

MÉTODO DE INOCULAÇÃO E AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA
DE GENÓTIPOS DE EUCALIPTO À MANCHA FOLIAR,
CAUSADA POR *Teratosphaeria nubilosa*

CAMILA DA SILVA FREITAS

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
FEVEREIRO - 2016

MÉTODO DE INOCULAÇÃO E AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA
DE GENÓTIPOS DE EUCALIPTO À MANCHA FOLIAR,
CAUSADA POR *Teratosphaeria nubilosa*

CAMILA DA SILVA FREITAS

“Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Genética e Melhoramento de Plantas.”

Orientador: Prof. Silvaldo Felipe da Silveira

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
FEVEREIRO - 2016

MÉTODO DE INOCULAÇÃO E AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA
DE GENÓTIPOS DE EUCALIPTO À MANCHA FOLIAR,
CAUSADA POR *Teratosphaeria nubilosa*

CAMILA DA SILVA FREITAS

“Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Genética e Melhoramento de Plantas.”

Aprovada em 25 de fevereiro de 2016.

Comissão Examinadora:

Prof. Acelino Couto Alfenas (Ph.D., Fitopatologia) – UFV

Prof^a. Rosana Rodrigues (D. Sc., Produção Vegetal) – UENF

Prof. Geraldo Amaral Gravina (D.Sc., Genética e Melhoramento) - UENF

Prof. Silvaldo Felipe da Silveira (D.Sc., Produção Vegetal) – UENF
(Orientador)

DEDICATÓRIA

Agradeço a Deus.

Dedico,
Aos meus pais e esposo pelo amor, carinho e incentivo durante todos os
momentos.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por me conceder o dom da vida e de chegar até aqui.

À UENF, pela acolhida e oportunidade de realizar o curso de mestrado.

Ao Professor Silvaldo, pela orientação, ensinamentos, amizade, cuidado, e pela oportunidade de realizar a parceria com a UFV, me mantendo inserida e motivada dentro da minha área de atuação.

Ao Programa de Genética e Melhoramento de Plantas - UENF, pelo suporte e excelência.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela concessão da bolsa.

Ao Professor Acelino Couto Alfenas, pela coordenação, pelos ensinamentos e aconselhamentos, pelo carinho, amizade e pelas inúmeras oportunidades desde a minha graduação, me permitindo aprender no campo profissional e pessoal, principalmente com ética e respeito ao próximo.

À minha conselheira, Professora Rosana Rodrigues, pela atenção e disponibilidade.

Ao meu conselheiro Professor Geraldo Gravina, pela atenção, carinho e grande ajuda nas análises estatísticas.

À coordenação do Programa de Genética e Melhoramento de Plantas da UENF e ao Sr. José Daniel, pela eficiência e responsabilidade.

À Clonar Resistência a Doenças, pela estrutura cedida para os experimentos e pela equipe responsável e capacitada.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Laboratório de Patologia Florestal pela excelência na estrutura e qualidade profissional.

À CMPC Celulose Riograndense e ao Norton Borges por disponibilizar o material vegetal utilizado nos experimentos e por permitir estudos em nível de campo.

Ao laboratório de Fitopatologia da UENF, pela estrutura e equipe.

Aos amigos do Laboratório de Patologia Florestal, da Clonar e da UFV.

Ao Eduardo (Clonar) pela dedicação, amizade e profissionalismo.

À Talyta Zarpelon, pela amizade, ajuda nas análises, dicas e conselhos.

Aos amigos da UENF, em especial à Tathianne, Beatriz e Pedro, pelas conversas e momentos de descontração.

Aos meus pais, Ely e Fátima e ao meu irmão Daniel, pelo amor incondicional, incentivo, oportunidades e por sempre acreditarem em mim.

Ao meu esposo Tiago, por todo amor, companheirismo, cumplicidade, pelo grande apoio nos experimentos, e por sempre estar ao meu lado.

A todos meus familiares pelo apoio, torcida e aconchego.

