aos Núcleo de Microscopia e Microanálise/UFV pela disponibilização de equipamentos para análises microscópicas, especialmente aos funcionários Karla, Gilmar e Nívea.

Ao André Costa, Renata Resende, Carlos Aucique, Ana Carolina Sá, Thamires Almeida pela ajuda nos experimentos.

Aos amigos Michele Lisboa, Leila Lins, Adans Colman, Sara Salcedo, Carlos Aucique e André Xavier pelo companheirismo.

Aos membros da banca Dr. Fabrício de Ávila Rodrigues, Dra. Daniele Arriel, Dr. Carlos Eduardo Aucique Perez, Dr. Adriano Nunes Nesi e Dr. Jorge Luiz Badel pelas correções e sugestões.

Aos colegas do Laboratório de Patologia Florestal Molecular - PATOMOL - pela amizade, pelo carinho e pela ótima convivência. Em especial agradeço às “coisinhas” pela amizade.

Aos funcionários do PATOMOL, principalmente à Márcia Maria Brandão, Paulo Sinei e à Mara Souza pelo carinho e pela pronta disponibilidade em ajudar.

Ao BIOAGRO e a todos os seus funcionários por toda atenção.

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

SUMÁRIO

RESUMO	vi
ABSTRACT.....	viii
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
REFERÊNCIAS.....	4
ARTIGO 1	6
Infecção de <i>Erwinia psidii</i> em eucalipto	6
ABSTRACT.....	6
MATERIAL E MÉTODOS	8
Material Vegetal.....	8
Inoculação das plantas com <i>E. psidii</i>	8
Translocação de <i>E. psidii</i> na haste principal das mudas de Eucalipto	9
Preparação dos fragmentos da haste principal e de folhas para observação no microscópio eletrônico de varredura (MEV)	9
RESULTADOS.....	10
Translocação de <i>E. psidii</i> no tecido do caule	10
Colonização dos tecidos do caule e da folha por <i>E. psidii</i>	11
DISCUSSÃO	12
AGRADECIMENTOS	14
REFERÊNCIAS.....	15
LISTA DE FIGURAS.....	18
ARTIGO 2	24
Eficiência fotossintética de clones de eucalipto resistente e suscetível à seca de ponteiros causada por <i>Erwinia psidii</i>.....	24
ABSTRACT.....	24
INTRODUÇÃO	25
MATERIAL E MÉTODOS	27
Material Vegetal.....	27
Inoculação das plantas com <i>E. psidii</i>	27
Avaliação das trocas gasosas	27
Avaliação dos parâmetros da fluorescência da clorofila <i>a</i>	28
Avaliação da severidade da seca de ponteiros	29
Delineamento experimental e análise estatística dos dados	29
RESULTADOS.....	30
DISCUSSÃO	30
AGRADECIMENTOS	33
REFERÊNCIAS.....	34
LISTA DE FIGURAS.....	37
ARTIGO 3	41

Gama de hospedeiros e resistência de <i>Eucalyptus</i> spp. e <i>Corymbia</i> spp. à <i>Erwinia psidii</i>	41
.....	
ABSTRACT.....	41
MATERIAL E MÉTODOS	43
Determinação da gama de hospedeiros	43
Avaliação da resistência em diferentes espécies de <i>Eucalyptus</i> spp. e <i>Corymbia</i> spp...	44
RESULTADOS.....	45
Gama de hospedeiros de <i>E. psidii</i> na família <i>Myrtaceae</i>	45
Identificação de fontes de resistência em <i>Eucalyptus</i> spp. e <i>Corymbia</i> spp.	45
DISCUSSÃO	46
AGRADECIMENTOS	49
REFERÊNCIAS.....	50
CONCLUSÕES GERAIS.....	58

RESUMO

CAIRES, Nilmara Pereira, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2017. **Interação *Erwinia psidii* - *Eucalyptus* spp.: Infecção, alterações fisiológicas e fontes de resistência.** Orientador: Acelino Couto Alfenas. Coorientadores: Fabrício de Ávila Rodrigues e Lúcio Mauro da Silva Guimarães.

A seca-de-ponteiros, causada por *Erwinia psidii* é, atualmente, uma das doenças emergentes mais importantes na cultura do eucalipto no Brasil. Por se tratar de uma enfermidade recentemente descrita, pouco se sabe sobre a relação patógeno-hospedeiro, cujo conhecimento pode auxiliar na determinação de medidas de controle. Assim, o presente estudo teve como objetivos: 1) Estudar a translocação e colonização de *E. psidii* em mudas de eucalipto; 2) Avaliar as alterações fisiológicas de plantas infectadas em relação a plantas saudáveis, principalmente quanto a trocas gasosas e danos ocorridos na maquinaria fotossintética e 3) Avaliar diferentes espécies de *Eucalyptus* e *Corymbia* quanto à resistência à seca-de ponteiros e ampliar o conhecimento sobre a gama de hospedeiros da bactéria em espécies da família *Myrtaceae*. No primeiro estudo, por meio de microscopia eletrônica de varredura, determinou-se que a colonização é principalmente acropetal e ocorre pelos vasos do xilema. Além dos vasos xilemáticos, a bactéria coloniza os espaços intercelulares e os tecidos parenquimáticos. Dentro destes tecidos, as células bacterianas formam agregados, que podem conter material fibrilar envolvendo-as, o que sugere a formação de biofilme, o qual pode desempenhar importante papel na agressividade da bactéria. No segundo estudo, não se detectaram alterações de trocas gasosas nem de fluorescência da clorofila *a* de plantas do clone resistente inoculadas ou não inoculadas. Entretanto, nas plantas do clone suscetível, houve redução significativa nos valores de taxa de assimilação líquida de CO₂, condutância estomática ao vapor de água, concentração interna de CO₂, taxa de transpiração, máxima eficiência fotoquímica, rendimento da fotoquímica, rendimento para dissipação e aumento nos valores de rendimento por outras perdas não-fotoquímicas em relação às plantas não-inoculadas (testemunhas) do mesmo clone. A infecção de *E. psidii* alterou a maquinaria fotossintética das plantas do clone suscetível principalmente quanto aos mecanismos de fotodissipação e fotoproteção. No terceiro estudo, por meio de inoculações conduzidas em casa de

vegetação, determinou-se que todas as outras oito espécies da família *Myrtaceae* avaliadas foram suscetíveis à seca de ponteiros, constituindo potenciais novos hospedeiros do patógeno. Encontrou-se, contudo, ampla variação na intensidade da doença entre as 28 espécies de *Eucalyptus* e quatro de *Corymbia* testadas. A variabilidade intra e interespecífica quanto à resistência permite a seleção de materiais superiores para plantio. Os resultados deste trabalho fornecem informações importantes sobre a interação *E. psidii* - eucalipto e para o estabelecimento de estratégias de controle da doença por meio do plantio de genótipos resistentes.

ABSTRACT

CAIRES, Nilmara Pereira, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2017. **Interaction *Erwinia psidii* - *Eucalyptus* spp.: Infection, physiological changes and sources of resistance.** Adviser: Acelino Couto Alfenas. Co-advisers: Fabrício de Ávila Rodrigues and Lúcio Mauro da Silva Guimarães.

Dieback caused by *Erwinia psidii* is one of the most important emerging diseases eucalypt in Brazil. Because it is a disease recently described in eucalypt, little is known about host-pathogen relations, which knowledge may help in establishing control measures. Thus, the present study aimed: 1) to study translocation and colonization of *E. psidii* in eucalypt cuttings; 2) to evaluate the physiological changes, estimated by gas exchanges and damages in the photosynthetic machinery and 3) to evaluate resistance of *Eucalyptus* spp., *Corymbia* spp. and several other species of *Myrtaceae*.to *E. psidii*. In the first study, we found that colonization occurs mainly acropetally by xylem vessels. In addition to the xylem vessel, the bacterium colonizes the intercellular spaces and the parenchyma cells. Intracellularly, bacterial cells form clusters, which may contain fibrillar material, suggesting biofilm formation, which may play an important role in aggressiveness of the te bacterium. In the second study, no differences in gas exchange or chlorophyll fluorescence parameters were detected in either inoculated or non-inoculated plants of a resistant clone, but net CO₂ assimilation rate, stomatal conductance to water vapor, internal CO₂ concentration, transpiration rate, maximum quantum yield, effective PSII quantum yield, quantum yield of regulated energy dissipation, quantum yield of non-regulated energy dissipation were altered in infected plants in relation to non-inoculated (control). Changes occurred in photosynthetic machinery of the susceptible clone mainly for photodissipation and photoprotection mechanisms. In the third study, through inoculations conducted in greenhouse, it was determined that all the other eight species of the *Myrtaceae* family evaluated were susceptible to dieback, constituting potential new hosts of the pathogen. However, there was a wide variation in disease intensity of 28 species of *Eucalyptus* spp. and four species of *Corymbia* spp. tested. The intra and interspecific variability of the resistance allows the selection of superior materials for planting. The results of this work provide important information on the host-pathogen interactions between *E. psidii* - eucalyptus and the establishment of strategies of disease control by selecting and planting resistant genotypes.

INTRODUÇÃO GERAL

O gênero *Erwinia* compreende bastonetes gram-negativos que possuem 0,5 - 1,0 x 1,0 - 3,0 nm. Ocorrem em células individuais, pares ou cadeias. As células são anaeróbias facultativas e móveis por meio de flagelos peritríquios. *Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow et al. foi a primeira espécie do gênero descrita por Burrill em 1880 e nomeada como *Micrococcus amylovorus*. Desde então, várias espécies foram descritas e o gênero foi revisto por diversas vezes. Em 1920, Winslow et al., reclassificou o gênero como *Erwinia*, tendo *Erwinia amylovora* como espécie-tipo.

Características fenotípicas, bioquímicas e sorológicas como morfologia de células e colônias, perfil de proteínas e ácidos graxos foram utilizadas para a identificação de espécies durante muitos anos (Schaad et. al., 2001). Recentemente, com o avanço das ferramentas moleculares, esta classificação passou a ter uma abordagem polifásica, em que sequências de DNA constituem a característica importante. Em 1998, Hauben et al, utilizando a sequência completa da região 16S de 29 estirpes, dividiu as espécies do gênero em três grupos filogeneticamente distintos, permanecendo no grupo das Erwinias Verdadeiras, as seguintes espécies: *E. amylovora*, *E. maliotivora*, *E. persicinus*, *E. psidii*, *E. rhapontici* e *E. tracheiphila*. As demais espécies foram reclassificadas nos gêneros *Pectobacterium* e *Brenneria* gen. nov.

Devido a sua ampla distribuição geográfica e importância econômica, *E. amylovora*, é, indubitavelmente, a mais estudada, tendo seu genoma completo sequenciado desde 2010 (Smits et al., 2010). *E. amylovora* que infecta plantas da família Rosaceae, possui vários aspectos sobre a interação com seus hospedeiros elucidados, tais como seu processo infeccioso, transmissão, disseminação, variabilidade genética, fatores de patogenicidade e virulência, gama de hospedeiros,

epidemiologia e controle (Youle, 1987; Vanneste & Eden-Green, 2000; Roberts & Sawyer, 2008; Milčevićová et al., 2010; Puławska & Sobiczewski, 2012). *Erwinia amylovora* ainda não foi relatada no Brasil.

Erwinia psidii Rodrigues Neto, Robbs & Yamashiro, descrita em goiabeira no estado de São Paulo, em 1987, (Rodrigues Neto, 1987), é atualmente a espécie bacteriana mais importante da cultura da goiaba no país, onde causa perdas significativas de produtividade (Coelho et al., 2002). O patógeno provoca o colapso do tecido e a morte de ponteiros em goiabeira (Rodrigues Neto, 1987). Inoculações sob condições controladas mostraram que outras mirtáceas como araçazeiro (*Psidium cattleianum* Sabine), melaleuca (*Melaleuca viridiflora* Brogn. & Gris) e jambolana (*Eugenia jambolana* Lamb.) são também suscetíveis à doença (Rodrigues Neto, 1987). Atualmente, *E. psidii* é um dos patógenos mais importantes da goiabeira no Brasil central (Teixeira et al., 2009).

Até recentemente *E. psidii* encontrava-se restrita à goiabeira, mas, foi relatada como agente causal da seca dos ponteiros em *Eucalyptus* spp. no Uruguai e na Argentina (Coutinho et al., 2011) e no Brasil (Arriel et al., 2014). Desde o seu primeiro relato em eucalipto, a doença tem sido frequentemente observada no Brasil (Arriel et al., 2014) e Uruguai (Palladino et al., 2013). No Brasil, até o presente, a enfermidade tem sido observada apenas no Rio Grande do Sul, em São Paulo e no Mato Grosso do Sul em espécies puras e híbridos de *Eucalyptus* (Arriel et al., 2014). Em eucalipto, o patógeno induz principalmente, seca de ponteiros e necrose do pecíolo e da nervura central das folhas. Embora, não raramente, observa-se também a murcha, que culmina com a morte das árvores no campo. As plantas infectadas apresentam escurecimento dos tecidos e exsudação macroscópica e microscópica de pus bacteriano (Arriel et al., 2014).

Na cultura da goiaba, as principais medidas de controle da doença incluem poda e queima dos ramos afetados (Marques et al., 2007). Entretanto, em eucalipto tais medidas de controle são inviáveis em virtude das extensas áreas cultivadas e principalmente em virtude do porte da planta. O plantio de mudas livres do patógeno e o emprego de genótipos resistentes são, atualmente, as medidas de controle mais eficientes. A avaliação da intensidade da doença em mudas inoculadas, sob condições controladas, pode ser realizada mediante o emprego de uma escala de notas de severidade (Ferraz et al., 2015).

Variação na intensidade da doença no campo e os resultados de inoculação do patógeno, sob condições controladas em diferentes materiais genéticos de *Eucalyptus* spp. indicam ser possível a seleção e o plantio de materiais resistentes (Hermenegildo, 2015). Todavia, pouco se sabe sobre o processo de colonização de *E. psidii* na planta hospedeira e as alterações fisiológicas induzidas pela bactéria em plantas resistentes e suscetíveis, cujo conhecimento pode embasar a determinação de estratégias de manejo da doença.

Esta tese é apresentada em três capítulos. No primeiro capítulo, estudou-se a translocação e a colonização da bactéria nos tecidos de mudas de um clone suscetível de eucalipto por meio de imagens de microscopia eletrônica de varredura. No segundo, estudaram-se as alterações na fisiologia de plantas inoculadas de um clone resistente e de um suscetível durante o processo infeccioso por *E. psidii*, especialmente quanto às trocas gasosas e a fluorescência da clorofila *a*, com ênfase para os danos da maquinaria fotossintética. No terceiro capítulo, avaliou-se a resistência de 32 espécies de *Eucalyptus* e *Corymbia* e oito espécies de outros gêneros de *Myrtaceae* como potenciais hospedeiras de *Erwinia psidii*.

