

ANA LÚCIA RODRIGUES

**ANTRACNOSE DO EUCALIPTO: ETIOLOGIA E FATORES
RELACIONADOS À INFECÇÃO DO PATÓGENO**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2013

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

T

R696a
2013
Rodrigues, Ana Lúcia, 1985-
Antracnose do eucalipto : etiologia e fatores
relacionados à infecção do patógeno / Ana Lúcia Rodrigues.
- Viçosa, MG, 2013.
x, 37f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador : Gleiber Quintão Furtado.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Antracnose. 2. Infecção. 3. Eucalipto - Doenças e
pragas. 4. Fitopatologia. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Fitopatologia. Programa de
Pós-Graduação em Fitopatologia. II. Título.

CDD 22. ed. 632.4

ANA LÚCIA RODRIGUES

**ANTRACNOSE DO EUCALIPTO: ETIOLOGIA E FATORES
RELACIONADOS À INFECÇÃO DO PATÓGENO**

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

APROVADA: 31 de julho 2013.

Olinto Liparini Pereira

Renata Sousa Resende

Gleiber Quintão Furtado
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

À Deus pelo Dom da vida, pelas oportunidades e pelas Graças alcançadas.

Aos meus pais, Sílvio Geraldo Rodrigues (in memoria) e Vera Lúcia da Silva Rodrigues pelo carinho, cumplicidade, incentivo e amor incondicional.

Ao meu namorado pelo apoio e incentivo durante esta caminhada.

Ao professor Gleiber Quintão Furtado pela orientação e dedicação em todos os momentos.

A professora Maria Catarina Megumi Kasuya pela orientação durante graduação, incentivo, ensinamentos e conselhos.

Ao professor Olinto Liparini pelos ensinamentos e incentivo.

A todos os integrantes do Laboratório de Patologia Florestal pela convivência, em especial a Daniela e Mariana pela ajuda na execução deste trabalho.

À Deiziane Dutra, Denise Pereira Torres e Lílian Costa pela amizade, companheirismo, apoio e companhia nos estudos.

As amigas conquistadas neste período: André Campos Rosado, Filipe Borel, Lílian Costa, Raul Coutinho e Tiago Lelis pelo apoio, incentivo e solidariedade em um momento difícil que passei no decorrer das disciplinas, sem vocês ao meu lado não teria conseguido.

Aos professores do Departamento de Fitopatologia pelos ensinamentos e contribuição à minha formação profissional.

Aos demais estudantes de Pós Graduação em Fitopatologia pela convivência.

Aos amigos Danilo Pinho, Henrique Duarte, Jonas Rios, José Maria pelo incentivo e pela ajuda com as análises moleculares e estatísticas.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

Aos funcionários da Universidade Federal de Viçosa pelos serviços prestados.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós Graduação em Fitopatologia,
pela oportunidade de realização do curso.

À todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

MUITO OBRIGADA!

BIOGRAFIA

ANA LÚCIA RODRIGUES, filha de Vera Lúcia da Silva Rodrigues e Sílvio Geraldo Rodrigues, nasceu em 14 de maio de 1985, em Ponte Nova, Minas Gerais.

Em maio de 2006, iniciou o Curso de Agronomia na Universidade Federal de Viçosa (UFV), Minas Gerais, graduando-se em julho de 2011.

Durante a graduação, foi bolsista de iniciação científica no laboratório de Associações Micorrízicas/Departamento de Microbiologia sob orientação da Professora Maria Catarina Megumi Kasuya.

Em agosto de 2011, iniciou o curso de Mestrado em Fitopatologia na Universidade Federal de Viçosa (UFV), Minas Gerais, sob orientação do Professor Gleiber Quintão Furtado.

SUMÁRIO

RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	viii
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	4
ARTIGO 1.....	8
Colletotrichum theobromicola causing defoliation, stem rot and stem and death of seedlings on nurseries of eucalyptus in Brazil.....	9
ABSTRACT.....	9
REFERENCES.....	17
ARTIGO 2.....	20
Infecção de Colletotrichum theobromicola em folhas de eucalipto.....	21
RESUMO.....	21
AGRADECIMENTOS.....	33
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	33
CONCLUSÕES.....	37

RESUMO

RODRIGUES, Ana Lúcia, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2013. **Antracnose do eucalipto: etiologia e fatores relacionados à infecção do patógeno.** Orientador: Gleiber Quintão Furtado.

Entre os fatores que prejudicam a produtividade do eucalipto destacam-se as doenças. A antracnose do eucalipto é uma doença que ocorre em viveiros, jardim clonal e em plantações nos estádios fenológicos A e B. Os objetivos deste trabalho foram identificar 3 isolados monospóricos oriundos de mudas de eucalipto com sintoma de antracnose, com base em características morfológicas, moleculares e teste de patogenicidade; avaliar a influência da superfície foliar, luminosidade e idade da folha no desenvolvimento de estruturas infectivas (germinação e apressórios) do patógeno e no desenvolvimento da antracnose e avaliar a suscetibilidade de diferentes clones de eucalipto a antracnose. As estruturas fúngicas oriundas dos isolados apresentaram características típicas do complexo *Colletotrichum gloeosporioides*. Para caracterização molecular, sequências de DNA foram geradas para região ITS 1 e 2, incluindo o gene 5.8S rRNA, β -tubulina e gliceraldehído-3-phosphato desidrogenase (GAPDH). Os isolados foram identificados como pertencentes à espécie *C. theobromicola* (Ct) e a patogenicidade confirmado por meio de postulados de Koch. Para avaliação da influência da superfície foliar (adaxial ou abaxial) e luminosidade (luz ou escuro) no desenvolvimento de estruturas infectivas de Ct, folhas destacadas do clone CPC 006 (*Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*) foram inoculadas e incubadas em temperatura de 25°C. Posteriormente, fragmentos foliares do clone CPC 006 foram coletados, clareados em álcool e cloral hidratado, corados em azul de toluidina (1%) e avaliados quanto à porcentagem de germinação e de formação de apressório em microscópio de luz. A avaliação da severidade foi realizada por meio do programa Quant. As maiores porcentagens de germinação foram observadas na face adaxial, sob luz constante. Para formação de apressórios não houve influência da luminosidade e da superfície foliar. Em relação ao desenvolvimento da antracnose, a severidade foi maior quando a superfície adaxial (43,6%) foi inoculada em relação à inoculação na abaxial (26,7%), independentemente da luminosidade. Para avaliar o efeito da idade da folha no desenvolvimento de estruturas infectivas de Ct e da severidade da antracnose, utilizaram-se folhas do clone CPC 006, coletadas dos terço inferior, médio e superior do quarto e quinto ramo, no sentido base-ápice. Observaram-se máxima taxa de germinação de conídios de Ct sobre folhas dos terços médio e superior a partir de 12

h.a.i.. Não houve efeito da idade da folha no desenvolvimento de apressórios. A severidade da antracnose não foi influenciada pela idade da folha do eucalipto. Diferentes genótipos (clones) de eucalipto foram inoculados com Ct e avaliados quanto à suscetibilidade. Os clones apresentaram uma reação diferencial em relação ao patógeno. Os clones CPC 10, CPC 16 e CPC 20 não apresentaram lesões.

ABSTRACT

RODRIGUES, Ana Lúcia, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2013.
Anthracnose of eucalyptus: etiology and factors related to pathogen infection.
Adviser: Gleiber Quintão Furtado.

Among the factors that affect the yield of eucalypt plants the diseases have a major relevance. Anthracnose of eucalyptus is a disease that occurs in nurseries, clonal garden and grown plants in phenological stages A and B. We aimed with this study identify three monosporic isolates derived from eucalyptus seedlings with symptoms of anthracnose based on morphological, molecular and pathogenicity test; to evaluate the influence of leaf surface, light and leaf age on the development of infective structures (germination tag and appressoria) of the pathogen and development of the anthracnose disease. In addition, to assess the susceptibility of different eucalyptus clones to anthracnose disease. Fungal structures derived from fungal isolates showed typical features of the *Colletotrichum gloeosporioides* complex. To the molecular identification of the isolates, DNA sequences have been generated for the ITS region 1 and 2, including the 5.8S rRNA gene, β -tubulin and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH). The isolates were identified as belonging to the species *C. theobromicola* (Ct) and pathogenicity has been confirmed by Koch's postulates. To assess the leaf surface (adaxial or abaxial) and brightness (light or dark) influence in the development of infective structures of Ct, detached leaves from 006 CPC (*Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*) clone were inoculated and incubated at 25°C. Subsequently, leaf fragments of clone CPC 006 were collected, cleared in alcohol and chloral hydrate, stained with toluidine blue (1%) and evaluated for germination and appressoria formation by light microscopy. The severity assessment was performed using Quant program. The highest percentage of germination was observed on the adaxial surface under continuous light regime. The appressorium formation wasn't affected by brightness and leaf surface position. In relation to the anthracnose disease, severity was greater when the adaxial surface (43.6%) was inoculated in relation to abaxial surface (26.7%), regardless of the brightness. To evaluate the effect of leaf age on the development of Ct infective structures and anthracnose severity, we used leaves of CPC 006 clone, collected from the lower third, middle and top of the fourth and fifth branch from the base to apex. It was observed maximum germination rate of Ct conidia on leaves of the middle and upper thirds in the period of 12 h.a.i. There was no effect of

leaf age in developing appressoria. Disease severity was not influenced by age of the eucalyptus leaf. Different genotypes (clones) of Eucalyptus were inoculated with Ct and evaluated for susceptibility. The clones showed a differential reaction against the pathogen. There was no lesion in CPC 10, CPC 16 and CPC 20 clones.

INTRODUÇÃO GERAL

O gênero *Eucalyptus* são plantas arbóreas pertencentes à família das mirtáceas, originária da Austrália e possui mais de 670 espécies conhecidas. No Brasil, seu cultivo em escala econômica deu-se a partir de 1904, através do trabalho do agrônomo silvicultor Edmundo Navarro de Andrade, para atender a demanda da Companhia Paulista de Estradas de Ferro (CIFlorestas, 2012). Atualmente, as plantações de eucalipto no Brasil ocupam cerca de 4,9 milhões de hectares, sendo que 28,8% estão em Minas Gerais, 21,2% em São Paulo, 12,5% na Bahia e o restante distribuído entre os demais estados produtores. O principal fator que alavancou o desenvolvimento da eucaliptocultura foi o estabelecimento de novos plantios visando atender à demanda dos projetos industriais do segmento de Papel e Celulose (Abraf, 2012).

