

ADERLAN GOMES DA SILVA

HISTOPATOLOGIA E INFLUÊNCIA DE NUTRIENTES NA
INTENSIDADE DA BACTERIOSE FOLIAR DO EUCALIPTO
CAUSADA POR *Xanthomonas axonopodis*.

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
2007

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

S586h
2007

Silva, Aderlan Gomes da, 1977-

Histopatologia e influência de nutrientes na intensidade da bacteriose foliar do eucalipto causada por *Xanthomonas axonopodis* / Aderlan Gomes da Silva. – Viçosa, MG, 2007.
xi, 58f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

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

1. Mancha foliar. 2. Eucalipto - Doenças e pragas - Controle. 3. Bactérias fitopatogênicas. 4. Relação hospedeiro-parasito.
5. *Xanthomonas axonopodis*. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 632.32

ADERLAN GOMES DA SILVA

HISTOPATOLOGIA E INFLUÊNCIA DE NUTRIENTES NA
INTENSIDADE DA BACTERIOSE FOLIAR DO EUCALIPTO
CAUSADA POR *Xanthomonas axonopodis*.

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: 28 de março de 2007.

Nairam Félix de Barros
(Co-Orientador)

Luiz Antônio Maffia
(Co-Orientador)

Cláudia Alencar Vanetti

Reginaldo Gonçalves Mafia

Acelino Couto Alfenas
(Orientador)

Aos meus pais, irmãos, esposa e sobrinhos.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa, por meio do Departamento de Fitopatologia, pela oportunidade de realização do curso.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa.

À empresa Aracruz Celulose S. A., nas pessoas do senhor Robert Cardoso Sartório e Dr. Sebastião da Fonseca, pelo apoio e sugestões dadas para realização do projeto.

Ao Departamento de Solos da Universidade Federal de Viçosa, na pessoa do professor Nairam Félix de Barros, pelo empréstimo da casa de vegetação para realização deste trabalho.

Ao professor Acelino Couto Alfenas, pela orientação, apoio e confiança.

Ao professor Eduardo Euclides de Lima e Borges, por possibilitar a realização das análises dos açúcares.

Ao professor Nairam Félix de Barros e à Dra. Cláudia Alencar Vanetti, por todas as contribuições, conselhos e ajuda na teoria e prática.

Ao laboratorista José Mauro Ferreira, pela ajuda na análise de monossacarídeos.

Ao professor Francisco Alves Ferreira por todos os ensinamentos, pelas opiniões, pelo exemplo profissional, pela amizade e por ter inspirado meu ingresso no estudo de doenças de plantas.

Aos amigos da pós-graduação, Wânia, Rosângela, Ivanete, Danielle e Ricardo Brainer pela ajuda, pela amizade e pelo companheirismo.

Ao laboratorista Renildo pela amizade.

Aos amigos do laboratório, Eraclides Ferreira, Carla Rosado, Vanessa Lana, Cíntia Xavier, Daniela Neves, Márcia Brandão, Miranda, Talyta Zarpelon, Elisângela Nascimento, Daíse Bernardino, Sandra Eulália, Douglas Lau, Guilherme Geingermeir, Márcio, Ricardo Roberto, Ricardo Martins, Leonardo Sarno, Rodrigo Neves, Alex Freitas, Edival Zauza, Lúcio, Francisco A. Neto, pela amizade.

Aos colegas de república, Ricardo Brainer, Bruno, Everaldo, Cristiano, Evander e Rosilene pela ótima convivência.

A Cláudia, pela companhia, pelo carinho, pelo apoio, pela amizade e pelas sugestões e ajuda para realização deste trabalho.

Aos meus sobrinhos Bianca e Davi, pela alegria proporcionada.

Aos meus irmãos Aderbal e Roquilane, que me apoiaram, auxiliaram e incentivaram em todos os momentos, desde o início de minha vida.

Aos meus pais pelo amor, incentivo e apoio incondicional.

A Deus, por tudo, especialmente por minha família e amigos.

BIOGRAFIA

ADERLAN GOMES DA SILVA, filho de José Gomes da Silva e Eremita Ramos da Silva, nasceu no dia 21 de fevereiro de 1977, em Sete Lagoas, Minas Gerais.

Em 1995 concluiu o curso de Técnico em Metalurgia na Escola Técnica de Sete Lagoas.

Em março de 1996 iniciou o curso de graduação em Engenharia Florestal na Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, concluindo-o em março de 2001. No mês de abril do mesmo ano iniciou o curso de mestrado em Fitopatologia na Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais. Defendeu a dissertação de Mestrado em fevereiro de 2003. Em abril do mesmo ano, ingressou no curso de doutorado em Fitopatologia, na mesma instituição, tendo defendido tese em março de 2007. Foi contratado pela Universidade Estadual de Goiás para lecionar Patologia Florestal, Dendrologia e Ecologia Florestal em agosto de 2007.

SUMÁRIO

RESUMO	viii
ABSTRACT	x
1. – INTRODUÇÃO GERAL	1
2 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	3
Artigo 1.....	5
RESUMO.....	5
ABSTRACT.....	6
1. INTRODUÇÃO	7
2. – MATERIAL E MÉTODOS	8
2.1. - Cultivo das plantas	8
2.2.- Preparo do inóculo e inoculação.....	8
2.3. - Avaliação da doença.....	9
2.4. - Penetração e colonização	9
2.5. - Relação entre número de estômatos e severidade da doença	11
3. – RESULTADOS.....	12
3.1. – Penetração e colonização de <i>Xanthomonas axonopodis</i> em folhas de eucalipto	12
3.2. – Relação entre número de estômatos e severidade da doença	14
4. – DISCUSSÃO	14
6. – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	18
Artigo 2.....	25

RESUMO	25
ABSTRACT.....	26
1. INTRODUÇÃO	27
2. – MATERIAL E MÉTODOS	31
2.1. - Cultivo das plantas	31
2.2.- Preparo do inóculo e inoculação.....	32
2.3. - Avaliação da intensidade da doença.....	33
2.4. – Intensidade da doença em relação ao manejo nutricional.....	33
2.4.1. – Experimentos em casa de vegetação	33
2.4.2. Incidência da mancha foliar e de mofo cinzento em mudas tratadas com diferentes níveis de cloreto de potássio	36
3. – RESULTADOS.....	37
3.1. – Efeito de nutrientes na severidade da doença	37
3.1.1. – Influência da aplicação de cloreto de potássio em mudas de eucalipto em viveiro comercial de produção de mudas.....	40
4. DISCUSSÃO	40
5. - REFERÊNCIAS	45
6. – CONCLUSÕES GERAIS	57

RESUMO

SILVA, Aderlan Gomes da, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2007. **Histopatologia e influência de nutrientes na intensidade da bacteriose foliar do eucalipto causada por *Xanthomonas axonopodis*.** Orientador: Acelino Couto Alfenas. Co-Orientadores: Nairam Félix de Barros e Luiz Antônio Maffia.

Este trabalho objetivou estudar a pré-penetração e penetração de *Xanthomonas axonopodis* em folhas de eucalipto, verificar a importância do índice estomático e da idade da folha na suscetibilidade da planta ao patógeno e estudar a influência do status nutricional das plantas na suscetibilidade à doença. Por meio de microscopia eletrônica de varredura, observou-se que o patógeno penetra por estômatos, havendo a formação de microcolônias na câmara sub-estomática e no interior de cavidades secretoras, 6 horas após a inoculação. Aos oito dias após a inoculação, observou-se a ruptura da epiderme e no interior dos tecidos uma grande massa de bactérias e uma substância mucilaginosa próxima às células bacterianas. A quantidade de bactérias aumentou com o período de incubação. A influência de portas-de-entrada (estômatos) sobre a suscetibilidade das plantas à bacteriose foi estudada utilizando-se clones com diferentes níveis de resistência. Amostras de folhas de mesma posição no ramo foram coletadas e submetidas ao clareamento com cloral hidratado e à microscopia de luz para avaliar o índice estomático nas plantas de diferentes clones e determinar a existência da relação entre número de estômatos e severidade da doença. A severidade da doença não se relacionou com o índice estomático. Para avaliar a influência da idade das folhas na suscetibilidade à doença, plantas de cinco clones foram inoculadas da primeira à sexta folhas. Folhas mais velhas apresentaram maior

percentagem de área foliar lesionada. Para testar a influência de nutrientes na suscetibilidade à doença realizaram-se três ensaios em casa de vegetação e um em viveiro comercial de produção de mudas. Em casa de vegetação foram utilizadas mudas de clones híbridos de *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis* cultivadas com em vasos contendo areia, e irrigadas com diferentes soluções nutritivas, suplementadas com cobre, boro, potássio, cálcio e, ou nitrogênio. A ação de cobre, boro e cálcio foi variável. A influência do manejo de nitrogênio e notadamente do potássio sobre a intensidade da doença foi consistente e apresentou elevado potencial de utilização. Níveis intermediários de nitrogênio na solução nutritiva aumentaram a suscetibilidade das plantas à bacteriose. A intensidade da bacteriose reduziu com o aumento dos níveis de potássio na solução nutritiva. A redução da bacteriose pôde, em parte, ser explicada por uma redução da relação nitrogênio/potássio e por um aumento no teor de açúcares no tecido foliar. Devido ao efeito do potássio em casa de vegetação, testou-se, em viveiro, o efeito da aplicação de KCl em mudas de dois clones de *Eucalyptus globulus*. A incidência da bacteriose reduziu com o aumento da concentração de KCl aplicada, mas houve aumento na incidência de mofo cinzento nas mudas. O manejo da nutrição mineral, especialmente do potássio, apresenta grande potencial de utilização no manejo da mancha foliar do eucalipto causada por *X. axonopodis*.

ABSTRACT

SILVA, Aderlan Gomes da, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, March, 2007. **Histopathology and influence of nutrients in the intensity of leaf bacterial blight of eucalyptus caused by *Xanthomonas axonopodis*.** Advisor: Acelino Couto Alfenas. Co-Advisors: Nairam Félix de Barros and Luiz Antônio Maffia.

This work aimed at to study the pre-penetration and penetration of *Xanthomonas axonopodis* in eucalyptus leaves, to verify the importance of the stomatal index and of the leaf age in the susceptibility of the plant to the pathogen and to study the influence of the plant nutritional *status* in the susceptibility to the disease. By means of scanning electron microscopy, it was observed that the bacteria penetrates the leaves by the stomata and that formation of microcolonies has occurred in the substomatal chamber and inside the secretors cavities 6 hours after the inoculation. At the eighty day after the inoculation, the rupture of the epidermis was observed and inside the tissue was a great mass of bacteria involved in a mucilage-like substance. The amount of bacteria increased with the incubation period. The influence of stomata in the susceptibility of the plants to the bacterial blight was studied being used clones with different resistance levels. Samples of leaves of same position in the branch were collected and submitted to the clearing with hydrated clorox and to the light microscopy to evaluate the stomatal index in the plants of different clones and to determine the existence of the relationship between number of stomata and severity of the disease. The severity of the disease didn't link with the stomatal index. To evaluate the influence of the leaf age in the susceptibility to the disease, plants of five clones were inoculated from the first to the sixth leaves. Older leaves presented larger percentage of

diseased area. To test the influence of nutrients in the susceptibility to the disease were done three tests in glasshouse and one in commercial nursery. Eucalypts seedlings of hybrid clones from *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis* were cultivated in vases containing sand, and irrigated with different nutrient solutions, with different levels of copper, boron, potassium, calcium and, or nitrogen. The copper, boron and calcium action was variable. The influence of the management of nitrogen and especially of the potassium was consistent in reducing the disease intensity and it presented high use potential. Intermediate levels of nitrogen in the nutrient solution increased the susceptibility of the plants to the bacterial blight. The intensity of the bacterial blight reduced with the increase of the potassium levels. The reduction of the disease was partially explained by a reduction of the relationship nitrogen/potassium and for an increase in the amount of sugars laves. Due to the effect of the potassium in glasshouse, it was tested, in nursery, the effect of the application of KCl in seedlings of two clones of *Eucalyptus globulus*. The incidence of the bacterial blight reduced with the increase of the concentration of KCl applied, but the incidence of gray mold in the seedlings increased. The management of the mineral nutrition, especially of the potassium, presents great use potential in the control of bacterial blight of eucalypts.

1. – INTRODUÇÃO GERAL

A mancha foliar bacteriana, causada principalmente por *Xanthomonas axonopodis* incide em mudas em viveiro e plantas jovens no campo (Alfenas et al., 2004) induzindo lesões internervurais, encharcadas, que progridem para lesões necróticas ressecadas, podendo ocasionar desfolha intensa sob condições favoráveis à doença. Em viveiro, tem sido mais freqüente nas fases de crescimento e rustificação, em que a irrigação por aspersão e a água da chuva proporcionam molhamento foliar essencial à disseminação, multiplicação e penetração da bactéria. Mudas com elevada infecção e desfolha tornam-se inaptas para plantio no campo em virtude da redução da área fotossintética.

Bactérias que infectam folhas podem penetrar através de ferimentos ou aberturas naturais como hidatódeos e estômatos (Huang, 1986; Hugouvieux et al., 1998; Romeiro, 2005). O processo infeccioso é afetado por diversos fatores que atuam em pré e pós-penetração. Dentre os que atuam antes da penetração, incluem-se a presença de cera na superfície foliar, a disponibilidade de nutrientes, a formação de agregados bacterianos, o tamanho, o número e a morfologia dos estômatos, a presença ou não de outros microrganismos (Mercier e Lindow, 2000; Marcell e Beattie, 2002; Monier e Lindow, 2005). Após a penetração, a colonização pode ser afetada pela produção de exopolissacarídeos pela bactéria, pela capacidade da bactéria em promover o extravasamento de eletrólito celular do hospedeiro para os espaços intercelulares, pela inter-relação entre bactérias e pela capacidade e velocidade das respostas do hospedeiro à infecção (Boher et al., 1997; Beattie e Lindow, 1999).

Apesar da importância atual da bacteriose foliar do eucalipto, não se conhece o processo de infecção e colonização da bactéria, fundamental no estudo das relações patógeno-hospedeiro, para embasar estratégias de controle.

Na eucaliptocultura, o controle da bacteriose tem sido executado por práticas de manejo que reduzem as fontes de inóculo e as condições favoráveis à infecção. Dentre essas práticas, incluem-se a eliminação de folhas e plantas doentes, o uso de irrigação por gotejamento ou subirrigação, a propagação de clones suscetíveis em épocas desfavoráveis à infecção, o uso de viveiros com cobertura e a utilização de material propagativo e ferramentas livres do patógeno (Alfenas et al., 2004). Entre essas medidas, a mais eficiente consiste em evitar o molhamento foliar, que muitas vezes torna-se muito dispendioso por exigir subirrigação por capilaridade e cobertura do viveiro em todas as fases da produção de mudas. Como essas práticas são dispendiosas e nem sempre exeqüíveis em todos os viveiros, aventou-se a hipótese de que o manejo da nutrição constitui uma alternativa viável para o controle da bacteriose foliar do eucalipto, dado que os nutrientes minerais têm importantes funções no metabolismo das plantas, influenciando no crescimento e desenvolvimento, na produção (Taiz e Zeiger, 2004) e também na incidência e, ou, na severidade de doenças (Zambolim e Ventura, 1993).