REFERÊNCIAS

- Arriel DAA, Fonseca NR, Guimarães LMS, Hermenegildo PS, Mafia RG, Borges Júnior N, Souza HP, Alfenas AC. (2014). Wilt and die-back of *Eucalyptus* spp. caused by *Erwinia psidii* in Brazil. *Forest Pathology*. 44: 255-265.
- Burrill TJ. (1880). Anthrax of fruit trees or the so-called fire blight of pear, and twig blight of apple tree. *Proceedings of the American Association for the Advancement of Science* 29: 583-597.
- Coelho MVS, Mendes AP, Marques ASA. (2002). Seca dos ponteiros da goiabeira causada por *Erwinia psidii*: levantamento e caracterização. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, EMBRAPA. Brasília, DF. Comunicado Técnico, nº59, 8p.
- Coutinho TA, Brady CL, Vaart M, Van der Wart M, Venter SN, Telechea N, Rolfo M, Perez C, Wingfiel MJ. (2011). A new shoot and stem disease of *Eucalyptus* species caused by *Erwinia psidii*. *Australasian Plant Pathology*. 40: 55-60.
- Ferraz HGM, Demuner GA, Guimarães LMS, Arriel DAA, da Silva AC, Junior NB, Mafia RG, Alfenas AC. (2015). Methods of inoculation and evaluation of *Erwinia psidii* in eucalypt. *Forest Pathology* 46: 240-247.
- Hauben L, Moore ER, Vauterin L, Steenackers M, Mergaert J, Verdonck L, Swings J. (1998). Phylogenetic position of phytopathogens within the Enterobacteriaceae. *Systematic and Applied Microbiology* 21: 384-397.
- Hermenegildo PS. (2015). Seca de ponteiros, causada por *Erwinia psidii*: Diversidade genética do patógeno e resistência em *Eucalyptus* spp. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Viçosa, Brasil, 38 p.
- Marques ASA, Coelho MVS, Ferreira MASV, Damasceno JPS, Mendes AP, Vieira TM. (2007). Seca dos ponteiros da goiabeira causada por *Erwinia psidii*: Níveis de incidência e aspectos epidemiológicos. *Revista Brasileira de Fruticultura*. 29: 488-493.
- Milčevićová R, Gosch C, Halbwrith H, Stich K, Hanke MV, Peil, A., ... & Hausman, J. F. (2010). *Erwinia amylovora*-induced defense mechanisms of two apple species that differ in susceptibility to fire blight. *Plant Science* 179: 60-67.

- Palladino C, Pérez G, Alonso R, Pérez CA. (2013). Identificación y control de enfermedades bacterianas en plantaciones jóvenes de *Eucalyptus dunnii* y *E. grandis*. In: V Jornada técnica de protección forestal. Avances de investigación en plagas y enfermedades forestales. Serie Técnica N° 209, Montevideo, Uruguay.
- Puławska J, Sobiczewski P. (2012). Phenotypic and genetic diversity of *Erwinia amylovora*: the causal agent of fire blight. *Trees-Structure and Function* 26: 3-12.
- Roberts RG, Sawyer AJ. (2008). An updated pest risk assessment for spread of *Erwinia amylovora* and fire blight via commercial apple fruit. *Crop Protection* 27: 362-368.
- Rodrigues Neto J, Robbs CF, Yamashiro TA. (1987). A bacterial disease of guava (*Psidium guajava*) caused by *Erwinia psidii* sp. nov. *Fitopatologia Brasileira*. 12: 345-350.
- Schaad NW. (2001). Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. St. Pau-Minesota. APS Press The American Phytopathological Society.
- Smits TH, Rezzonico F, Kamber T, Blom J, Goesmann A, Frey JE, Duffy B. (2010). Complete genome sequence of the fire blight pathogen *Erwinia amylovora* CFBP 1430 and comparison to other *Erwinia* spp. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 23: 384-393.
- Teixeira ACO, Marques ASA, Ferreira MASV. (2009). Low genetic diversity among pathogenic strains of *Erwinia psidii* from Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*. 40: 678-684.
- Vanneste JL, Eden-Green S. (2000). Migration of *Erwinia amylovora* in host plant. Vanneste JL(Ed.). *Fire Blight: The Disease and its Causative Agent, Erwinia amylovora*. CABI Publishing, Oxon, UK.
- Youle D, Cooper RM. (1987). Possible determinants of pathogenicity of *Erwinia amylovora*, evidence for an induced toxin. *Acta Horticulturae* 217: 161-166.
- Winslow CEA, Broadhurst J, Buchanan RE. (1920) The families and genera of the bacteria Erwinae. *Journal of Bacteriology* 5: 209.

ARTIGO 1

Infecção de *Erwinia psidii* em eucalipto

Nilmara Pereira Caires, Daniella Flávia Said Heid Schettini Silva, Lúcio Mauro Silva Guimarães, Fabrício Ávila Rodrigues, Acelino Couto Alfenas

Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais 36570-900, Brasil

Autor para correspondência: Acelino Couto Alfenas, e-mail: aalfenas@ufv.br

Keywords: bacteriose, biofilme, die-back, microscopia eletrônica de varredura, patógeno vascular.

ABSTRACT

Dieback, caused by the bacterium *Erwinia psidii*, is an emerging disease in the eucalyptus culture that has been causing damage to the crop. Since this is a new pathosystem, several aspects of this interaction need elucidation. In this work, the process of colonization and infection of the pathogen in the host tissues was studied, using scanning electron microscopy. Based on the results obtained, the bacterium moved mainly in the acropetal or basipetal direction, to a lesser extent, but always through the xylem. No colonization was observed in the phloem tissues. Besides the xylem, the intercellular spaces and parenchyma tissues were also colonized by *E. psidii*. In these, the bacteria formed aggregates, which may contain fibrillar material enveloping them. The observation of bacterial cells around the xylem vessel points indicated a possible route of pathogen movement in the plant outside the vascular tissue.

INTRODUÇÃO

Com uma área de aproximadamente 5,6 milhões de hectares e com o incremento volumétrico médio anual de 36 m³/ha/ano (IBÁ, 2016), o Brasil possui a maior área plantada e a maior produtividade de *Eucalyptus* spp. no mundo. O grande potencial produtivo da cultura, uso múltiplo da madeira, adaptabilidade à maioria das condições edafoclimáticas do país, seu rápido crescimento e sua capacidade de rebrota, o que permite sua condução por talhadia, fazem da eucaliptocultura um setor em rápida expansão no país. Nas últimas décadas, com o aumento do plantio e a introdução da cultura em novas áreas, novos patógenos têm sido constados em eucalipto no Brasil (Alfenas et al., 2004; 2011). Dentre esses, merece destaque a bactéria *Erwinia psidii* Rodrigues Neto, Robbs & Yamashiro, agente causal da murcha e seca de ponteiros do eucalipto (Coutinho et al., 2011; Arriel et al., 2014). *E. psidii* pertencente à família Enterobacteriaceae, foi descrita pela primeira vez em goiabeira (*Psidium guajava* L.) no Brasil. É considerada, atualmente, uma das principais doenças dessa cultura (Teixeira et al., 2009). No início da década 2010, a doença foi observada em *Eucalyptus* spp. no Uruguai e na Argentina (Coutinho et al., 2011) e no Brasil (Arriel et al., 2014).

A ocorrência da enfermidade tem sido observada principalmente em plantações jovens de eucalipto de até 24 meses de idade (Arriel et al., 2014). Lesões necróticas avermelhadas ou bronzeadas no pecíolo e na nervura central das folhas é um dos primeiros sintomas causados pela infecção de *E. psidii*. Além disso, a bactéria induz o murchamento das plantas e a formação de cancos na haste principal que, quando seccionada transversalmente, apresenta escurecimento da medula e exsudação macroscopicamente visível de pus bacteriano. Com o desenvolvimento da doença, ocorre a morte dos ponteiros e, conseqüentemente, a quebra da dominância apical e o surgimento de brotações laterais atrasando, assim, o crescimento das plantas (Arriel et al., 2014, Coutinho et al. 2011). Em determinados locais de cultivo e épocas do ano, a doença pode

atingir até 100% de incidência reduzindo sobremaneira a capacidade produtiva do eucalipto (Arriel et al., 2014).

O entendimento do processo infeccioso de *E. psidii* pode embasar a adoção de medidas eficientes de controle da doença. Considerando a falta de informação sobre o processo infeccioso de *E. psidii* em plantas de eucalipto, o presente estudo objetivou avaliar por meio de microscopia eletrônica da varredura a colonização da bactéria nos tecidos e a sua movimentação no sistema vascular.

MATERIAL E MÉTODOS

Material Vegetal

Mudas do clone CLR 360 (*E. urophylla* × *E. globulus*), previamente identificado como suscetível à seca de ponteiros (Ferraz et al., 2015), foram transplantadas para sacolas com capacidade de 2 L contendo o substrato Carolina Soil (Sphagnum 70%, palha de arroz torrefada 20%, perlita 10%) enriquecido com superfosfato (6.0 kg m^{-3}) e Osmocote (19: 06: 10 em 1.5 kg m^{-3}). Durante todos os experimentos, as plantas foram mantidas em casa de vegetação com temperatura média de $28 \pm 5^\circ\text{C}$, irrigadas duas vezes ao dia e fertilizadas quinzenalmente com solução de NPK (05: 10: 30 a 6 g/L).

Inoculação das plantas com *E. psidii*

Aos 30 dias após o transplante, as mudas foram inoculadas com o isolado LPF 435 de *E. psidii* pertencente a coleção de culturas do Laboratório de Patologia Florestal/Bioagro/ UFV, o qual foi previamente caracterizado por Arriel et al. (2014). O isolado bacteriano foi cultivado em meio de cultura Luria-Bertani (LB) sólido por 24 h na temperatura de $28 \pm 5^\circ\text{C}$. Com o auxílio de uma agulha estéril, foi realizado um delicado ferimento na axila de uma folha localizada no terço médio de cada planta. Sobre o ferimento, depositou-se células bacterianas com auxílio de um palito de madeira

esterilizado. Após a inoculação, as plantas foram mantidas em casa de vegetação com temperatura de $28 \pm 5^\circ\text{C}$. Plantas apenas com ferimento na axila foliar serviram como tratamento controle. Foram utilizadas três repetições por tratamento (plantas inoculadas ou não inoculadas), sendo uma planta por repetição.

Translocação de *E. psidii* na haste principal das mudas de Eucalipto

Foram retirados, a partir do ponto de inoculação, fragmentos da haste principal ($\approx 2 \text{ mm}^2$) em diferentes alturas no sentido da base para o ápice e do ápice para a base aos 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 e 16 dias após inoculação (dai). Para cada amostra, foi realizado o teste de exsudação para confirmar microscopicamente a presença de exsudado bacteriano. Para os fragmentos onde se observou a presença de exsudado bacteriano, a bactéria foi isolada segundo os procedimentos descritos por Mafia et al. (2016), e a identidade da bactéria reisolada foi confirmada por PCR.

Para tal, o DNA bacteriano foi extraído utilizando o kit Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega) a partir das culturas bacterianas cultivadas em meio 523 (Kado e Heskett, 1970) líquido a 28°C por 24 h, sem agitação. Utilizou-se $10 \text{ ng}/\mu\text{L}$ de DNA para uma reação de PCR com volume total de $25 \mu\text{L}$ incluindo $1\times$ Dream Taq Green PCR Master Mix (Fermentas, Lithuania) e $1,5 \mu\text{L}$ dos primers específicos Ep2L (3' CCA AAA AGC TTG GTG TGG ATA 5') and Ep2R (3' AAA TTG GTG ACT CGC ACA TG 5') em termociclador Veriti 96 well (AB Applied Biosystems) nas condições descritas por Silva et al. (2015). O produto da reação de PCR foi analisado em gel de agarose a 2% com tempo de corrida de aproximadamente 40 min.

Preparação dos fragmentos da haste principal e de folhas para observação no microscópio eletrônico de varredura (MEV)

Fragmentos da haste principal ($\approx 1 \text{ cm}$) foram coletados até os 5 cm abaixo e acima do ponto de inoculação com auxílio de um bisturi esterilizado aos 2, 4, 6, 8, 10,

12, 14 e 16 dai. Fragmentos de folhas ($\approx 1 \text{ cm}^2$) apresentando sintomas da murcha e seca de ponteiros foram coletadas aos 12 dai. Fragmentos da haste principal e de folhas de plantas não inoculadas serviram como tratamento controle. Os fragmentos da haste principal e de folhas foram transferidos para frascos de vidro contendo 5 mL de fixativo Karnovsky modificado (2,5% v/v de glutaraldeído, 2% paraformaldeído em tampão cacodilato de sódio 0,05 M, pH 7,2) e mantidos em geladeira. Após 24 h, as amostras foram lavadas em tampão cacodilato de sódio (0,1 M), desidratadas em uma série alcoólica (30, 50, 70, 80, 95 e 100%) e submetidas à secagem no ponto crítico em CO₂ utilizando-se o aparelho “Critical Point Dryer”, Bal-Tec, CPD 030 (Balzers, Liechtenstein). Em seguida, alguns fragmentos foram seccionados com lâmina de barbear inox estéril na espessura de $\approx 2 \text{ cm}$ e juntamente com os fragmentos de folhas foram montados em stubs de alumínio e metalizados com ouro no aparelho “Sputter Coater” acoplado a um “Freezing Drying Unit”, FDU010 (Balzers, Liechtenstein) e analisados no MEV LEO-1430 (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) operando a 20 Kv e com distância de trabalho de 12 a 31 mm. Para cada época de coleta, as amostras, tanto do caule quanto das folhas, foram obtidas de três plantas inoculadas ou não com *E. psidii* e até duas amostras, ao acaso, por tempo de coleta e tratamento foram observadas no MEV.

RESULTADOS

Translocação de *E. psidii* no tecido do caule

A bactéria movimentou-se principalmente no sentido acropetal a partir do ponto de inoculação no caule (Figura 1), sendo que aos 5 dai, só foi observada ascendentemente a 4 cm acima do ponto de inoculação. A bactéria translocou-se tanto acropetal, quanto basipetalmente, sendo neste sentido maior dificuldade (Fig. 1). Não foram realizadas avaliações a partir dos 15 dai devido a morte do ponteiro das plantas.

Colonização dos tecidos do caule e da folha por *E. psidii*

Observou-se a presença de *E. psidii* como células individuais ou formando colônias, variando de pequenos a grandes agregados bacterianos, no mesofilo, espaços intercelulares e nos vasos do xilema (Fig. 2). Células bacterianas não foram detectadas nos vasos do floema. As células bacterianas encontravam-se fortemente envolvidas por uma matriz ou frouxamente agregadas (Fig. 2A-B). Nos vasos do xilema, tanto em cortes longitudinais quanto transversais, *E. psidii* foi observada predominante no espessamento em espiral da parede secundária (Fig. 2C-D).

Nos elementos traqueais, células bacterianas individuais ou formando pequenos ou grandes agregados, foram observadas ao redor e sobre as pontações dos vasos do xilema (Fig. 3). Em estágios avançados da infecção por *E. psidii*, as células bacterianas colonizaram o parênquima a partir dos vasos do xilema culminando com a necrose do tecido do caule.

A partir dos 10 dai, tiloses, material de natureza fibrilar, goma e, em raras ocasiões, cristais ocluíram os vasos do xilema (Fig. 4). Tanto no pecíolo e na folha, células bacterianas e material de natureza fibrilar foram encontrados nos parênquimas paliádicos (Fig. 5A) e lacunoso (Fig. 5B), além dos feixes vasculares (Fig. 5). Frequentemente, observou-se a presença de material de natureza fibrilar conectando as células bacterianas vizinhas, o que contribuiu para a aderência das mesmas nas paredes dos vasos do xilema. Células bacterianas semelhantes às observadas nos tecidos inoculados não foram encontradas nos fragmentos do caule e de folhas das plantas não inoculadas (dados não apresentados).

DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo mostram, pela primeira vez, a capacidade de *E. psidii* de colonizar sistemicamente a haste principal de plantas de eucalipto culminando com a sua colonização no tecido foliar. A partir do ponto de inoculação, *E. psidii* foi capaz de se movimentar tanto acropetal quanto basipetalmente, colonizando com eficiência o xilema e as células parenquimáticas adjacentes, além dos espaços intercelulares. No tecido foliar, a bactéria colonizou os parênquimas paliçádico e lacunoso, além do sistema vascular.

Embora o floema seja rico em nutrientes, vários patógenos vasculares multiplicam-se no xilema, um ambiente pobre em nutrientes e com pouca capacidade de responder à infecção por meio de mecanismos de defesa (Purcell & Hopkins, 1996). Nos vasos do xilema, a bactéria está minimamente exposta aos mecanismos de defesa das plantas, devido a sua rápida migração e à lignificação das paredes das células xilemáticas (Bogs et al., 1998). A presença de *E. psidii* sobre as pontuações destas células indica que a movimentação transversal pode ocorrer entre os vasos através dos elementos traqueais. No presente estudo, a ausência da colonização dos tecidos floemáticos por *E. psidii* permite concluir que a movimentação da bactéria ocorre exclusivamente via xilema, mesmo no sentido basipetal. A colonização dos vasos do xilema tanto basipetal ou acropetalmente foi reportado para os patossistemas tomate-*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Xu et al., 2010), melão e abobrinha-*E. tracheiphila* (Vrisman et al., 2016).