A produtividade do eucalipto é grandemente variável em função das condições ambientais, da espécie utilizada, origem ou procedência do genótipo, grau de melhoramento e tipo de manejo. O eucalipto vem desempenhando uma importante função de floresta de substituição, para a produção sustentada de madeira para múltiplas finalidades, reduzindo significativamente a pressão de consumo sobre as florestas naturais de todo mundo (Embrapa, 2010).

Segundo a Associação Brasileira de Produtores de Florestas Plantadas, a produtividade do eucalipto, dado o seu rápido crescimento, pode ser considerada como um dos principais fatores que determinaram sua expansão no mercado de papel e celulose e, também para serraria. Embora a produtividade média anual, considerada em torno de 35 m³ por hectare, seja relativamente baixa, existem plantios com uso de eucaliptos melhor adaptados, que atingem rendimentos próximos a 60 m³ /ha/ano (Abraf, 2012).

Entre os fatores que prejudicam o desenvolvimento do eucalipto em viveiro e no campo destacam-se as doenças. A antracnose é uma doença que pode ocorrer em viveiros, jardim clonal e em plantações nos estádios fenológicos A e B. Os sintomas são lesões e cancrios em brotações. Nas hastes e galhos de mudas e brotações maduras pode se observar cancrios marrons claros, alongados a elipsoidais, isolados ou interligados. Em brotações tenras é possível observar lesões alongadas e escuras (Demuner & Ferreira, 1994; Ferreira & Milani 2002). Em folhas ocorrem manchas de formato circular e coloração marrom claro a avermelhada, podendo ocorrer a desfolha (Demuner & Ferreira, 1994). Entretanto, maiores danos têm sido observados em clones

suscetíveis, com sintomas de secamento descendente da haste de minicepas. Em condições favoráveis, essas lesões progridem, podendo levar ao anelamento da haste e à morte das plantas. Os sinais da doença são massas de esporos de coloração creme a rosada que exsudam dos conidiomas, circundados por setas, presentes nas lesões (Alfenas et al. 2009).

No Brasil, a antracnose foi detectada em clones híbridos e em *E. grandis*, *E. pellita*, *E. urophylla*, *E. viminalis* e *E. deglupta*, entre outros, podendo causar danos significativos a clones altamente suscetíveis (Alfenas et al., 2009).

A causa da antracnose do eucalipto, até o presente momento, é atribuída ao fungo *Colletotrichum gloeosporioides*. Porém a variabilidade morfológica entre culturas oriundas de eucalipto indica haver possivelmente mais de uma espécie associada à doença o que torna importante a realização de novos estudos visando à correta identificação deste patógeno (Alfenas et al., 2009).

Os fungos do gênero *Colletotrichum*, pertencem ao Filo Ascomycota, são encontrados especialmente em regiões tropicais e subtropicais, sendo capazes de atacar diversas espécies de plantas das famílias *Amaranthaceae*, *Chenopodiaceae*, *Cucurbitaceae*, *Dioscoreaceae*, *Leguminosae*, *Malvaceae*, *Solanaceae*, *Rosaceae*, entre outras (Bailey & Jeger, 1992; Piccini & Pascholati, 1997). Este gênero foi recentemente eleito o oitavo grupo mais importante de fungos patogênicos de plantas no mundo, baseado na importância econômica das antracnoses (Cannon et al., 2012; Dean et al., 2012).

Atualmente o fungo *C. gloeosporioides* é considerado um complexo de espécies devido a grande variabilidade fenotípica e por ser a espécie mais frequente em hospedeiras distintas taxonomicamente (López et al., 2010; López, 2001). Para a identificação de agentes patogênicos, ferramentas moleculares têm sido cada vez mais utilizadas na etiologia de doenças (Cannon et al., 2012). Embora o complexo de espécies *C. gloeosporioides* possa ser definido geneticamente baseado na sequência do gene ITS, esta região decifra apenas 10 das 22 espécies aceitas neste complexo, isto devido ao baixo número de mudanças de bases nesta região genômica. Genes que codificam proteínas tem apresentado maior variação que a região ITS (Fitzpatrick et al., 2006; Aguilera et al., 2008; Weir & Johnston, 2012; Cannon et al., 2012), e tem sido utilizados para uma identificação mais precisa de espécies dentro do complexo *C. gloeosporioides* (Cannon et al., 2012). Antes da disponibilidade de dados de sequência de DNA, conceitos taxonômicos dentro de *Colletotrichum* eram baseados em

características como espécies hospedeiras, substrato, tamanho e forma de conídios, forma de apressórios, taxa de crescimento em cultura, cor da cultura, presença ou ausência de setas, desenvolvimento com ou sem teleomorfo. Porém, muitas destas características podem mudar de acordo com o ambiente ou podem ser perdidas ao longo de sucessivas repicagens (Cannon et al., 2012). Portanto, constata-se a importância de identificar espécies no complexo não somente baseado em tais características, mas também baseado na análise filogenética de genes.

Segundo Cannon et al., 2012 as primeiras utilizações de dados de sequência de DNA para distinguir espécies de *Colletotrichum* foram publicadas por Mills et al. (1992) e por Sreenivasaprasad et al. (1992), que detectaram polimorfismos na região ITS1 do DNA entre linhagens de *C. gloeosporioides* de diferentes hospedeiros. Recentemente, Weir et al., (2012) em um trabalho com o objetivo de identificar espécies dentro do complexo *C. gloeosporioides*, aceitaram 22 espécies e 1 subespécie obtida de sequências genéticas a partir de oito regiões genéticas nucleares: actina (ACT), calmodulina (CAL), quitina sintase (CHS-1), gliceraldeído-3-fosfato (GAPDH), o espaçador interno transcrito ribossomal (ITS), glutamina sintetase (GS), manganês-superóxido dismutase (SOD2) e β -tubulina 2 (TUB2).

Espécies de *Colletotrichum* empregam diversas estratégias para a penetração no hospedeiro, desenvolvendo uma série de estruturas de infecção especializadas como tubos germinativos, apressórios, vesículas de infecção, hifas primárias e hifas secundárias (Pereira et al., 2005). Os apressórios formados por espécies do gênero *Colletotrichum* aparecem diretamente do conídio, mas podem formar-se na extremidade de tubos germinativos ou de ramificações de hifas. O apressório jovem é hialino ou ligeiramente pigmentado, mas com a maturação, as paredes tornam-se espessas e escuras devido ao acúmulo de melanina na camada da parede celular próximo a membrana plasmática (Bailey et al., 1992). A camada de melanina envolve todo o apressório, exceto a região em contato com o substrato (Howard, 1994). O apressório tem a função de permitir a penetração do fungo na cutícula do hospedeiro e na parede celular epidérmica por meio do peg de penetração que emerge da sua base. O peg de penetração do apressório é rodeado por uma estrutura em formato de funil, chamado de cone apressorial, que pode auxiliar na pressão hidrostática no local de penetração (Bailey et al., 1992).

A penetração do fungo *C. gloeosporioides* em diferentes hospedeiros pode ocorrer através de aberturas naturais, ferimentos ou através de penetração direta na cutícula da

epiderme. Em trabalhos com hospedeiros como plantas daninhas da família Malvaceae, plântulas de cafeeiro, frutos de mamão e macieira observaram-se que o patógeno penetra diretamente a cutícula do hospedeiro (Chau & Alvarez, 1983; Morim et al., 1996; Lins et al., 2007; Ferreira et al., 2009; Araújo & Stadnik., 2011). Segundo Ferreira et al (2009) foi possível observar a penetração via estômatos em folhas de cafeeiro inoculados sem a formação de apressório. Porém, para antracnose do eucalipto causado por espécies do complexo *C. gloeosporioides* ainda não existem relatos de como acontece a penetração.

Com base no exposto, os objetivos do presente trabalho foram:

- Identificar a espécie de três isolados de *Colletotrichum* oriundos de plantas de eucalipto com sintomas de mancha foliar, secamento de haste e morte, por meio de morfologia e análise de DNA;
- Avaliar a influência da superfície foliar (adaxial ou abaxial), da luminosidade (luz ou escuro) e da idade da folha no desenvolvimento de estruturas infectivas do fungo *Colletotrichum theobromicola*.
- Avaliar a suscetibilidade de diferentes clones de eucalipto ao fungo *C. theobromicola*.

REFERÊNCIAS:

ABRAF (2012) Anuário estatístico ABRAF, ano base 2012. Disponível em: [http://www.abraflor.org.br/estatisticas/ABRAF13/ABRAF13 BR.pdf](http://www.abraflor.org.br/estatisticas/ABRAF13/ABRAF13_BR.pdf). Acessado em 22 de abril de 2013.

Aguileta G, Marthey S, Chiapello H, Lebrun MH, Rodolphe F (2008) Assessing the performance of single-copy genes for recovering robust phylogenies. *Systematics and Biology* 57: 613-627.

Alfenas AC (2009) Antracnose do Eucalipto. In: Zauza EAV, Mafia RG, Assis TF (Eds.) *Clonagem e Doenças do Eucalipto*. Viçosa. UFV. pp. 237-239.

Araújo L, Stadnik MJ (2011) Processo infeccioso e atividade de enzimas em plântulas de macieira de genótipo resistente ou suscetível à mancha foliar de *glomerella* causada por *Colletotrichum gloeosporioides*. *Tropical Plant Pathology* 36: 241-248.

Bailey JA, Jeger MJ (1992) *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control*. Wallingford UK. CAB International.

Bailey JA, O'Connell RJ, Pring RJ, Nash C (1992) Infection strategies of *Colletotrichum* species. In Bailey JA, Jeger MJ (Eds.) *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control*. Wallingford UK. CAB International. pp. 88–120.

Cannon PF, Damm U, Johnston PR, Weir BS (2012) *Colletotrichum* - current status and future directions. *Studies in Mycology* 73:181-213.

Chau KF, Alvarez AM (1983) A histological study of anthracnose on *Carica papaya*. *Phytopathology* 73: 1113-1116.

CIFlorestas: Centro de Inteligência em Florestas. As Plantações de Eucalipto no Brasil. Disponível em <http://www.ciflorestas.com.br/>. Acessado em 15 de setembro de 2012.

Dean R, Van Kan JAL, Pretorius ZA, Hammond-Kosack KE, Di Pietro A (2012) The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology* 13: 414-430.

Embrapa Florestas. Cultivo de Eucalipto. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Eucalipto/CultivodoEucalipto/>. Acessado em 5 outubro 2012.

Ferreira FA, Demuner AM (1994) Antracnose do Eucalipto. In: Ferreira FA, Milani D (Eds.) *Diagnose visual e controle das doenças abióticas e bióticas do eucalipto no Brasil*. Viçosa. UFV. pp 56.