A ação dos nutrientes em relação a doenças em plantas varia de acordo com o nutriente, a espécie hospedeira e o patógeno. Os nutrientes podem aumentar ou reduzir a intensidade de infecção (Silveira e Higashi, 2003). Diversos trabalhos mostraram os efeitos de nutrientes em vários patossistemas (Biggs, 1999; Bécot et al., 2000; Long et al., 2000; Kim et al., 2002), mas seu modo de ação ainda não foi totalmente esclarecido.

Este trabalho teve como objetivos estudar os estádios iniciais do processo de infecção da planta pelo patógeno, a colonização de tecidos pelo patógeno, a influência do número de portas de entrada (estômatos) na incidência e na severidade da doença (Artigo 1) e a influência de nutrientes na severidade e na incidência da mancha foliar bacteriana do eucalipto causada por *Xanthomonas axonopodis* (Artigo 2). Esta tese encontra-se dividida em dois artigos escritos segundo as normas da revista Fitopatologia Brasileira.

2 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFENAS, A.C., ZAUZA, E.A.V., MAFIA, R.G. & ASSIS, T.F. Clonagem e doenças do eucalipto. Viçosa. Editora UFV. 2004.
- BEATTIE, G. A. & LINDOW, S. E. Bacterial colonization of leaves: a spectrum of strategies. *Phytopathology*. 89:353-359. 1999.
- BÉCOT, S., PAJOT, E., CORRE, D.L., MONOT, C. & SILUÉ, D. Phytogard (K_2HPO_3) induces localized resistance in cauliflower to downy mildew of crucifers. *Crop Protection*. 19:417-425. 2000.
- BIGGS, A.R. Effects of calcium salts on apple bitter rot caused by two *Colletotrichum* spp. *Plant Disease*. 83:1001-1005. 1999.
- BOHER, B., NICOLE, M., POTIN, M. & GEIGER, J. P. Extracellular polysaccharides from *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* interact with cassava cell walls during pathogenesis. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 10:803-811. 1997.
- HUANG, J. S. Ultrastructure of bacterial penetration in plants. *Annual Review of Phytopathology*. 24:141-57. 1986.
- HUGOUVIEUX, V., BARBER, C. E. & DANIELS, M. J., Entry of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* into hydathodes of *Arabidopsis thaliana* leaves: a system for studying early infection events in bacterial pathogenesis. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 11:537-543. 1998.
- KIM, S. G., KIM, K. W., PARK, E. W. & CHOI, D. Silicon-induced cell wall fortification of rice leaves: A possible cellular mechanism of enhanced host resistance to blast. *Phytopathology*. 92:1095-1103. 2002.
- LONG, D.H., LEE, F.N. & TEBEEST, D.O. Effect of nitrogen fertilization on disease progress of rice blast on susceptible and resistant cultivars. *Plant Disease*. 84:403-409. 2000.
- MARCELL, L. M. & BEATTIE, G. A. Effect of leaf surface waxes on leaf colonization by *Pantoea agglomerans* and *Clavibacter michiganensis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 15:1236-1244. 2002.

- MERCIER, J. & LINDOW, S. E. Role of leaf surface sugars in colonization of plants by bacterial epiphytes. *Applied and Environmental Microbiology*. 66:369-374. 2000.
- MONIER, J. M. & LINDOW, S. E. Spatial organization of dual-species bacterial aggregates on leaf surfaces. *Applied and Environmental Microbiology*, 71:5484-5493. 2005.
- ROMEIRO, R. S. Bactérias Fitopatogênicas. Viçosa. Editora UFV. 2005.
- SILVEIRA, R. L.V.A. & HIGASHI, E.N. Aspectos nutricionais envolvidos na ocorrência de doenças com ênfase para o eucalipto. IPEF (Circular Técnica nº 200). 14. 2003.
- TAIZ, L. & ZEIGER, E. Fisiologia vegetal. 3ª ed. São Paulo. Artmed. 2004.
- ZAMBOLIM, L. & VENTURA, J.A. Resistência a doenças induzida pela nutrição mineral das plantas. *Revisão Anual de Patologia de Plantas*. 1:275-318. 1993.

Artigo 1

Histopatologia da interação *Xanthomonas axonopodis* e eucalipto.

Aderlan Gomes da Silva, Acelino Couto Alfenas, Claudia Alencar Vanetti,
Nairam Félix de Barros.

RESUMO

A mancha foliar do eucalipto causada por *Xanthomonas axonopodis* inicia-se com manchas cloróticas que progridem sucessivamente para anasarca, necrose e desfolha. A doença ocorre com maior intensidade em folhas expandidas, mas a penetração e colonização da bactéria, fundamentais para embasar estratégias de controle, ainda não foram estudados. Por meio de microscopia eletrônica de varredura, observou-se que o patógeno penetra por estômatos, havendo a formação de microcolônias na câmara sub-estomática e no interior de cavidades secretoras 6 horas após a inoculação. Aos oito dias após a inoculação, observou-se a ruptura da epiderme e no interior dos tecidos uma grande massa de bactérias e uma substância mucilaginosa próxima às células bacterianas. A quantidade de bactérias aumentou com o período de incubação. A influência de portas-de-entrada (estômatos) sobre a suscetibilidade das plantas à bacteriose foi estudada utilizando-se clones com diferentes níveis de resistência. Amostras de folhas de mesma posição no ramo foram coletadas e submetidas ao clareamento com cloral hidratado e à microscopia de luz para avaliar o índice estomático nas plantas de diferentes clones e determinar a existência da relação entre número de estômatos e severidade da doença. A severidade da doença não se relacionou com o índice estomático. Para avaliar a influência da idade das folhas na suscetibilidade à doença, plantas de cinco clones foram inoculadas da primeira à sexta folhas. Folhas mais velhas apresentaram maior percentagem de área foliar lesionada.

ABSTRACT

The bacterial leaf blight of eucalypts caused by *Xanthomonas axonopodis* begins with chlorotic lesions that develop to water soaking lesions followed by necrosis, and may result in intense leaf fall. The disease occurs with larger intensity in expanded leaves, but the penetration and colonization of the pathogen were not yet studied. The understanding of these events has singular importance to control the disease. In this work was shown that the ingress of the pathogen has occurred through stomata. It was observed bacterial aggregates in intercellular spaces in internal leaf tissues 6 h.a.i. Chlorotic lesions were observed at SEM eight days after the inoculation and was observed that the leaf epidermis was disrupted. Inside the tissues was observed a big mass of bacteria and a slime-like substance next to the bacterial cells. The amount of bacteria increased with the incubation period. To determine the influence of the number of entry sites on the host susceptibility, leaves from five eucalypts clones were collected before inoculation and had their stomatal index evaluated by light microscopy. There was no relationship between stomatal index and disease susceptibility. Leaves from one to six of five eucalypts clone plants were inoculated in order of studying the influence of leaf age in disease susceptibility. It was observed that the disease susceptibility increased with the aging of eucalypts leaves.

1. INTRODUÇÃO

A mancha foliar do eucalipto causada por *Xanthomonas axonopodis* Vauterin ocorre em plantas no viveiro e no campo (Gonçalves, 2003). No viveiro tem sido mais freqüente nas fases de crescimento e rustificação, em que a irrigação por aspersão e a água da chuva proporcionam condição de molhamento foliar essencial para a penetração da bactéria. A remoção de folhas doentes, ausência de molhamento da parte aérea das plantas a multiplicação de clones suscetíveis em épocas do ano que sejam menos favoráveis à ocorrência da bacteriose têm sido as medidas de controle recomendadas (Alfenas et al., 2004).

Bactérias que infectam folhas podem penetrar por ferimentos ou aberturas naturais como hidatódeos e estômatos (Huang, 1986; Hugouvieux et al., 1998; Romeiro, 2005). O processo infeccioso é afetado por diversos fatores que atuam em pré e pós-penetração. Dentre os que atuam antes da penetração, incluem-se a presença de cera e a disponibilidade de nutrientes na superfície foliar, a formação de agregados bacterianos, o tamanho, número e morfologia dos estômatos, a presença ou não de outros microrganismos (Marcell e Beattie, 2002; Monier e Lindow, 2003; Monier e Lindow, 2005).

Além da capacidade e velocidade das respostas do hospedeiro à infecção, a colonização pode ser afetada pela produção de exopolissacarídeos pela bactéria, pela capacidade da bactéria em promover o extravasamento de eletrólito celular do hospedeiro para os espaços intercelulares e pela inter-relação entre bactérias (Boher et al., 1997; Beattie e Lindow, 1999; Yun, 2006). O conhecimento do processo de infecção e colonização dos tecidos do hospedeiro é fundamental no estudo das relações entre patógeno e hospedeiro a fim de embasar estratégias de controle da doença, objeto deste estudo.

2. – MATERIAL E MÉTODOS

2.1. - Cultivo das plantas

Mudas de cinco clones híbridos (clones 1501, 6011, 6061, 6075 e 6084) de *Eucalyptus urophylla* Blake x *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden, com 50 dias de idade, com raízes nuas e lavadas foram transplantadas para vasos com capacidade de 1,8 L contendo areia lavada. As mudas foram irrigadas com a solução nutritiva número 1 utilizada em minijardim clonal (Alfenas et al., 2004), com algumas modificações. Para preparo das soluções foram utilizados fertilizantes comerciais. Cada planta recebeu 200 mL de solução por dia, divididos em quatro aplicações de cerca de 50 mL, sendo duas no período da manhã e duas à tarde. As soluções estoque de macro e micronutrientes utilizadas foram compostas por: **solução estoque 1**: nitrato de cálcio (23 g/L), cloreto de potássio branco (6 g/L), nitrato de potássio (3,5 g/L), fosfato monoamônico (2,4 g/L); **solução estoque 2**: sulfato de magnésio (9,1 g/L), quelato de ferro Tenso Ferro (1,3 g/L); **solução estoque 3**: ácido bórico (3,5 g/L), sulfato de zinco (0,6 g/L), sulfato de manganês (1,4 g/L), sulfato de cobre (0,125 g/L), molibdato de sódio (0,05 g/L). A solução de irrigação foi constituída de 1 L da solução estoque 1, 1 L da solução estoque 2 e 20 mL da solução estoque 3, diluídos em 25 litros de água.

2.2.- Preparo do inóculo e inoculação

Empregou-se o isolado BSC475 de *X. axonopodis* identificado por Gonçalves (2003), oriundo de folhas infectadas de plantas de eucalipto do clone 475, híbrido de *E. urophylla* x *E. grandis*, do sul do estado da Bahia. O isolado foi repicado a partir de tubos da cultura armazenados em glicerol a -20

°C para placas de Petri contendo meio 523 (Kado e Heskett, 1970). As placas foram mantidas a 28 °C até o crescimento bacteriano, quando este foi repicado para meio 523, visando-se à produção de inóculo bacteriano em suspensão salina. Após 36 h a 28 °C, adicionou-se 1 mL de solução salina (0,9 % de NaCl) e as colônias foram raspadas com uma alça de Drigalsky. O número de unidades formadoras de colônias (u.f.c.) da suspensão bacteriana foi determinado indiretamente, com o uso de espectrofotômetro Beckman (modelo DU-640), de acordo com testes preliminares realizados no laboratório. A suspensão de células bacterianas foi diluída até aproximadamente 10^8 u.f.c./mL, que corresponde à densidade ótica de 0,15 ($\lambda = 540$ nm).

As plantas permaneceram em casa de vegetação até a véspera da inoculação, quando foram mantidas em câmara de nevoeiro, a 25 °C, por 12 h. Após esse período foram aspergidas com a suspensão de inóculo ($OD_{540} = 0,15$) e a seguir foram novamente alojadas na câmara de nevoeiro por 24 h, com fotoperíodo de 12 h e intensidade de luz de $12 \mu\text{mol.s}^{-1}.\text{m}^{-2}$. Em seguida, foram transferidas para casa de vegetação onde permaneceram até a avaliação. A temperatura variou de 18 a 42 °C durante o experimento.

2.3. - Avaliação da doença

Para avaliar a severidade (percentagem de área foliar lesionada), imagens das folhas de dois ramos de cada planta foram digitalizadas em “scanner”, e mensuradas com o programa Quant 1.0, para Windows (Vale et al., 2001).

2.4. - Penetração e colonização

Estudou-se a interação entre fitobactéria e planta, antes da colonização dos tecidos do hospedeiro, com microscopia eletrônica de varredura para

verificar a disposição das células bacterianas antes de ingressarem na folha e determinar a porta-de-entrada do patógeno no tecido foliar. Para isso, mudas dos clones 6075 e 6084, híbridos de eucalipto que diferem quanto à suscetibilidade à bacteriose, foram inoculadas como já descrito. Para avaliação dos eventos de pré-penetração e penetração propriamente dita, as folhas foram coletadas a 1, 3, 6, 12, 18 e 24 h após a inoculação. De cada planta, coletaram-se as folhas cinco e seis a contar do ápice do ramo (Figura 1). Cada folha foi seccionada e os fragmentos, com cerca de 1 cm², foram fixados por 1 h em solução contendo glutaraldeído a 3 % e formaldeído a 1,5 % em solução-tampão de fosfato de potássio a 0,05 M, pH 6,8. Após a fixação, os fragmentos foram lavados seis vezes, durante 10 min, na mesma solução-tampão. Após a lavagem, as amostras foram desidratadas em série etanólica crescente de 30, 50, 70, 80, 95 e 100% por 10 min, sendo realizadas três passagens na última concentração. O material foi submetido à secagem ao ponto crítico, usando-se CO₂ líquido, no aparelho Critical Point Drier, Bal-Tec CPD 030. A seguir os fragmentos tissulares foram aderidos em suportes metálicos (*stubs*) com fita adesiva de carbono dupla face e cobertos com ouro por meio de pulverizações catódicas (Sputter Coating Balzers – FDU 010). As amostras foram observadas no microscópio eletrônico de varredura (modelo LEO, 1430 VP) com aceleração de 20 KV e distância de trabalho de 10 -15 mm.

Para avaliar a colonização bacteriana no interior dos tecidos, secções de folhas com aproximadamente 10x3 mm de largura foram obtidas com o auxílio de uma lâmina de barbear, a partir de folhas coletadas nos tempos citados anteriormente. As secções de folhas foram preparadas como descrito no parágrafo anterior para observações ao microscópio eletrônico de varredura, exceto que elas foram dispostas lateralmente sobre os suportes metálicos para

serem observadas transversalmente para determinar os sítios ocupados pelas bactérias.