A degradação e a embolia do sistema vascular, o transporte reverso de água na ausência de luz ou contra o fluxo por meio do pilus bacteriano explicam o transporte basipetal das células bacterianas nos vasos do xilema (Barak et al., 2002; Bove & Garnier, 2002; Meng et al., 2005). O transporte reverso de água no xilema, no sentido do ápice

para a base, pode ocorrer quando esse está sujeito a uma pressão negativa devido a uma baixa absorção de água pelas raízes e uma reduzida transpiração nas folhas (Tatter & Tatter, 1999). Devido à pressão hidráulica negativa nos vasos do xilema do caule de macieira, *E. amylovora* foi detectada nas raízes a partir da sua inoculação na parte aérea (Bogs et al., 1998).

Tanto *Ralstonia solanacearum* quanto *Xylella fastidiosa* são capazes de colonizar os vasos do xilema contra o fluxo de água devido à formação de pili (Liu et al., 2001; Meng et al., 2005). Considerando que *E. amylovora* produz pili bacteriano do tipo IV (Koczan et al., 2011) é plausível aventar a hipótese que em *E. psidii* essa estrutura também colabora para maximizar a colonização dos tecidos do caule pela bactéria. Adicionalmente, essa hipótese é reforçada pela ocorrência da degradação dos vasos do xilema em estádios avançados da infecção por *E. psidii*. De acordo com Koczan et al. (2011), a produção de pili por outras espécies do gênero *Erwinia* colaborou para o transporte por pressão negativa no xilema.

A partir dos 10 dai, tiloses foram observadas nos vasos do xilema. As tiloses, formadas em resposta à infecção por patógenos vasculares, resulta da hipertrofia e invaginação do protoplasma de células do parênquima adjacentes aos vasos do xilema para conter o avanço do patógeno, mas quando formada tardiamente, a mesma acaba obstruindo o fluxo de água e nutrientes, resultando no sintoma de murcha, causado por patógenos vasculares (Stevenson et al., 2004).

Material de natureza fibrilar foi encontrado com frequência nas células colonizadas por *E. psidii*. A produção de material de natureza fibrilar por certos tipos de patógenos bacterianos como *Xylella fastidiosa* Wells, é comum e certamente desempenha a função de adesão das células bacterianas no tecido da planta (Bashan et al., 1991; Janissen et al., 2015; Levanony & Bashan, 1991). Além disso, o material fibrilar pode

estar associado com a formação do biofilme bacteriano. O biofilme é uma comunidade microbiana envolta numa matriz celular, na qual as células bacterianas coordenam seu comportamento utilizando moléculas sinalizadoras para que se tornem mais resistentes à agentes antimicrobianos (Fleming & Wingender, 2010).

Considerando a importância da seca de ponteiros para o cultivo do eucalipto e a falta de informação na literatura sobre a colonização e movimentação da bactéria, este estudo fornece informações úteis para ajudar a desenvolver estratégias de controle eficazes. Além disso, este estudo abre perspectivas de investigações sobre a formação de biofilme por *E. psidii* em eucalipto.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à CMPC Celulose Riograndense pelo suporte financeiro, à Clonar Resistência a Doenças Florestais pela disponibilização da estrutura para montagem dos experimentos e ao Núcleo de Microscopia e Microanálise-CCB/UFV pela utilização de equipamentos.

REFERÊNCIAS

- Alfenas AC, Zauza EAV, Mafia RG, de Assis TF. (2004). Clonagem e doenças do eucalipto. Viçosa: Ed. da UFV. 442p.
- Alfenas RF, Coutinho MM, Freitas CS, Freitas R. G., and Alfenas, A. C. (2011). Developing clones of *Eucalyptus cloeziana* resistant to rust (*Puccinia psidii*). In: Proc. 4th Int. Workshop Genet. Host-Parasite Interactions in Forestry: Disease and Insect Resistance in Forest Trees.
- Arriel DAA, Fonseca NR, Guimarães LMS, Hermenegildo PS, Mafia RG, Borges Júnior N, Souza HP, Alfenas AC. (2014). Wilt and die-back of *Eucalyptus* spp. caused by *Erwinia psidii* in Brazil. *Forest Pathology* 44: 255-265.
- Barak JD, Koike ST, Gilbertson RL. (2002). Movement of *Xanthomonas campestris* pv. *vitians* in the stems of lettuce and seed contamination. *Plant Pathology* 51: 506-512.
- Bashan Y, Hanna L, Robert E. (1991). Root surface colonization of non-cereal crop plants by pleomorphic *Azospirillum brasilense*. *Microbiology* 137: 187-196.
- Bogs J, Bruchmuller I, Erbar C, Geider K. (1998). Colonization of host plants by the fire blight pathogen *Erwinia amylovora* marked with genes for bioluminescence and fluorescence. *Phytopathology* 88: 416-421.
- Bove JM, Garnier M. (2002). Phloem and xylem-restricted plant pathogenic bacteria. *Plant Science* 163: 1083-1098.
- Coutinho TA, Brady CL, Vaart M, Van der Wart M, Venter SN, Telechea N, Rolfo M, Perez C, Wingfiel MJ. (2011). A new shoot and stem disease of *Eucalyptus* species caused by *Erwinia psidii*. *Australasian Plant Pathology* 40: 55-60.

- Ferraz HGM, Demuner GA, Guimarães LMS, Arriel DAA, Silva AC, Borges Júnior N, Mafia RG, Alfenas AC. (2015). Methods of inoculation and evaluation of *Erwinia psidii* in Eucalyptus. *Forest Pathology* 46: 240-247.
- Flemming HC, Wingender J. (2010). The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology* 8: 623-633.
- IBÁ 2016, Indústria Brasileira de Árvores (2016), 96p.
- Janissen R, Murillo DM, Niza B, Sahoo PK, Nobrega MM, Cesar CL, Cotta MA (2015). Spatiotemporal distribution of different extracellular polymeric substances and filamentation mediate *Xylella fastidiosa* adhesion and biofilm formation. *Scientific Reports* 5: 9856.
- Kado, C. I., & Heskett, M. G. (1970). Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. *Phytopathology* 60: 969-976.
- Koczan JM, Lenneman BR, McGrath MJ, Sundin GW. (2011) Cell surface attachment structures contribute to biofilm formation and xylem colonization by *Erwinia amylovora*. *Applied and Environmental Microbiology* 77: 7031-7039.
- Levanony H, Bashan Y. (1991). Active attachment of *Azospirillum brasilense* to root surface of non-cereal plants and to sand particles. *Nitrogen Fixation* 3: 187-193.
- Liu HL, Kang YW, Genin S, Schell MA, Denny TP. (2001). Twitching motility of *Ralstonia solanacearum* requires a type IV pilus system. *Microbiology* 147: 3215-3229.
- Mafia R, Alfenas AC. (2016). Métodos em Fitopatologia. Viçosa: Ed. UFV. 516 p.

- Meng Y, Li Y, Galvani CD, Hao G, Turner JN, Burr TJ, Hoch HC. (2005). Upstream migration of *Xylella fastidiosa* via pilus driven twitching motility. *Journal of Bacteriology* 187: 5560-5567.
- Oh C-K, Beer SV. (2005). Molecular genetics of *Erwinia amylovora* involved in the development of fire blight. *FEMS Microbiology Letters* 253: 185-192.
- Purcell AH, Hopkins DL. (1996). Fastidious xylem-limited bacterial plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 34: 131-151.
- Rodrigues Neto J, Robbs CF, Yamashiro TA. (1987). A bacterial disease of guava (*Psidium guajava*) caused by *Erwinia psidii* sp. nov. *Fitopatologia Brasileira* 12: 345-350.
- Silva CF, Torres P, Oliveira NP, Marques AS, Ferreira MA. (2015). PCR-based methods for detection of *Erwinia psidii* on guava. *Tropical Plant Pathology* 40: 251-259.
- Stevenson JF, Matthews MA, Greve LC, Labavitch JM & Rost TL. (2004). Grapevine susceptibility to Pierce's disease II: progression of anatomical symptoms. *American Journal of Enology and Viticulture* 55: 238-245.
- Tatter TA, Tatter SJ. (1999). Evidence for the downward movement of materials injected into trees. *Journal of Arboriculture* 25: 325-332.
- Vrisman CM, Deblais L, Rajashekara G, Miller SA. (2016). Differential colonization dynamics of cucurbit hosts by *Erwinia tracheiphila*. *Phytopathology* 106: 684-692.
- Xu X, Miller SA, Baysal-Gurel F, Gartemann KH, Eichenlaub R, Rajashekara G. (2010). Bioluminescence imaging of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* infection of tomato seeds and plants. *Applied Environmental Microbiology* 76: 3978-3988.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Translocação de *Erwinia psidii* em hastes de plantas de eucalipto acropetal e basipetalmente, a partir do ponto de inoculação, aos 5, 8, 11, 14 e 17 dias após inoculação. As barras representam o erro padrão da média de 5 repetições.

Figura 2. Eletromicrografias de varredura da colonização dos tecidos da haste de plantas de eucalipto aos 10 dias após inoculação com *Erwinia psidii* nos intervalos 2- 3 cm acima (A) e abaixo (B) do ponto de inoculação. Colonização bacteriana e oclusão dos vasos em cortes longitudinal (C) e transversal (D) da haste. Barras: 2 (A, B e C) e 10 μm (D). Setas indicam células bacterianas no espessamento em espiral do xilema.

Figura 3. Eletromicrografias de varredura da colonização dos tecidos da haste de plantas de eucalipto aos 10 dias após inoculação com *Erwinia psidii*. Agregado bacteriano nos vasos do xilema e células bacterianas (seta) próximas às pontações no xilema (seta). Barra: 2 μm .

Figura 4. Eletromicrografias de varredura da colonização dos tecidos da haste de plantas de eucalipto aos 18 dias após inoculação com *Erwinia psidii*. Obstrução dos vasos do xilema por tiloses (A), material de natureza fibrilar (B), gomas (C) e cristais (seta) (D). Barras: 10 (A, B e C) e 2 μm (D).

Figura 5. Eletromicrografias de varredura da colonização do tecido foliar de plantas de eucalipto em cortes longitudinal (A) e transversal (B) aos 12 dias após inoculação com *Erwinia psidii*. Intensa colonização do tecido foliar por células de *E. psidii* (setas) e presença de material de natureza fibrilar. Barra: 10 μm .