SUMARIO

RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	ix
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	4
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
3.1. O gênero <i>Eucalyptus</i> : aspectos botânicos, importância da eucaliptocultura e da espécie <i>E. globulus</i>	5
3.2. A TDL (<i>Teratosphaeria Leaf Disease</i>) em <i>Eucalyptus</i> spp.....	7
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	11
4.1. Isolamento e identificação de <i>T. nubilosa</i>	11
4.2. Ejeção de ascósporos de <i>Teratosphaeria nubilosa</i> sob diferentes temperaturas e ao longo do tempo.....	15
4.3. Avaliação do método de inoculação e reação de mudas clonais de <i>Eucalyptus</i> spp. à <i>T. nubilosa</i>	15
4.4. Resistência de <i>Eucalyptus</i> spp. a <i>Teratosphaeria nubilosa</i>	20
4.5. Análises estatísticas.....	21
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	22
5.1. Isolamento e identificação de <i>T. nubilosa</i>	22
5.2. Ejeção de ascósporos de <i>Teratosphaeria nubilosa</i> sob diferentes temperaturas e ao longo do tempo.....	27

5.3. Avaliação do método de inoculação e reação de mudas clonais de <i>Eucalyptus spp.</i> à <i>T. nubilosa</i>	30
5.4. Resistência de <i>Eucalyptus spp.</i> a <i>Teratosphaeria nubilosa</i>	40
6. CONCLUSÕES.....	44
REFERÊNCIAS.....	45
APÊNDICE.....	52

RESUMO

Freitas, Camila da Silva; M.Sc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; fevereiro, 2016; Método de inoculação e avaliação da resistência de genótipos de eucalipto à mancha foliar, causada por *Teratosphaeria nubilosa*; Orientador: Prof. Silvaldo Felipe da Silveira; Conselheiros: Prof. Acelino Couto Alfenas, Prof. Geraldo Amaral Gravina e Prof^a. Rosana Rodrigues.

Manchas foliares acompanhadas de desfolha podem ser induzidas por fungos dos gêneros *Teratosphaeria* e *Mycosphaerella* em *Eucalyptus* spp.. Em *Eucalyptus globulus*, no Brasil, *Teratosphaeria nubilosa* é o patógeno predominante e mais importante, causando a doença denominada *Teratosphaeria Leaf Disease* (TLD). Pelo fato do fungo não ser facilmente cultivado *in vitro*, há necessidade de se determinar as condições ótimas para obtenção de inóculo e inoculação de plantas, visando à seleção de genótipos resistentes à doença para plantio comercial ou para fins de melhoramento genético. Nesta dissertação, determinaram-se as condições ótimas de temperatura e tempo para a obtenção de inóculo constituído de ascósporos de *T. nubilosa* ejetados de folhas doentes coletadas em talhões de *E. globulus* do Sul do Brasil. A temperatura ótima para ejeção de ascósporos de *T. nubilosa* foi de aproximadamente 24°C, com pico de ejeção às 3h após incubação. Avaliou-se metodologia de inoculação do patógeno em larga escala, testando-se a disposição das folhas doentes em câmara úmida, e promovendo-se a ejeção direta de ascósporos em mudas saudáveis. Houve variações de severidade e de desfolha incitada por *T. nubilosa*, em função do

genótipo e da posição da fonte de inóculo nas câmaras úmidas. Maiores severidades de TLD e maiores índices de desfolha, para a maioria dos clones avaliados, ocorreram quando se dispôs as folhas doentes acima e abaixo das mudas. Os clones de *E. globulus*, bem como os híbridos *E. globulus* x *E. nitens*, foram os mais suscetíveis à TLD. Já clones de *E. dunnii*, bem como do híbrido *E. globulus* x *E. urophylla* apresentaram resistência parcial, com severidade moderada e sem apresentar desfolha. Clones de *E. benthamii* e de *E. grandis* x *E. urophylla* foram imunes à TLD. Das 13 progênies avaliadas noutro ensaio, apenas *E. dunnii* e *E. punctata* apresentaram sintomas após inoculação de ascósporos de *T. nubilosa*, enquanto que as demais foram imunes ao patógeno. As fontes de resistência à TDL testadas neste trabalho poderão ser recomendadas em programas de hibridação com *E. globulus*, visando à obtenção de híbridos e a seleção de clones resistentes a *T. nubilosa*. O método de inoculação desenvolvido é viável, rápido, prático e eficiente para avaliação em larga escala da resistência à TLD em *Eucalyptus* spp.