2.5. - Relação entre número de estômatos e severidade da doença

Para determinar a relação entre severidade da doença e número de estômatos, cinco mudas dos clones 6061, 6075, 6084, 6011 e 1501, foram aspergidas com uma suspensão de *X. axonopodis*, com aproximadamente 1×10^8 u.f.c./mL. O preparo do inóculo e inoculação foram realizados como descrito em 2.2 e a avaliação da percentagem de área foliar lesionada, como em 2.3. Para avaliar o índice estomático ($100 \times n^\circ$ de estômatos/(número de estômatos + n° células epidérmicas)) antes da inoculação, as folhas cinco e seis (Figura 1) foram coletadas e submetidas à diafanização conforme metodologia adaptada de Longo et al., (1994). Amostras das folhas foram clareadas com cloral hidratado diluído em água destilada a 5:2 (v/v), durante cinco dias, em ambiente de laboratório (cerca de 25 °C). Após o clareamento, as amostras foram mantidas em lactofenol durante 24 h e a seguir dois fragmentos de cada folha, com cerca de 0,3 cm², foram dispostos em cada lâmina contendo lactofenol-azul de algodão (0,25%) de modo que a face abaxial ficasse voltada para cima. A amostra foi coberta com lamínula e observada em microscópio de luz transmitida com aumento de 200 vezes. Avaliou-se a densidade estomática em cinco campos microscópicos para cada secção de tecido. Considerou-se cada folha como uma repetição e foram realizadas dez repetições por clone. O experimento foi montado em delineamento inteiramente casualizado. Os dados de percentagem de área foliar lesionada e de índice estomático foram submetidos à análise de variância. Os dados de percentagem de área foliar lesionada (x) foram

transformados para $\sqrt{(x+0,1)}$ para realização da análise de variância. Foi realizada análise de correlação não paramétrica, de Spearman, entre o índice estomático e a percentagem de área foliar lesionada. As análises estatísticas foram realizadas com o programa Statistica 5.5.

2.6. - Influência da idade da folha

Utilizaram-se plantas dos clones 1501, 6011, 6061, 6075 e 6084 para estudar a influência da idade da folha na suscetibilidade à doença. Inocularam-se as folhas 1, 2, 3, 4, 5 e 6 como anteriormente descrito. Foram avaliadas duas folhas de cada estágio fenológico por planta quanto à percentagem de área foliar lesionada 30 dias após a inoculação. Cada planta foi considerada uma unidade experimental, sendo realizadas cinco repetições. Para análise dos dados, para cada repetição, as folhas foram consideradas aos pares considerando-se o estágio fenológico, sendo analisadas a média das folhas 1 e 2, 3 e 4 e folhas 5 e 6. O experimento consistiu de um delineamento inteiramente casualizado em arranjo fatorial, com cinco clones e três estádios fenológicos. Os dados de percentagem de área foliar lesionada foram submetidos à análise de variância e teste LSD de Fisher ao nível de 5 % de significância com o programa Statistica 5.5.

3. – RESULTADOS

3.1. – Penetração e colonização de *Xanthomonas axonopodis*

Não foram observadas células bacterianas na superfície de folhas não inoculadas, porém nas demais plantas, 1 h após a inoculação (h.a.i.) observaram-se poucas células bacterianas, principalmente na proximidade dos estômatos (Figura 2 a), cujo número aumentou com o tempo de incubação, até

24 h.a.i. Duas horas após a inoculação, foram observadas microcolônias sobre os estômatos. Microcolônias e células bacterianas isoladas foram observadas adjacentes às cavidades secretoras 4 h.a.i. Com 6 h.a.i. foram observadas células e microcolônias nos espaços intercelulares da superfície epidérmica, externa, próximas dos estômatos e das cavidades secretoras (Figura 2 b). A partir dos cortes histológicos, observaram-se microcolônias e células individuais no interior dos tecidos, nos espaços intercelulares próximos das câmaras subestomáticas e nas cavidades secretoras 6 h.a.i (Figura 2c). Não houve diferenças de penetração bacteriana entre as plantas dos clones 6075 e 6084, mas as plantas do clone 6084 aparentemente tinham maior número de células bacterianas e microcolônias, 6 h.a.i. Notou-se a presença de material mucilaginoso nas microcolônias bacterianas localizadas na superfície e no interior do tecido em diversas amostras a partir de 6 h.a.i. Aos 8 dias da inoculação, foram observados pontos escuros no centro de áreas cloróticas no limbo foliar. O exame dessas lesões ao microscópio eletrônico de varredura revelou rupturas do tecido epidérmico correspondentes aos pontos escuros centrais (Figura 2d). Observou-se uma grande massa de bactérias no interior dos tecidos e algumas células bacterianas isoladas localizadas próximas dos estômatos. Aos 22 dias após a inoculação, observaram-se bactérias que extravasavam dos ferimentos. No interior do tecido houve aumento na população bacteriana. O número de células bacterianas foi aparentemente maior nos tecidos do clone 6084. Observou-se que até 24 h.a.i. as células bacterianas tinham formato de bastonetes curtos e cocos, e aos 8 e 22 dias após a inoculação adquiriram o formato de bastonetes longos (Figura 2e).

3.2. – Relação entre número de estômatos e severidade da doença

O índice estomático diferiu significativamente entre as plantas dos clones na análise de variância e pelo teste LSD de Fisher a 5 % de significância. As plantas dos clones diferiram quanto à percentagem de área foliar lesionada, na análise de variância e no teste LSD de Fisher a 5 % de significância. As plantas do clone 6061 tiveram maior percentagem de área foliar lesionada (Tabela 1). Não houve relação entre índice estomático e severidade da doença ($p > 0,05$).

3.3. – Influência da idade da folha

A percentagem de área foliar lesionada variou entre folhas de diferentes idades, sendo que as folhas mais velhas apresentaram maior severidade da doença (Tabela 2).

4. – DISCUSSÃO

A morfologia e o número de células bacterianas variaram com o período de incubação, apresentando formato de bastonetes curtos nas primeiras horas após a inoculação e bastonetes longos e em maior número a partir do oitavo dia pós-inoculação. Células bacterianas em forma de bastonetes curtos encontravam-se em divisão e iniciavam a formação de microcolônias. A redução do tamanho da bactéria ocorreu provavelmente devido à menor disponibilidade de nutrientes na superfície foliar nos estágios iniciais da infecção. Decorridos oito dias da inoculação, houve um aparente aumento no tamanho das células bacterianas. Esse aumento no tamanho das células bacterianas pode ser atribuído à maior disponibilidade de nutrientes no interior do tecido vegetal, pois decorridos oito dias da inoculação eram notados a olho

nu, pontos de anasarca no centro das lesões cloróticas, indicando o extravasamento de eletrólito. A observação das lesões ao microscópio eletrônico de varredura mostrou que a epiderme havia rompido o que pode ter liberado nutrientes para o meio. Em condições de redução de nutrientes no meio, células de *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* van Hall apresentaram redução do tamanho, tanto na planta quanto em condições de cultura. A adição de nutrientes ao meio ou a transferência de células bacterianas para meio com maior quantidade de nutrientes resultou na retomada da forma e do tamanho das células bacterianas (Monier e Lindow, 2003). Björklöf et al. (2000) também observaram redução do tamanho de células de *P. syringae* pv. *syringae* em plantas inoculadas e mantidas em umidade relativa de 100 %.

A percentagem de área foliar lesionada não foi afetada pelo índice estomático da face abaxial das folhas das plantas dos clones de eucalipto avaliados. Embora os estômatos sejam utilizados como porta-de-entrada, a suscetibilidade de plantas de eucalipto à doença não está ligada ao número de estômatos. Folhas jovens (1º par de folhas), com cerca de uma semana de idade geralmente não apresentaram infecção, ou apresentaram baixa percentagem de área foliar lesionada. A ausência de relação significativa entre índice estomático e suscetibilidade das plantas à doença indica que outros fatores como atividade estomática e presença de ceras e nutrientes na superfície foliar podem estar relacionados à suscetibilidade das plantas ao patógeno.

Diferentemente de outros estudos em que órgãos mais jovens permitem maior multiplicação do patógeno e maior severidade da doença, no presente trabalho, as folhas mais velhas, com duas a seis semanas, foram as mais suscetíveis. No patossistema *Erwinia amylovora* (Burril) Winslow e macleod, a

botões florais permitem maior multiplicação do patógeno quando inoculados nos estádios iniciais de desenvolvimento, sendo que à medida que os botões florais envelhecem a capacidade de manutenção do crescimento e multiplicação do patógeno decresce, assim como de agentes de biocontrole (Thomson e Gouk, 2003). Plantas de repolho resistentes à podridão negra das brássicas causada por *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Pammel) Dowson podem não expressar resistência no estágio de plântulas, exibindo apenas resistência de planta adulta (Hunter et al., 1987).

Até o presente, não se conhecem os mecanismos envolvidos na resistência de eucalipto à infecção de *X. axonopodis*, mas é possível que a quantidade de carboidratos e outros nutrientes presentes na superfície das folhas interfira na relação entre patógeno e hospedeiro, visto que em condições de privação nutricional pode haver redução da multiplicação de bactérias na superfície do hospedeiro antes da penetração (Mercier e Lindow, 2000), diminuindo assim o número de bactérias que ingressam no hospedeiro e dando à planta maior chance de resposta à infecção. A presença de ceras na superfície foliar pode aumentar a hidrofobicidade foliar e reduzir a adesão, a penetração e a colonização das folhas pela fitobactéria. Plantas mutantes de milho com menor quantidade de cera superficial nas folhas ou plantas do tipo selvagem em que foi retirada parte da cera apresentaram maiores populações de *Pantoea agglomerans* (Ewing e Fife) Gavine et al. (Marcell e Beattie, 2002). Após a penetração, a capacidade do patógeno em driblar ou desativar o sistema de defesa da planta é importante para o sucesso da infecção assim como a presença de nutrientes nos espaços intercelulares das folhas (Beattie e Lindow, 1999). Além de nutrientes, substâncias antimicrobianas e inibitórias ao crescimento bacteriano podem estar presentes nos espaços intercelulares em

diferentes proporções variando entre folhas de uma mesma planta. Para que haja sucesso da infecção, o patógeno deve apresentar resistência a tais compostos antimicrobianos, inibir sua produção, ter algum mecanismo de detoxificação ou de transporte de tais compostos como a bomba de efluxo induzida em *E. amylovora* que promove resistência a acriflavina, evitando que a mesma atinja concentrações tóxicas (Burse et al., 2004). Folhas de *Cichorium endiva* L. apresentam populações bacterianas maiores quando jovens. Para folhas de mesma idade em plantas jovens e velhas, as maiores populações bacterianas são encontradas nas folhas das plantas velhas (Jacques et al., 1995). Diferenças na quantidade e no tipo de compostos fenólicos que ocorrem nas plantas podem afetar a relação entre patógeno e hospedeiro em folhas de diferentes estádios fenológicos dentro de uma planta ou em plantas de diferentes linhagens. Kangatharalingam et al. (2002) verificaram que plantas de algodão que produziam e acumulavam antocianina nas células subsidiárias eram mais resistentes a *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* (Smith) Dye que plantas que não produziam, ou que produziam em menor quantidade, na ausência do gene de resistência B_{in} . No presente trabalho é possível que tenha ocorrido maior produção de compostos relacionados à defesa nas folhas mais resistentes e, ou, uma menor disponibilidade de nutrientes. Em geral, folhas possuem pouca quantidade de carboidratos sendo que sua maior parte é transportada para órgãos com maior necessidade de energia, de maior atividade fisiológica ou em que os açúcares possam ser armazenados por mais tempo e em maior quantidade (Koslowski e Pallardy, 1996). A quantidade de carboidratos no interior das células, nos espaços intercelulares e na superfície foliar pode variar com a idade foliar, e resultar em diferenças na multiplicação e colonização bacteriana em folhas de diferentes idades. Os estômatos possuem

diversos papéis na resistência de plantas a doenças sendo que a resistência pode estar relacionada com o tamanho, número e, ou, morfologia dos estômatos (Huang, 1986). Além desses fatores a atividade de abertura e fechamento de estômatos também pode estar envolvida na resistência de plantas a patógenos como demonstrado para o patossistema *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh e *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Okabe) Young et al. em que na presença do patógeno a planta responde fechando os estômatos, mas nesse caso a bactéria suplanta tal defesa induzindo a abertura estomática (Melotto et al., 2006). É possível que em folhas de eucalipto os estômatos permaneçam com maior abertura, durante maior tempo em folhas mais velhas. Estudos adicionais são necessários para verificar existência de relação entre a severidade e incidência da doença e o comportamento estomático em folhas de diferentes estádios fenológicos e entre plantas de eucalipto de diferentes clones.

6. – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFENAS, A.C., ZAUZA, E.A.V., MAFIA, R.G. & ASSIS, T.F. Clonagem e doenças do eucalipto. Viçosa. Editora UFV. 2004.
- BEATTIE, G. A., LINDOW, S. E. Bacterial colonization of leaves: a spectrum of strategies. *Phytopathology*. 89:353-359. 1999.
- BJÖRKLÖF, K., NURMIAHO-LASSILA, E.-L., KLINGER, N., HAAHTELA, K. & ROMANTSCHUK, M. Colonization strategies and conjugal gene transfer of inoculated *Pseudomonas syringae* on the leaf surface. *Journal of Applied Microbiology*. 89: 423-432. 2000.
- BOHER, B., NICOLE, M., POTIN, M. & GEIGER, J. P. Extracellular polysaccharides from *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* interact with cassava cell walls during pathogenesis. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 10:803-811. 1997.
- BURSE, A., WEINGART, H. & ULLRICH, M. S. The phytoalexin inducible multidrug efflux pump AcrAB contributes to virulence in the fire blight pathogen, *Erwinia amylovora*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 17:43-54. 2004.
- GONÇALVES, R. C. Etiologia da mancha bacteriana do eucalipto no Brasil. Tese de Doutorado. Viçosa MG. Universidade Federal de Viçosa. 2003.

- HUANG, J. S. Ultrastructure of bacterial penetration in plants. *Annual Review of Phytopathology*. 24:141-57. 1986.
- HUGOUVIEUX, V., BARBER, C. E. & DANIELS, M. J., Entry of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* into hydathodes of *Arabidopsis thaliana* leaves: a system for studying early infection events in bacterial pathogenesis. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 11:537-543. 1998.
- HUNTER, J. E., DICKSON, M. H. & LUDWIG, J. W. Source of resistance to black rot of cabbage expressed in seedlings and adult plants. *Plant Disease*. 71:263-266. 1987.
- JACQUES, M. A., KINKEL, L. L. & MORRIS, C. E. Population sizes, immigration, and growth of epiphytic bacteria on leaves of different ages and positions of field-grown endive (*Cichorium endiva* var. *latifolia*). *Applied and Environment Microbiology*. 61:899-906. 1995.
- KADO, E. I. & HESKETT, M. G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. *Phytopathology*. 60:969-976. 1970.
- KANGATHARALINGAM, N., PIERCE, M. L., BAYLES, M. B. & ESSENBERG, M. Epidermal anthocyanin production as an indicator of bacterial blight resistance in cotton. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 61:189-195. 2002.
- KOSLOWSKI, T.T. & PALLARDY, S.G. *Physiology of woody plants*. San Diego. Academic Press. 1996.
- MARCELL, L. M. & BEATTIE, G. A. Effect of leaf surface waxes on leaf colonization by *Pantoea agglomerans* and *Clavibacter michiganensis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 15:1236-1244. 2002.
- MELOTTO, M., UNDERWOOD, W., KOCZAN, J., NOMURA, K. & HE, S. Y. Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion. *Cell*. 126:969-980. 2006.
- MERCIER, J. & LINDOW, S. E. Role of leaf surface sugars in colonization of plants by bacterial epiphytes. *Applied and Environmental Microbiology*. 66:369-374. 2000.
- MONIER, J. M. & LINDOW, S. E. Differential survival of solitary and aggregated bacterial cells promotes aggregate formation on leaf surfaces. *PNAS*. 100:15977-15982. 2003.
- MONIER, J. M. & LINDOW, S. E. Spatial organization of dual-species bacterial aggregates on leaf surfaces. *Applied and Environmental Microbiology*. 71:5484-5493. 2005.
- ROMEIRO, R. S. *Bactérias Fitopatogênicas*. Viçosa. Editora UFV, 2005.
- THOMSON, S. V. & GOUK, S. C. influence of age of apple flowers on growth of *Erwinia amylovora* and biological control agents. *Plant Disease*. 87:502-509. 2003.
- YUN, M. H., TORRES, P. S., OIRDI, M. E., RIGANO, L. A., GONZALEZ-LAMOTHE, R., MARANO, M. R., CASTAGNARO, A. P., DANKERT, M. A., BOUARAB, K. & VOJNOV, A. A. Xanthan induces plant susceptibility by suppressing callose deposition. *Plant Physiology*. 141:178-187. 2006.