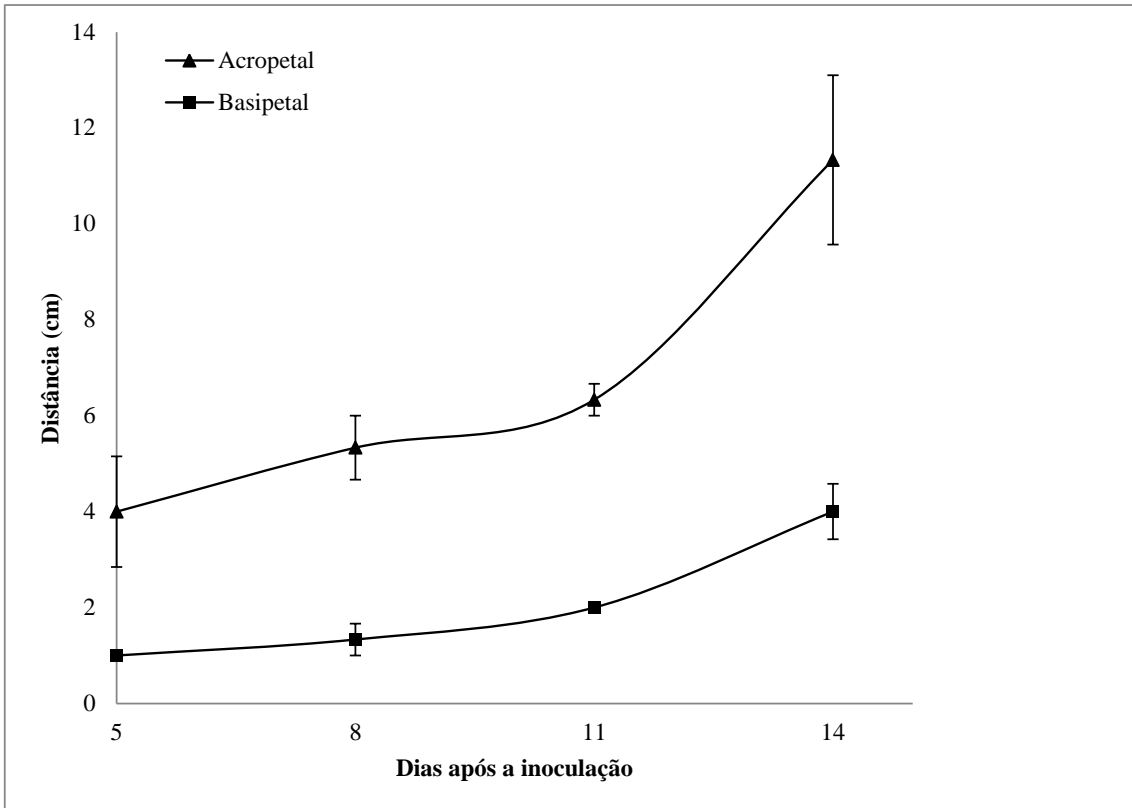


Figura 1

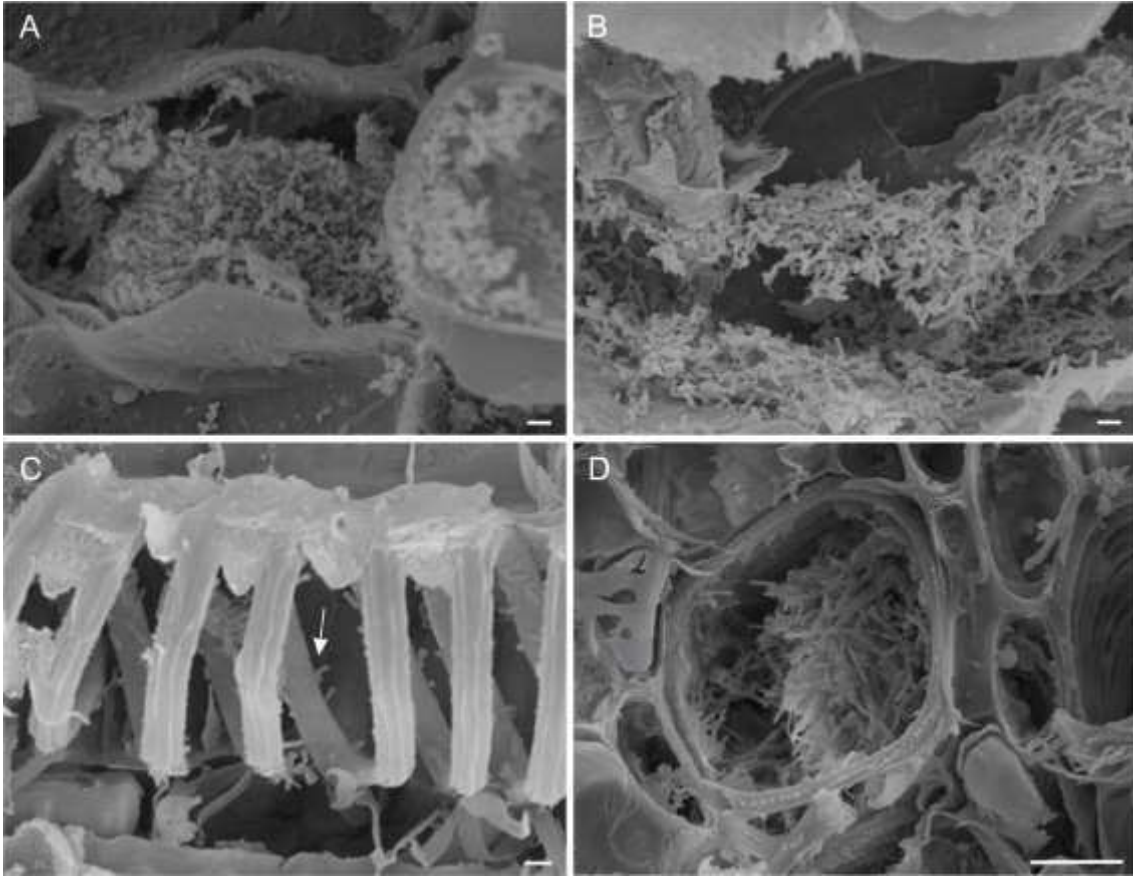


Figura 2

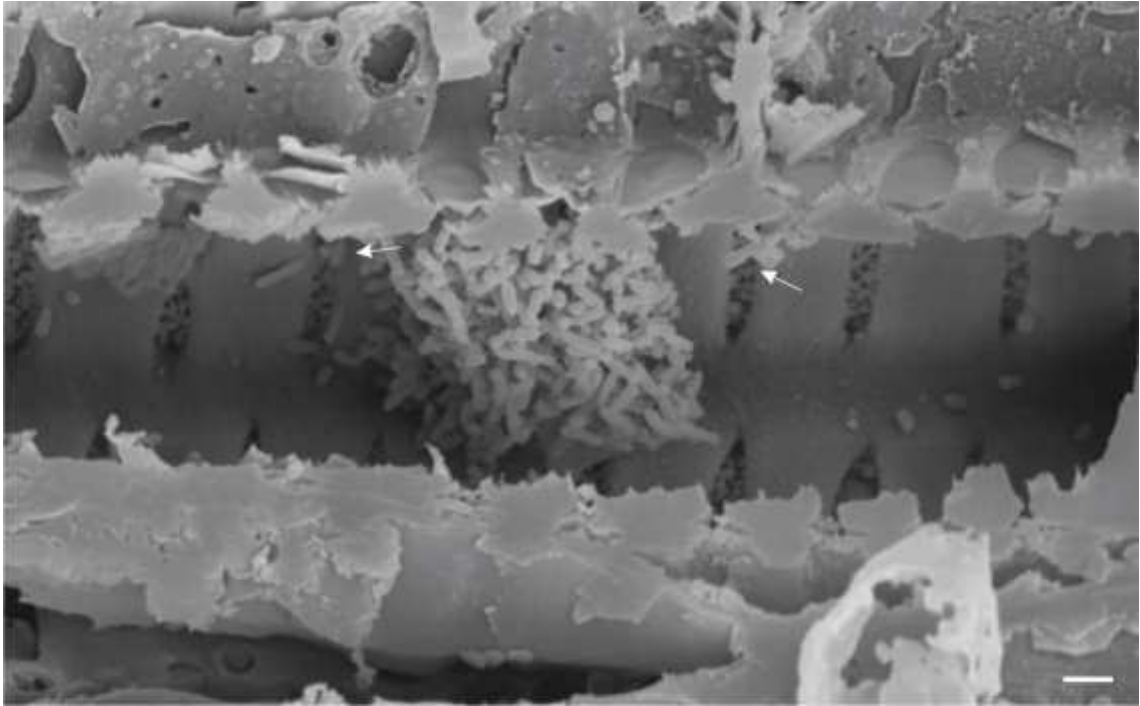


Figura 3

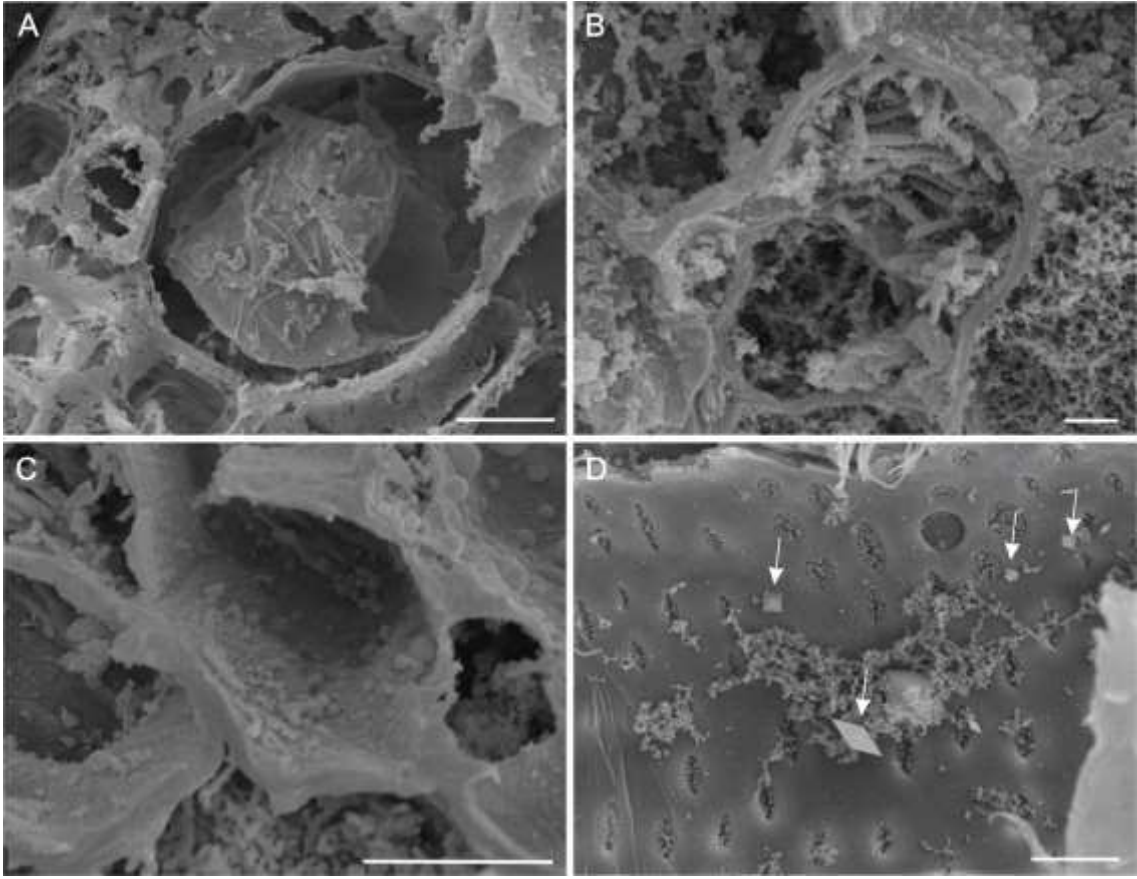


Figura 4

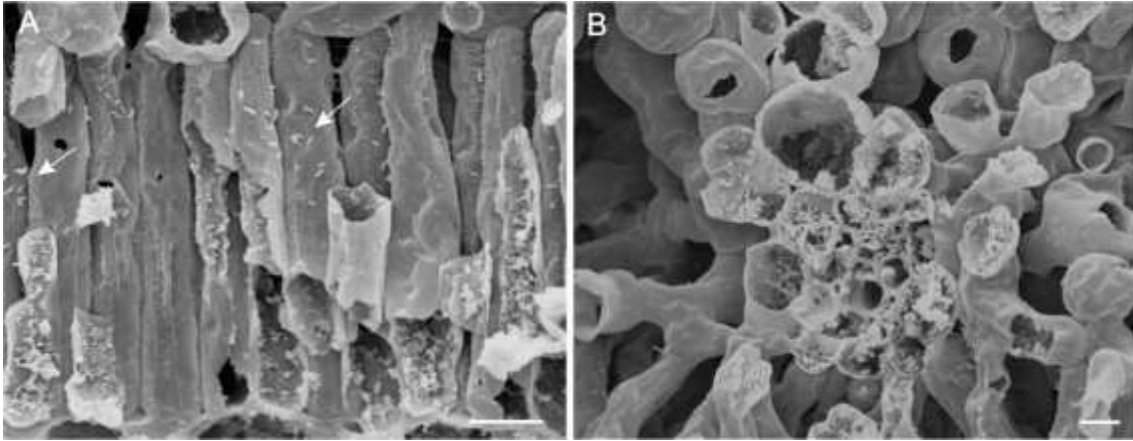


Figura 5

ARTIGO 2

Eficiência fotossintética de clones de eucalipto resistente e suscetível à seca de ponteiros causada por *Erwinia psidii*

Nilmara Pereira Caires, Carlos Eduardo Aucique Pérez, Fabrício Ávila Rodrigues, Acelino Couto Alfenas

Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais 36570-900, Brasil

Autor para correspondência: Acelino Couto Alfenas, e-mail: aalfenas@ufv.br

Keywords: bacteriose, die-back, , fotossíntese, murcha, patógeno vascular

ABSTRACT

In this study, we investigated the physiological changes in eucalyptus plants of susceptible and resistant clones to *Erwinia psidii* infection. The net assimilation rate of CO₂ (A), the stomatal conductance to water vapor (g_s), the internal CO₂ concentration (C_i) and the transpiration rate (E) was estimated at 9, 11 and 15 days after inoculation (dai). Chlorophyll fluorescence parameters: fluorescent quantum efficiency (F_v/F_m), effective PSII quantum yield [Y(II)], quantum yield of regulated energy dissipation [Y(NPQ)] and yield of other non-regulated energy dissipation [Y(NO)] were also evaluated. In the resistant clone, there was no change in the gas exchange for plants inoculated and non-inoculated plants. However, for plants of the susceptible clone, there were significant reductions in A , g_s , C_i and E . At 9 dai, there was an increase in values of Y(NPQ) for the resistant and susceptible clones plants. There were significant decreases of 35, 51 and 55% in the F_v/F_m and Y(II) values, respectively, and a significant increase of 132% in the Y(NO) values in relation to the non-inoculated plants of the susceptible clone at 15 dai. *E. psidii* infection caused changes in the photosynthetic machinery of the clone plants susceptible mainly to photodissipation and photoprotection.

INTRODUÇÃO

A fotossíntese é o processo chave para a geração de energia para os diferentes processos fisiológicos vitais das plantas (Vilas-Boas et al., 2007). A infecção por patógenos altera o metabolismo dos seus hospedeiros interferindo na fotossíntese por danos causados ao aparato fotossintético ou pela mobilização de fontes de carbono para prover os metabólitos necessários para as rotas relacionadas à defesa (Karpinski et al., 2003).

Os patógenos que colonizam sistemicamente os tecidos da planta e induzem marchas vasculares ocasionam redução na fotossíntese por interferirem na regulação estomática (Ribeiro et al., 2003). Quando as folhas apresentam os sintomas reflexos da infecção por patógenos, a redução fotossintética é ocasionada pela combinação ou não do fechamento dos estômatos, do estresse hídrico e da clorose do tecido foliar (Hampton et al., 1990).

Embora a avaliação das trocas gasosas seja uma ferramenta importante para determinar a taxa fotossintética, essa pode não ser eficiente para quantificar os danos ocorridos nos cloroplastos durante o processo infeccioso de um determinado patógeno (Baker, 2008). Assim, a avaliação das trocas gasosas em conjunto com a eficiência fotoquímica, obtida por meio dos parâmetros da fluorescência da clorofila *a*, tem sido uma maneira de monitorar as alterações ocorridas no desempenho fotossintético das plantas (Baker & Rosenqvist, 2004). A fluorescência da clorofila *a* tem sido utilizada com sucesso para distinguir um cultivar resistente de uma suscetível à determinada doença antes mesmo do aparecimento dos sintomas, bem como diferenças no nível de resistência (Berger et al., 2007).

Erwinia psidii Rodrigues Neto, Robbs & Yamashiro causa o colapso do tecido foliar e a morte dos ponteiros de plantas de goiabeira (Rodrigues Neto et al., 1987). Essa

bactéria também foi relatada causando doença em plantas jovens de eucalipto (Coutinho et al. 2011, Arriel et al., 2014), nas quais ocorre seca de ponteiros, perda da dominância apical e murcha das plantas que pode tornar-se irreversível levando à morte. Nas folhas, ocorrem lesões necróticas no pecíolo e na nervura central (Coutinho et al. 2011; Arriel et al., 2014). Em determinadas regiões e épocas do ano, a incidência da doença pode atingir 100% das plantas, o que pode limitar o cultivo de alguns clones produtivos e suscetíveis e gerar grandes prejuízos (Arriel et al., 2014).

Conforme demonstrado no Capítulo 1 desta tese, *E. psidii* coloniza os vasos do xilema e produz abundante material de natureza fibrilar bloqueando, assim, o fluxo de água e nutrientes e causando o murchamento foliar que por consequência acaba por afetar a fotossíntese e o metabolismo primário das plantas infectadas.

Observações de campo e estudos conduzidos no Laboratório de Patologia Florestal/UFV, descritos no Capítulo 3 dessa tese, demonstraram ocorrer variabilidade genética de *Eucalyptus* spp. e *Corymbia* spp. quanto à resistência à seca de ponteiros. Entretanto, essa variabilidade não tem sido explorada e informações sobre como a suscetibilidade ou a resistência do eucalipto à seca de ponteiros afeta o desempenho fotossintético das plantas infectadas são inexistentes na literatura. Assim, hipotetiza-se que um clone de eucalipto resistente à seca de ponteiros é mais eficiente em preservar o fluxo de água nos vasos do xilema e, conseqüentemente, manter uma quantidade de água nas folhas aceitável do ponto de vista fisiológico que para que a fotossíntese não seja impactada negativamente. Desse modo, esse estudo objetivou determinar o desempenho fotossintético de clones de eucalipto resistente e suscetível à infecção por *E. psidii*, avaliando-se as trocas gasosas e dos parâmetros de fluorescência da clorofila *a*.

MATERIAL E MÉTODOS

Material Vegetal

Mudas clonais de *E. urophylla* × *E. globulus* e *E. urophylla* × *E. grandis*, previamente identificadas, respectivamente, como suscetível e resistente à seca de ponteiros foram transplantadas para sacolas plásticas de 2 L, contendo substrato (Sphagnum 70%, palha de arroz torrefada 20% e perlita 10%), enriquecido com superfosfato (6 kg/m³) e Osmocote (19:06:10, 1.5 kg/m³). Durante todos os experimentos, as plantas foram mantidas em casa de vegetação com temperatura média de 28 ± 5°C e fertilizadas quinzenalmente com solução nutritiva (NPK 05:10:30; 6 g/L).

Inoculação das plantas com *E. psidii*

Aos 30 dias após o transplântio, as mudas foram inoculadas com o isolado LPF 435 de *E. psidii*, previamente caracterizado por Arriel et al. (2014), pertencente à coleção de culturas do Laboratório de Patologia Florestal/Bioagro/UFV. O isolado foi cultivado em meio de cultura Luria-Bertani (LB) sólido a 28°C por 24 h. Com o auxílio de uma agulha estéril, realizou-se um leve ferimento na axila da primeira folha completamente expandida, localizada no terço superior de cada planta. Sobre o ferimento, depositou-se a cultura bacteriana com o auxílio de um palito de esterilizado (Ferraz et al., 2015). Após a inoculação, as plantas permaneceram em casa de vegetação a 28 ± 5°C. Plantas apenas com ferimento na axila foliar serviram como testemunha. Essa metodologia de inoculação foi utilizada em todas as análises.

Avaliação das trocas gasosas

Para a avaliação dos parâmetros de trocas gasosas, utilizou-se um sistema fechado portátil de análise da fotossíntese (LI-6400XT; LI-COR, Lincoln, NE). A câmara do aparelho foi posicionada sobre a folha anexa à axila foliar inoculada ou não com *E. psidii*.