Palavras-chave: desfolha, doença, severidade

ABSTRACT

Freitas, Camila da Silva; M.Sc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; february, 2016; Inoculation method and resistance evaluation of *eucalyptus genotypes* to leaf spot, caused by *Teratosphaeria nubilosa*; Adviser: Prof. Silvaldo Felipe da Silveira; Counselors: Prof. Acelino Couto Alfenas, Prof. Geraldo Amaral Gravina e Prof^a. Rosana Rodrigues.

Leaf blight and defoliation can be induced by various species of *Mycosphaerella* and *Teratosphaeria* in *Eucalyptus* spp.. *T. nubilosa* is the predominant and most important pathogen, causing a disease called, *Teratosphaeria* Leaf Disease (TLD) on *Eucalyptus globulus* in Brazil. This fungus is not be easily grown *in culture* so it is necessary to determine the optimal conditions for obtaining inoculum and inoculation of plants, aimed at selection of genotypes resistant to disease for planting and for breeding purposes. In this Dissertation, we determined the optimal conditions of temperature and time to obtain inoculum, which consisted of *T. nubilosa* ascospores, ejected from infected leaves, collected in *E. globulus* plantation in southern Brazil. The optimum temperature for ascospore ejection was about 24 ° C, with peak of ejection at 3 h after incubation. We evaluated the pathogen inoculation methodology on a large scale in order to subsidize the genetic improvement works aimed at the selection of *Eucalyptus* spp. TLD resistant genotypes by testing the position of infected leaves in relation to the host in a mist irrigation chamber. Plants of *Eucalyptus* spp clones inoculated by active ejection of ascospores from diseased leaves showed variation in intensity, severity

and defoliation induced by *T. nubilosa*, depending on the genotype and inoculum source's position in the mist irrigation chambers. Superior TLD severity and higher defoliation levels were obtained for most of the assessed clones, in treatment 2, when the diseased leaves were placed above and under the plants. *E. globulus* clones and the hybrids *E. globulus* x *E. nitens*, were the most susceptible. The hybrid *E. globulus* x *E. urophylla* and *E. dunnii* showed partial resistance to the disease, with moderate severity, with no defoliation. *E. benthamii* and *E. grandis* x *urophylla* clones were immune to TLD. In another test, among 13 progenies tested, only *E. dunnii* and *E. punctata* were susceptible, while the others were immune. The TDL resistance sources tested in this work may be used in hybridization programs with *E. globulus* to obtain interspecific hybrids and in the selection of resistant clones to *T. nubilosa*. The methodology of inoculation developed in this work was efficient and practical for large-scale screening for resistance of *Eucalyptus* spp. to TLD.

Key words: defoliation, disease, severity

1. INTRODUÇÃO

A área plantada com eucalipto (*Eucalyptus* spp.) em todo o mundo ocupa cerca de 18 milhões de hectares (FAO, 2010) e destes, cerca de 5,4 milhões de hectares são de plantações florestais brasileiras (IBÁ, 2014). Florestas industriais de eucalipto estão amplamente espalhadas pelo território nacional, ocupando maiores áreas nos estados de Minas Gerais, São Paulo, Bahia, Mato Grosso do Sul, Rio Grande do Sul e Espírito Santo e, com áreas em expansão no Piauí, Maranhão e Tocantins (ABRAF, 2010).

O uso múltiplo da madeira de eucalipto (celulose e papel, carvão vegetal, madeira serrada para móveis e madeira peletizada para energia térmica, entre outros) tem estimulado o desenvolvimento da eucaliptocultura no país e do setor florestal, como consequência (SBS, 2009). Em regiões de clima temperado, a espécie *E. globulus* e seus híbridos interespecíficos se destacam dentre os mais cultivados, devido a adaptabilidade dessa espécie ao clima frio e devido a qualidade da sua madeira, de alta densidade e com baixo teor de lignina, proporcionar produção de celulose de melhor qualidade (Fonseca et al, 2010).