VALE, F. X. R. ; FERNANDES FILHO, E. I. ; LIBERATO, J. R. ; ZAMBOLIM, L.
Quant - a software to quantify plant disease severity. Resumos, VIII
International workshop on plant disease epidemiology, Ouro Preto MG. 2001.
pp. 160.

Tabela 1 – Índice estomático (IE) e percentagem de área foliar lesionada (AL) para folhas de plantas de cinco clones híbridos de *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis*.

Clone	IE	AL
6061	16,39 b	10,39 a
6075	17,67 b	3,15 b
6084	17,55 b	5,49 b
6011	21,35 a	1,23 b
1501	19,74 a	2,28 b

Médias seguidas pela mesma letra numa mesma coluna não diferem significativamente pelo teste LSD de Fisher ao nível de 5 % de significância.

Tabela 2 – Percentagem de área foliar lesionada para folhas, de diferentes idades, de plantas de cinco clones híbridos de *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis* inoculadas com *Xanthomonas axonopodis*.

Clone	Área foliar lesionada (%)		
	Folhas 1 e 2	Folhas 3 e 4	Folhas 5 e 6
6061	0,69 b	2,29 b	17,09 a
6075	0,65 c	4,58 b	9,25 a
6084	1,08 b	7,40 a	13,00 a
6011	0,00 a	0,60 b	2,50 c
1501	1,19 a	2,08 a	3,54 a

Médias seguidas pela mesma letra numa mesma linha não diferem significativamente pelo teste LSD de Fisher ao nível de 5 % de significância.



Figura 1 – Representação esquemática da disposição das folhas nos ramos avaliados.

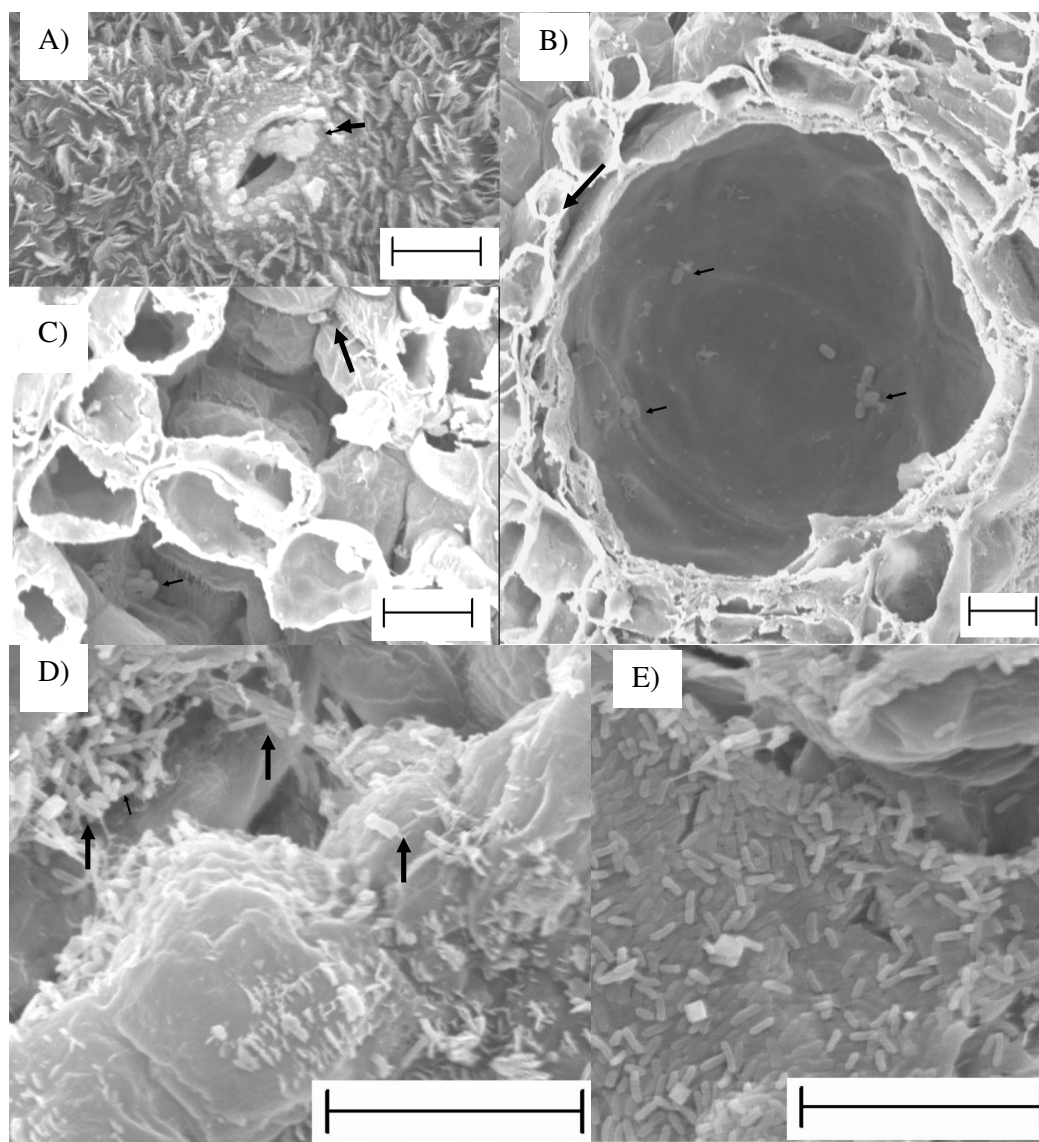


Figura 2 - Presença de células de *Xanthomonas axonopodis* em folhas de eucalipto, híbrido de *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis*, inoculadas com o patógeno. A) sobre estômato 2 h.a.i.; B) no interior de glândula secretora 6 h.a.i.; C) na câmara subestomática, 6 h.a.i.; D) em espaços intercelulares, sob a epiderme, em área de tecido com sintoma de clorose com pontos escuros no centro 8 dias após a inoculação; E) no interior do tecido vegetal envolta em massa mucilaginosa 22 dias após a inoculação. Setas (A-D) indicam células bacterianas. Barra de 10 µm.

Artigo 2

INFLUÊNCIA DE NUTRIENTES NA INCIDÊNCIA E NA SEVERIDADE DA MANCHA FOLIAR DO EUCALIPTO CAUSADA POR *Xanthomonas axonopodis*.

Aderlan Gomes da Silva, Acelino Couto Alfenas, Nairam Félix de Barros, Cláudia Aparecida Pontes, Robert Cardoso Sartório, Sebastião da Fonseca, Daniela Andrade Neves

RESUMO

A mancha foliar bacteriana do eucalipto, causada por *Xanthomonas axonopodis*, é uma das principais enfermidades do eucalipto em viveiros no Brasil. Diversas medidas de controle são utilizadas para reduzir a perda de mudas, sendo a mais eficaz evitar o molhamento foliar. Em certos casos não tem sido possível executar tal medida, assim aventou-se a hipótese de que o manejo da nutrição mineral poderia reduzir a intensidade da doença em mudas de eucalipto. Para testar essa hipótese realizaram-se três ensaios em casa de vegetação e um em viveiro comercial de produção de mudas. Em casa de vegetação foram utilizadas mudas de clones híbridos de *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis* cultivadas em vasos contendo areia, e irrigadas com diferentes soluções nutritivas, suplementadas com cobre, boro, potássio, cálcio e, ou nitrogênio. A ação de cobre, boro e cálcio foi variável. A influência do manejo de nitrogênio e notadamente do potássio sobre a intensidade da doença foi consistente e apresentou elevado potencial de utilização. Níveis intermediários de nitrogênio na solução nutritiva aumentaram a suscetibilidade das plantas à bacteriose. A intensidade da bacteriose reduziu com o aumento dos níveis de potássio na solução nutritiva. A redução da bacteriose pôde, em parte, ser explicada por uma redução da relação nitrogênio/potássio e por um aumento no teor de açúcares no tecido foliar. Devido ao efeito do potássio em casa de vegetação, testou-se, em viveiro, o efeito da aplicação de KCl em

mudas de dois clones de *Eucalyptus globulus*. A incidência da bacteriose reduziu com o aumento da concentração de KCl aplicada, mas houve aumento na incidência de mofo cinzento nas mudas. O manejo da nutrição mineral, especialmente do potássio, apresenta grande potencial de utilização no manejo da mancha foliar do eucalipto causada por *X. axonopodis*.

ABSTRACT

Bacterial leaf blight of eucalyptus, caused by *Xanthomonas axonopodis*, is a major disease of eucalypts in Brazilian nurseries. We hypothesized that mineral nutrients could reduce both disease severity and incidence. To test this hypothesis we conducted three experiments in glass house and one in a commercial eucalypts nursery. The plants were irrigated with solutions which varied in concentrations of copper, boron, potassium, calcium, and nitrogen. Although the effects of copper, boron and calcium were not consistent, management of potassium and nitrogen levels consistent in all clones tested. Higher potassium levels decreased disease severity, which was higher in plants with higher nitrogen/potassium ratio. At the nursery we tested the effect of irrigation with KCl on disease intensity. Bacterial blight incidence reduced and the gray mold incidence increased as potassium level in leaves increased and as nitrogen/potassium ratio decreased. Management of mineral nutrition, especially of potassium, has a potential use for integrated disease management of *X. axonopodis* in eucalypts nurseries.

1. INTRODUÇÃO

A mancha foliar bacteriana, causada principalmente por *Xanthomonas axonopodis* Vauterin, incide em mudas no viveiro e plantas jovens no campo (Alfenas et al., 2004) induzindo lesões internervurais, encharcadas, que progridem para lesões necróticas ressecadas, podendo ocasionar desfolha intensa sob condições favoráveis à infecção. Em viveiro, tem sido mais freqüente nas fases de crescimento e rustificação, em que a irrigação por aspersão e, ou a água da chuva proporcionam molhamento foliar essencial à disseminação, multiplicação e penetração da bactéria. Mudas com elevada infecção e desfolha tornam-se inaptas para plantio no campo em virtude da redução da área fotossintética.

O controle da bacteriose foliar do eucalipto tem sido executado por práticas de manejo que reduzem as fontes de inóculo e as condições favoráveis à infecção. Dentre essas práticas incluem-se a eliminação de folhas e plantas doentes, uso de irrigação por gotejamento ou subirrigação, propagação de clones suscetíveis em épocas desfavoráveis a infecção, uso de viveiros suspensos e cobertos bem como a utilização de material propagativo e ferramentas livres do patógeno (Alfenas et al., 2004). Entre essas medidas a mais eficiente consiste em evitar o molhamento foliar, que muitas vezes torna-se muito dispendioso por exigir sub-irrigação por capilaridade e cobertura do viveiro em todas as fases de produção das mudas. A maior ou menor suscetibilidade de plantas a doenças muitas vezes está ligada à presença de compostos orgânicos cuja síntese é influenciada pelo status nutricional da planta. Assim, pode-se levantar a hipótese que a intensidade da mancha foliar bacteriana do eucalipto seja influenciada pela nutrição da muda, sendo dessa forma o manejo da nutrição uma alternativa viável para o controle da doença.

Diversos trabalhos mostraram os efeitos de nutrientes em vários patossistemas (Biggs, 1999; Bécot et al., 2000; Kim et al., 2002), mas seu modo de ação ainda não foi totalmente esclarecido. Como o efeito de nutrientes em doenças de plantas varia com o nutriente, a espécie hospedeira e o patógeno, eles podem aumentar ou reduzir a intensidade de infecção (Silveira e Higashi, 2003).

O nitrogênio pode aumentar a susceptibilidade das plantas a patógenos devido à produção de tecido juvenil e retardamento da maturação dos tecidos produzidos (Zambolim e Ventura, 1993). Plantas de arroz com nível normal de nitrogênio apresentaram maior severidade de brusone que plantas que receberam menor adubação. O incremento da adubação além do usualmente recomendado pode aumentar a susceptibilidade de plantas suscetíveis, mas não tem efeito em plantas resistentes (Long et al., 2000). O nitrogênio pode ser encontrado nos vacúolos citoplasmáticos como íon livre e em diversos compostos orgânicos como aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, etc. É um componente essencial do protoplasma e das enzimas. Encontra-se acumulado na parte aérea juvenil, nas gemas, sementes e órgãos de armazenamento. A deficiência de nitrogênio pode causar nanismo, escleromorfismo e senescência foliar precoce (Koslowski e Pallardy, 1996; Larcher, 2000; Taiz e Zeiger, 2004).

Os efeitos do potássio tem sido verificados para patógenos facultativos e obrigatórios (Zambolim e Ventura, 1993). Sua ação geralmente é restrita à faixa de deficiência, mas aplicações de fosfato de potássio aumentam a resistência de couve-flor, pimentão, milho e outras plantas cultivadas a míldos pulverulentos (Reuveni et al., 1998; Bécot et al., 2000). Em plantas de café cultivadas em solução nutritiva, o aumento da concentração de potássio da

solução de 1 para 3 mmol/L reduziu a área abaixo da curva de progresso da incidência (AACPI) de cercosporiose, mas esta aumentou ao se elevar a concentração de potássio na solução para 7 mmol/L (Garcia Jr. et al., 2003). Os autores justificaram a redução da doença devido à redução de efluxo de íons potássio e o aumento da doença devido à competição do potássio com outros cátions nas concentrações maiores, interferindo especialmente na absorção de nitrogênio e cálcio, uma vez que o aumento da concentração de cálcio na solução nutritiva resultou em queda na AACPI da cercosporiose. Plantas com deficiência de potássio geralmente têm maiores concentrações de açúcares foliares que plantas com níveis adequados de potássio e ele está envolvido na osmorregulação, síntese de carboidratos e proteínas, sendo um elemento rapidamente translocável na planta (Marschner, 1995), dessa forma a deficiência de potássio pode afetar a síntese de proteínas relacionadas com as respostas de defesa das plantas principalmente em folhas mais velhas.