A taxa de assimilação líquida de CO₂ (A), a condutância estomática ao vapor de água (g_s), a concentração interna de CO₂ (C_i) e a taxa de transpiração (E) foram medidos aos 9, 11 e 15 dias após inoculação (dai) entre às 9:00 e 11:00 h em condições de casa de vegetação. Nesse momento, A encontrava-se no seu máximo sob radiação fotossinteticamente ativa artificial (1000 μmol de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a nível foliar e $400 \pm 10 \mu\text{mol CO}_2$ atmosférico mol^{-1}). Todas as medições foram realizadas na temperatura de 25° C, o déficit de pressão de vapor foi mantido em, aproximadamente, 1,0 kPa e a quantidade de luz azul ajustada para 10% da densidade de fluxo de fótons para otimizar a abertura estomática.

Avaliação dos parâmetros da fluorescência da clorofila a

As imagens dos parâmetros da fluorescência da clorofila a foram obtidas das plantas dos clones resistente e suscetível não inoculadas ou inoculadas com *E. psidii* aos 9, 11 e 15 dai, utilizando-se o fluorômetro de imagem Imaging-PAM (modelo IMAG - MAX/L) e o software ImagingWin (Heinz Walz, Effeltrich, Alemanha). Duas folhas de plantas inoculadas e não inoculadas com *E. psidii* por unidade experimental, foram aclimatadas no escuro por 60 min e colocadas individualmente na câmara “charge-coupled device” (CCD) para obtenção das imagens. Primeiramente, foi calculada a fluorescência inicial (F_0) através de um pulso de luz de baixa intensidade (0,5 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, 100 μs , 1 Hz) e, posteriormente, foi emitido um pulso de luz saturante (2,400 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 10 Hz) por 0,8 s para o cálculo da fluorescência máxima (F_m), usada para o cálculo do rendimento quântico máximo do fotossistema II ($F_v/F_m = ((F_m - F_0)/F_m)$). As folhas foram expostas à luz actínica durante 4 min para obtenção da fluorescência em estado estacionário (F_s) e, subsequentemente, um pulso de luz saturante foi aplicado para obtenção da fluorescência máxima em estado de luz adaptado (F_m'). A fluorescência inicial (estado de luz adaptado) (F_0') foi estimada de acordo com Oxborough & Baker (1997). Os demais parâmetros foram calculados da seguinte forma: rendimento quântico

eficaz do PSII ($Y(II) = (F_m' - F)/F_m'$), rendimento quântico de dissipação de energia regulada ($Y(NPQ) = 1 - Y(II) - 1/(NPQ + 1 + q_L(F_m/F_0 - 1))$), rendimento quântico de dissipação de energia não regulada ($Y(NO) = 1/(NPQ + 1 + q_L(F_m/F_0 - 1))$), quenching não-fotoquímico ($NPQ = (F_m - F_m')/F_m'$) e a taxa de transporte de elétrons ($ETR = 0,5 \times \text{Yield} \times \text{PAR} \times 0,84 \mu \text{ equivalentes m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). Todos os parâmetros foram calculados com o auxílio do Software ImagingWin em quatro áreas circulares ($\approx 0,78 \text{ cm}^2$) escolhidas ao acaso em cada folha. Decréscimo ou aumento nos valores dos parâmetros obtidos em cada uma das áreas foram calculados com base nos valores obtidos nas folhas do tratamento testemunha.

Avaliação da severidade da seca de ponteiros

A severidade foi avaliada aos 9, 11 e 15 dai utilizando-se uma escala de notas proposta por Ferraz et al. (2015). Os valores de severidade foram utilizados para calcular o índice de doença de acordo com Mckinney (1923).

Delineamento experimental e análise estatística dos dados

Foram realizados dois experimentos independentes. No primeiro experimento, avaliaram-se as trocas gasosas e no segundo obtiveram-se os parâmetros da fluorescência da clorofila *a*. Os experimentos foram instalados em delineamento inteiramente casualizado com quatro tratamentos (clones resistente e suscetível inoculados ou não com *E. psidii*) e cinco repetições. Uma planta foi utilizada em cada repetição. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias dos tratamentos foram comparadas pelos testes *t* ($P \leq 0.05$) utilizando-se o software SAS versão 6.12 (SAS Institute Inc., Cary, NC).

RESULTADOS

O índice de doença foi de 40, 55 e 70% aos 9, 11 e 15 dai, respectivamente, para as plantas do clone suscetível. Não foi observado sintomas da seca de ponteiros nas plantas do clone resistente.

Aos 15 dai, houve reduções de 47, 71, 9 e 50%, respectivamente, para os valores de A , g_s , C_i e E para as plantas do clone suscetível inoculadas com *E. psidii* em relação às plantas não inoculadas (Fig. 1). Para o clone resistente, não houve diferença significativa entre plantas inoculadas ou não com *E. psidii* para nenhum dos parâmetros avaliados independente da época de avaliação.

Para o clone suscetível, houve diferença significativa para os parâmetros da fluorescência da clorofila a entre plantas inoculadas e não inoculadas aos 9 dai para $Y(NPQ)$, aos 11 dai para $[Y(II)]$ e aos 15 dai para F_v/F_m , $Y(II)$, $Y(NO)$ e ETR (Fig. 2) e houve decréscimos significativos de 35, 51 e 55% nos valores de F_v/F_m , $Y(II)$ e ETR , respectivamente, e de 33% nos valores de $Y(NO)$ aos 15 dai. Os valores de $Y(NPQ)$ aumentaram em 8 e 15%, respectivamente, para os clones resistente e suscetível aos 9 dai (Fig. 2).

DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo confirmam a hipótese de que a infecção por *E. psidii* ocasiona alterações no desempenho fotossintético perturbando todos os parâmetros de trocas gasosas e da fluorescência da clorofila a no clone suscetível, enquanto no clone resistente estes parâmetros não foram afetados (Fig. 2). Estes resultados condizem com estudos realizados com clones de *E. urophylla* resistente e suscetível ao patógeno *Puccinia psidii*, em que se verificou que em material resistente, o fungo causou ínfimas alterações nos parâmetros de trocas gasosas e da fluorescência da clorofila a , enquanto

no clone suscetível, o desenvolvimento da doença, representado pela área foliar doente, correlacionou-se negativamente com os parâmetros F_v/F_m , A , E e g_s (Alves et al., 2011). Assim, na interação *E. psidii* x eucalipto, postula-se que devido ao alto nível de resistência basal à seca de ponteiros, o clone resistente limitou a infecção pela bactéria, o que pôde ser constatado pela ausência de sintomas e inclusive ausência de exsudação de pus bacteriano.

Estudos fisiológicos envolvendo a avaliação de trocas gasosas e mais especificamente com a técnica de fluorescência da clorofila *a* para infecções bacterianas são raros na literatura, principalmente para a cultura do eucalipto (Habermann et al., 2003a, b). No melhor conhecimento dos autores, este é o primeiro estudo sobre alterações na fisiologia de plantas de eucalipto em resposta à infecção pelo patógeno vascular *E. psidii*, e o primeiro reportado para doenças de origem bacteriana nesta cultura.

Reduções nos valores de g_s foram acompanhados por decréscimo acentuado nos valores de A aos 15 dai. Sabe-se que as doenças vasculares causam, indiretamente, o fechamento dos estômatos com a finalidade de manter um potencial de água foliar acima de um valor fisiologicamente crítico (Pinheiro & Chaves, 2011). O fechamento dos estômatos exerce forte influência na taxa fotossintética uma vez que o CO_2 que será utilizado na fotossíntese entra pelos estômatos da folha por difusão através dos quais também ocorre a perda de água para a atmosfera (Addington et al., 2004). A redução na fotossíntese das plantas do clone suscetível condiz com estudos que relataram que a infecção por patógenos bacterianos tendem, em geral, reduzir a taxa fotossintética (Robinson et al., 2004; Bonfig et al., 2006). Na interação compatível *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC 3000 e *Arabidopsis thaliana*, houve decréscimo no máximo rendimento e rendimento efetivo do PSII (F_v/F_m , $Y(II)$), enquanto a dissipação não regulada ($Y(NO)$) sofreu acréscimo. Essas alterações foram observadas antes mesmo do

aparecimento dos sintomas (Bonfig et al., 2006). Na interação *E. psidii*-*Eucalyptus* sp., essas diferenças foram observadas somente quando os sintomas se tornaram visíveis dificultando, assim, o uso dos parâmetros da fluorescência da clorofila *a* para diferenciar reações incompatíveis de compatíveis fora do laboratório (Fig. 3).

A máxima eficiência na qual a luz é absorvida pelo PSII para reduzir Q_A , representado pelo parâmetro F_v/F_m , é um indicador sensível do desempenho fotossintético das plantas sendo que valores ótimos situam-se entre 0,75 a 0,85 para a maioria das espécies de plantas (Bolhàr-Nordenkampf et al., 1989; Baker, 2008). Nas plantas do clone suscetível, os valores de F_v/F_m foram, em média, de 0,5 aos 15 dai indicando dano na maquinaria fotossintética do PSII devido a infecção bacteriana.

Houve aumento nos valores de $Y(NPQ)$ aos 9 dai nas plantas dos clones resistente e suscetível. Este parâmetro refere-se à dissipação térmica regulada que ocorre no centro de reação do PSII através do ciclo das xantofilas (Kramer et al., 2004). Os maiores valores de $Y(NPQ)$ sugerem a ocorrência de dissipação do excesso de energia de excitação na forma de calor sendo um mecanismo fisiológico de fotoproteção. Nesse momento, as plantas dos clones suscetível e resistente estavam certamente reagindo à infecção por *E. psidii*. As plantas do clone resistente, no entanto, conseguiram reagir de maneira a não ter os outros parâmetros de fluorescência afetados nas avaliações subsequentes. Nas plantas do clone suscetível, houve aumento nos valores de $Y(NO)$ aos 15 dai. Decréscimos nos valores de $Y(NPQ)$ combinados com incrementos nos valores de $Y(NO)$ indicam a ocorrência de bloqueio no fluxo de elétrons necessário para as reações de transporte de elétrons na fotossíntese resultando, portanto, em danos irreversíveis na maquinaria fotossintética (Bonfig et al., 2006).

As imagens obtidas da fluorescência da clorofila *a* forneceram uma visão temporal da alteração na fotossíntese das folhas de eucalipto durante o processo infeccioso de *E. psidii* no tecido vascular. Aos 9 dai, os sintomas foram observados na nervura central da

folha devido a presença da bactéria, a qual é translocada via xilema. Aos 15 dai, a bactéria havia colonizado todo o limbo foliar, inclusive as nervuras secundárias, e causando necrose do tecido foliar que acabou por reduzir por completo a eficiência fotossintética. Embora as imagens obtidas para os parâmetros da Chl *a* foram relacionadas com o progresso da seca de ponteiros nas folhas, essa informação em combinação com os dados de trocas gasosas não mostrou uma relação direta com os valores do índice de doença. Postula-se que os parâmetros de trocas gasosas foram avaliados sempre na mesma folha ao longo do processo infeccioso de *E. psidii* e nem sempre a folha refletia o quadro sintomatológico da muda como um todo.

Os resultados do presente estudo indicam que *E. psidii* causou drásticas alterações na maquinaria fotossintética das plantas do clone suscetível de eucalipto principalmente por comprometer os mecanismos de fotodissipação e fotoproteção resultando, assim, em menor ganho fotossintético que poderia ser convertido para ativar mecanismos de defesa. Essas informações são importantes considerando que maior conhecimento sobre esse patossistema necessita ser obtido para que se possam estabelecer estratégias de controle para a seca de ponteiros.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), e ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e à CMPC Celulose Riograndense pelo suporte financeiro e à Clonar Resistência a Doenças Florestais pela disponibilização da estrutura para montagem dos experimentos.

REFERÊNCIAS

- Addington RN, Mitchell RJ, Oren R, Donovan LA. (2004). Stomatal sensitivity to vapor pressure deficit and its relationship to hydraulic conductance in *Pinus palustris*. *Tree Physiology* 24: 561-569.
- Alves AA, da Silva Guimaraes LM, de Melo Chaves AR, DaMatta FM, Alfenas AC. (2011). Leaf gas exchange and chlorophyll *a* fluorescence of *Eucalyptus urophylla* in response to *Puccinia psidii* infection. *Acta Physiologia e Plantarum* 33: 1831-1839.
- Arriel DAA, Fonseca NR, Guimarães LMS, Hermenegildo PS, Mafia RG, Borges Júnior N, Souza HP, Alfenas AC. (2014). Wilt and die-back of *Eucalyptus* spp. caused by *Erwinia psidii* in Brazil. *Forest Pathology* 44: 255-265.
- Baker NR. (2008). Chlorophyll Fluorescence: A Probe of Photosynthesis *In Vivo*. *Annual Review of Plant Biology* 59: 89-113.
- Baker NR, Rosenqvist E. (2004). Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: an examination of future possibilities. *Journal of Experimental Botany* 55: 1607-1621.
- Berger S, Sinha AK, Roitsch T. (2007). Plant physiology meets phytopathology: plant primary metabolism and plant–pathogen interactions. *Journal of Experimental Botany* 58: 4019-4026.
- Bolhar-Nordenkamp HR, Long SP, Baker NR, Oquist G, Schreiber U, Lechner EG. (1989). Chlorophyll fluorescence as probe of the photosynthetic competence of leaves in the field: a review of current instrumentation. *Functional Ecology* 3: 497-514.
- Bonfig KB, Schreiber U, Gabler A, Roitsch T, Berger S. (2006). Infection with virulent and avirulent *P. syringae* strains differentially affects photosynthesis and sink metabolism in *Arabidopsis* leaves. *Planta* 225: 1-12.

- Coutinho TA, Brady CL, Vaart M, Van der Wart M, Venter SN, Telechea N, Rolfo M, Perez C, Wingfiel MJ. (2011). A new shoot and stem disease of *Eucalyptus* species caused by *Erwinia psidii*. *Australasian Plant Pathology* 40: 55-60.
- Ferraz HGM, Demuner GA, Guimarães LMS, Arriel DAA, Silva AC, Borges Júnior N, Mafia RG, Alfenas AC. (2015). Methods of inoculation and evaluation of *Erwinia psidii* in Eucalyptus. *Forest Pathology* 46: 240-247.
- Habermann G, Machado EC, Rodrigues JD, Medina CL. (2003a). Gas exchange rates at different vapour pressure deficits and water relations of 'Pera' sweet orange plants with citrus variegated chlorosis (CVC). *Scientia Horticulturae* 98: 233-45.
- Habermann G, Machado EC, Rodrigues JD, Medina CL. (2003b). CO₂ assimilation, photosynthetic light response curves, and water relations of 'Pêra' sweet orange plants infected with *Xylella fastidiosa*. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 15: 79-87.
- Hampton, R. E., Wullschleger, S. D., and Oosterhuis, D. M. 1990. Impact of verticillium wilt on net photosynthesis, respiration and photorespiration in field-grown cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Physiological and Molecular Plant Pathology* 37: 271-280.
- IBÁ 2016, Indústria Brasileira de Árvores (2016), 96p.
- Karpinski S, Gabrys H, Mateo A, Karpinska B, Mullineaux PM. (2003). Light perception in plant disease defense signaling. *Current Opinion in Plant Biology* 6: 390-396.
- Kramer DM, Johnson G, Kiirats O, Edwards GE. (2004). New fluorescence parameters for the determination of Q_A redox state and excitation energy fluxes. *Photosynthesis Research* 79: 209-218.
- McKinney HH. (1923). Influence off soil, temperature and moisture on infection of wheat seedlings by *Helminthosporium sativum*. *Journal of Agricultural Research* 26: 195-217.