Ferreira FA, Milani D (2002) *Diagnose visual e controle das doenças abióticas e bióticas do eucalipto no Brasil*. Viçosa. UFV.

Ferreira JB, Abreu MS de, Alves E, Pereira IS, Fernandes KD (2009) Events of the infection process of *Colletotrichum gloeosporioides* on leaves of *Coffea arabica* L. *Summa Phytopathologica* 35: 273-281.

Fitzpatrick DA, Logue ME, Stajich JE, Butler G (2006) A fungal phylogeny based on 42 complete genomes derived from supertree and combined gene analysis. *BMC Evolutionary Biology* 6: 99

Howard RJ (1944) Cell biology of pathogenesis. In: Zeigler RS, Leong SA, Teng PS (Eds.) *Rice blast disease*. Wallingford UK. CAB International. pp. 3-22.

Lins SRO, Alves E, Abreu MS (2007) Estudos histopatológicos de *Colletotrichum* spp. em plântulas de cafeeiro. *Fitopatologia Brasileira* 32: 488-495.

López AMQ, Pereira DST (2010) Interação entre *Colletotrichum gloeosporioides* e ecótipos de pinha. *Bragantia* 69: 105-114.

López AMQ (2001) Taxonomia, patogênese e controle de espécies do gênero *Colletotrichum*. *Revisão Anual de Patologia de Plantas* 9: 291-337.

Mills PR, Sreenivasaprasad S, Brown AE (1992) Detection and differentiation of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates using PCR. *FEMS Microbiological Letters* 98: 137-144.

Morin L, Derby JAL, Kokko EG (1996) Infection process of *Colletotrichum gloeosporioides* f.sp. *malvae* on malvaceae weeds. *Mycological Research* 100: 165-172.

Pereira IS, Abreu MS, Ferreira JB, Alves E (2005) Pré infecção de *Colletotrichum gloeosporioides* em hipocótilos de cafeeiro inoculados artificialmente. Disponível em <http://www.sbicafe.ufv.br/handle/10820/1398>. Acessado 20 de junho de 2013.

Piccini E, Pascholati SF (1997) Doenças da goiabeira (*Psidium guajava*). In: Kimat H, Amorim L, Bergamim Filho A, Camargo LEA, Rezende JAM (Eds.) *Manual de*

Fitopatologia. Doenças de Plantas Cultivadas. São Paulo - SP. Agronômica Ceres, pp. 451-455.

Sreenivasaprasad S, Brown AE, Mills PR (1992) DNA sequence variation and interrelationship among *Colletotrichum* species causing strawberry anthracnose. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 41: 265–281.

Weir B, Johnston PR, Damm U (2012) The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. *Studies in Mycology* 73: 115-180.

ARTIGO 1

(De acordo com as normas da Tropical Plant Pathology)

**Colletotrichum theobromicola causing defoliation, stem rot and death of seedlings
on nurseries of eucalyptus in Brazil**

Colletotrichum theobromicola causing defoliation, stem rot and death of seedlings on nurseries of eucalyptus in Brazil

Ana L. Rodrigues¹, Danilo B. Pinho¹, Daniela O. Lisboa¹, Robson J. Nascimento²,
Olinto L. Pereira¹, Acelino C. Alfenas¹, Gleiber Q. Furtado¹

¹Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais 36570-000, Brazil

Author for correspondence: Gleiber Q. Furtado, e-mail: gfurtado@ufv.br

ABSTRACT

The area planted with eucalyptus in Brazil is around 4.8 million hectares. Considering the demand for forest products from planted forests, this area is likely to increase. Among the diseases that occur in nurseries eucalyptus has been highlighted recently the anthracnose. In 2012, leaves and stem of eucalyptus urograndis showing leaf spots, and symptoms were collected from nurseries in the Pará e Minas Gerais states. The isolates were primarily identified in the *C. gloeosporioides* species complex, based on search with DNA sequences of the Internal Transcribed Spacer region within database Q-bank fungal. After, morphological characterization and phylogenetic analysis of the β -tubulin (TUB2) and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) regions were performed for the accurate identification of the pathogen. To confirm pathogenicity, suspension of conidia was prepared at a concentration of 10^5 conídios/mL and sprayed on plants of eucalyptus urograndis. Morphology of the isolates in culture as well as phylogenetic analysis showed that the causal agent of the defoliation, stem rot and death of seedlings of eucalyptus on nursery is *C. theobromicola*. To our knowledge, this is the first report of *C. theobromicola* in Brazil.

Key words: anthracnose, *Colletotrichum gloeosporioides*, Eucalyptus, forest pathology, tropical fungi

Currently, the area planted with eucalyptus in Brazil is around 4.8 million hectares. Considering the high demand for products forest sector and pressure to reduce the use of wood and wood products sourced from native forests, the area is likely to increase (ABRAF, 2012). The expansion of areas planted represents a risk for the appearance of phytosanitary problems. Among the diseases that occur in eucalyptus, anthracnose is considered quite harmful for some clones, especially in nurseries, due to high susceptibility of some genotypes and climatic conditions favorable to the emergence of diseases.

The anthracnose occurs in nursery, clonal garden and in plantation at phenological stage A and B (Ferreira & Milani, 2002). The symptoms are ellipsoidal lesions on shoots, often interconnected, and cankers (Demuner & Ferreira, 1994). Leaf spots have circular shape and coloration light brown to reddish and may lead to defoliation. Major damage have been observed in susceptible clones, causing symptoms of dryness descending rod ministumps. In favorable environmental conditions, these lesions progress and may lead to stem girdling and death of plants. On the lesions formed spore mass color pink cream (Alfenas et al., 2009).

The etiology of this disease have been attributed to *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc (Ferreira & Milani, 2002; Alfenas et al., 2009; Mendes & Urben, 2013). However, the identification this pathogen was performed by morphological characteristics. Currently, the correct identification of the species of *Colletotrichum* must be performed by morphological and molecular approach (Hyde et al., 2010; Cai et al., 2011; Weir et al., 2012; Cannon et al., 2012).

Recently, several specimens de *C. gloeosporioides* sensu lato have been proposed as a new species within *C. gloeosporioides* complex based mainly on analysis of DNA sequence data (Phoulivong et al., 2010; Cannon et al., 2012; Weir et al., 2012). To facilitate the identification of *Colletotrichum* species with DNA sequences, the Q-bank fungal databases provides data of strains that are regarded as type material or reference strains from *Colletotrichum* spp. (Raak & Groenewald, 2013). Therefore, based on comparisons of DNA sequences and morphological characteristics, the aim of this research was to determine the etiology of the leaf spot, defoliation and death of seedlings of eucalyptus at nurseries (Figure 1).

In 2012, leaves and stem of eucalyptus *urograndis* showing leaf spots, and symptoms were collected from nurseries in the Pará e Minas Gerais states. The leaves were brought to the Laboratório de Patologia Florestal and examined under a

stereomicroscope Olympus SZX7. Fungal structures were removed, mounted in drops of lactophenol on microscope slides and observed under a light microscope FC MotiC BA 210. The conidia size was based on 30 measurements.

Three isolates were obtained from single spore suspensions and grown on potato-dextrose-agar (PDA) at 25 °C, and derived cultures were deposited at the Coleção de Culturas de Fungos Fitopatogênicos “Prof. Maria Menezes”, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Brazil (codes CMM X, CMM X and CMM X). Total DNA was extracted with the Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega corporation, WI, U.S.A.) following the protocol described by Pinho et al. (2012).

Target regions of the Internal Transcribed Spacer regions 1 and 2 including the 5.8S rRNA gene (ITS), β -tubulin (β t) and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) were amplified using primers ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') and ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') for ITS (White et al., 1990); Bt2a (5'-GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC-3') and Bt2b (5'-ACCCTCAGTGTAGTG ACCCTTGGC-3') for partial β t (Glass & Donaldson, 1995) and GDF (5'-GCCGTC AACGACCCCTTCATTGA-3') and GDR (5'-GGGTGGAGTCGTA CTTGAGCATGT-3') for partial GAPDH (Templeton et al., 1992).

PCR reactions included the following ingredients for each 25 μ L reaction: 12.5 μ L of Dream Taq™ PCR Master Mix 2X (MBI Fermentas, Vilnius, Lithuania), 1 μ L of 10 μ M of each forward and reverse primer synthesised by Invitrogen (Carlsbad, EUA), 1 μ L of dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A.), 5 μ L of 100 \times (10 mg/mL) Bovine Serum Albumin (BSA, Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A.), 2 μ L of genomic DNA (25 ng/ μ l), and nuclease-free water to complete the total volume. The parameters of the PCR were the same as described by Weir et al. (2012). PCR products were purified and sequenced by Macrogen Inc., South Korea. The nucleotide sequences were edited with the BioEdit software (Hall, 2012). All sequences were checked manually and nucleotides with ambiguous positions were clarified using both primer direction sequences. New sequences were deposited in GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Sequences of ITS, β t and GAPDH of additional species were retrieved from GenBank (Table 1).

Consensus sequences were compared against Q-bank database using DNA sequences of ITS, β t and GAPDH regions. In addition, DNA sequences were selected from Weir et al. (2012) to confirm the identity of *Colletotrichum*. The closest hit sequences were then downloaded in FASTA format and aligned using the multiple

sequence alignment program MUSCLE® (Edgar, 2004), built in MEGA v. 5 software (Tamura et al., 2011). Alignments were checked and manual adjustments were made when necessary. All the ambiguously aligned regions within dataset were included in the analysis. The resulting alignment and tree were deposited into TreeBASE (<http://www.treebase.org/>) as accession number X.

Bayesian inference concatenated (BI) analysis employing a Markov Chain Monte Carlo method were performed with all sequences, first with each gene/locus separately, and then with the concatenated sequences (ITS, β t and GAPDH). The SYM+I model of evolution was used for ITS, HKY+G for β t and HKY+I for GAPDH. The phylogenetic analysis of the concatenated alignment was performed on CIPRES webportal (Miller et al., 2010) following the procedures described by Pinho et al. (2012).

To confirm pathogenicity, the conidia suspension calibrated to 10^5 conídios/mL was sprayed on plants of clone (CPC 011) eucalyptus urograndis. Five plants were sprayed with the isolated suspension and another five plants with distilled water. In the first 24 hours the plants were incubated in the moist chamber at 24 °C and after, they were taken to the growth chamber at 25°C and monitored daily until the appearance of symptoms.

Inoculated plants showed symptoms that were similar to those initially observed, four days after inoculation. The fungal structures was seen in the center of the spot about one week after the inoculation. The control plants showed no symptoms. *Colletotrichum* sp. was successfully reisolated from the symptomatic plants.