Em decorrência dos inúmeros avanços obtidos nas últimas décadas, quer sejam na multiplicação clonal ou no manejo dos plantios, o setor florestal brasileiro se destaca no cenário mundial. No entanto, a expansão das áreas plantadas é limitada pelo pequeno número de genótipos, muitos dos quais são suscetíveis ao ataque de doenças e pragas. Ciclos sucessivos de plantio do eucalipto em áreas extensas condicionam ao aumento na incidência de doenças,

as quais assumem caráter endêmico em certas regiões de cultivo. Não raramente, as doenças na eucaliptocultura atingem severidades elevadas, resultando em danos à produção e a perdas econômicas significativas (Alfenas et al., 2009).

Dentre diversas doenças foliares que atacam o eucalipto no Brasil, as causadas por espécies de *Teratosphaeria* são de particular interesse devido à intensa desfolha que provocam em genótipos derivados de *E. globulus*, principal espécie produtora de celulose de qualidade em regiões de clima temperado (Fonseca et al, 2010). A mancha de *Teratosphaeria*, ou *Teratosphaeria* Leaf Disease (TLD) é causada por um complexo de espécies de ascomicetos classificados no gênero *Teratosphaeria*, família Mycosphaerellaceae (Alfenas et al., 2009). *Teratosphaeria nubilosa* (Cooke) Crous & U. Braun e *T. cryptica* (Cooke) Crous & U. Braun são consideradas as espécies mais importantes mundialmente, sendo *E. globulus*, a espécie hospedeira mais afetada (Mohammed et al., 2003; Hunter et al., 2006; Carnegie et al., 2007). Ambas as espécies de *Teratosphaeria* são hemibiotróficas em *Eucalyptus* e se multiplicam na natureza somente em tecidos vivos do hospedeiro, apresentando crescimento lento e estéril (sem esporos) *in vitro* (Park & Keane 1982b; Hunter et al., 2009).

No Brasil, a TLD foi relatada pela primeira vez causando danos severos em plantações de *E. globulus* no Rio Grande do Sul, em 2007, sendo esta a primeira constatação de *T. nubilosa* no país (Perez et al., 2009). Os sintomas da TLD caracterizam-se por numerosas lesões, inicialmente arredondadas e de coloração palha e, posteriormente, adquirindo formatos variáveis. Com o avanço da infecção, as lesões coalescem e a necrose compromete significativa porção do limbo, o que culmina numa desfolha acentuada da planta (Crous, 1998; Pinkard & Mohammed, 2006). Nas lesões, são sinais representativos da doença as pontuações nas necroses, constituídas dos pseudotécios que se formam predominantemente na superfície abaxial do limbo. Quando as folhas são molhadas, os ascósporos são ejetados ativamente dos pseudotécios e disseminados pelo vento, atuando como inóculo primário e secundário nas epidemias. Nas folhas sadias, especialmente nas mais jovens, os esporos germinam e o tubo germinativo penetra a folha via estômatos (Park & Keane, 1982; Park & Keane, 1984; Alfenas et al., 2009).

O plantio de genótipos resistentes constitui a melhor alternativa de controle de doenças em plantas, principalmente em espécies florestais no campo.

Para seleção de plantas resistentes é fundamental determinar as condições de cultivo e produção de inóculo do patógeno *in vitro*, bem como avaliar métodos de inoculação e de quantificação da doença. Todavia, o crescimento lento *in vitro* de *Teratosphaeria* spp. e as dificuldades de esporulação do fungo em cultura constituem entraves à inoculação sob condições controladas, visando à seleção de genótipos resistentes (Teodoro et al., 2012).

Neste trabalho, objetivou-se: (i) determinar a temperatura ótima para obtenção de inóculo por ejeção de ascósporos de *T. nubilosa* a partir de folhas doentes; (ii) avaliar metodologia de inoculação do patógeno em larga escala, por ejeção de ascósporos a partir de folhas doentes; (iii) avaliar a reação de genótipos (clones, híbridos interespecíficos de *E. globulus* e *Eucalyptus*. spp.) a *T. nubilosa*; a fim de subsidiar trabalhos de melhoramento do eucalipto para resistência à TLD.