- Oxborough K, Baker NR. (1997). Resolving chlorophyll a fluorescence imaging of photosynthetic efficiency into photochemical and non-photochemical components - calculation of q_P and F_v'/F_m' without measuring F_o' . *Photosynthesis Research* 54: 135-142.
- Pinheiro C, Chaves MM. (2011). Photosynthesis and drought: can we make metabolic connections from available data? *Journal of Experimental Botany* 62: 869-882.
- Ribeiro RV, Machado EC, Oliveira LR. (2003). Early photosynthetic responses of sweet orange plants infected with *Xylella fastidiosa*. *Physiology and Molecular Plant Pathology* 62: 162-173.
- Robinson JM, Lydon J, Murphy CA, Rowland R, Smith RD. (2004). Effect of *Pseudomonas syringae* pv. *tagetis* infection on sunflower leaf photosynthetic and ascorbic acid relations. *International Journal of Plant Science* 165: 263-271.
- Rodrigues Neto J, Robbs CF, Yamashiro TA. (1987). A bacterial disease of guava (*Psidium guajava*) caused by *Erwinia psidii* sp. nov. *Fitopatologia Brasileira* 12: 345-350.
- Villas-Boas SG, Nielsen J, Smedsgaard J, Hansen MA, Roessner-Tunali U. (2007). *Metabolome Analysis: an Introduction* (Vol. 24). John Wiley & Sons.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Parâmetros de trocas gasosas. Taxa de assimilação líquida de CO₂ (A) (a e b), condutância estomática (g_s) (c e d), concentração interna de CO₂ (C_i) e transpiração (E) (e e f) determinados nas folhas de plantas de eucalipto dos clones resistente (a, c, e e g) e suscetível (b, d, i e h) não inoculadas (NI) ou inoculadas (I) com *Erwinia psidii*. Barras representam o erro padrão das médias. Para cada clone, médias dos tratamentos NI e I dentro de cada época de avaliação seguidas de um asterisco (*) são significativamente diferentes pelo teste de t. Para cada tempo de avaliação, médias dos tratamentos I seguidas de uma seta (▼) são significativamente diferentes entre clones, pelo teste de t.

Figura 2. Parâmetros da fluorescência da clorofila *a*. Máxima eficiência fotoquímica do *PS II* F_v/F_m , rendimento da fotoquímica $Y(II)$, rendimento para a dissipação $Y(NPQ)$ e rendimento por outras perdas não-fotoquímicas $Y(NO)$ determinados nas folhas de plantas de eucalipto dos clones resistente (a, c, e, g e i) e suscetível (b, d, i, h e j) não inoculadas (NI) ou inoculadas (I) com *Erwinia psidii*. Barras representam o erro padrão das médias. Para cada clone, médias dos tratamentos NI e I dentro de cada época de avaliação seguidas de um asterisco (*) são significativamente diferentes pelo teste de t. Para cada tempo de avaliação, médias dos tratamentos I seguidas de uma seta (▼) são significativamente diferentes entre clones, pelo teste de t.

Figura 3. Sintomas visíveis e imagens dos parâmetros de fluorescência da clorofila *a*. Máxima eficiência fotoquímica do *PS II* F_v/F_m , rendimento da fotoquímica $Y(II)$, rendimento para a dissipação $Y(NPQ)$, rendimento por outras perdas não-fotoquímicas $Y(NO)$ de clones resistente e suscetível de *Eucalyptus* sp. aos 9 e 15 dias após a inoculação (dai) com *Erwinia psidii*.

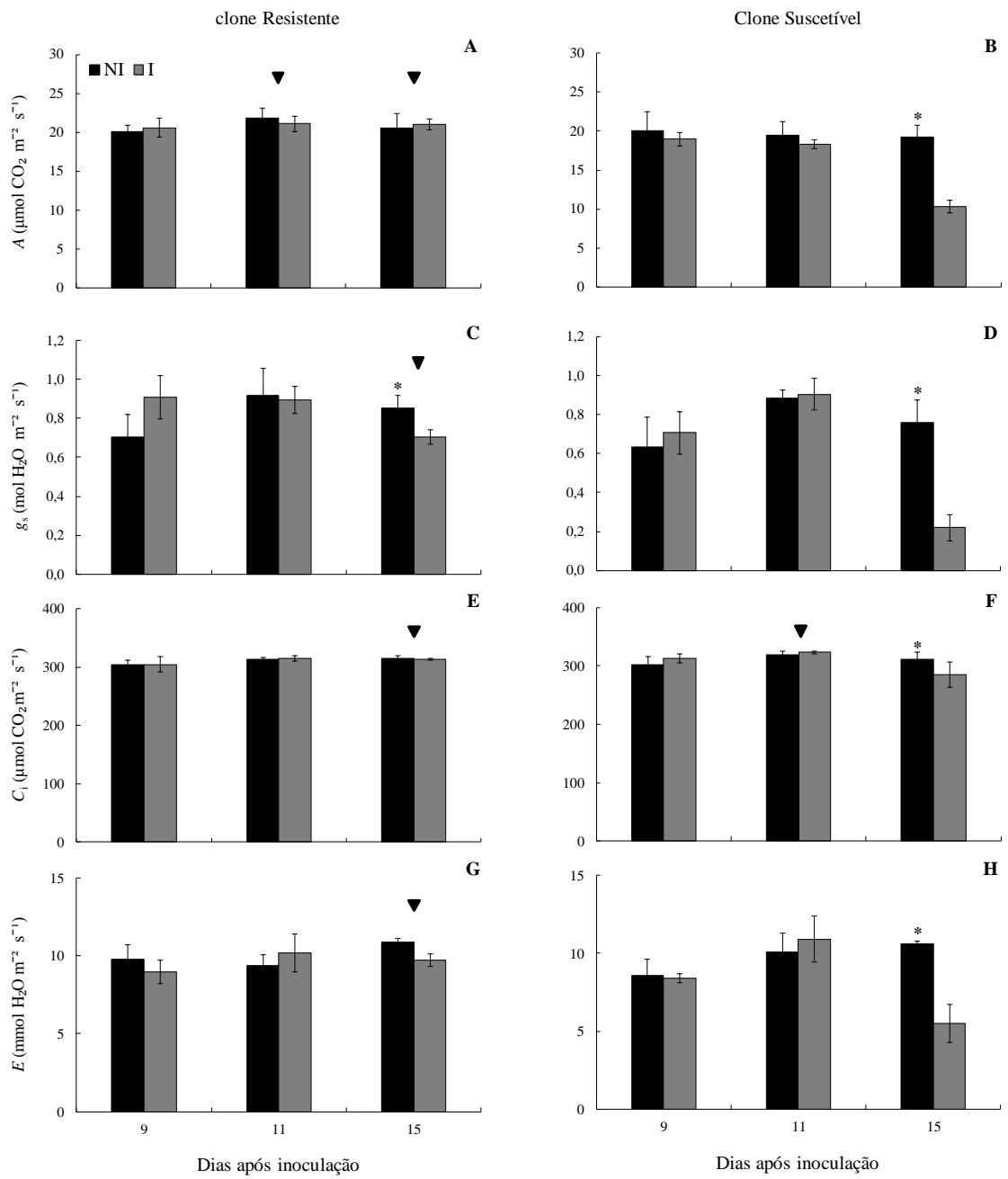


Figura 1

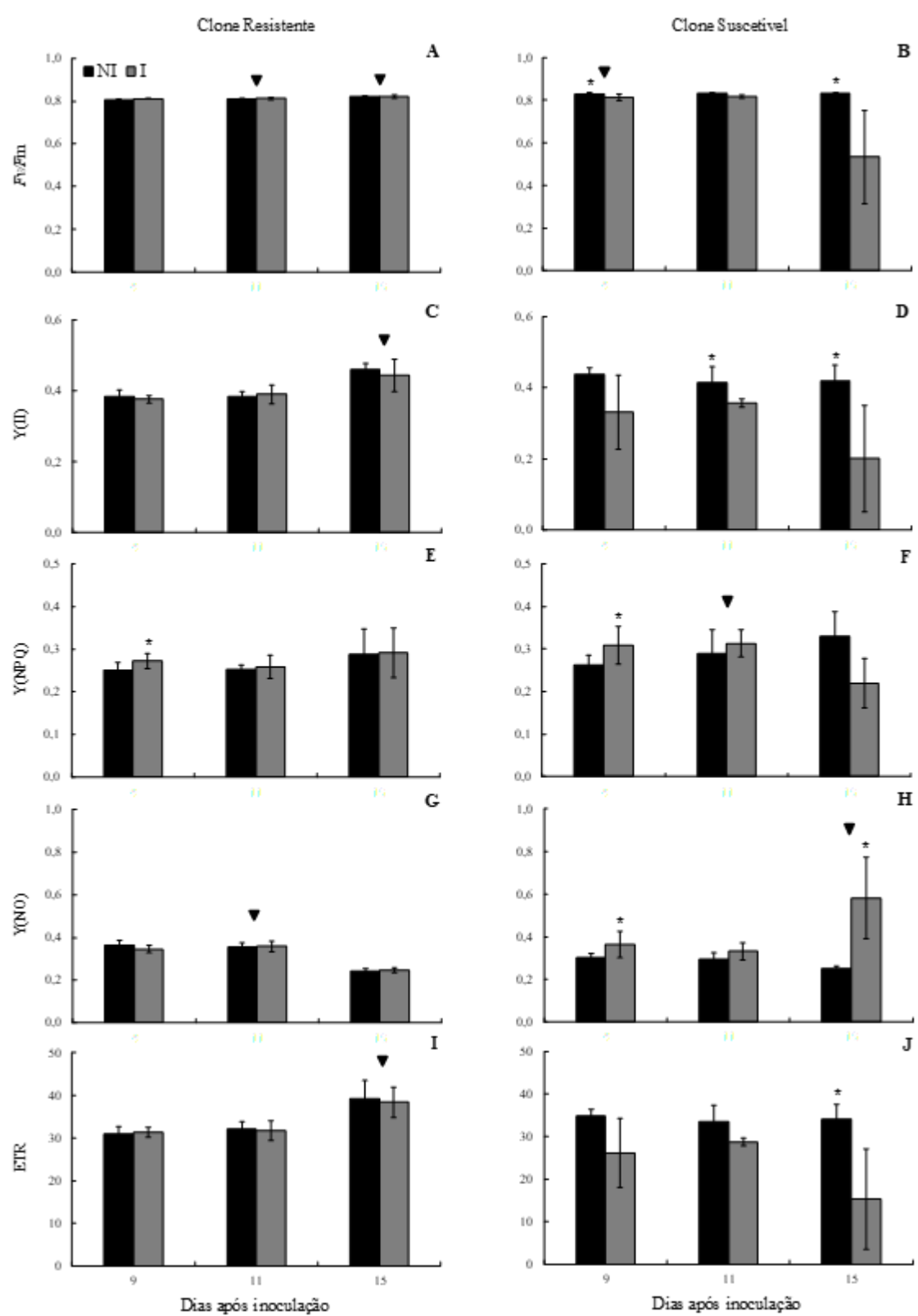


Figura 2

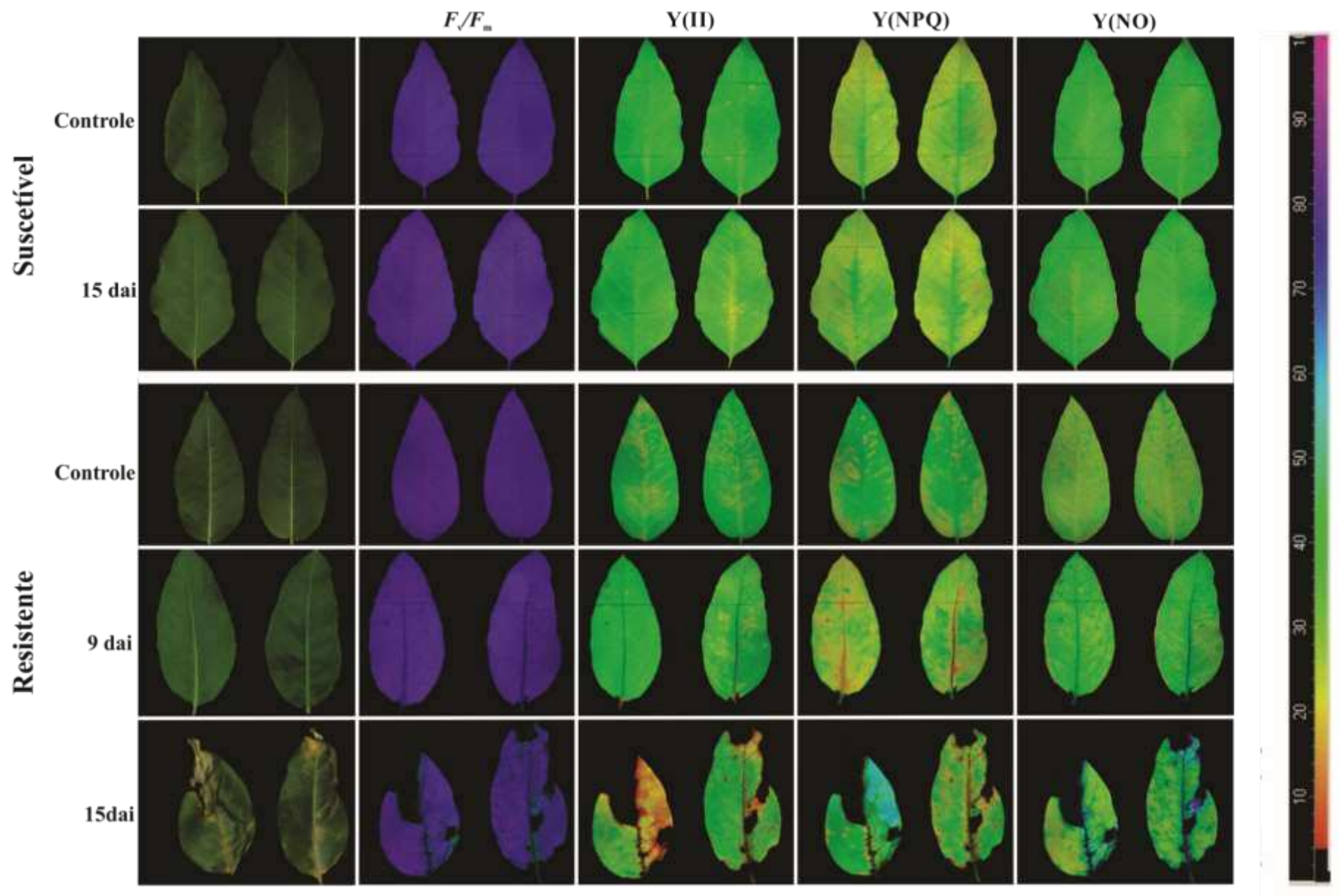


Figura 3

ARTIGO 3

Gama de hospedeiros e resistência de *Eucalyptus* spp. e *Corymbia* spp. à *Erwinia psidii*

**Nilmara Pereira Caires^a, Polyanne Hermenegildo^b, Lúcio Mauro da Silva Guimarães^{a,c},
Reginaldo Gonçalves Mafia^d, Edival Ângelo Valverde Zauza^e, Acelino Couto Alfenas^a**

^aDepartamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, Brazil;

^bDepartamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Brasília, Brazil;

^cClonar Resistência a Doenças Florestais, Cajuri, Brazil;

^dFibria S.A. Centro de Tecnologia, Aracruz, ES, Brazil;

^eSuzano Papel e Celulose, Suzano-SP, Brazil.

Autor para correspondência: Acelino Couto Alfenas, e-mail: aalfenas@ufv.br

Keywords: bacteriose, die-back, gama de hospedeiros, murcha, patógeno vascular

ABSTRACT

Die-back, caused by *Erwinia psidii*, is one of the most important emerging diseases for eucalyptus in Brazil. To determine the host range and identify potential sources of resistance, 32 species of the genus *Eucalyptus* spp. and *Corymbia* spp. in additions to eight other species of the family Myrtaceae were evaluated, inoculated with *E. psidii*, in greenhouse experiments. In the *Eucalyptus* and *Corymbia* species, the severity of the disease was obtained using a diagrammatic scale developed for this patosystem. In the other species, the incidence was evaluated. All species of Myrtaceae evaluated were susceptible to die-back. Twenty - six species of *Eucalyptus* and *Corymbia* presented more than 50% of resistant individuals, and in nine, resistance was observed in 100% of the inoculated plants. Our results indicated that there is inter and intraspecific variability in resistance to *E. psidii*, which allows the selection of species to be used in breeding programs.