The specimens isolated from leaves of eucalyptus at PDA medium showed colonies with coloration of mycelium ranging from white to gray, becoming black 2 to 3 days later, with presence of setae, and with sporulation of orange coloration. Conidia are hyaline, straight, subcylindrical to clavate, $10\text{--}17 \times 4\text{--}6 \mu\text{m}$, often with broadly rounded ends. The isolates obtained from leaf spots of eucalypts seedlings are micro-morphologically typical of *C. gloeosporioides* complex (Cannon et al., 2008; Rojas et al., 2010; Weir et al., 2012).

As differences between *Colletotrichum* spp. are slight and size ranges conidia overlap, morphology alone cannot discriminate species in this complex (Phoulivong et al., 2010; Weir et al., 2012). In the monograph of *C. gloeosporioides*, Weir et al. (2012) evaluated seven protein coding genes and recommend two protein-coding genes (β t and GAPDH) in addition to ITS for distinguishing *C. gloeosporioides* species complex

based in DNA sequences. Thus, we performed a search within Q-bank database using the ITS, β t and GAPDH sequences, where *Colletotrichum theobromicola* Delacr. was retrieved with 99.5, 100 and 98.5% identity, respectively. To confirm the identification, Bayesian inference concatenated (ITS, β t and GAPDH) analysis were employed and resulting tree (Figure 2) supports that isolates of *Colletotrichum* sp. obtained of leaf spots in eucalyptus seedlings belong to *C. theobromicola*.

Colletotrichum theobromicola belong to 22 species accepted within *C. gloeosporioides* complex (Rojas et al., 2010; Weir et al., 2012). This species was described on *Theobroma cacao* (Rojas et al., 2010) and currently is recorded on *Acca sellowiana*, *Annona diversifolia*, *Fragaria* × *ananassa*, *Fragaria vesca*, *Limonium* sp., *Olea europaea*, *Quercus* sp., *Stylosanthes guianensis* and *S. viscosa*, whereas this pathogen is only known to occur in Australia, Israel, Mexico, New Zealand, Panama and United States of America (Weir et al., 2012). Thus, this is the first report of *C. theobromicola* causing leaf spot, defoliation and lesions on stems of eucalyptus and the first report this fungus in Brazil. The presence of this species represents a threat in nurseries of eucalyptus seedlings, where spray irrigation promotes the dissemination of the disease and the climate is favorable for development of pathogen.

Table 1. Genbank accession numbers of DNA sequences of *Colletotrichum*/*Glomerella* used in the phylogenetic analysis.

Species	Isolate	ITS	GAPDH	TUB2
<i>C. aenigma</i>	ICMP 18608	JX010244	JX010044	JX010389
<i>C. aenigma</i>	ICMP 18686	JX010243	JX009913	JX010390
<i>C. aeshynomenes</i>	ICMP 17673	JX010176	JX009930	JX010392
<i>C. alatae</i>	ICMP 17919	JX010190	JX009990	JX010383
<i>C. alatae</i>	ICMP 18122	JX010191	JX010011	JX010449
<i>C. alienum</i>	ICMP 12071	JX010251	JX010028	JX010411
<i>C. aotearoa</i>	ICMP 18537	JX010205	JX010005	JX010420
<i>C. aotearoa</i>	ICMP 18535	JX010201	JX009968	JX010423
<i>C. asianum</i>	ICMP 18696	JX010192	JX009915	JX010384
<i>C. asianum</i>	ICMP 18580	FJ972612	JX010053	JX010406
<i>C. boninense</i>	ICMP 17904	JX010292	JX009905	JQ005588
<i>C. clidemiae</i>	ICMP 18706	JX010274	JX009909	JX010439
<i>C. clidemiae</i>	ICMP 18658	JX010265	JX009989	JX010438
<i>C. cordylinicola</i>	ICMP 18579	JX010226	JX009975	JX010440
<i>C. fructicola</i>	ICMP 18581	JX010165	JX010033	JX010405
<i>C. fructicola</i>	ICMP17921	JX010181	JX009923	JX010400
<i>C. gloeosporioides</i>	ICMP 17821	JX010152	JX010056	JX010445
<i>C. gloeosporioides</i>	ICMP 19121	JX010148	JX010054	-
<i>C. horii</i>	ICMP 10492	GQ329690	GQ329681	JX010450
<i>C. horii</i>	ICMP 17968	JX010212	GQ329682	JX010378
<i>C. kahawae</i>	ICMP 17922	JX010238	JX010042	JX010432
<i>C. kahawae</i>	ICMP 17816	JX010231	JX010012	JX010444
<i>C. musae</i>	ICMP 19119	JX010146	JX010050	HQ596280
<i>C. musae</i>	ICMP 17817	JX010142	JX010015	JX010395
<i>C. nupharicola</i>	CMP 17938	JX010189	JX009936	JX010397
<i>C. nupharicola</i>	ICMP 18187	JX010187	JX009972	JX010398
<i>C. psidii</i>	ICMP 19120	JX010219	JX009967	JX010443
<i>C. queenslandicum</i>	ICMP 17921	JX010185	JX010036	JX010412
<i>C. queenslandicum</i>	ICMP 1778	JX010276	JX009934	JX010414
<i>C. salsolae</i>	ICMP 19051	JX010242	JX009916	JX010403
<i>C. salsolae</i>	ICMP 18693	JX010241	JX009917	-
<i>C. siamense</i>	ICMP 18578	JX010171	JX009924	JX010404
<i>C. siamense</i>	ICMP 18642	JX010278	JX010019	JX010410
<i>C. theobromicola</i>	ICMP 17957	JX010289	JX009962	JX010380
<i>C. theobromicola</i>	ICMP 17927	JX010286	JX010024	JX010373
<i>C. theobromicola</i>	ICMP 18649	JX010294	JX010006	JX010447
<i>C. theobromicola</i>				
<i>C. theobromicola</i>				
<i>C. ti</i>	ICMP 5285	JX010267	JX009910	JX010441
<i>C. ti</i>	ICMP 4832	JX010269	JX009952	JX010442
<i>C. tropicale</i>	ICMP 18653	JX010264	JX010007	JX010407
<i>C. tropicale</i>	ICMP 18672	JX010275	JX010020	JX010396
<i>C. xanthorrhoeae</i>	ICMP 17903	JX010261	JX009927	JX010448
<i>C. xanthorrhoeae</i>	ICMP 17820	JX010260	JX010008	-

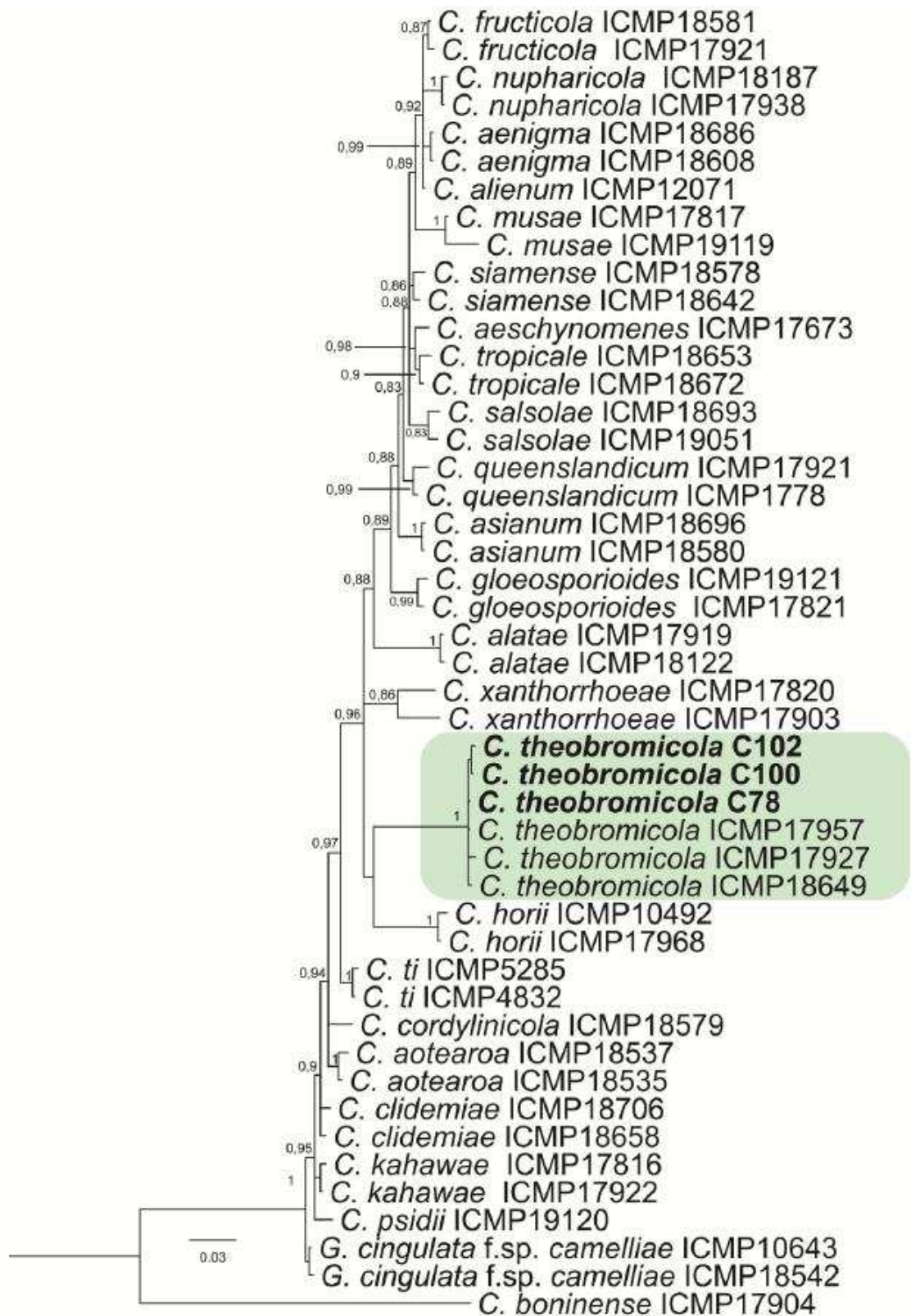


Figure 1. Multilocus phylogenetic tree inferred from Bayesian using the ITS and β -tubulin regions. Bayesian posterior probability values $>0,7$ are indicated used in this study are highlighted in bold. *Colletotrichum boninense* represents the outgroup taxon.