2. OBJETIVOS

Determinar combinações de temperatura e tempo ótimos para ejeção de ascósporos de *Teratosphaeria nubilosa* a partir de folhas com sintomas, a fim de otimizar metodologia de inoculação sob condições controladas. Determinar e avaliar método de inoculação em larga escala de *T. nubilosa* em *Eucalyptus* spp.. Avaliar a reação de genótipos (clones e híbridos interespecíficos de *E. globulus* e procedências de *Eucalyptus*. spp) a *T. nubilosa*; a fim de subsidiar trabalhos de melhoramento do eucalipto para resistência à TLD.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. O gênero *Eucalyptus*: aspectos botânicos, importância da eucaliptocultura e da espécie *E. globulus*

O gênero *Eucalyptus* L'Herit pertence à família Myrtaceae, sendo composto por mais de 700 espécies. São descritos dentro do gênero *Eucalyptus* 10 subgêneros, sendo o principal o *Symphyomyrtus*, com mais de 470 espécies, dentre as quais estão as mais plantadas para fins comerciais *E. grandis*, *E. globulus*, *E. urophylla*, *E. calmadulensis*, *E. saligna* e *E. tereticornis* (Eldridge et al., 1994; Brooker, 2000; Poke et al., 2005; Grattapaglia et al., 2012).

O *Eucalyptus* é endêmico da Austrália, com a exceção de *E. deglupta*, *E. orophylla*, *E. urophylla* e *E. wetarensis*, que são naturais da Indonésia, Filipinas e Papua Nova Guiné (Grattapaglia et al., 2012). Devido às diferentes condições edafoclimáticas verificadas em seu continente de origem, o *Eucalyptus* possui espécies que se adaptam muito bem em diferentes regiões do globo, nas mesmas latitudes (Grattapaglia et al., 2012). Muitas espécies de *Eucalyptus* são reconhecidas pelo seu rápido crescimento, qualidade boa da madeira, tolerância aos mais diversos climas e solos e facilidade de manejo por plantio direto e rebrota (Eldridge et al., 1994; Potts, 2004).

O gênero apresenta ampla variabilidade genética e fenotípica, o que serve de base para a seleção em programas de melhoramento genético florestal, pois existem espécies e genótipos adaptados a um amplo espectro de ambientes,

como verificado no Brasil. Árvores de eucalipto são hermafroditas, protândricas e predominantemente alógamas. Embora possam reproduzir-se por autofecundação, apresentam forte depressão por endogamia (Williams & Woinarski, 1997). Espécies de *Eucalyptus* são diplóides e o genoma varia entre 600 e 700 milhões de pares de bases, distribuídos em 22 cromossomos ($2n=2x=22$) (Grattapaglia et al., 2012).

A partir do século 18, diversas espécies de *Eucalyptus* foram introduzidas em países como Índia, França, Chile, Brasil, África do Sul e Portugal, onde têm apresentado boa adaptação climática, sucesso reprodutivo e elevados índices de produtividade de madeira (Potts, 2004).

Na década de 1960, com o desenvolvimento de métodos industriais de processamento das fibras curtas do eucalipto, os plantios de espécies do gênero começaram a crescer comercialmente e os programas de melhoramento foram iniciados em países como Estados Unidos (*E. grandis*) e Portugal (*E. globulus*). Em 1970, iniciaram as plantações clonais no Congo e no Brasil, com ênfase na espécie *E. urophylla*, devido à maior facilidade de propagação vegetativa desta espécie. A partir de 1980, outras populações foram constituídas envolvendo as espécies de *E. grandis*, *E. tereticornis* e *E. viminalis*, na tentativa de se ampliar a base genética para fins de melhoramento florestal (Eldridge et al., 1994).

No início da década de 1990, o Brasil já detinha grande acervo genético de *Eucalyptus* spp, ficando atrás somente da Austrália e Indonésia (Ferreira, 1992). Isto evidencia o interesse neste gênero por parte das indústrias de celulose e siderurgia, o que envolveu esforços no planejamento de programas de melhoramento florestal no Brasil, visando abastecer a grande demanda nacional. Atualmente, o eucalipto é cultivado em mais de 90 países, sendo a eucaliptocultura fonte de diferentes produtos: madeira sólida, postes, energia, celulose, carvão vegetal, óleos essenciais e tanino, dentre outras finalidades (Grattapaglia et al., 2012).