INTRODUÇÃO

O cultivo sistemático do eucalipto (*Eucalyptus* spp.) começou nas primeiras décadas do século XIX, tornando-se a espécie florestal mais plantada em todo o mundo no século XX. No Brasil, a eucaliptocultura ocupa uma área de 5,6 milhões de hectares e emprega 3,8 milhões de pessoas, o que corresponde cerca de 3% da população economicamente ativa (IBÁ, 2016). Dentre os desafios para a manutenção e expansão da cultura do eucalipto no país, destacam-se o aumento da produtividade dos materiais genéticos plantados, a adaptabilidade dos clones nas novas fronteiras agrícolas e o controle de pragas e doenças (Abad et al., 2013). Recentemente, uma nova doença, causada pela bactéria *Erwinia psidii* Rodrigues Neto, Robbs & Yamashiro, foi descrita na região Centro-Sul do Brasil, no Uruguai e na Argentina, causando a murcha e seca de ponteiros (Ariel et al., 2014; Coutinho et al., 2011). Essa doença tem sido responsável pela perda de produtividade e limitação do cultivo de materiais genéticos suscetíveis (Arriel et al., 2014).

Erwinia psidii foi relatada pela primeira vez em 1987, provocando colapso do tecido e morte de ponteiros em goiabeira (*Psidium guajava*), no estado de São Paulo, Brasil (Rodrigues Neto, 1987). Atualmente, *E. psidii* é um dos patógenos mais importantes que afetam a cultura da goiabeira no Brasil, levando a perdas de mais de 85% da produção (Teixeira et al., 2009). No eucalipto, a infecção por este patógeno geralmente ocorre até os dois anos de idade após o plantio causando a morte dos ponteiros e, conseqüentemente, a perda de dominância apical que retarda o crescimento da planta e ocasiona perda na produtividade. Nas folhas, ocorrem lesões necróticas no pecíolo e na nervura central (Coutinho et al. 2011; Arriel et al., 2014). Em alguns clones observa-se também a murcha, que pode tornar-se irreversível levando a planta à morte (Arriel et al., 2014).

Doenças bacterianas, como a seca de ponteiros, são de difícil controle devido à rápida multiplicação do patógeno no tecido infectado e ausência de produtos químicos disponíveis,

tornando-se praticamente impossível após o início da epidemia (Fritscher-Neto & Borém, 2012). O emprego de clones/cultivares resistentes representa um pilar dentre as estratégias utilizadas para o controle de doenças, por ser aplicável em grandes áreas e possuir baixo impacto ambiental comparado ao uso de agrotóxicos (Fonseca et al., 2010). Entretanto, por se tratar de um recente patossistema, até o momento não foram realizadas avaliações de fontes de resistência a *E. psidii* nas diferentes espécies de *Eucalyptus* e pouco se conhece a respeito da gama de hospedeiros dessa bactéria (Rodrigues Neto et al, 1987). Assim, o presente trabalho teve como objetivo identificar fontes de resistência em 28 espécies de *Eucalyptus* spp. e quatro de *Corymbia* spp., além da ampliação dos estudos sobre a gama de hospedeiros em oito outras espécies da família *Myrtaceae*.

MATERIAL E MÉTODOS

Determinação da gama de hospedeiros

Para determinação da gama de hospedeiros, foram inoculadas plantas de oito espécies de diferentes gêneros da família *Myrtaceae* (Tabela 1), escolhidas devido a importância silvicultural no Brasil (Lorenzi, 1992) e da disponibilidade de mudas. Foram utilizadas 10 mudas de cada espécie em delineamento inteiramente casualizado. As mudas foram adquiridas em viveiros florestais, transplantadas para vasos com capacidade de 3 L, contendo substrato MecPlant (Telêmaco Borba, Paraná, Brasil), enriquecido com superfosfato simples ($6,0 \text{ kg m}^{-3}$) e Osmocote (19:06:10 a $1,5 \text{ kg m}^{-3}$) (Israel Chemicals LTDA, Holanda) e inoculadas quando atingiram uma altura aproximada de 45 cm.

As plantas foram inoculadas utilizando-se metodologia de inoculação proposta por Ferraz et al. (2015) para o eucalipto. Antes da inoculação, cinco ramos foram marcados com fitas adesivas delimitando as três primeiras gemas axilares, que foram inoculadas utilizando-se palitos de

madeira previamente esterilizados, impregnados com cultura bacteriana do isolado LPF 435 de *E. psidii*, pertencente à coleção de culturas do Laboratório de Patologia Florestal/UFV e previamente caracterizado por Arriel et al. (2014). Foram utilizadas duas testemunhas para cada espécie, cujas plantas foram apenas feridas com palito estéril. Como comparador de suscetibilidade, utilizou-se mudas de goiabeira cultivar Pedro Sato, devido a suscetibilidade à doença (Coelho et al., 2002). As plantas foram avaliadas quanto a incidência da doença semanalmente até 35 dias após a inoculação (dai). Ramos que apresentavam sintomas da doença foram analisados no laboratório quanto à presença de exsudação em gota. Para isso, retiraram-se fragmentos retangulares adjacentes à nervura central da folha, que foram depositados em uma lâmina, cobertos com água e observados em microscópio de luz.

Avaliação da resistência em diferentes espécies de *Eucalyptus* spp. e *Corymbia* spp.

Para a identificação de fontes de resistência a *E. psidii* foram avaliadas 28 espécies do gênero *Eucalyptus* e quatro do gênero *Corymbia*. As mudas seminais foram produzidas em tubetes contendo substrato Carolina Soil (Vera Cruz, Rio Grande do Sul, Brasil) e enriquecido com 6,0 kg m⁻³ de superfosfato simples e 1,5 kg m⁻³ Osmocote (19:06:10). Após a germinação das sementes, realizou-se o desbaste das mudas excedentes, mantendo apenas a planta mais vigorosa por recipiente. Aos 60 dias de idade, as mudas foram transplantadas para sacolas com capacidade de 2 L contendo o mesmo substrato e fertilizadas quinzenalmente com solução de NPK (05:10:30) na proporção de 6 g L⁻¹. Trinta dias após o transplante, 3 a 25 mudas de cada espécie (Tabela 2) foram inoculadas com o isolado LPF 435 de *E. psidii*. O número de plantas inoculadas por espécie variou em função da taxa de germinação das sementes.

As plantas foram inoculadas utilizando-se metodologia de inoculação proposta por Ferraz et al. (2015). Após a inoculação, as plantas foram mantidas em casa de vegetação e avaliadas

semanalmente quanto a severidade da doença até 35 dai. Para cada planta foi atribuída uma nota de acordo com a presença de sintomas da seca de ponteiros. Para isso, utilizou escala de notas onde: Nota 0- plantas sem sintomas; Nota 1 - presença de minicancros, morte de brotações e lesões necróticas na nervura próxima ao ponto de inoculação; Nota 2 - presença de cancrs extensos no caule; Nota 3 - ocorrência da perda da dominância apical, aumento do vigor das brotações laterais e envassouramento e nota 4 - seca e morte do ponteiro (Ferraz et al., 2015 adaptado). Aos 21 dai, as plantas assintomáticas foram reinoculadas, utilizando a mesma metodologia descrita acima, de modo a evitar plantas escape. Ao fim do experimento, as mudas foram submetidas ao teste de exsudação microscópica de pus bacteriano para de confirmar a presença da bactéria nos tecidos da planta. Foram consideradas resistentes à seca de ponteiros, as plantas que apresentaram notas 0 e 1.

RESULTADOS

Gama de hospedeiros de *E. psidii* na família *Myrtaceae*

Todas as espécies de *Myrtaceae* avaliadas foram suscetíveis à *E. psidii*. As plantas apresentaram seca de ponteiros como sintoma principal, sendo os primeiros sintomas observados aos 10 dai (Fig. 1). Nas mudas de jabuticabeira (*Plinia cauliflora*) e uvaieira (*Eugenia pyriformis*), verificou-se a queda prematura das folhas dos ramos inoculados. Já as mudas de goiabeira var. Pedro Sato apresentaram os mesmos sintomas descritos por Rodrigues Neto et al. (1987).

Identificação de fontes de resistência em *Eucalyptus* spp. e *Corymbia* spp.

As espécies *E. thozetiana*, *C. henryi*, *C. maculata*, *E. cloeziana*, *E. viminalis*, *E. longirostrata*, *E. dalrympleana*, *E. diversicolor* e *E. pilularis* 100% dos indivíduos avaliados resistentes à *E. psidii* (Tabela 2). As demais espécies apresentaram porcentagem de mudas

resistentes variando de 95,6 a 0% (Tabela 2). Dentre essas, o *E. occidentalis* foi a espécie mais suscetível, com todas as plantas apresentando algum tipo de sintoma relacionado com a doença (Figura 2). Os sintomas observados nas diferentes espécies de eucalipto foram semelhantes aos descritos por Arriel et al. (2014) tais como lesões necróticas nas nervuras das folhas, cancro nas hastes das plantas e seca de ponteiros (Fig 2). Algumas espécies que possuíam a haste principal de menor diâmetro, como *E. argopholia* e *E. creba*, por exemplo, apresentavam quebra da haste e morte prematura da planta devido a infecção pela bactéria. Por vezes, essa morte ocorreu antes mesmo que as folhas exibissem os sintomas da doença.

DISCUSSÃO

Este é o primeiro estudo caracterizando a resistência à seca de ponteiros dentro dos gêneros *Eucalyptus* e *Corymbia*. A facilidade de selecionar plantas resistentes nas mais diferentes espécies avaliadas indica que há variação significativa na resistência e potencial para selecionar famílias com níveis reduzidos de infecção. Até o momento, essa variabilidade inter e intraespecífica para resistência entre diferentes espécies de *Eucalyptus* spp. tem sido observada em diversos patossistemas (Zauza et al., 2004; Santos et al., 2008; Guimarães et al., 2010). Possivelmente, o curto tempo de melhoramento deste gênero associado a uma ampla base genética contribua para essa alta variabilidade (Caixeta et al., 2003).

Nove das espécies de eucalipto avaliadas (*E. thozetiana*, *C. henryi*, *C. maculata*, *E. cloeziana*, *E. viminalis*, *E. longirostrata*, *E. dalrymplena*, *E. diversicolor* e *E. pilularis*), apresentaram todos os indivíduos resistentes à seca de ponteiros. Dentre essas, apresenta especial importância para o melhoramento *E. cloeziana* que vem se destacando como uma das mais importantes espécies plantadas para fins energéticos, principalmente por sua boa densidade e seus

altos teores de carbono fixo (Vital e Della Lucia, 1986). Entretanto, *E. cloeziana* não cruza naturalmente com outras espécies de eucalipto, dificultando a obtenção de híbridos interespecíficos e, conseqüentemente, impedindo a transferência de possíveis genes de resistência presentes nesta espécie. Além disso, apresenta baixa taxa de enraizamento para propagação vegetativa o que dificulta o uso de clones (Baker & Walker, 2005). Outra espécie resistente e importante dentro do gênero *Eucalyptus*, *E. viminalis*, tem sido utilizada como fonte de tolerância a frio intenso e geada (Fonseca et al., 2010). Na Argentina, país onde foi relatado a primeira ocorrência de *E. psidii* no eucalipto, *E. viminalis* está entre as sete espécies de *Eucalyptus* que possui maior incremento volumétrico (Cappa et al., 2010).

As quatro espécies do gênero *Corymbia* avaliadas (*C. henryi*, *C. maculata*, *C. citriodora*, *C. torelliana*) foram resistentes à seca de ponteiros. Essas espécies são de especial interesse para empresas florestais ligadas à siderurgia por possuírem alta densidade (acima de 600 Kg/m³), sendo bons biorredutores. Além disso, espécies do gênero *Corymbia* são resistentes ao vento e à seca dos ponteiros do Vale do Rio Doce, importante doença de origem abiótica que ocorre principalmente nos estados de Minas Gerais, Bahia e Espírito Santo; e *C. torelliana* é resistente também à mancha de Quambalaria (de Assis et al, 1996). Entretanto, são espécies que não se cruzam com espécies do gênero *Eucalyptus* reduzindo assim, seu potencial como espécies doadoras de genes de resistência para as espécies mais plantadas no Brasil, *E. grandis* e *E. urophylla* (Fonseca et al. 2010; Dickinson et al. 2013).

Nos últimos anos, com a expansão da eucaliptocultura no Brasil, houve a necessidade da escolha de espécies ou a obtenção de híbridos mais aptos para todo o território nacional e finalidades de uso (Flores et al., 2016). Assim, tem sido recorrente nos programas de melhoramento a utilização de espécies como *E. tereticornis*, *E. nitens* e *E. pellita*, dentre outras

(Flores et al., 2016). As espécies *E. tereticornis* e *E. nitens* apresentaram uma porcentagem de plantas resistentes maior que 75, tornando promissora a seleção de plantas resistentes. *Eucalyptus nitens* apresenta como característica principal para sua utilização em programas de melhoramento a sua tolerância ao frio (Eldridge et al., 1994), enquanto *E. tereticornis* possui madeira com propriedades desejáveis para utilização em fins energéticos e aptidão para cultivo no semiárido (Wrege et al., 2011). Já *E. pellita*, que apresentou 50% das plantas resistentes, além da resistência à *E. psidii* demonstrada neste trabalho, possui também resistência à ferrugem (*Austropuccinia psidii*), mancha-de-Calonectria (*Calonectria pteridis*) e à murcha-de-Ceratocystis (*Ceratocystis fimbriata*) (Guimarães et al. 2010), sendo, portanto, uma importante fonte de genes de resistência a doenças para ser utilizada em programas de melhoramento genético de eucalipto.

A determinação da gama de hospedeiros de um patógeno é de fundamental importância para elaboração de estratégias de manejo da doença (Garret & Mundt, 1999). No presente trabalho, todas espécies de mirtáceas avaliadas em inoculações controladas foram suscetíveis à *E. psidii*, embora não exista relato da doença em campo nos hospedeiros avaliados. Uma hipótese é que isto se deve ao fato do manejo dessas espécies ser menos intensivo e pelo modo de propagação por sementes. Por exemplo, na cultura da goiabeira, a principal forma de disseminação da doença dentro de um pomar se dá pela poda, que transfere inóculo bacteriano de um ramo doente para outro sadio (Ribeiro et al., 1985) e por mudas assintomáticas entre diferentes pomares (Rodrigues Neto et al., 1987). Além disso, em seu ambiente natural, infecções em mirtáceas nativas podem passar despercebidas, pois não são objetos de estudo comum.

Em estudo anterior, avaliando a gama de hospedeiros de *E. psidii* a partir de um isolado de goiabeira, Rodrigues Neto et al. (1987) demonstram que a bactéria é capaz de infectar, além da goiabeira, o araçazeiro (*Psidium cattleianum*), o jambeiro-vermelho (*Eugenia jambolana*) e a

melaleuca (*Melaleuca viridiflora*). Neste trabalho, acrescentou-se a essa lista de potenciais hospedeiros mais oito espécies de *Myrtaceae*, o araçazeiro (*Psidium guineense*), o cambuazeiro (*Plinia edulis*), a cerejeira-do-Rio-Grande (*Eugenia involucrata*), a jabuticabeira (*Plinia cauliflora*), o jambeiro (*Syzygium jambos*), a maria-preta (*Siphoneugena densiflora*), a pitangueira (*Eugenia uniflora*) e a uvaieira (*Eugenia pyriformis*), além das 28 espécies de *Eucalyptus* e quatro de *Corymbia*. Os resultados encontrados neste trabalho diferiram dos encontrados por Rodrigues Neto et al. (1987) para duas espécies, *Corymbia citriodora* e *Eugenia uniflora*, que não foram consideradas hospedeiras da bactéria no trabalho anterior. No entanto, essas diferenças podem ser atribuídas a variação intraespecífica das espécies, como demonstrado para *Corymbia* spp. neste estudo, método de inoculação e diferenças devido a origem dos isolados utilizados, goiabeira e eucalipto. Entretanto, mais espécies de *Myrtaceae* e também de outras famílias botânicas relacionadas devem ser inoculadas com *E. psidii* para confirmar essa hipótese.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), e ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e à CMPC Celulose Riograndense pelo suporte financeiro e à Clonar Resistência a Doenças Florestais pela disponibilização da estrutura para montagem dos experimentos.