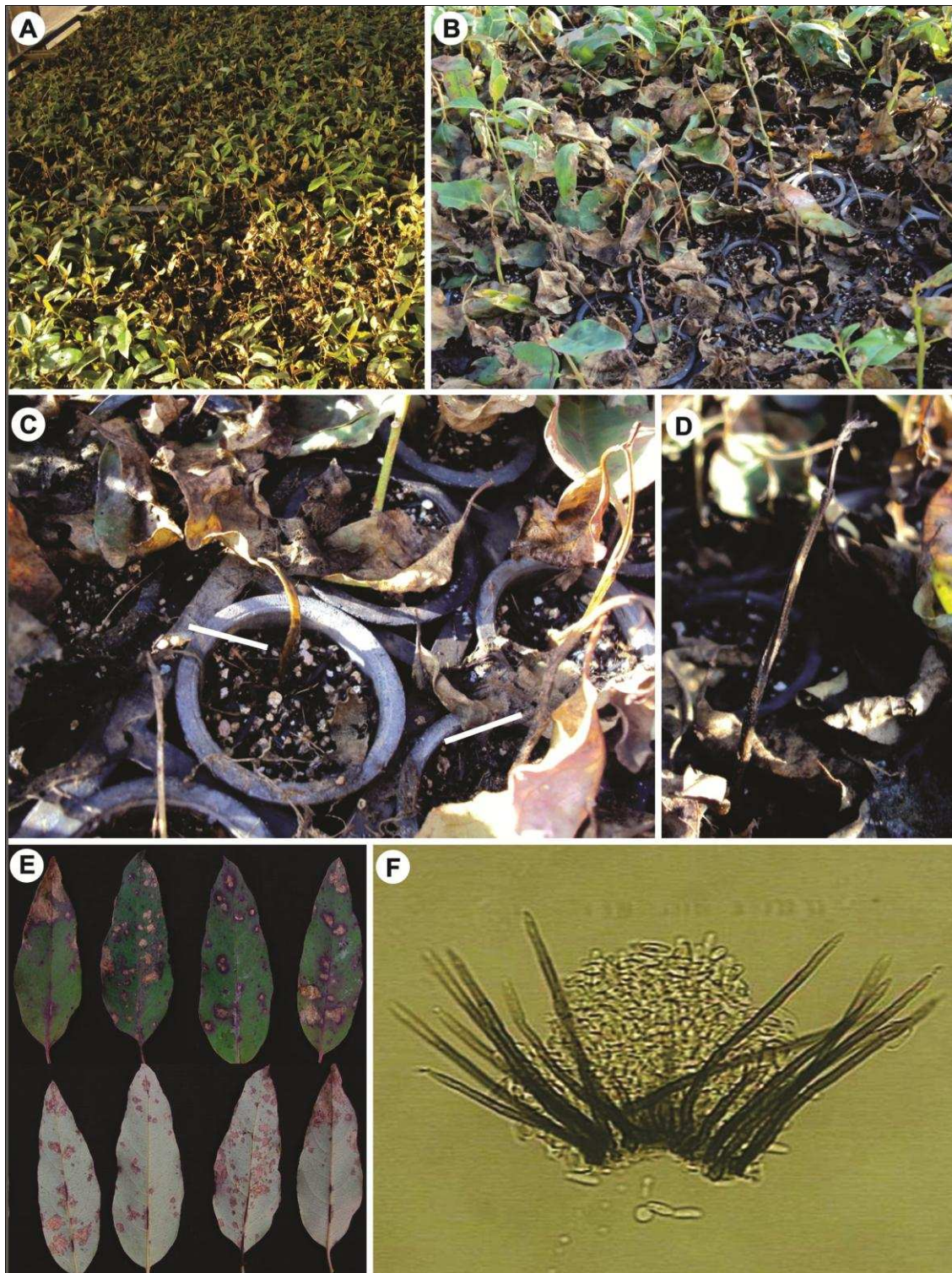


Figure 2. Anthracnose on urograndis eucalyptus seedlings in nursery stock, caused by *Colletotrichum theobromicola*. (A) Overview of seedlings with heavy pathogen infection. (B) plants showing leaf spots and defoliation. (C) Appearance of rot due to girdling of the eucalyptus stem by pathogen. (D) Dead plant resulting from annealing at different heights of the stem. (E) Appearance of spots on the abaxial and adaxial surface of eucalyptus. (F) Acervulus of *C. theobromicola* containing arrows and conidia.

REFERENCES:

ABRAF (2012) Anuário estatístico ABRAF, ano base 2012. Available at: http://www.abraflor.org.br/estatisticas/ABRAF13/ABRAF13_BR.pdf. Accessed on July 22, 2013.

Alfenas AC, Zauza EAV, Mafia RG, Assis TF (2009) Clonagem e doenças de eucalipto. 2ª Ed. Viçosa. Editora Universidade Federal de Viçosa.

Cai L, Udayanga D, Manamgoda DS, Maharachchikumbura SSN, McKenzie EHC, Guo LD, Liu XZ, Bahkali A, Hyde KD (2011) The need to carry out re-inventory of plant pathogenic fungi. *Tropical Plant Pathology* 36:205-213.

Cannon PF, Buddie AG, Bridge PD (2008) The typification of *Colletotrichum gloeosporioides*. *Mycotaxon* 104:189-204.

Cannon PF, Damm U, Johnston PR, Weir BS (2012) *Colletotrichum* – current status and future directions. *Studies in Mycology* 73:181-213.

Edgar RC (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* 32:1792-1797.

Ferreira FA, Demuner AMM (1994) Cancros e antracnose por *Colletotrichum gloeosporioides* (*Glomerella cingulata*) em eucalipto. In: XXVII Congresso Brasileiro de Fitopatologia, resumos...Itajaí SC. Sociedade Brasileira de Fitopatologia. p.274.

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

Glass NL, Donaldson GC (1995) Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous Ascomycetes. *Applied and Environmental Microbiology* 61: 1323-1330.

Hall T (2012) BioEdit v7.0.9: Biological sequence alignment editor for Win95/98/2K/XP/7. Available at <http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>
[Accessed 15 July 2012.](#)

Hyde KD, Abd-Elsalam K, Cai L (2010) Morphology: still essential in a molecular world. *Mycotaxon* 114: 439-451.

Mendes MAS, Urban AF (2012) Fungos relatados em plantas no Brasil, Laboratório de Quarentena Vegetal. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Available at: <http://pragawall.cenargen.embrapa.br/aiqweb/michtml/fgbanco01.asp>
Accessed on 16 July 2013.

Miller MA, Pfeiffer W, Schwartz T (2010) Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. In: Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop (GCE). New Orleans LA, USA. pp. 1-8.

Phoulivong S, Cai L, Chen H, McKenzie EHC, Abdelsalam K, Chukeatirote E, Hyde KD (2010) *Colletotrichum gloeosporioides* is not a common pathogen on tropical fruits. *Fungal Diversity* 44: 33-43.

Pinho DB, Firmino AL, Pereira OL, Ferreira Junior WG (2012) An efficient protocol for DNA extraction from Meliolales and the description of *Meliola centellae* sp. nov.. *Mycotaxon*. 122: 333-345.

Raak MV, Groenewald E (2013) Q-bank Fungi database: comprehensive databases on quarantine plant pests and diseases. Available at: <http://www.q-bank.eu/Fungi/>
Accessed on 16 July 2013.

Rojas EI, Rehner SA, Samuels GJ, Van Bael SA, Herre EA, Cannon P, Chen R, Pang J, Wang R, Zhang Y, Peng YQ, Sha T (2010) *Colletotrichum gloeosporioides* s.l. associated with *Theobroma cacao* and other plants in Panamá: multilocus phylogenies distinguish host-associated pathogens from asymptomatic endophytes. *Mycologia* 102: 1318-1338.

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011) MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology Evolution* 28:2731-2739.

Templeton MD, Rikkerink EHA, Solon SL, Crowhurst RN (1992) Cloning and molecular characterization of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-encoding gene and cDNA from the plant pathogenic fungus *Glomerella cingulata*. *Gene* 122: 225-230.

Weir B, Johnston PR, Damm U (2012) The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. *Studies in Mycology* 73: 115-180.

White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (Eds.) *PCR Protocols: A guide to methods and applications*. San Diego, California, USA, Academic Press, 315-322.

ARTIGO 2

(De acordo com as normas da Tropical Plant Pathology)

Infecção de *Colletotrichum theobromicola* em folhas de eucalipto

Infecção de *Colletotrichum theobromicola* em folhas de eucalipto

Ana Lúcia Rodrigues¹, Daniela Lisboa¹, Mariana A. Silva¹, Gleiber Q. Furtado¹

¹Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais
36570-000, Brasil

Autor para correspondência: Gleiber Q. Furtado, email: gfurtado@ufv.br

RESUMO

Os objetivos do trabalho foram avaliar a influência da superfície foliar, da luminosidade e da idade da folha de eucalipto inoculada no desenvolvimento de estruturas infectivas de *C. theobromicola* (Ct) e no desenvolvimento da antracnose; e avaliar a suscetibilidade de diferentes genótipos de eucalipto à antracnose. Em todos os experimentos foram utilizadas folhas destacadas e suspensão de 10⁵ conídios/mL. A superfície adaxial ou abaxial de folhas de eucalipto clone CPC 006 (*Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*) foi inoculada e incubada na presença ou na ausência de luz. Em um segundo experimento, foi inoculado a superfície adaxial de folhas de diferentes idades do clone CPC 006, oriundas dos terços inferior, médio e superior, no sentido base-ápice, e incubada sob luz contínua. Em ambos os experimentos foram avaliados a porcentagem de germinação e de formação de apressórios ao longo do tempo e a severidade por meio do programa Quant, aos 9 dias após a inoculação. Foi também avaliado a suscetibilidade à antracnose de 10 clones de eucalipto quanto ao número de lesões/folha. Observou maior germinação na superfície adaxial de folhas incubadas sob luz. Na presença de luz, os conídios iniciaram a germinação a partir de 3 (0,4%) e 12 h.a.i. (2,8%) na face adaxial e abaxial, respectivamente. A severidade foi maior quando se inoculou a superfície adaxial (43,6%) em relação a abaxial (26,7%), porém não houve efeito da luminosidade. Quanto à influência da idade da folha na germinação de conídios em relação ao tempo após a inoculação, observaram-se máxima taxa de germinação de conídios de Ct sobre folhas dos terços médio e superior a partir de 12 h.a.i. Em folhas do terço inferior, a germinação máxima ocorreu com 72 h.a.i. Para a formação de apressório, não houve influência da luminosidade, da superfície foliar e da idade da

folha. A idade da folha não influenciou no desenvolvimento da antracnose. Os materiais genéticos testados apresentaram diferentes graus de suscetibilidade.