Fosfatos e fosfitos têm se mostrado eficientes no controle de várias doenças quando aplicados via foliar. Existem produtos comerciais à base de fosfato ou fosfito de potássio utilizados como ativadores de resistência. Alguns desses produtos atuam estimulando respostas de defesa das plantas, enquanto outros têm efeito direto sobre o patógeno (Förster et al., 1998; Wilkinson et al., 2001; Abbasi, 2002; Reuveni et al., 2003). Quando em baixas concentrações o fosfito pode atuar interagindo com o patógeno nos locais de ingresso estimulando as respostas de defesa da planta e em concentrações elevadas pode atuar diretamente sobre o patógeno (Jackson et al., 2000).

O cálcio tem apresentado efeito positivo na redução de várias doenças (Biggs et al., 1997; Biggs, 1999; Blodgett et al., 2002) e é provável que atua no fortalecimento da parede celular (Huber, 1980). Diversas espécies de

Xanthomonas liberam no meio enzimas que podem degradar a parede e aumentar a permeabilidade das membranas permitindo que o eletrólito celular extravase e sirva de substrato para multiplicação bacteriana (Swings e Civerolo, 1993). Além disso, o cálcio possui importante papel fisiológico em plantas como sinalizador secundário (Taiz e Zeiger, 2004).

O boro é um elemento para o qual ainda restam muitas dúvidas quanto ao seu papel no metabolismo vegetal. Sabe-se que o boro é importante para síntese de ácidos nucléicos, no alongamento celular, em respostas hormonais e no funcionamento de membrana (Taiz e Zeiger, 2004). Plantas de eucalipto deficientes em boro têm o crescimento apical prejudicado, podendo ocorrer morte de terminais de ramos provocando crescimento de brotações laterais além de poder quebra de ramos devido à redução da lignificação (Dell et al., 2001). No desenvolvimento de doenças há resultados conflitantes em relação à ação deste nutriente na intensidade de doenças (Keinath e Loria; 1990), mas sua ação contra fungos destruidores da madeira tem sido estudada em vários trabalhos, sendo o ácido bórico utilizado em preservativos de madeira de forma eficiente (Smith, 1970; Kartal et al., 2004). O boro pode atuar inibindo a glicólise (Bowen e Gauch, 1966), mas esse mecanismo de atuação pode ser suplantado (Parker et al., 1999).

O cobre é um importante co-fator enzimático e é essencial para a fotossíntese por estar ligado nas folhas à plastocianina que é o principal componente na cadeia de transporte de elétrons (Taiz e Zeiger, 2004). Produtos à base de cobre estão entre os produtos mais antigos utilizados no controle de patógenos e são utilizados no controle de doenças fúngicas e bacterianas (Agrios, 2005), mas algumas bactérias são naturalmente

insensíveis a compostos cúpricos em altas concentrações tanto “in vitro” como “in vivo” (Swings e Civerolo, 1993; Ritchie e Dittapongpitch, 1991).

Este trabalho objetivou estudar a influência de nutrientes na intensidade da mancha foliar bacteriana do eucalipto causada por *X. axonopodis*.

2. – MATERIAL E MÉTODOS

2.1. - Cultivo das plantas

Mudas de seis clones híbridos (clones 1428, 2029, 6011, 6061, 6084 e 20242) de *Eucalyptus urophylla* Blake x *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden com 50 dias de idade, com raízes nuas e lavadas foram transplantadas para vasos com capacidade de 1,8 L contendo areia lavada. As mudas foram irrigadas com a solução nutritiva número 1, neste trabalho designada como solução nutritiva padrão, utilizada em minijardim clonal (Alfenas et al., 2004), com algumas modificações. Para preparo das soluções foram utilizados fertilizantes comerciais. Cada planta recebeu 200 mL de solução por dia, divididos em quatro aplicações de cerca de 50 mL cada, sendo duas no período da manhã e duas à tarde. As soluções estoque de macro e micronutrientes utilizadas foram compostas por: **solução estoque 1**: nitrato de cálcio (23 g/L), cloreto de potássio branco (6 g/L), nitrato de potássio (3,5 g/L), fosfato monoamônico (2,4 g/L); **solução estoque 2**: sulfato de magnéssio (9,1 g/L), quelato de ferro Tenso Ferro (1,3 g/L); **solução estoque 3**: ácido bórico (3,5 g/L), sulfato de zinco (0,6 g/L), sulfato de manganês (1,4 g/L), sulfato de cobre (0,125 g/L), molibdato de sódio (0,05 g/L). A solução de irrigação foi constituída de 1 L da solução estoque 1, 1 L da solução estoque 2 e 20 mL da solução estoque 3, diluídos em 25 litros de água.

2.2.- Preparo do inóculo e inoculação

Empregou-se o isolado BSC475 de *X. axonopodis* identificado por Gonçalves (2003), oriundo de folhas infectadas de plantas de eucalipto do clone 475, híbrido de *E. urophylla* x *E. grandis*, do sul do estado da Bahia. O isolado foi repicado a partir de tubos da cultura armazenados em glicerol a -20 °C para placas de Petri contendo meio 523 (Kado e Heskett, 1970). As placas foram mantidas a 28 °C até o crescimento bacteriano, quando este foi repicado para meio 523, visando-se à produção de inóculo bacteriano em suspensão salina. Após 36 h a 28 °C, adicionou-se 1 mL de solução salina (0,9 % de NaCl) e as colônias foram raspadas com uma alça de Drigalsky. O número de unidades formadoras de colônias (u.f.c.) da suspensão bacteriana foi determinado indiretamente, pela determinação da turbidez da suspensão com o uso de espectrofotômetro Beckman (modelo DU-640) de acordo com testes preliminares realizados no laboratório. A suspensão de células bacterianas foi diluída até aproximadamente 10^8 u.f.c./mL, que corresponde à densidade ótica de 0,15 ($\lambda = 540$ nm).

As plantas permaneceram em casa de vegetação até a véspera da inoculação, quando foram mantidas em câmara de nevoeiro, a 25 °C, por 12 h. Após esse período foram aspergidas com a suspensão de inóculo ($OD_{540} = 0,15$) e a seguir foram novamente alojadas na câmara de nevoeiro por 24 h, com fotoperíodo de 12 h e intensidade de luz de $12 \mu\text{mol.s}^{-1}.\text{m}^{-2}$. Em seguida, foram transferidas para casa de vegetação onde permaneceram até a avaliação. A temperatura variou de 18 a 42 °C durante o experimento.

2.3. - Avaliação da intensidade da doença

A intensidade da doença (percentagem de área foliar lesionada) foi determinada para as folhas cinco e seis de dois ramos por planta (Figura 1). Imagens digitais das folhas, obtidas com scanner, foram avaliadas com o programa Quant 1.0 para Windows (Vale et al., 2001), 30 dias após a inoculação. Nos casos em que ocorreu desfolha das referidas folhas antes da avaliação, foi atribuído o valor 100 % para a área foliar lesionada.

Para avaliação da incidência da doença em viveiro, 20 mudas do centro da bandeja foram avaliadas quanto à presença ou ausência de sintomas, sendo determinada a percentagem de mudas doentes.

2.4. – Intensidade da doença em relação ao manejo nutricional

Realizaram-se quatro experimentos, três em casa de vegetação e um em viveiro comercial de produção de mudas, para determinar o efeito do status nutricional das plantas de eucalipto na intensidade da doença. Para as análises do teor de nutrientes nos experimentos em casa de vegetação, 12 h antes da inoculação quatro folhas (da folha três até a seis) foram retiradas de cada planta. As folhas de diferentes plantas de cada clone em cada tratamento formaram uma amostra composta

2.4.1. – Experimentos em casa de vegetação

No primeiro ensaio em plantas dos clones 1428 e 2029, avaliaram-se os efeitos da concentração de cobre, boro, potássio, cálcio ou nitrogênio na solução nutritiva ou da influência da irrigação semanal com um complexo de aminoácidos (Aminon-25 a 0,12%) na intensidade da bacteriose.

Compararam-se 12 tratamentos: 1 – solução nutritiva padrão (testemunha); 2 - solução nutritiva padrão + 50 mL de solução de Aminon-25 a 0,12 %, aplicados semanalmente (SN + Am); 3 – solução nutritiva sem cobre (SN – Cu); 4 – solução nutritiva com dez vezes a concentração padrão de cobre (SN + Cu); 5 – solução nutritiva sem boro (SN – B); 6 – solução nutritiva com 2,85 vezes a concentração padrão de boro (SN + B); 7 – solução nutritiva sem cálcio (SN – Ca); 8 – solução nutritiva com 1,5 vezes a concentração padrão de cálcio (SN + Ca); 9 – solução nutritiva sem potássio (SN – K); 10 – solução nutritiva com 1,5 vezes a concentração padrão de potássio (SN + K); 11 – solução nutritiva sem nitrogênio (SN – N); 12 – solução nutritiva com 0,4 vezes a concentração padrão de nitrogênio (SN +/- N). O experimento foi um delineamento inteiramente casualizado em arranjo fatorial com dois tratamentos adicionais, com três repetições por tratamento. Os dados de percentagem de área foliar lesionada foram submetidos à análise de variância e análise de contrastes usando o Statistica 5.5, onde se comparou a testemunha com cada um dos outros onze tratamentos individualmente, perfazendo onze contrastes ortogonais.

Baseado nos resultados do primeiro ensaio realizou-se um segundo, com plantas dos clones 6061 e 6075, híbridos de *E. urophylla* x *E. grandis*. O cultivo foi como descrito em 2.1. Compararam-se oito tratamentos: 1 – solução nutritiva padrão (testemunha); 2 – solução nutritiva sem cobre (SN – Cu); 3 – solução nutritiva com dez vezes a concentração padrão de cobre (SN + Cu); 4 – solução nutritiva sem potássio (SN – K); 5 – solução nutritiva com 1,5 vezes a concentração padrão de potássio (SN + K); 6 – solução nutritiva sem nitrogênio (SN – N); 7 – solução nutritiva com 0,4 vezes a concentração padrão de nitrogênio (SN +/- N); 8 – solução nutritiva com 1,5 vezes a concentração

padrão de nitrogênio (SN + N). O experimento foi um delineamento inteiramente casualizado em arranjo fatorial com um tratamento adicional (testemunha) e cinco repetições, sendo avaliada a intensidade de doença que foi submetida à análise de variância e análise de contrastes usando o Statistica 5.5, onde se comparou a testemunha com cada um dos sete tratamentos individualmente, perfazendo sete contrastes ortogonais.

No terceiro ensaio, utilizaram-se plantas de quatro clones híbridos de eucalipto (6061, 6075, 6084, 20242) cultivados como em 2.1. Testaram-se cinco níveis de potássio (0, 1,11, 2,22, 3,34 e 4,45 mmol/L) ou nitrogênio (0, 0,38, 0,76, 1,13 e 1,51 mmol/L) na solução nutritiva de irrigação sobre a severidade da doença. O experimento foi montado em delineamento inteiramente casualizado em arranjo fatorial $4 + 1 \times 2$, ou seja, cinco concentrações e dois nutrientes sendo uma concentração testada como tratamento adicional, a testemunha. Foram realizadas quatro repetições. A avaliação foi realizada como no experimento anterior. Os dados de intensidade da doença (percentagem de área foliar lesionada) foram submetidos à análise de variância e de regressão usando o Statistica 5.5. A qualidade de ajuste dos modelos foi avaliada pela distribuição dos resíduos da regressão e pelo coeficiente de determinação. Neste ensaio determinou-se o teor de açúcares nas folhas antes da inoculação. Coletou-se da terceira até a sexta folha de maneira que restassem no mínimo dois ramos com folhas intactas a serem inoculadas. Para cada clone e tratamento fez-se uma amostra composta, com todas as folhas, as quais foram secas a 45 ° C e trituradas em moinho martelo. A amostra foi homogeneizada e subdividida em duas. De cada, extraíram-se lipídeos a frio, durante 24 h, com éter de petróleo, seguindo-se a secagem a 45 ° C. Subseqüentemente, extraíram-se os açúcares redutores (Buckeridge e

Dietrich, 1990). A fração sólida foi submetida à análise da concentração de amido pelo método colorimétrico fenol-sulfúrico (Dubois et al., 1956). A fração líquida foi armazenada a -20 °C e se efetuou a cromatografia. Para tal, as amostras foram descongeladas e derivatizadas para alditol-acetato (Englyst e Cummings, 1984). Injetou-se 1,0 µL de alditol acetato para cada corrida cromatográfica em cromatógrafo Shimadzu GC 14-A, equipado com detector de ionização de chama (FID), acoplado a um registrador e integrador C-R6A Chromatopac. Empregou-se uma coluna capilar moderadamente polar, com 50% de cianopropil fenil dimetil siloxane com 25 m de comprimento e espessura do filme de 0,25 µm. O fluxo do gás de arraste (H₂) foi de 0,25 mL/min, a temperatura da coluna foi de 220 °C, a do injetor 250 °C e a do detector de 275 °C.

Nos três experimentos cada planta foi considerada uma unidade experimental.

2.4.2. Incidência da mancha foliar e de mofo cinzento em mudas tratadas com diferentes níveis de cloreto de potássio

Verificou-se o efeito da aplicação de soluções de cloreto de potássio na incidência da mancha foliar bacteriana em mudas de dois clones (37219 e 37297) de *Eucalyptus globulus* Labill, suscetíveis à bacteriose. Empregaram-se plantas em fase de crescimento, com cerca de 60 dias de idade. O experimento foi em viveiro coberto e irrigaram-se as mudas por aspersão. Compararam-se cinco níveis de adubação potássica: 0; 0,152; 0,305; 0,458 e 0,611 g/L de cloreto de potássio (KCl). Aplicou-se a solução de cloreto de potássio com um regador de jardim.

Trinta dias após a montagem do experimento, anotaram-se a altura das mudas, a incidência da bacteriose e de *Botrytis cinerea* Pers. e avaliou-se o teor de nutrientes nas folhas. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em arranjo fatorial, composto por cinco tratamentos com seis repetições por tratamento, sendo que uma bandeja possuía 96 mudas. Avaliaram-se as 20 mudas centrais de cada bandeja e as demais serviram de bordadura. Os dados de incidência (%) foram submetidos à análise de variância e regressão. Foi realizada análise de correlação de Pearson entre o teor foliar dos nutrientes e a incidência das doenças.

3. – RESULTADOS

3.1. – Efeito de nutrientes na severidade da doença

A intensidade da doença variou com o clone e a concentração de nutrientes da solução nutritiva. No primeiro experimento, a análise de variância foi significativa para os efeitos de tratamentos e da interação entre tratamentos e clones em relação à intensidade da doença. Nas plantas do clone 1428, a intensidade da doença no tratamento testemunha foi maior que nas plantas do clone 2029 no mesmo tratamento. Houve redução, não significativa, da doença no tratamento SN + K na solução nutritiva. As plantas do clone 1428 apresentaram maior intensidade da doença, em relação à testemunha (SN), no tratamento SN – K, a percentagem de área foliar lesionada das plantas desse tratamento foi significativamente maior que das plantas do tratamento SN. Para as plantas do clone 2029 a maior intensidade da doença ocorreu no tratamento SN + Ca, quando comparado ao tratamento SN (Tabela 1).