Em 2013, a área ocupada por plantios florestais de *Eucalyptus* e *Pinus* no Brasil totalizou 7,6 milhões de ha, sendo 72,0% correspondente à área de plantios de *Eucalyptus*, ou seja, 5.473.176 ha, representando crescimento de 3,2% (169.012 ha) em relação a 2012. O principal fator que alavancou esse crescimento foi o estabelecimento de novos plantios frente à demanda dos projetos industriais do segmento de papel e celulose (IBÁ, 2014). Em 2013, o

setor brasileiro de árvores plantadas adicionou ao produto interno bruto brasileiro cerca de R\$ 56 bilhões, representando 1,2% de toda a riqueza gerada no País e cerca de 24% do valor adicionado ao PIB pelo setor agropecuário e empregando diretamente cerca de 630 mil pessoas (IBÁ, 2014).

Os plantios de eucalipto estão espalhados pelo território nacional, principalmente, nos estados de Minas Gerais (28,8%), São Paulo (21,2%), Bahia (12,5%), Mato Grosso do Sul (9,8%), Rio Grande do Sul (5,7%), Espírito Santo (4,1%) e Paraná (3,9%) (ABRAF, 2010). No sul do Brasil, os plantios de eucalipto ainda são incipientes, havendo necessidade de os programas de melhoramento genético florestal avançarem na seleção de genótipos adaptados a estas regiões. Dentre as espécies mais adaptadas a regiões frias, destaca-se *E. globulus*.

E. globulus é uma das espécies mais importantes para a produção de celulose e papel, pois sua madeira possui alto teor de celulose, baixo teor de lignina, densidade elevada e, conseqüentemente, baixo consumo específico e menor consumo de cloro no branqueamento da polpa celulósica (Fonseca et al. 2010). *E. globulus* exige clima frio e inverno chuvoso, porém não tolera geadas (Eldridge et al. 1994), não se adaptando dessa forma a climas tropicais e subtropicais como no Brasil. Contudo, os cruzamentos de *E. globulus* com outras espécies ou com outros híbridos interespecíficos já cultivados no Brasil, derivados de *E. grandis*, *E. urophylla*, *E. camaldulensis*, *E. grandis* x *E. urophylla* dentre outras, apresentam potencial para a produção de celulose de maior qualidade, e melhor adaptabilidade às condições brasileiras (Alfenas et al. 2009).

No Brasil, tem-se utilizado *E. globulus* nos programas de melhoramento genético em cruzamentos com *E. grandis*, *E. urophylla* dentre outras espécies. Essa estratégia tem sido denominada de “globulização” da eucaliptocultura nacional e visa à obtenção de ganhos em rendimento de celulose (Alfenas et al. 2009). Entretanto, a alta suscetibilidade de *E. globulus* à desfolha incitada por *Teratosphaeria* spp. limita o sucesso desta estratégia a ser utilizada nos programas de melhoramento genético do eucalipto.

3.2. A TDL (Teratosphaeria Leaf Disease) em Eucalyptus spp.

A *Teratosphaeria* Leaf Disease (TLD) é causada por várias espécies de fungos do gênero *Teratosphaeria* (Crous, 1998) e representa uma das doenças

que mais ameaçam as florestas plantadas de eucalipto no mundo (Hunter et al., 2008). Os sintomas da TDL em *Eucalyptus* spp. caracterizam-se por numerosas lesões, inicialmente arredondadas e de coloração palha, que ao progredirem coalescem e adquirem formatos variáveis, comprometendo grande área do limbo foliar. A perda de área fotossintética é agravada pela desfolha intensa provocada nos genótipos e espécies mais suscetíveis de *Eucalyptus*, tais como *E. globulus* (Crous, 1998; Pinkard & Mohammed, 2006). O estágio fenológico das folhas de *E. globulus* influencia diretamente na intensidade da doença, que incide de forma mais severa em folhas jovens (Alfenas et al. 2009). Nas lesões, o fungo desenvolve estruturas reprodutivas ascogênicas, vistas como pontuações, as quais são corpúsculos com parede, denominados pseudotécios.