Palavras chave: antracnose, germinação, apressório, severidade, suscetibilidade.

O gênero *Eucalyptus* com suas espécies e híbridos ocupa uma posição de destaque em relação aos reflorestamentos com as demais espécies florestais no Brasil. Atualmente, a área plantada com eucalipto está em torno de 4,8 milhões de hectares, e considerando a crescente demanda por esta matéria-prima, a tendência é a expansão desta área (Abraf, 2012).

Entre as diversas doenças que ocorrem em viveiros e em estádios iniciais de plantações de eucalipto, destaca-se a antracnose. Os sintomas são lesões de coloração marrom clara a avermelhada em folhas, hastes e ramos. Estas lesões podem coalescer culminando em grandes áreas necróticas (Alfenas, 2009). A causa desta doença era até recentemente atribuída ao fungo *Colletotrichum gloeosporioides* (Ferreira & Milani, 2002). Entretanto, atualmente, *C. gloeosporioides* sensu lato é considerado um complexo de espécies (Weir et al., 2012). Em um estudo realizado por Lisboa et al. (2013); isolados de *Colletotrichum* oriundos de mudas de eucalipto com manchas foliares e secamento de hastes foram identificados, por meio de características morfológicas e moleculares, como pertencente a espécie *C. theobromicola*. Apesar da importância da antracnose do eucalipto, aspectos básicos da infecção de *C. theobromicola* em folhas de eucalipto não foram elucidados. Os objetivos do presente trabalho foram avaliar a influência da superfície foliar (adaxial ou abaxial) de eucalipto e da luminosidade (luz ou escuro) no desenvolvimento de estruturas infectivas (germinação e formação de apressórios) de *C. theobromicola* e no desenvolvimento da antracnose; avaliar o efeito da idade da folha de eucalipto no desenvolvimento de estruturas infectivas de *C. theobromicola* e no desenvolvimento da antracnose, e avaliar a suscetibilidade de diferentes genótipos de eucalipto a antracnose.

Foi utilizado o isolado C78 de *C. theobromicola*, obtido a partir de mudas sintomáticas de eucalipto *urograndis* (*Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*), oriundas do estado de Minas Gerais. O isolado foi cultivado em meio BDA (batata-dextrose-ágar), sob temperatura de 25°C e fotoperíodo de 12 horas de luz. Para as inoculações, foram utilizadas culturas fúngicas com 12 dias de idade. As colônias foram removidas de placas de Petri utilizando-se 10 mL de água esterilizada e alça de Drigalsky. A suspensão foi filtrada em dupla camada de gaze e ajustada, em câmara de Neubauer, para 10^5 conídios mL⁻¹.

Em todos os experimentos utilizaram-se folhas destacadas. As folhas foram depositadas em caixas plásticas (Gerbox) contendo três folhas de papel de filtro umedecidas com água destilada, formando uma câmara úmida. O pecíolo de cada folha

foi envolvido com chumaço de algodão. As caixas contendo as folhas foram incubadas em temperatura de 25°C.

Para verificar a influência da superfície foliar no desenvolvimento de estruturas infectivas, as superfícies adaxial ou abaxial de folhas do clone CPC 006 (*Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*), foram inoculadas por meio da deposição de 5 gotas de 20 µL e mantidas a superfície inoculada voltada para cima. Posteriormente, foram incubadas na presença ou na ausência de luz. A avaliação da porcentagem de germinação de conídios e de formação de apressórios foi realizada na superfície foliar 1, 3, 6, 8, 12, 24, 36, 48, 72, 96 e 144 horas após inoculações (h.a.i.), em microscópio de luz (Motic Instruments Inc., BA210, Canadá) com aumento de 400x. Para visualização das estruturas do fungo, primeiramente os fragmentos foliares, com cerca de 1 cm², foram clareados. Para isto, eles foram colocados em frascos contendo álcool 70% e, esta solução trocada diariamente por sete dias para retirada da clorofila dos tecidos. Em seguida, os fragmentos foram transferidos para frascos de vidro contendo solução saturada de cloral hidratado (Vetec[®]) e mantidos por três dias a fim de se obter o máximo de clareamento. Posteriormente, os fragmentos clareados foram corados com azul de toluidina (0,1%) e depositados em lâminas de vidro contendo uma gota de água glicerinada. Os conídios foram considerados germinados quando apresentaram comprimento do tubo germinativo superior ao seu diâmetro ou quando formaram apressórios (Morin et al., 1996).

Com o intuito de se avaliar a severidade, a suspensão de conídios foi atomizada nas superfícies das folhas até o ponto de máxima retenção de gotas. As folhas com as superfícies adaxial ou abaxial inoculadas foram depositadas em placas de Petri contendo meio de cultura ágar-água (2%) e 100 mgL⁻¹ de benzimidazole, para evitar a senescência das folhas. A superfície foliar inoculada foi depositada com a superfície inoculada voltada para cima. As placas contendo as folhas foram incubadas na presença ou na ausência de luz contínua. A avaliação da severidade da antracnose do eucalipto foi realizada aos 9 dias após a inoculação (d.a.i.). As folhas foram digitalizadas e as imagens analisadas quanto à proporção de tecido doente e sadio, por meio do programa QUANT[®] (v.1.01; Universidade Federal de Viçosa, 2003).

Para avaliar a influência da idade da folha de eucalipto na porcentagem de germinação de conídios e na formação de apressórios de *C. theobromicola* e também da severidade da antracnose, foi utilizado o clone CPC 006. As folhas foram coletadas dos terços inferior (primeira e segunda folha), médio (terceira e quarta folha) e superior

(quinta e sexta folha). O terço dos ramos da planta foi definido no sentido base-ápice. As folhas foram acondicionadas em caixas plásticas, conforme descrito anteriormente. A superfície adaxial das folhas foi inoculada e as folhas incubadas sob luz contínua. Os fragmentos foliares com cerca de 1 cm² foram coletados com 1, 3, 12, 48 e 72 h.a.i., clareados e analisados, quanto a porcentagem de germinação e formação de apressórios, conforme descrito anteriormente. O experimento para avaliação da severidade também foi realizado conforme descrito anteriormente.

Os dois experimentos para avaliar desenvolvimento das estruturas infectivas foram montados em delineamento inteiramente casualizado, com 5 repetições por tratamento. Cada repetição consistiu em uma folha e foram contabilizados 50 conídios/folha. O experimento foi repetido uma vez. Os dados foram analisados por meio da análise de variância (ANOVA), e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade utilizando-se o Sistema de Análises Estatísticas e Genéticas – SAEG (Versão 9.1. Universidade Federal de Viçosa, 2007). Os dois experimentos para avaliar a severidade da doença foram montados em delineamento inteiramente casualizado, com 4 repetições por tratamento. Cada repetição consistiu em uma folha. A homogeneidade de variância dos dois experimentos foi confirmada pelo teste de Bartlett (Gomes & Garcia, 2002). Os dados foram analisados por meio da análise de variância (ANOVA), e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade utilizando-se o software SAS (Versão 9.0, Cary, USA).

No experimento para avaliação da suscetibilidade de diferentes genótipos de eucalipto a antracnose utilizaram-se os clones CPC 001, CPC 005, CPC 006, CPC 010, CPC 011, CPC 020. Os genótipos CPC 001, CPC 005, CPC 006, CPC010, CPC 011 e CPC 020 são clones de eucalipto urograndis (híbrido de *Eucalyptus urophylla* x *E. grandis*); CPC 025 e CPC 028 clones de híbridos *E. urophylla* x *E. globulus*; CPC 013 clone de *E. grandis* e CPC 016 (oriundo do cruzamento de *E. grandis* e um progenitor desconhecido). A inoculação foi realizada por meio de deposição de 4 gotas de 20 µL equidistantes na superfície adaxial das folhas. O experimento foi montado em delineamento inteiramente casualizado, com 5 repetições. Cada repetição consistiu em uma folha com 4 gotas. A doença foi avaliada 9 d.a.i. por meio do número de lesões/folha.

Em relação à germinação de conídios de *C. theobromicola*, houve interação significativa entre as faces adaxial e abaxial sob luz contínua. Porém, não houve interação significativa entre as superfícies foliares inoculadas mantidas no escuro.

O início do processo de germinação dentro do gênero *Colletotrichum* apresenta alta variabilidade, podendo ocorrer entre 3 e 48 horas h.a.i (Bailey & Jeger, 1992; Lopez, 2001). Segundo Pereira et al (2009), na interação *C. gloeosporioides*- cafeeiro, a germinação dos conídios em hipocótilos ocorreu a partir de 6 horas após a inoculação. Lins et al (2007) observaram germinação de conídios 5 horas após inoculações para *C. gloeosporioides*, 12 horas para *C. acutatum* e 24 horas para *C. dematium* inoculados em folhas e hipocótilos de plântulas de cafeeiro. Neste estudo, quando na presença de luz, os conídios iniciaram a germinação a partir de 3 (0,4%) e 12 h.a.i. (2,8%) na face adaxial e abaxial, respectivamente (Figura 1) e, no escuro, iniciou às 8 h.a.i (0,1%) (Figura 2). As maiores porcentagens de germinação de conídios de *C. theobromicola* na face adaxial e abaxial foi, respectivamente, 68,8% e 31% às 96 h.a.i., na presença de luz (Figura 1) e, atingiu o máximo de germinação no escuro às 96 h.a.i. (30,9%) (Figura 2). A intensidade da luz é um fator que pode afetar a germinação de conídios, resultado semelhante foi encontrado por Chakraborty & Chakraborty (1995) em folhas de *Camellia sinensis* inoculadas com *Glomerella cingulata*, a porcentagem de germinação de conídios foi superior quando as folhas foram incubadas na presença de luz.

Para a formação de apressórios não houve interação significativa entre a luminosidade e a superfície foliar. A formação desta estrutura iniciou-se às 8 h.a.i. (0,07%), as maiores taxas (25,6%) foram observadas às 96 h.a.i. (Figura 3). Resultados análogos foram obtidos por Ferreira et al (2009) e por Pereira et al (2009) que verificaram que a formação de apressórios de *C. gloeosporioides* em folhas de cafeeiro ocorreu 12 h.a.i.. Após 12 horas das inoculações alguns apressórios estavam melanizados. A formação de apressórios melanizados permite a penetração mecânica da hifa de infecção no hospedeiro e, isso acontece para a maioria das espécies de *Colletotrichum*, principalmente aquelas que infectam tecidos novos (Bailey et al., 1992; Ferreira et al., 2009).