O nível de potássio das plantas de todos os tratamentos e a intensidade da doença correlacionaram-se negativamente ($r = -0,756$; $p < 0,01$), para as

plantas do clone 1428. Assim, quanto maior o nível de potássio menor a intensidade da doença. Os níveis de cobre e zinco correlacionaram-se positivamente com a intensidade da doença, $r = 0,8194$ ($p < 0,01$) e $r = 0,9267$ ($p < 0,01$). O nível dos demais nutrientes não apresentou correlação significativa com a doença. A relação nitrogênio/potássio (N/K) apresentou correlação positiva ($r = 0,8739$; $p < 0,01$) com a intensidade da doença. Para as plantas do clone 2029, apenas a razão teores de cobre e de zinco correlacionou-se à intensidade da doença significativamente ($r = 0,5847$, $p < 0,05$).

No segundo experimento, as plantas dos clones 6061 e 6075 não diferiram quanto à intensidade da doença no tratamento testemunha. Como a interação entre tratamentos e clones foi significativa ($p < 0,05$) para a intensidade da doença realizou-se o desdobramento da interação. A intensidade da doença foi maior nos tratamentos SN – K e SN +/- N, para ambos os clones. Houve redução na intensidade da doença nos tratamentos SN + K e SN – N, para as plantas dos clones 6075 e 6061, respectivamente (Tabela 2).

Obteve-se correlação negativa entre a percentagem de área foliar lesionada e os níveis de potássio e correlação positiva com os níveis de nitrogênio. Para os níveis de potássio os valores do coeficiente de correlação de Pearson foram 0,3521 ($p < 0,05$) e 0,5156 ($p < 0,05$) para as plantas dos clones 6061 e 6075, respectivamente. Em relação ao teor de nitrogênio das plantas obteve-se coeficiente de correlação de 0,7609 ($p < 0,05$) e de 0,7322 ($p < 0,05$) respectivamente para as plantas dos clones 6061 e 6075.

No terceiro experimento em casa de vegetação, a intensidade da doença foi afetada significativamente ($p < 0,05$) pela interação clone x nutriente.

Considerando-se todos os clones e todos os tratamentos, a intensidade da doença correlacionou-se com os teores de amido ($r = 0,47$, $p < 0,01$), glicose ($r = 0,37$, $p < 0,05$), manose ($r = 0,38$, $p < 0,05$), com a relação N/K ($r = 0,61$, $p < 0,05$) e com os teores foliares de Ca ($r = 0,60$, $p < 0,01$), pela correlação de Spearman.

O aumento da concentração de K na solução nutritiva causou redução na intensidade da doença nas plantas de todos os clones (Figura 2). O teor de K foliar tendeu a aumentar com a elevação da concentração de K na solução, exceto para as plantas do clone 20242, em que o maior teor de K foliar foi máximo na concentração de 2,22 mmol/L. Houve variação na concentração de açúcares redutores e amido com a alteração de K na solução (Figura 3). Houve correlação negativa ($r = -0,80$, $p < 0,01$) entre teor de K foliar e a intensidade da doença para as plantas do clone 6084.

Para as plantas submetidas a diferentes níveis de N, a intensidade de doença foi maior na concentração 0,38 mmol/L para os clones 6075 e 6084 e na concentração de 0,76 mmol/L para os clones 6061 e 20242 (Figura 4). O teor de N tendeu a aumentar com a elevação da concentração de N na solução, exceto para as plantas do clone 20242, onde o máximo foi atingido na concentração de 0,76 mmol/L. A concentração de amido e de açúcares redutores variou com a concentração de N (Figura 5). Houve correlação positiva ($r = 0,73$, $p < 0,05$) entre o teor de N foliar e a intensidade da doença para as plantas do clone 20242.

A relação N/K se correlacionou positivamente com a intensidade da doença para as plantas dos clones 20242 e 6084 ($r = 0,71$, $p < 0,05$).

Os teores de manose se correlacionaram com a intensidade da doença nas plantas do clone 6061 ($r = 0,63$, $p < 0,05$), já os teores de glicose se

correlacionaram com a intensidade da doença nas plantas do clone 6075 ($r = 0,65$, $p < 0,05$).

3.1.1. – Influência da aplicação de cloreto de potássio em mudas de eucalipto em viveiro comercial de produção de mudas

Houve efeito significativo da dose de cloreto de potássio na incidência da bacteriose ($p < 0,01$). Os clones 37219 e 37297 diferiram estatisticamente quanto à incidência da doença ($p < 0,01$). Considerando-se ambos os clones, a incidência da bacteriose reduziu com o aumento da dose de cloreto de potássio utilizada ($p < 0,01$) sendo a incidência explicada pela equação $y = - 0,0265 \cdot x + 55,789$ ($R^2 = 0,90$). A incidência da bacteriose tendeu a aumentar com o aumento da relação N/K para os dois clones. O aumento da incidência foi significativo ($p < 0,01$) com o aumento da relação N/K apenas para o clone 37297 (Figura 6). Em relação aos teores foliares de potássio, houve tendência de redução da incidência da bacteriose com o aumento do potássio (Figura 7). A incidência da bactéria se correlacionou ($p < 0,01$) com os teores foliares de fósforo ($r = -0,57$), potássio ($r = -0,53$), cálcio ($r = -0,45$), cobre ($r = -0,50$) e boro ($r = -0,70$). Em contrapartida, a incidência de mofo cinzento aumentou com o aumento da concentração de KCl aplicado (Figura 8), correlacionando-se ($p < 0,05$) com os teores foliares de potássio ($r = 0,50$), de cálcio ($r = 0,48$), de fósforo ($r = 0,56$) e de cobre ($r = 0,46$).

4. DISCUSSÃO

Mostrou-se que o status nutricional influencia a suscetibilidade de plantas de eucalipto a *X. axonopodis*. O efeito do potássio pode ser devido à sua atuação na atividade estomática, pois, níveis adequados de potássio são

importantes nesse processo. Alguns trabalhos citam efeitos benéficos do potássio apenas quando esse é fornecido para plantas com deficiência do elemento ou quando é aplicado na forma de fosfatos ou fosfitos (Zambolim e Ventura, 1993; Reuveni et al., 1998; Bécot et al., 2000), mas no presente trabalho, o fornecimento de potássio em doses acima das usualmente utilizadas e a utilização de KCl propiciou uma redução na intensidade da doença o que pode ter ocorrido devido a um melhor controle estomático, uma maior produção de compostos relacionados à defesa ou a uma redução dos teores de açúcares nas folhas quando comparadas com folhas de plantas com deficiência de potássio, porque a deficiência de potássio pode resultar em acúmulo de açúcares nas folhas (Marschner, 1995).

Observou-se que as plantas dos clones 6061, 6075, 6084 e 20242 geralmente apresentaram níveis de amido, glicose, manose e galactose menores nas plantas irrigadas com as soluções nutritivas contendo 3,34 e 4,45 mmol/L de potássio. Provavelmente a maior disponibilidade de açúcares, como ocorre em plantas deficientes em potássio, propicie maior crescimento e multiplicação bacteriana, além de permitir uma maior penetração devido a alterações que podem ocorrer na atividade estomática. Nas plantas dos clones 6061 e 6075 irrigadas com solução nutritiva sem nitrogênio os teores de glicose e manose também foram baixos, o que pode explicar em parte a menor severidade da doença nesses tratamentos. O potássio está envolvido na osmorregulação, síntese de carboidratos e proteínas e é um elemento rapidamente translocável na planta (Marschner, 1995), dessa forma a deficiência de potássio pode afetar a síntese de proteínas relacionadas com as respostas de defesa das plantas. A menor disponibilidade de carboidratos na superfície foliar também pode ter afetado negativamente a bacteriose. Espécies

de *Pseudomonas* respondem à menor disponibilidade de carboidratos na superfície foliar reduzindo o tamanho das células e a taxa de multiplicação na fase epifítica (Mercier e Lindow, 2000, Monier e Lindow, 2003). Maiores níveis de nitrogênio podem ter contribuído para redução na intensidade da doença, porque, plantas com deficiência de nitrogênio podem ter os processos de síntese de ácidos nucleicos e síntese protéica afetados resultando em menor capacidade de sintetizar proteínas relacionadas à defesa além de poder afetar negativamente a síntese de outras substâncias que possam atuar contra patógenos. Como o nitrogênio, o fósforo está envolvido na síntese de ácidos nucleicos além de ser importante nos processos fisiológicos que necessitam de energia proveniente do ATP (Taiz e Zeiger, 2004). Assim, um maior teor foliar de fósforo pode ter contribuído para uma reação mais rápida e eficiente da planta contra o patógeno.

Níveis mais elevados de cálcio não foram efetivos em reduzir a doença provavelmente devido à ação de enzimas que a bactéria possa ter liberado no meio, pois espécies de *Xanthomonas* podem liberar enzimas que podem atuar na degradação da parede celular (Swings e Civerolo, 1993), dessa forma, a bactéria pode utilizar o material liberado pela ação das enzimas como nutriente para seu crescimento e multiplicação. Nos casos em que o maior teor de cálcio foliar se correlacionou negativamente com a incidência da doença pode ter ocorrido fortalecimento da parede celular, por espessamento ou deposição de calose dificultando de alguma forma a atuação da bactéria. Além do fortalecimento da parede pode ter ocorrido uma resposta mais rápida da planta à presença do patógeno, uma vez que o cálcio pode também atuar como mensageiro secundário (Taiz e Zeiger, 2004). O cálcio tem apresentado efeito

positivo na redução de várias doenças (Biggs et al., 1997; Biggs, 1999; Blodgett et al., 2002).

Tem sido demonstrado que muitas vezes o cobre não tem efeito sobre bactérias, “in vitro” ou quando ele é utilizado em pulverizações para o controle de bacterioses. Algumas bactérias são naturalmente insensíveis a compostos cúpricos em altas concentrações tanto “in vitro” como “in vivo” (Ritchie e Dittapongpitch, 1991). No presente trabalho houve variação na resposta dos clones à alteração de cobre da solução nutritiva, mas em geral maiores níveis de cobre não propiciaram redução da bacteriose. Nos casos em que houve redução da intensidade da bacteriose, a atuação do cobre pode ter se dado devido ao seu papel de co-fator enzimático que pode ter auxiliado na defesa das plantas por propiciar funcionamento adequado do aparato enzimático, ou devido à ação direta sobre o patógeno ou ainda devido à fortificação das paredes celulares devido sua importância na síntese de lignina.

Em casa de vegetação, as plantas tratadas com boro tiveram severidade da bacteriose semelhante às plantas do tratamento testemunha, todavia estudos sobre o efeito do boro, no desenvolvimento de doenças, têm apresentado resultados conflitantes em relação à ação deste nutriente a incidência e a severidade de doença em outros patossistemas (Keinath e Loria; 1990). No experimento realizado no viveiro a análise dos teores de boro nas folhas mostrou que houve uma correlação negativa entre níveis de boro e intensidade da bacteriose. A forma de atuação do boro em relação a doenças de plantas ainda não está elucidada e mesmo o papel do boro no metabolismo ainda não foi totalmente esclarecido, sendo que existem evidências de que o boro possa atuar na síntese de ácidos nucléicos, no funcionamento de

membranas, no alongamento celular e em respostas hormonais (Taiz e Zeiger, 2004).

O aumento na incidência de *B. cinerea* nas mudas de eucalipto no viveiro à medida que houve redução na bacteriose pode ter ocorrido por diversos motivos, sendo que os nutrientes que desfavoreceram a ocorrência da bacteriose, notadamente o K, podem ter deixado as plantas mais suscetíveis a *B. cinerea*. Isso não implica em limitações no uso do KCl para o manejo da bacteriose devido ao fato que outras medidas de controle poderiam ser associadas a aplicação em viveiros para evitar a ocorrência de *B. cinerea*, entre elas o uso de fungicidas e catação e eliminação de plantas doentes.

O manejo da nutrição mineral de plantas de eucalipto mostrou ser uma importante ferramenta para manejo da mancha foliar bacteriana reduzindo a severidade em casa de vegetação e a incidência em ocorrência natural em viveiro. Esse é um fato importante porque em muitos casos não é possível valer-se das medidas de controle recomendadas para a bacteriose, seja devido ao custo ou a problemas técnicos que possam ocorrer durante a produção de mudas de eucalipto. Manejando-se a nutrição do eucalipto nos viveiros e até mesmo no campo, principalmente com uso de fertilizantes que sejam fonte de potássio, e associando esse manejo às outras medidas recomendadas como catação de folhas doentes (Alfenas et al., 2004) ocorrerá redução na perda de mudas em viveiros devido à bacteriose. Outro fator importante demonstrado neste trabalho é a necessidade de uma adubação padronizada para avaliação da resistência de plantas de eucalipto à bacteriose, pois mudas com deficiência de potássio podem ter sua suscetibilidade aumentada. Essa adubação dependerá da eficiência de uso nutricional das plantas, pois deverá propiciar um nível de potássio foliar provavelmente igual ou superior a 2 %, tomando-se

como base os dados apresentados, e cuidando para que não haja deficiência de outros nutrientes para evitar que haja efeito negativo na resistência das plantas.

5. - REFERÊNCIAS

- ABBASI, P.A., SOLTANI, N., CUPPELS, D.A. & LAZAROVITS, G. Reduction of bacterial spot disease severity on tomato and pepper plants with foliar applications of ammonium lignosulfonate and potassium phosphate. *Plant Disease*. 86:1232-1236. 2002.
- AGRIOS, G. N. *Plant Pathology*. 5th Ed. New York. Academic Press. 2005.
- ALFENAS, A.C., ZAUZA, E.A.V., MAFIA, R.G. & ASSIS, T.F. *Clonagem e doenças do eucalipto*. Viçosa. Editora UFV. 2004.
- BÉCOT, S., PAJOT, E., CORRE, D.L., MONOT, C. & SILUÉ, D. Phytogard (K_2HPO_3) induces localized resistance in cauliflower to downy mildew of crucifers. *Crop Protection*. 19:417-425. 2000.
- BIGGS, A. R., EL-KHOLI, M. M., EL-NESHAWY, S. & NICKERSON, R. Effects of calcium salts on growth, polygalacturonase activity, and infection of peach fruit by *Monilinia fructicola*. *Plant Disease*. 81:399-403. 1997.
- BIGGS, A.R. Effects of calcium salts on apple bitter rot caused by two *Colletotrichum* spp. *Plant Disease*. 83:1001-1005. 1999.
- BIGGS, A.R. Effects of calcium salts on apple bitter rot caused by two *Colletotrichum* spp. *Plant Disease*. 83:1001-1005. 1999.
- BLODGETT, A. B., CALDWELL, R. W. & MCMANUS P. S. Effects of calcium salts on the cranberry fruit rot disease complex. *Plant Disease*. 86:747-752. 2002.
- BOWEN, J. E. & GAUCH, H. G. Nonessentiality of Boron in fungi and the nature of its toxicity. *Plant Physiology*. 41:319-324. 1966.
- BUCKERIDGE, M. S. & DIETRICH, S. M. C. Galactomanans from Brazilian legume seeds. *Revista Brasileira de Botânica*. 13:109-112. 1990.
- DELL, B. MALAJCZUK, N., XU, D. & GROVE, T. S. Nutrient disorders in plantation eucalypts. Canberra. ACIAR. 2001.
- DUBOIS, M., GILLES, K. A., HAMILTON, J. K., REBERS, P. A. & SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*. 28:350-356. 1956.
- ENGLYST, H. N. & CUMMINGS, J. H. Simplified method for the measurement of total non-starch polysaccharides by gas-liquid chromatograph of constituent sugars as alditol acetates. *Analyst*. 109:973-942. 1984.
- FÖRSTER, H., ADASKAVEG, J. E., KIM, D. H. & STANGHELLINI, M. E. Effect of phosphite on tomato and pepper plants and on susceptibility of pepper to *Phytophthora* root and crown rot in hydroponic culture. *Plant Disease*. 82:1165-1170. 1998.