Os pseudotécios são formados em ambas superfícies foliares, sendo mais abundantes na abaxial. O molhamento foliar promove a ejeção ativa dos ascósporos dos pseudotécios. Os ascósporos são disseminados pelo vento e atuam como inóculo primário ou secundário nas epidemias. A infecção ocorre nas folhas jovens, onde os esporos germinam na presença de água em sua forma líquida. A penetração na folha ocorre pelo crescimento da hifa infectiva via estômatos (Park & Keane 1982; Park & Keane 1984).

No Brasil, a preocupação com relação à TLD teve início em 2007, com a primeira constatação de *Teratosphaeria nubilosa* no Rio Grande do Sul, causando grandes danos em plantações de *E. globulus* (Perez et al., 2009). Passador et al. (2012), analisaram cinco locais no Sul e Sudeste do Brasil, confirmando a presença de *T. nubilosa*, agente causal da TDL em plantios de *E. globulus*, em várias regiões.

Em 2007, levantamento amostral preliminar realizado na região de Pinheiro Machado e Piratini, Estado do Rio Grande do Sul, apontaram para uma incidência da TDL variando de 50 a 90 % das árvores de *E. globulus*. Mortandade variável de 2,5 a 18,4 % das árvores foi atribuída à desfolha contínua associada à TDL, causada por *Teratosphaeria* spp. em plantios de 16 meses de *E. globulus* (Pérez et al., 2009).

Teratosphaeria, juntamente com *Mycosphaerella*, pertencem ao Filo Ascomycota, Classe Loculoascomycetes, Ordem Capnodiales, Famílias Teratosphaeriaceae e Mycosphaerellaceae. *Mycosphaerella* spp. e *Teratosphaeria* spp. produzem ascósporos em estroma unilocular peritecióide,

denominado pseudotécio (Alexopoulos et al., 1996, Putzke e Putzke, 1998). Os pseudotécios abrigam ascas bitunicadas diferindo pois, dos peritécios típicos, os quais possuem parede delgada (não-estromáticos) e abrigam ascos unitunicados, com ou sem paráfises. Existem cerca de 90 espécies de fungos enquadradas nos gêneros *Mycosphaerella* e *Teratosphaeria*, englobando diferentes gêneros anamorfos, muitos dos quais ainda desconhecidos. Muitas espécies de ambos os gêneros são descritas atacando folhas de *Eucalyptus* spp. (Crous et al., 2007b).

O gênero *Teratosphaeria* difere de *Mycosphaerella*, pelo fato do anamorfo produzir conídios em picnídios e não em esporodóquios. Com base nisso e na filogenia molecular, Crous et al. (2007) transferiram muitas espécies de *Mycosphaerella* para o gênero *Teratosphaeria* Syd. & P. Syd., na família Teratosphaeriaceae Crous & Braun. Mais de 80 espécies de *Mycosphaerella* e *Teratosphaeria* já foram descritas associadas à *Eucalyptus* spp., incluindo aquelas patogênicas e outras saprófitas ou estremófilas. Dentre as espécies patogênicas em *Eucalyptus* spp., *T. cryptica* e *T. nubilosa* são as mais importantes em virtude da severidade das doenças, acompanhadas por desfolha acentuada que provocam em *E. globulus* em todo o mundo (Carnegie et al. 2007; Hunter et al. 2009). *T. nubilosa* já foi relatada causando 95% de desfolha em árvores de *E. globulus* na Austrália (Carnegie, 2007).

Trabalhos relacionados às espécies fitopatogênicas de *Teratosphaeria* e *Mycosphaerella* esbarram nas dificuldades de esporulação e de produção de inóculo *in vitro*, requisito básico para estudos envolvendo inoculações artificiais, sob condições controladas. *T. nubilosa* não produz conídios e, portanto, o anamorfo é desconhecido (Jackson et al., 2008). Embora *T. Nubilosa* tenha sido relacionado à *Uwebraunia juvenis* (Crous & Wingf, 1996), esta relação foi considerada duvidosa devida à rara ocorrência de conídios deste fungo em meio de cultura (Crous et al., 2006).