REFERÊNCIAS

- Abad JIM, Assis TF, Mafia RG, Aguiar AM. (2013). Melhoramento genético do eucalipto para resistência à doenças bióticas e abióticas. *Patologia Florestal: Desafios e Perspectivas*. 137-155.
- Alfenas AC, Zauza EAV, Mafia RG, de Assis TF. (2004). *Clonagem e doenças do eucalipto*. Viçosa: Ed. da UFV. 442p.
- Alfenas RF, Coutinho MM, Freitas CS, Freitas R. G., and Alfenas, A. C. (2012). Developing clones of *Eucalyptus cloeziana* resistant to rust (*Puccinia psidii*). In: Proc. 4th Int. Workshop Genet. Host-Parasite Interactions in Forestry: Disease and Insect Resistance in Forest Trees.
- Arriel DAA, Fonseca NR, Guimarães LMS, Hermenegildo PS, Mafia RG, Borges Júnior N, Souza HP, Alfenas AC. (2014). Wilt and die-back of *Eucalyptus* spp. caused by *Erwinia psidii* in Brazil. *Forest Pathology*. 44: 255-265.
- Baker A, Walker S. (2005). Assessment of the relative amenability to vegetative propagation by leafy cuttings of tropical and subtropical *Eucalyptus* and *Corymbia* species. in: *Plantation Technology in Tropical Forest Science*. K. Suzuki, K. Ishii, S. Sakurai, and S. Sasaki, eds. Springer-Verlag, Tokyo.
- Caixeta RP, Carvalho D, Rosado SCS, Trugilho PF. (2003). Variações genéticas em populações de *Eucalyptus* spp. detectadas por meio de marcadores moleculares. *Revista Árvore* 27: 357-363.
- Cappa EP, Pathauer PS, Lopez GA. (2010). Provenance variation and genetic parameters of *Eucalyptus viminalis* in Argentina. *Tree Genetics & Genomes* 6: 981-994.
- Coelho MVS, Mendes AP, Marques, ADA. (2002). Seca dos ponteiros da goiabeira causada por *Erwinia psidii*: levantamento e caracterização. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia- Comunicado Técnico (INFOTECA-E).

- Coutinho TA, Brady CL, Vaart M, Van der Wart M, Venter SN, Telechea N, Rolfo M, Perez C, Wingfiel MJ. (2011). A new shoot and stem disease of *Eucalyptus* species caused by *Erwinia psidii*. *Australasian Plant Pathology* 40: 55-60.
- de Assis TF, Abad JIM, Aguiar AM. (1996). Melhoramento genético do eucalipto. *Informe Agropecuário* 18: 32-51.
- Dickinson GR, Wallace HM, Lee DJ. (2013). Reciprocal and advanced generation hybrids between *Corymbia citriodora* and *C. torelliana*: forestry breeding and the risk of gene flow. *Annals of Forest Science* 70: 1-10.
- Eldridge K, Davidson J, Harwood C, Wyk GV. (1994). *Eucalypt Domestication and Breeding*. Clarendon Press.
- Ferraz HGM, Demuner GA, Guimarães LMS, Arriel DAA, Silva AC, Borges Júnior N, Mafia RG, Alfenas AC. (2015). Methods of inoculation and evaluation of *Erwinia psidii* in eucalypti. *Forest Pathology* 46: 240-247.
- Flores TB, Alvares CA, Souza VC, Stape JL. (2016). *Eucalyptus* no Brasil: zoneamento climático e guia para identificação. Piracicaba: IPEF. 448p.
- Fonseca SM, de Resende MDV, Alfenas AC, Guimarães LMS, de Assis TF, Grattapaglia D. (2010). *Manual Prático de Melhoramento Genético do Eucalipto*. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa.
- Fritsche-Neto R, Borém A. (2012). *Melhoramento de plantas para condições de estresses bióticos*. Visconde do Rio Branco: Suprema, 240p.
- Garret KA, Mundt CC. (1999). Epidemiology in mixed host populations. *Phytopathology* 89: 949-990.

- Guimarães LMS; Titon M; Lau D; Rosse LN; Oliveira LSS; Rosado GCC; Christo GGO; Alfenas AC. (2010). *Eucalyptus pellita* as a source of resistance to rust, Ceratocystis wilt and leaf blight. *Crop Breeding and Applied Biotechnology* 10: 124-131.
- Hossain MM, Sultana F. (2015). Genetic variation for induced and basal resistance against leaf pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 among *Arabidopsis thaliana* accessions. *SpringerPlus* 4: 1-9.
- IBÁ 2016, Indústria Brasileira de Árvores (2016), 96p.
- Lorenzi H. (1992). Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa: Editora Plantarum 352p.
- Mckinney HH. (1923). Influence of soil, temperature and moisture on infection of wheat seedlings by *Helminthosporium sativum*. *Journal of Agricultural Research* 26:195-217.
- Ribeiro IJA; Sugimori MH; Rodrigues Neto J, Yamashiro T, Piza Júnior C. de T, Prates HS, Frediani AJA. (1985). A bacteriose da goiabeira. Campinas: CATI 13 p. (CATI. Instruções Práticas, 231).
- Rodrigues Neto J, Robbs CF, Yamashiro TA. (1987). A bacterial disease of guava (*Psidium guajava*) caused by *Erwinia psidii* sp. nov. *Fitopatologia Brasileira* 12: 345-350.
- Santos MR; Guimaraes LMS; Mafia RG; Alfenas AC. (2008): Evaluation of resistance to rust (*Puccinia psidii*), bacterial spot (*Xanthomonas axonopodis*), Ceratocystis wilt (*Ceratocystis fimbriata*) and spot-the-pteridis (*Cylindrocladium pteridis*) in clones of *Eucalyptus* spp. *Tropical Plant Pathology* 33, S269.
- Teixeira ACO, Marques ASA, Ferreira MASV. (2009). Low genetic diversity among pathogenic strains of *Erwinia psidii* from Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology* 40: 678-684.

- Vital BR; Della Lucia RM. (1986). Propriedades físicas e mecânicas da madeira de eucalipto. Informe Agropecuário 12: 71-74.
- Wrege MS, RCV Higa, de Moura SB. (2011). Modelagem da distribuição geográfica de *Eucalyptus tereticornis* na região Nordeste do Brasil. Embrapa Semiárido-Artigo em anais de congresso (ALICE). In: Congresso Brasileiro de Agrometeorologia, 17. Guarapari. Riscos climáticos e cenários agrícolas futuros: anais. Guarapari: Incaper, 2011.
- Zauza EAV, Alfenas AC, Harrington TC, Silva JF. (2004). Resistance of Eucalyptus clones to *Ceratocystis fimbriata*. Plant Disease 88: 758-760.
- Zauza EA, Alfenas AC, Old K, Couto MM, Graça RN, Maffia LA. (2010). Myrtaceae species resistance to rust caused by *Puccinia psidii*. Australasian Plant Pathology 39: 406-411.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Tabela 1: Ocorrência de exsudação de pus bacteriano e principais sintomas observados nas diferentes espécies da família *Myrtaceae* inoculadas com *Erwinia psidii*.

Espécie	Principais sintomas
Araçazeiro (<i>Psidium guineense</i>)	Seca de ponteiro
Cambuazeiro (<i>Plinia edulis</i>)	Murcha, escurecimento da nervura central, seca de ponteiro
Cerejeira-do-Rio-Grande (<i>Eugenia involucrata</i>)	Murcha, escurecimento da nervura central, seca de ponteiro
Jaboticabeira (<i>Plinia cauliflora</i>)	Desfolha, escurecimento do ramo, cancos, seca de ponteiro
Jambeiro (<i>Syzygium jambos</i>)	Murcha, escurecimento da nervura central, seca de ponteiro
Maria-Preta (<i>Siphoneugena densiflora</i>)	Murcha, escurecimento da nervura central, seca de ponteiro
Pitangueira (<i>Eugenia uniflora</i>)	Seca de ponteiro, escurecimento do ramo
Uvaieira (<i>Eugenia pyriformis</i>)	Desfolha, escurecimento do ramo, seca de ponteiro

Tabela 2: Suscetibilidade de espécies de *Eucalyptus* and *Corymbia* na ordem da menos para a mais suscetível, baseado na porcentagem de mudas resistentes.

Espécies	Número de mudas avaliadas	Número de plantas/Classe de severidade (0: 1:2: 3: 4)	Mudas resistentes (%)
<i>Eucalyptus cloeziana</i>	9	9:0:0:0:0	100
<i>E. dalrymplea</i>	24	24:0:0:0:0	100
<i>E. diversicolor</i>	8	8:0:0:0:0	100
<i>Corymbia henryi</i>	25	25:0:0:0:0	100
<i>E. longirostrata</i>	3	3:0:0:0:0	100
<i>C. maculata</i>	21	21:0:0:0:0	100
<i>E. pilularis</i>	19	19:0:0:0:0	100
<i>E. thozetiana</i>	24	24:0:0:0:0	100
<i>E. viminalis</i>	20	20:0:0:0:0	100
<i>E. argopholia</i>	23	22:0:0:0:1	95,6
<i>C. citriodora</i> subsp. <i>variegata</i>	22	21:0:0:0:1	95,4
<i>E. paniculata</i>	19	18:0:0:1:0	94,7
<i>C. torelliana</i>	24	22:0:2:0:0	91,2
<i>E. nobilis</i>	20	18:0:1:1:0	90
<i>E. tereticornis</i>	25	22:0:2:1:0	88
<i>E. amplifolia</i>	20	17:0:2:0:1	85
<i>E. smithii</i>	24	20:0:2:2:0	83,3
<i>E. nitens</i>	18	14:0:3:1:0	77,8
<i>E. tricarpa</i>	9	7:0:1:0:1	77,7
<i>E. moluccana</i>	23	17:0:4:0:2	77,3
<i>E. microcorys</i>	19	12:2:5:0:0	73,7
<i>E. brassiana</i>	25	18:0:6:1:0	72
<i>E. sideroxylon</i>	17	12:0:4:0:1	70,6
<i>E. badjensis</i>	15	10:0:0:5:0	66,7
<i>E. major</i>	17	9:0:5:3:0	52,9
<i>E. robusta</i>	24	12:0:10:1:1	50
<i>E. pellita</i>	18	9:0:6:1:2	50
<i>E. cladocalyx</i>	14	6:0:4:1:3	42,8
<i>E. crebra</i>	24	8:0:6:4:6	33,3
<i>E. deglupta</i>	24	8:0:8:4:4	33,3
<i>E. occidentalis</i>	17	0:0:7:4:6	0

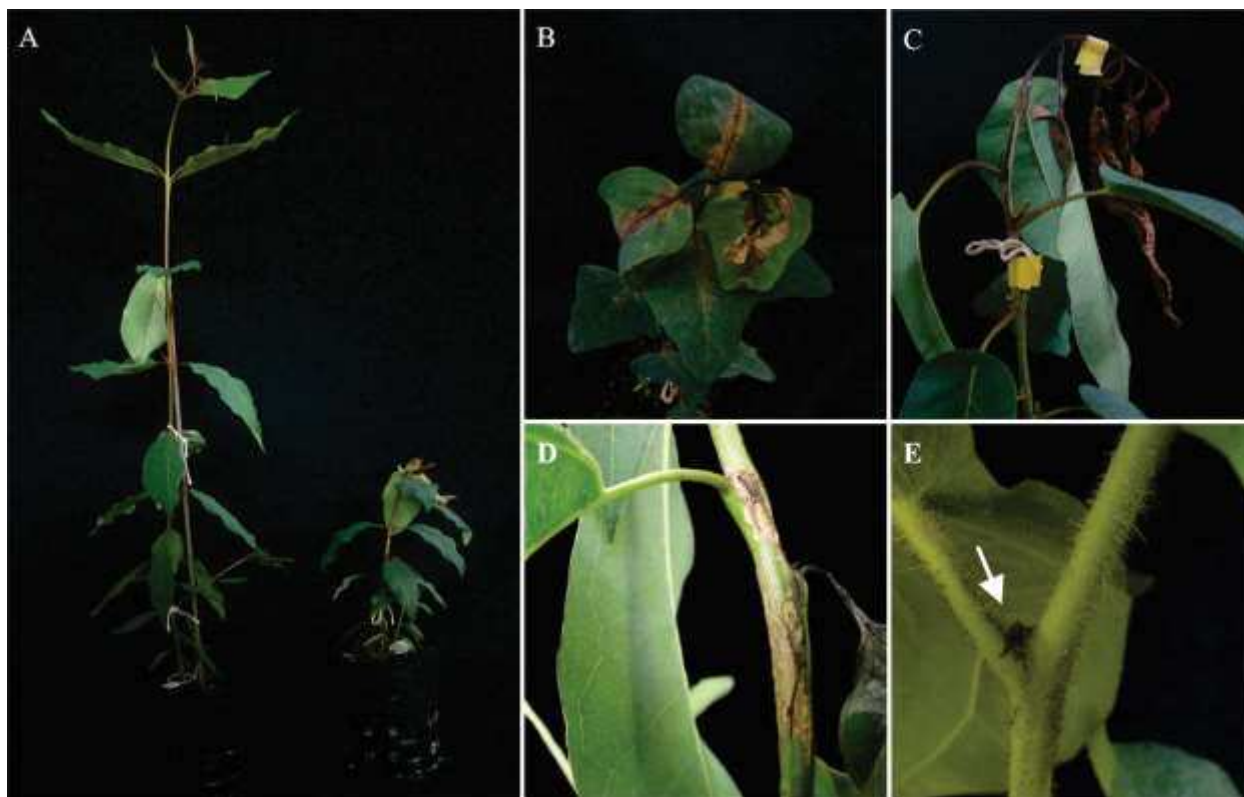


Figura 2- Seca de ponteiros, causada por *Erwinia psidii* em *Eucalyptus* spp. e *Corymbia* spp. aos 35 dias após inoculação. Redução do crescimento em *E. deglupta* (A), escurecimento e necrose da nervura principal em *E. occidentalis* (B), morte do ponteiro em *Corymbia citriodora* (C), cancro na haste de *E. tereticornis* (D) e reação localizada no ponto de inoculação em planta resistente de *E. torelliana*.



Figura 2- Sintomas da infecção por *Erwinia psidii* em plantas da família *Myrtaceae*. Cancro no caule em jambeiro (*Syzygium jambos*) (A). Seca de ponteiros em jabuticabeira (*Plinia cauliflora*) (B), pitangueira (*Eugenia uniflora*) (C), araçazeiro (*Psidium cattleianum*) (D), (cerejeira-do-Rio-Grande (*Eugenia involucrata*) (E), cambucazeiro (*Plinia edulis*) (F), uvaieira (*Eugenia pyriformis*) (G) e goiabeira (*Psidium guajava*) (H) aos 21 dias após a inoculação.

CONCLUSÕES GERAIS

A partir dos resultados obtidos, pode-se concluir que, 1) a colonização de *E. psidii* em eucalipto é principalmente acropetal pelos vasos do xilema; 2) a inoculação com a bactéria não causa mudanças significativas na fotossíntese de clones resistentes, porém, ocasiona significativas alterações na maquinaria fotossintética das plantas de clones suscetíveis principalmente a nível de fotodissipação e fotoproteção; 3) Existe variabilidade intra e interespecífica quanto à resistência a seca-de-ponteiros nos gêneros *Eucalyptus* e *Corymbia*, o que permite a seleção de materiais superiores para plantio; 4) existem espécies da família *Myrtaceae* nas quais a doença ainda não foi relatada em campo, mas que são potenciais hospedeiras à bactéria.