- GARCIA JUNIOR, D., POZZA, E. A., POZZA, A. A. A., SOUZA, P. E. CARVALHO, J. G. & BALIEIRO, A. C. Incidência e severidade da cercosporiose do cafeeiro em função do suprimento de potássio e cálcio em solução nutritiva. *Fitopatologia Brasileira*. 28:286-291. 2003.
- GONÇALVES, R. C. Etiologia da mancha bacteriana do eucalipto no Brasil. Tese de Doutorado. Viçosa MG. Universidade Federal de Viçosa. 2003.
- HUBER, D.M. The role of mineral nutrition in defence. In: HORSFALL, J. G., COWLING, E. B. *Plant Pathology, an advanced treatise*. New York. Academic Press. 5 1980. 381-406.
- JACKSON, T. J., BURGESS, T., COLQUHOUN, I. & HARDY, G. E. Action of the fungicide phosphite on *Eucalyptus marginata* inoculated with *Phytophthora cinnamomi*. *Plant Pathology*. 49:147–154. 2000.
- KADO, E. I. & HESKETT, M. G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. *Phytopathology*. 60: 969-976. 1970.
- KARTAL, S. N., YOSHIMURA, T. & IMAMURA, Y. Decay and termite resistance of borontreated and chemically modified wood by *in situ* co-polymerisation of allyl glycidyl ether (AGE) with methyl methacrylate (MMA). *International Biodeterioration and Biodegradation*. 53:111-117. 2004.
- KEINATH, A., P. & LORIA, R. Management of common scab of potato with plant nutrients. In: *Soilborne plant pathogens: Management of diseases with macro- and microelements*. Minesota: APS Press, 1990. p. 152-166.
- KIM, S. G., KIM, K. W., PARK, E. W. & CHOI, D. Silicon-induced cell wall fortification of rice leaves: A possible cellular mechanism of enhanced host resistance to blast. *Phytopathology*. 92:1095-1103. 2002.
- KOSLOWSKI, T.T. & PALLARDY, S.G. *Physiology of woody plants*. San Diego. Academic Press. 1996.
- LARCHER, W. *Ecofisiologia vegetal*. São Carlos. RiMa. 2000.
- LONG, D.H., LEE, F.N. & TEBEEST, D.O. Effect of nitrogen fertilization on disease progress of rice blast on susceptible and resistant cultivars. *Plant Disease*, 84:403-409. 2000.
- MARSCHNER, H. *The mineral nutrition of higher plants*. 2nd Ed. London. Academic Press. 1995.
- MERCIER, J. & LINDOW, S. E. Role of leaf surface sugars in colonization of plants by bacterial epiphytes. *Applied and Environmental Microbiology*. 66:369-374. 2000.
- MONIER, J. M. & LINDOW, S. E. Differential survival of solitary and aggregated bacterial cells promotes aggregate formation on leaf surfaces. *PNAS*. 100:15977-15982. 2003.
- PARKER, B. J., VENESS, R. G. & EVANS, C. S. A biochemical mechanism whereby *Paecilomyces variotii* can overcome the toxicity of the wood protectant, borate. *Enzyme Microbiology and Technology*. 24:402-406. 1999.

- REUVENI, M., SHEGLOV, D. & COHEN, Y. Control of moldy-core decay in apple fruits by γ -aminobutyric acids and potassium phosphites. *Plant Disease*. 87:933-936. 2003.
- REUVENI, R., DOR, G. & REUVENI, M. Local and systemic control of powdery mildew (*Leveillula taurica*) on pepper plants by foliar spray of mono-potassium phosphate. *Crop Protection*. 17:703-709. 1998.
- RITCHIE, D. F. & DITTAPONGPITCH, V. Copper- and streptomycin-resistant strains and host differentiated races of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in North Carolina. *Plant Disease*. 75:733-736. 1991.
- SILVEIRA, R. L.V.A. & HIGASHI, E.N. Aspectos nutricionais envolvidos na ocorrência de doenças com ênfase para o eucalipto. IPEF (Circular Técnica n° 200). pp. 14. 2003.
- SMITH, R. S. Borax to control *Fomes annosus* infection of white fir stumps. *Plant Disease Reporter*. 54:872-875. 1970.
- SWINGS, J. G. & CIVEROLO, E. L. *Xanthomonas*. 1th Ed. London. Chapman & Hall. 1993.
- TAIZ, L. & ZEIGER, E. *Fisiologia vegetal*. 3^a Ed. São Paulo. Artmed. 2004.
- VALE, F. X. R. ; FERNANDES FILHO, E. I. ; LIBERATO, J. R. & ZAMBOLIM, L. Quant - a software to quantify plant disease severity. Resumos, VIII International workshop on plant disease epidemiology, Ouro Preto MG. 2001. pp. 160.
- WILKINSON, C. J., HOLMESA, J. M., DELLA, B., TYNANA, K. M., MCCOMBA, J. A., SHEARER, B. L., COLQUHOUN, I. J. & HARDY, G. E. S.T. J. Effect of phosphite on in planta zoospore production of *Phytophthora cinnamomi*. *Plant Pathology*. 50:587-593. 2001.
- ZAMBOLIM, L. & VENTURA, J.A. Resistência a doenças induzida pela nutrição mineral das plantas. *Revisão Anual de Patologia de Plantas*. 1:275-318. 1993.

Tabela 1 – Intensidade da doença, em percentagem de área foliar lesionada, em plantas de dois clones híbridos de *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis* inoculadas com *Xanthomonas axonopodis*, submetidos a diferentes regimes nutricionais, 30 dias após a inoculação.

Tratamentos	Intensidade da doença (%)	
	Clone 1428	Clone 2029
SN	17,34	4,94
SN + Am	16,72	4,61
SN – Cu	6,77	19,56
SN + Cu	13,03	19,51
SN – B	17,37	9,17
SN + B	10,69	4,60
SN – Ca	7,66	6,43
SN + Ca	11,12	29,33 *
SN – K	53,04 *	12,43
SN + K	6,54	4,10
SN – N	4,06	9,36
SN +/- N	9,21	4,32

Médias, na mesma coluna, seguidas por “ * ” diferem significativamente da testemunha ao nível de 5 % de significância

Tabela 2 – Intensidade da doença, em percentagem de área foliar lesionada, em plantas de dois clones híbridos de *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis* inoculadas com *Xanthomonas axonopodis*, submetidos a diferentes regimes nutricionais, 30 dias após a inoculação.

Tratamentos	Intensidade da doença (%)	
	Clone 6061	Clone 6075
SN	4,46	4,10
SN – Cu	4,79	2,44
SN + Cu	5,41	3,26
SN – K	21,49 *	12,72 *
SN + K	2,54	0,94 *
SN – N	1,53 *	5,28
SN +/- N	35,24 *	10,42 *
SN + N	5,47	3,88

Médias, na mesma coluna, seguidas por “ * ” diferem significativamente da testemunha ao nível de 5 % de significância.



Figura 1 – Representação esquemática da disposição das folhas nos ramos avaliados.

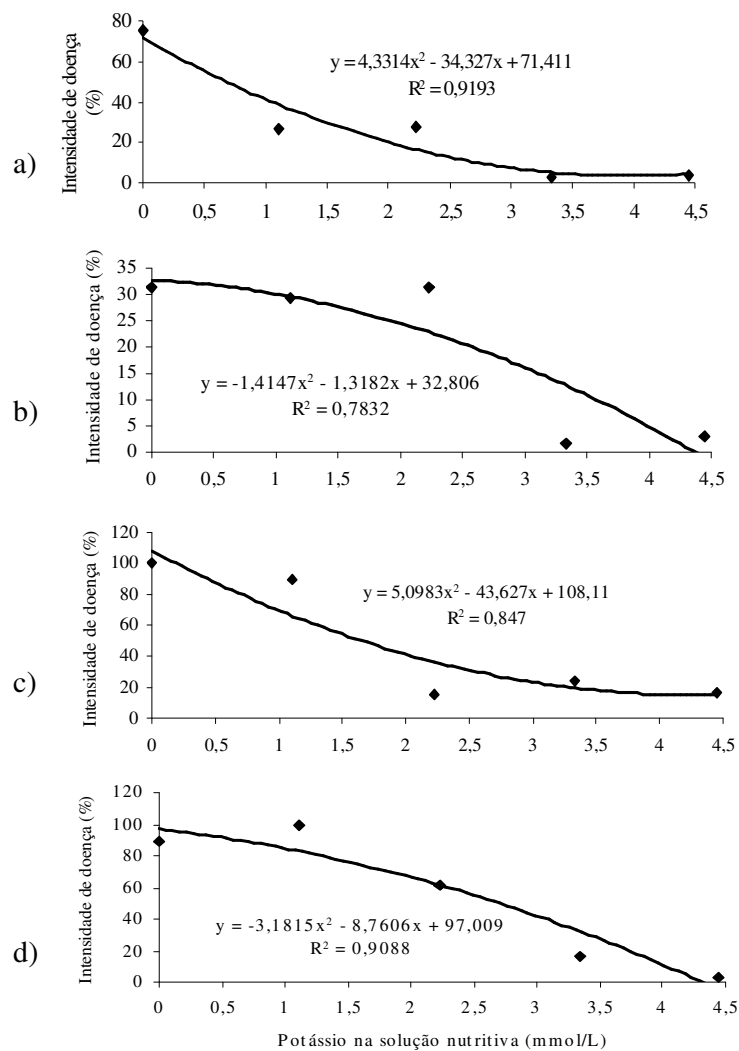


Figura 2 – Intensidade da mancha foliar do eucalipto causada por *Xanthomonas axonopodis* em função da alteração da concentração de potássio na solução nutritiva para quatro clones híbridos de *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis*. Clones 6061 (a), 6075 (b), 6084 (c) e 20242 (d).

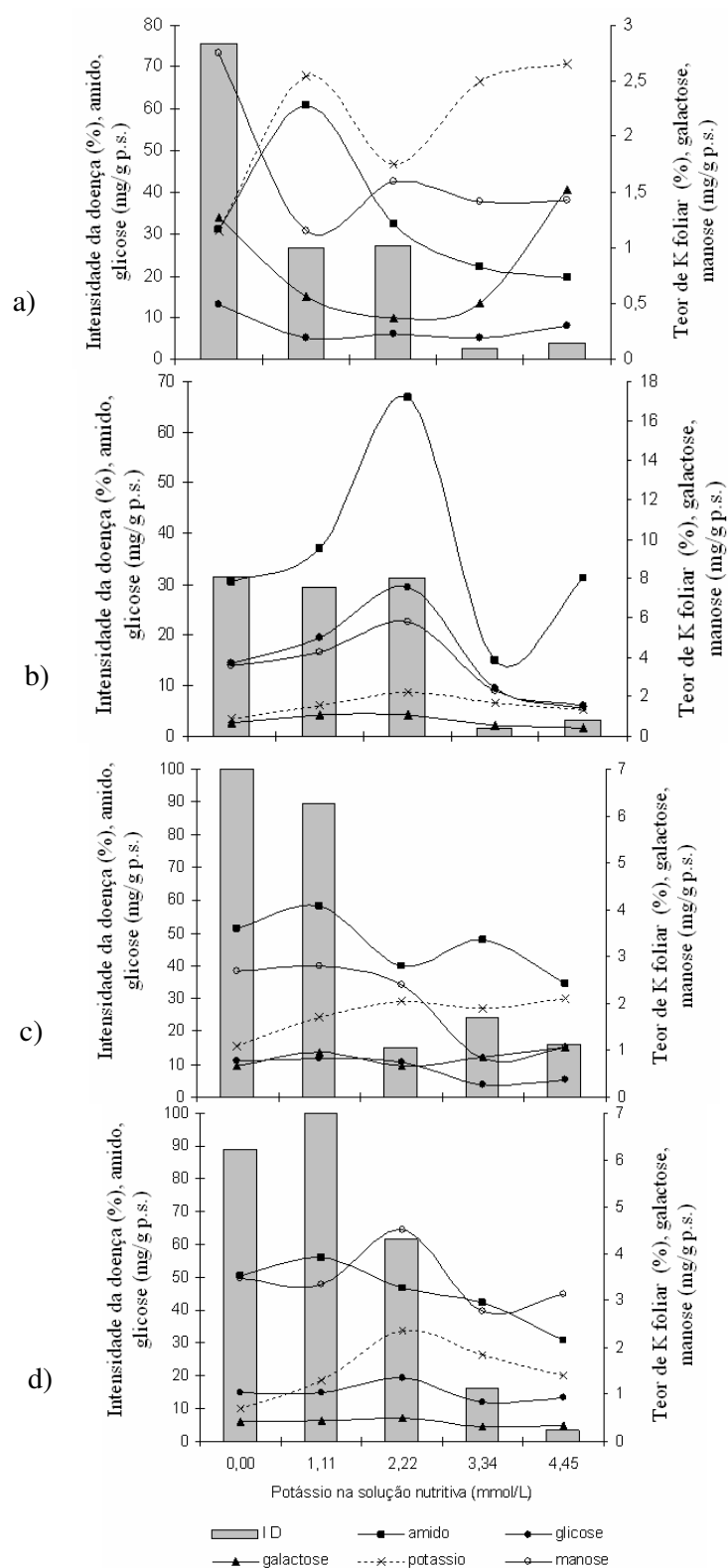


Figura 3 – Intensidade da bacteriose causada por *Xanthomonas axonopodis* em eucalipto e teores foliares de potássio, amido, glicose, galactose e manose para quatro clones híbridos de *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis* em resposta a concentração de potássio da solução nutritiva. Clones 6061 (a), 6075 (b), 6084 (c) e 20242 (d).