Foi observado um aumento gradativo da porcentagem de germinação e de formação de apressórios ao longo do tempo após a inoculação, sendo que este aumento foi mais significativo 24 h.a.i.. Estes resultados estão de acordo com diversos trabalhos da literatura que relataram que *Colletotrichum* spp. apresentam maiores taxas de germinação e formação de apressórios em intervalos de tempo superiores a 24 h.a.i. sobre plantas de guaraná (Bentes & Matsuoka, 2002), sorgo (Basavaraju et al., 2009) e feijão (Ishikawa et al., 2010).

Em relação ao desenvolvimento da antracnose quando a face adaxial ou abaxial foi inoculada e mantida sob luz ou escuro, não foi observado influência da luminosidade. Porém houve influência da superfície foliar inoculada (Figura 4). Os valores para a severidade quando a superfície adaxial e abaxial foi inoculada foram 43,6% e 26,7%, respectivamente. Resultados semelhantes foram observados para o patossistema *Phakopsora pachyrhizi* - soja (Furtado et al., 2009). Os autores observaram maiores densidade de lesões e severidade quando se inoculou a superfície adaxial de folhas de soja, porém incubadas no escuro.

Quanto à influência da idade da folha na germinação de conídios em relação ao tempo após a inoculação, observaram-se máxima taxa de germinação de conídios de *C. theobromicola* sobre folhas dos terços médio e superior a partir de 12 h.a.i.. Em folhas do terço inferior, a germinação máxima foi observada com 72 h.a.i. (Tabela 1). Resultados semelhantes também foram encontrados para o patossistema e *Colletotrichum graminicola* em folhas de milho (Mercure et al., 1994). Esta variação na germinação de esporos em folhas de diferentes idades está provavelmente relacionada com a composição da cutícula das folhas (Pascholati & Leite, 1995) e com a disponibilidade de nutrientes nas superfícies das folhas, folhas mais jovens apresentam cutículas mais finas em comparação com as mais velhas disponibilizando mais nutrientes para as superfícies das folhas (Obanor et al., 2008). Não houve influência da idade da folha na porcentagem de formação de apressórios de *C. theobromicola*. As maiores porcentagens de formação de apressórios foram observadas com 48 (53,2%) e 72 (54,1%) h.a.i, seguido de 12 h.a.i (31,7%) (Tabela 2). Em um estudo do patossistema *Colletotrichum guaranicola* – guaranazeiro, Bentes & Matsuoka (2002) observaram que a porcentagem de germinação não diferiu entre folhas novas e velhas no clone resistente, porém, no clone suscetível a germinação foi maior em folhas novas e, a formação de apressório foi maior em folhas novas de ambos os clones, demonstrando que há diferença nos eventos de pré-penetração conforme a idade dos tecidos. Nem todas as partes das plantas são igualmente suscetíveis a espécies de *Colletotrichum*, e muitas vezes a resistência de órgãos resulta de uma falha do fungo em penetrar os tecidos (Esquerré-Tugaýe et al., 1992; Bentes & Matsuoka., 2002).

Quando folhas oriundas dos diferentes terços (idades) dos ramos de plantas de eucalipto foram inoculados para avaliação da severidade, observaram-se que o período de incubação em folhas do terço superior foi de 3 dias e em folhas dos terços inferior e médio, 5 dias. Porém, a severidade da antracnose não se diferenciou estatisticamente em

relação a idade da folha inoculada, indicando não haver influência na idade da folha de eucalipto no desenvolvimento da antracnose. Bentes & Matsuoka (2002) observaram que em um ensaio para seleção de material, mudas de guaranazeiro do clone 626 ao serem inoculadas com *C. guaranicola* não apresentaram sintomas. Já nas inoculações seguintes, as mudas haviam passado por uma poda, e as inoculações foram feitas após o rebrotamento, em folhas mais novas que aquelas utilizadas anteriormente, o que pode ter favorecido o desenvolvimento dos sintomas em folhas novas. Tal comportamento pode ser atribuído à idade das folhas inoculadas, visto que o desenvolvimento das lesões está relacionado com a idade dos tecidos afetados, sendo as folhas mais novas, mais suscetíveis (Batista, 1983; Duarte et al., 1995; Bentes & Matsuoka., 2002).

Os clones de eucalipto avaliados quanto à incidência da antracnose apresentaram uma reação diferencial em relação ao isolado de *C. theobromicola* utilizado. Os clones CPC 10, CPC 16 e CPC 20 não apresentaram incidência da doença.

Considerando a importância da antracnose em eucalipto e a ausência de trabalhos na literatura envolvendo este patossistema, os resultados deste trabalho são importantes para a compreensão dos processos iniciais da infecção de *C. theobromicola* em clones de eucalipto, representando um importante passo para o desenvolvimento de estratégias de controle.

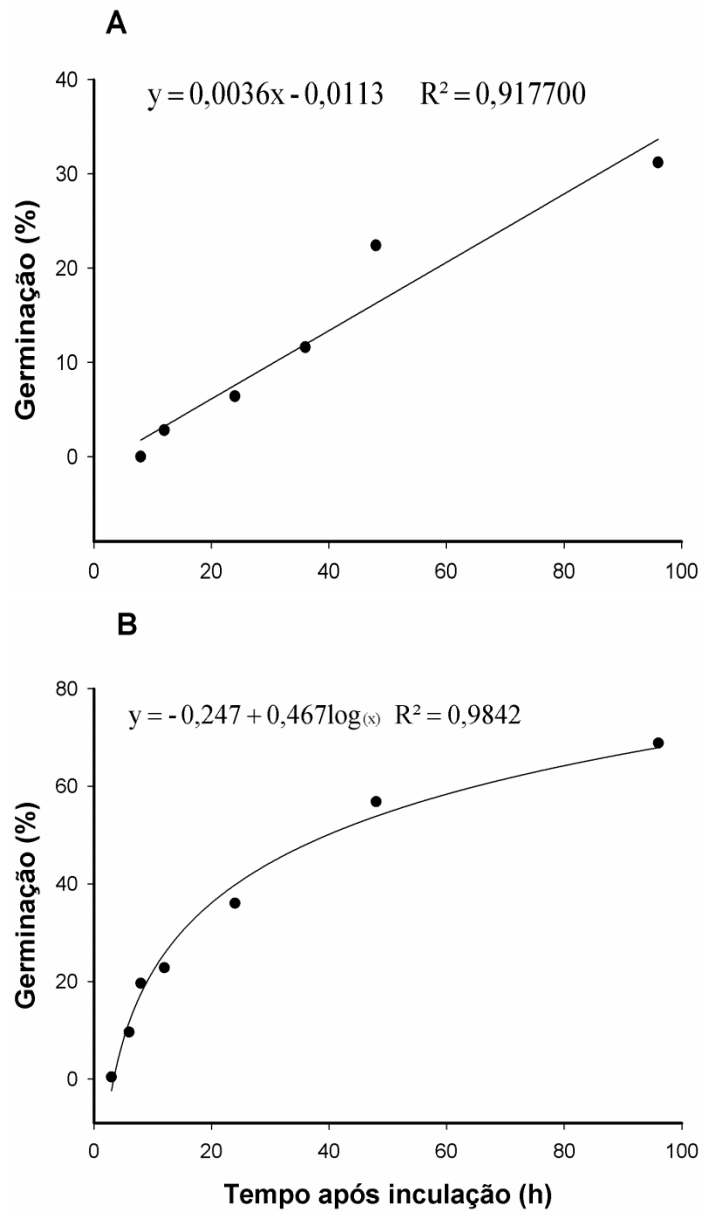


Figura 1. Porcentagem de germinação de conídios de *Colletotrichum theobromicola* nas superfícies abaxial (A) e adaxial (B) em relação ao tempo após a inoculação de folhas de eucalipto *urograndis*, sob luz contínua.

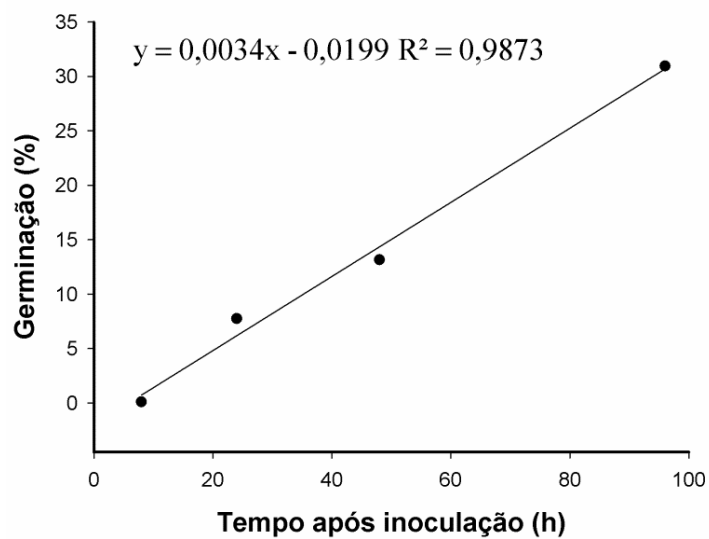


Figura 2. Porcentagem de germinação de conídios de *Colletotrichum theobromicola* em relação ao tempo após a inoculação de folhas de eucalipto urograndis (clone CPC 006), no escuro.

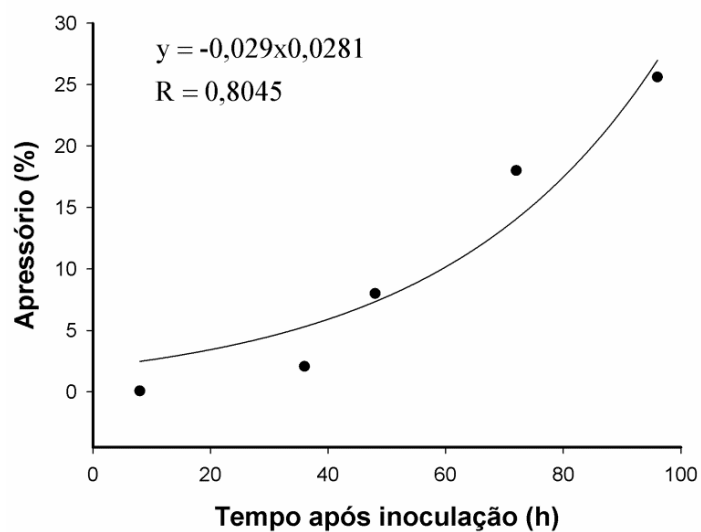


Figura 3. Porcentagem de formação de apressórios de *Colletotrichum theobromicola* em relação ao tempo após a inoculação de folhas de eucalipto urograndis (clone CPC 006).

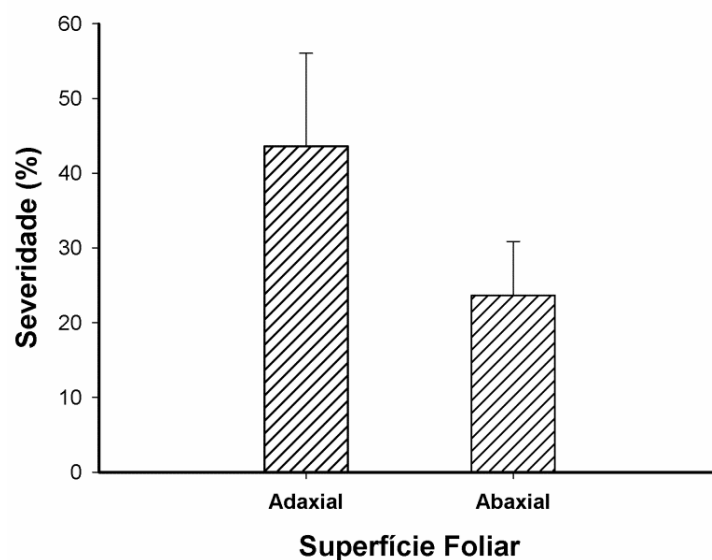


Figura 4. Severidade da antracnose em folhas de eucalipto urograndis (clone CPC 006) aos 9 dias após a inoculação de *Colletotrichum theobromicola* na face adaxial ou abaxial. Barras correspondem ao desvio padrão da média.

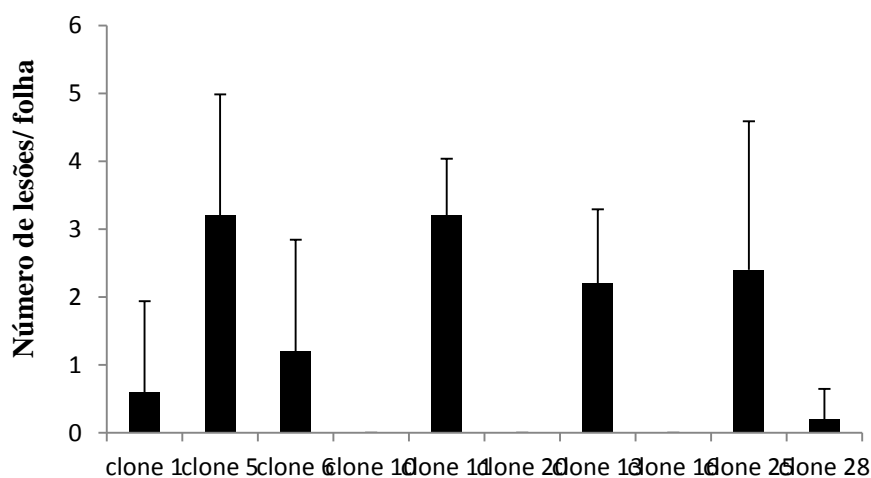


Figura 5. Número de lesões/folha da antracnose em diferentes clones de eucalipto, avaliada aos 9 dias após a inoculação. Genótipos 1, 5, 6, 10, 11, 20 são híbridos de *Eucalyptus urophylla* x *E. grandis*. Genótipos 25 e 28 são híbridos de *E. urophylla* x *E. globulus*. Genótipo 13, clone de *E. grandis*. Genótipo 16 (Rio Claro), clone oriundo do cruzamento entre *E. grandis* e um progenitor desconhecido. Barras representam o desvio padrão.

Tabela 1. Porcentagem de germinação de conídios de *Colletotrichum theobromicola* na superfície adaxial de folhas de eucalipto urograndis (clone CPC 006), oriundas dos terços inferior (primeira e segunda), médio (terceira e quarta) e superior (quinta e sexta) no sentido base-ápice, sob luz contínua,

Idade da folha (terço do ramo)	Tempo (horas após a inoculação)	Germinação (%)
Inferior	1	0 C
	3	0 C
	12	52,4 B
	48	50,4 B
	72	70,4 A
Médio	1	0 B
	3	0 B
	12	53,2 A
	48	69,6 A
	72	53,2 A
Superior	1	0 B
	3	8,4 B
	12	76,4 A
	48	70,4 A
	72	82,4 A

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (P<0,05).

Tabela 2. Porcentagem de formação de apressórios de *Colletotrichum theobromicola* na superfície adaxial de folhas de eucalipto urograndis (clone CPC 006), sob luz contínua, em relação ao tempo após a inoculação.

Tempo (horas após a inoculação)	Formação de apressórios (%)
1	0 C
3	0 C
12	31,7 B
48	53,2 A
72	54,1 A

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (P<0,05).

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos do primeiro autor.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAF (2012) Anuário estatístico ABRAF, ano base 2012. Disponível em: http://www.abraflor.org.br/estatisticas/ABRAF13/ABRAF13_BR.pdf. Acessado em 22 de julho de 2013.

Alfenas AC, Zauza EAV, Mafia RG, Assis TF (2009) Clonagem e doenças de eucalipto. 2ª Ed. Viçosa. Editora Universidade Federal de Viçosa.

Basavaraju P, Shetty NP, Shetty HS, Neergaard E, Jørgensen HJL (2009) Infection biology and defence responses in sorghum against *Colletotrichum sublineolum*. *Journal of Applied Microbiology* 107: 404-415.

Bailey JA, Jeger MJ (1992) *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control*. Wallingford UK. CAB International.

Bailey JA, O'Connell RJ, Pring RJ, Nash C (1992) Infection strategies of *Colletotrichum* species. In Bailey JA, Jeger MJ (Eds.) *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control*. Wallingford UK. CAB International. pp. 88–120.

Batista, MF. Doenças do Guaranazeiro (1983) M.A./Embrapa -UEPAE- Manaus. Circular Técnico nº9.

Bentes JLS, Matsuoka K. (2002) Histologia da interação *Colletotrichum guaranicola* e *Paullinia cupana* var. *sorbilis* em clones resistente e suscetível. *Fitopatologia Brasileira* 27: 71-77.

Chakraborty U, Chakraborty BN (1995) Factors influencing spore germination, apressoria formation and disease development in *Camellia sinensis* by *Glomerella cingulata*. *Folia Microbiol.* 40: 159-164.

Duarte, MLR, Albuquerque, FC, Corrêa, MPF (1995) Variações morfológicas e fisiológicas em isolamentos de *Colletotrichum guaranicola*. *Fitopatologia Brasileira* 20: 141-144.

Esquerré- Tugaye MT, Mazau D, Barthe JP, Lafitte C, Touze A (1992) Mechanisms of resistance to *Colletotrichum* species. In: Bailey, R.J. & Jeger, M.J. (Eds.) *Colletotrichum: biology, pathology and control*. Wallingford. CAB International. pp. 121-133.

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

Ferreira JB, Abreu MS de, Alves E, Pereira IS, Fernandes KD (2009) Events of the infection process of *Colletotrichum gloeosporioides* on leaves of *Coffea arabica* L. *Summa Phytopathologica* 35: 273-281.

Furtado GQ, Alves SAM, Godoy CV, Salatino MLF, Massola Júnior NS (2009) Influência da luminosidade e da camada de cera epicuticular de superfície de folhas de soja na infecção de *Phakopsora pachyrhizi*. *Tropical Plant Pathology* 34: 306-312.

Gomes FP, Garcia CH (2002) Estatística aplicada a experimentos agrônômicos e florestais. Piracicaba: FEALQ.

Ishikawa FH, Barcelos QL, Alves E, Camargo OAJ, Souza EA (2010) Symptoms and prepenetration events associated with the infection of common bean by the anamorph and teleomorph of *Glomerella cingulata* f.sp. *phaseoli*. *Journal of Phytopathology* 158: 270-277.

Lins SRO, Alves E, Abreu MS (2007) Estudos histopatológicos de *Colletotrichum* spp. em plântulas de cafeeiro. *Fitopatologia Brasileira* 32: 488-495.

Lisboa DO, Nascimento RJ, Rodrigues AL, Alfenas AC, Furtado GQ (2013) *Colletotrichum theobromicola* causando antracnose em eucalipto no Brasil. In: XXXVI Congresso Paulista de Fitopatologia, resumos.... São Paulo. *Summa Phytopathologica*. p. 129.

López AMQ (2001) Taxonomia, patogênese e controle de espécies do gênero *Colletotrichum*. *Revisão Anual de Patologia de Plantas* 9: 291-337.

Mercure EW, Kunoh H, Nicholson RL (1994) Adhesion of *Colletotrichum graminicola* conidia to corn leaves: a requirement for disease development. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 45: 407-420.

Morin L, Derby JAL, Kokko EG (1996) Infection processo of *Colletotrichum gloesporioides* f.sp. *malvae* on malvaceae weeds. *Mycological Research* 100: 165-172.

Obanor FO, Walter M, Jones EE, Jaspers MV (2008) Effect of temperature, relative humidity, leaf wetness and leaf age on *Spilocaea oleagina* conidium germination on olive leaves. *European Journal Plant Pathology* 120: 211-222.

Pascholati SF, Leite B (1995) Hospedeiro: mecanismos de resistência. In: Bergamin Filho, A., Kimati, H. & Amorim, L. (Eds.). Manual de Fitopatologia. São Paulo. CERES. pp. 417-453.

Pereira IS, Abreu MS, Alves E, Ferreira JB (2009) Estudos histopatológicos da interação *Colletotrichum gloeosporioides*- cafeeiro. *Bragantia* 68: 53-61.

Weir B, Johnston PR, Damm U (2012) The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. *Studies in Mycology* 73: 115-180.

Conclusões

Os resultados deste trabalho permitem concluir que:

- Os fungos isolados de plantas de eucalipto com sintoma de desfolha, podridão de haste e morte pertencem à espécie *C. theobromicola*.

- Ocorre maior porcentagem de germinação de conídios de *C. theobromicola* na superfície adaxial, sob luz contínua.

- A superfície foliar de folhas oriundas dos terços médio e superior dos ramos de mudas de eucalipto proporciona maior porcentagem de germinação de conídios de *C. theobromicola*.

- Não há efeito da luminosidade, da superfície foliar e da idade da folha na formação de apressórios de *C. theobromicola*.

- A inoculação de *C. theobromicola* na superfície adaxial de folhas de eucalipto proporciona maior severidade da antracnose.

- Genótipos de eucalipto apresentam reação diferencial a *C. theobromicola*.