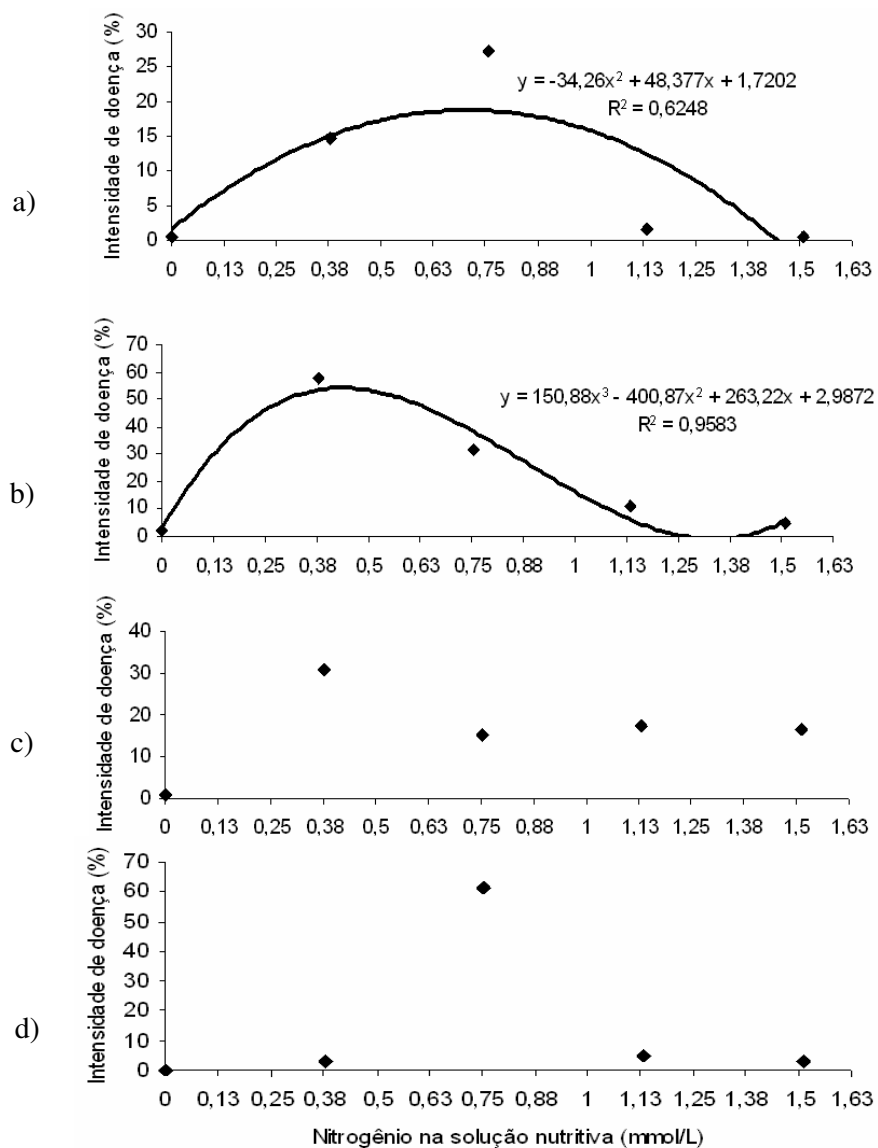


Figura 4 – Intensidade (percentagem de área foliar lesionada) da mancha foliar do eucalipto causada por *Xanthomonas axonopodis*, em função da alteração da concentração de nitrogênio na solução nutritiva para quatro clones híbridos de *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis*. Clones 6061 (a), 6075 (b), 6084 (c) e 20242 (d).

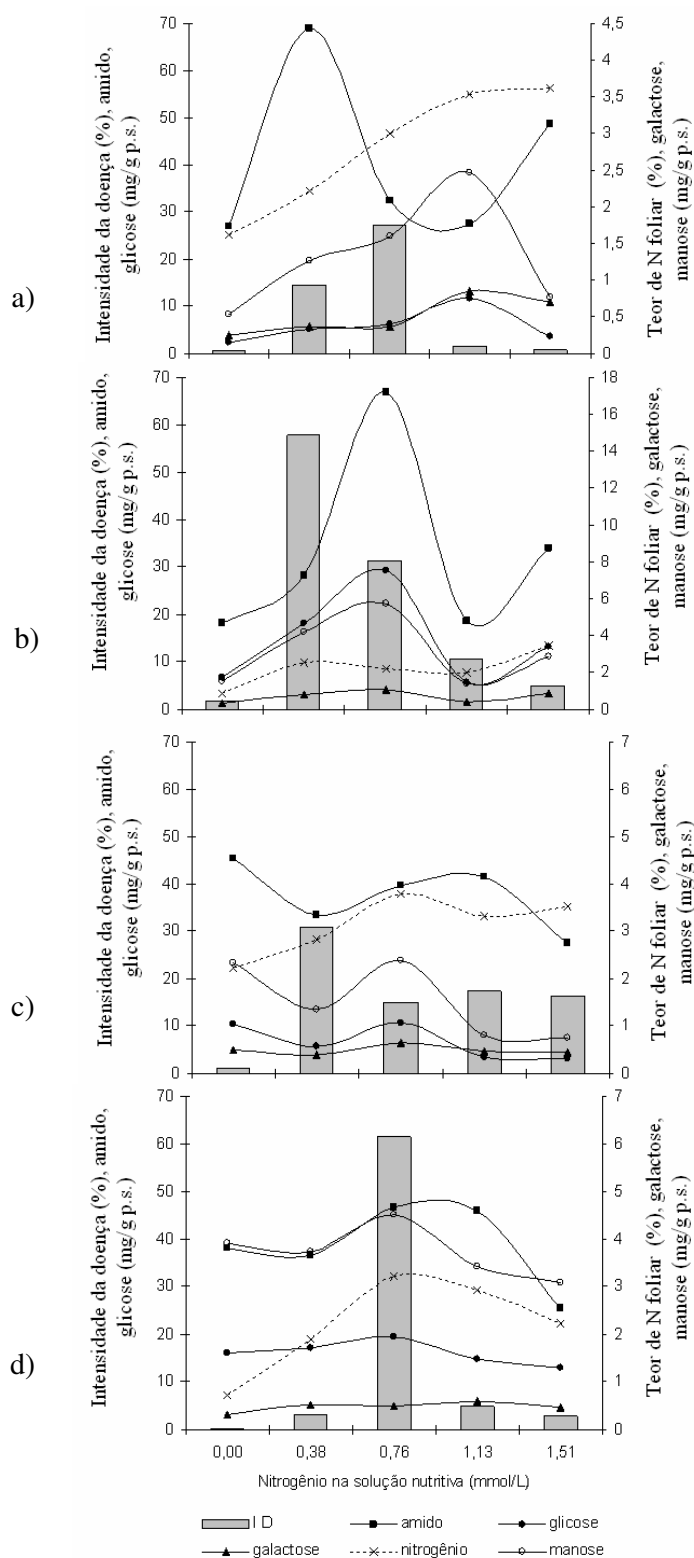


Figura 5 – Intensidade (percentagem de área foliar lesionada e percentagem de desfolha) da bacteriose causada por *Xanthomonas axonopodis* em eucalipto e teores foliares de nitrogênio, amido, glicose, galactose e manose para quatro clones híbridos de *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis* em resposta a concentração de nitrogênio da solução nutritiva. Clones 6061 (a), 6075 (b), 6084 (c) e 20242 (d).

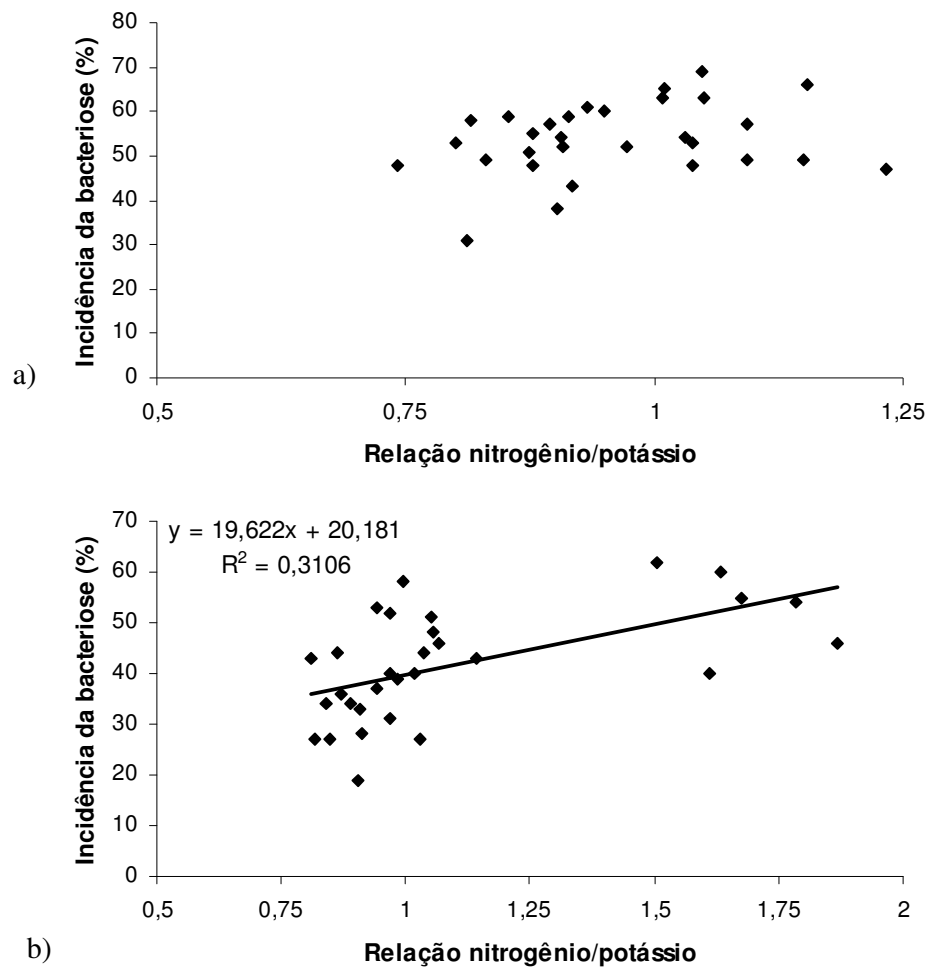


Figura 6 – Incidência da mancha foliar causada por *Xanthomonas axonopodis* em plantas de dois clones de *Eucalyptus globulus* em função da relação nitrogênio/potássio nas folhas de plantas. Clone 37219 (a) e clone 37297 (b).

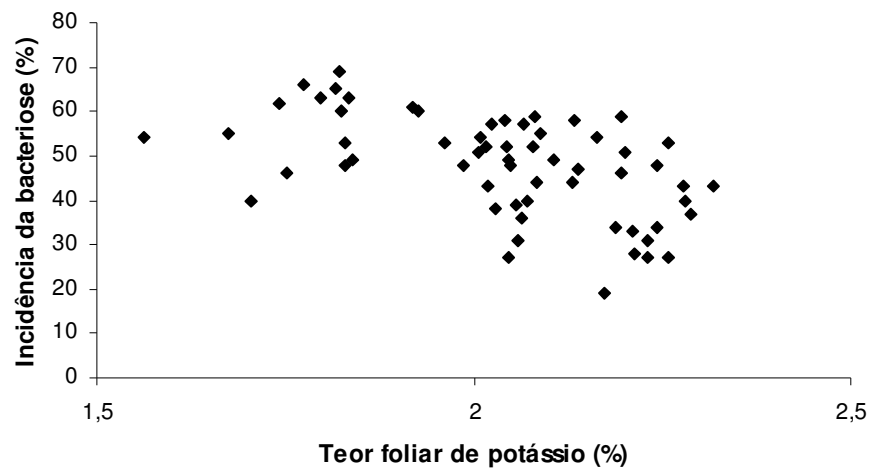


Figura 7 – Incidência da mancha foliar bacteriana nas plantas dos dois clones de *Eucalyptus globulus* em função do teor foliar de potássio.

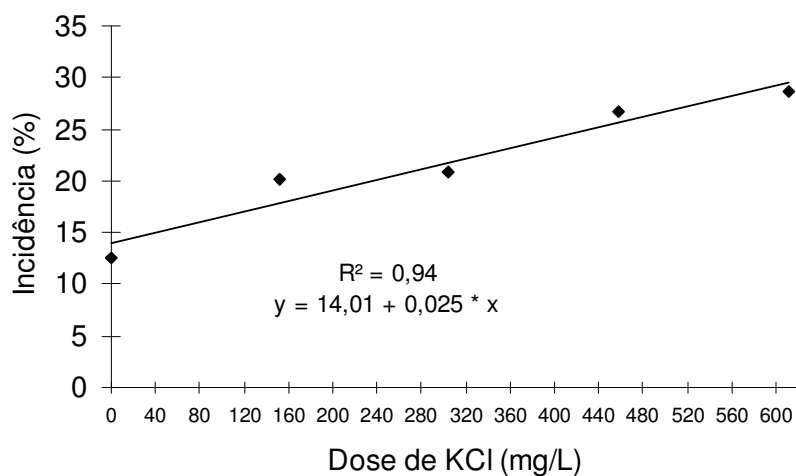


Figura 8 – Incidência da *Botrytis cinerea* em plantas dos dois clones de *Eucalyptus globulus* em da concentração de KCL aplicada via irrigação.

6. – CONCLUSÕES GERAIS

A severidade da mancha foliar do eucalipto causada por *Xanthomonas axonopodis* foi influenciada pela idade da folha, mas não pelo índice estomático. Essa influência é notada numa mesma planta, onde folhas em formação geralmente têm severidade da doença muito baixa. Folhas novas geralmente apresentam índices baixos de infecção o que pode ser reflexo de uma menor atividade estomática e não do índice estomático.

A penetração da bactéria ocorre em poucas h.a.i. sendo que depois de 6 h são observadas microcolônias nas câmaras subestomatais e nas glândulas secretoras. A presença de material mucilaginoso nas microcolônias foi observada na superfície foliar e no interior da folha indicando que esse material possa estar envolvido na patogênese. É provável que essa mucilagem seja exopolissacarídeo produzido pela fitobactéria.

Observaram-se alterações no formato das células bacterianas na superfície do hospedeiro (bastonetes curtos) ocorridas provavelmente devido à baixa disponibilidade de nutrientes para prover o crescimento e multiplicação do patógeno. Células bacterianas observadas no interior dos tecidos não apresentavam alterações, tendo o formato de bastonetes alongados.

Além da influência do número de portas de entrada (estômatos) na intensidade da doença foi verificado que o estado nutricional das plantas exerce papel importante podendo aumentar a severidade da doença, no caso de plantas deficientes em potássio, ou reduzir a severidade e incidência da doença nas plantas com níveis adequados desse elemento. A relação nitrogênio/potássio afetou a severidade e incidência da doença, sendo que em geral maior relação N/K resultou em maiores intensidades da bacteriose.

Os teores de alguns açúcares apresentaram tendência que podem contribuir para explicar o efeito de nutrientes na severidade da doença, mas a variação em seus teores não é o único fator relacionado ao aspecto nutricional que afeta a suscetibilidade de plantas de eucalipto ao patógeno. Em viveiro, a aplicação de KCL em mudas de dois clones de *E. globulus* reduziu a incidência da bacteriose, mas aumentou a incidência *B. cinerea*. O manejo da nutrição mineral, especialmente do potássio, apresenta grande potencial de utilização no manejo da mancha foliar do eucalipto causada por *X. axonopodis*, principalmente se associado a outras medidas para controle de outros patógenos.