Dentre as estratégias de controle de doenças de plantas, o plantio de genótipos resistentes destaca-se como a mais sustentável, principalmente no caso de espécies florestais de grande porte, em condições de campo. Nesse sentido, é uma exigência fundamental o desenvolvimento de métodos padronizados de produção de inóculo, de inoculação e de avaliação e quantificação da doença. Todavia, o crescimento lento de *Teratosphaeria* spp. *in vitro*, bem como as dificuldades de esporulação do fungo em cultura constituem

nos maiores obstáculos para se desenvolver métodos padronizados de inoculação e de avaliação da TLD, visando aprofundar os estudos de genética da resistência, e da variabilidade genética do patógeno, e outros que fundamentariam o melhoramento genético do eucalipto, visando resistência a doença.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Isolamento e identificação de *T. nubilosa*

Para cada ensaio de inoculação, foram coletadas cerca de 5000 folhas jovens com sintomas de TLD, em talhões clonais de *Eucalyptus globulus* no Horto Chalé, no município de Eldorado do Sul (RS), Brasil, da empresa Celulose Riograndense (CMPC®). Amostras de folhas doentes e com sintomas e sinais típicos da TDL causada por *Teratosphaeria nubilosa*, foram coletadas a partir de clones severamente atacados, após derrubada das árvores no campo. Somente cerca de 40% das folhas recém-coletadas e enviadas ao Laboratório de Patologia Florestal da UFV, foram utilizadas para isolamento do patógeno e para os experimentos de inoculação, como fontes de inóculo.

Para o isolamento do patógeno, empregou-se a técnica de ejeção ativa de ascósporos (Crous, 1998). Para tal, fragmentos foliares contendo lesões com pseudotécios foram mantidas em água destilada durante 2h, a fim de estimular a ejeção ativa dos ascósporos. Os fragmentos foram aderidos à tampa de placa de Petri (90 x 15 mm) sobre meio de extrato de malte - ágar (MEA). As placas foram mantidas a 25°C por 12 h. Culturas monoascospóricas foram obtidas a partir da transferência de um único ascósporo recém-germinado, para meio MEA em placas, sob microscópio estereoscópico. As placas de isolamento foram incubadas a 15°C por 15 dias e, posteriormente, a 20°C durante 30 dias. Os isolados obtidos foram armazenados em replicatas em solução salina (0,85%),

dispostas em tubos de microcentrífuga (2ml), contendo 6 discos de cultura em meio MEA, os quais foram mantidos a temperatura ambiente, juntos à micoteca do Laboratório de Patologia Florestal (Bioagro – UFV).

Todas as amostras foliares selecionadas para os isolamentos, apresentavam sintomas característicos de TLD induzida por *T. nubilosa*. No entanto, como lesões similares são também causadas por outras espécies do gênero, para se confirmar a identificação do provável patógeno isolado em cultura pura, efetuou-se o sequenciamento de segmentos gênicos específicos para *T. nubilosa*, amplificados por reação de PCR. Para isso, foram utilizados primers específicos, conforme metodologia em uso no Laboratório de Patologia Florestal-Bioagro (UFV), adaptada de Crous et al. (2009) e do Wizard Genomic DNA Purification Kit.

Para a extração de DNA, discos das culturas monoascospóricas com 45 dias de idade foram transferidos para placas de Petri contendo meio de extrato de malte - ágar (MEA), e incubados a 20 °C por 60 dias. Após incubação, o micélio foi transferido para tubos de microcentrífuga (2,0 mL) e a este adicionado 600 µL da “Nuclei Lysis Solution”, seguindo-se de homogeneização por 2 min em macerador TissueLyser II (Quiagen®). A seguir, as amostras foram incubadas a -20 °C por 5 min. Após incubação, adicionou-se às amostras, 400 µL “Precipitation Protein Solution” e agitou-se em macerador *TissueLyser* por 1 min a 30 Hz, seguindo por centrifugação a 13200 rpm/10 min. Em seguida transferiram-se 400 µL da fase aquosa (sobrenadante) para um novo tubo de 1,5 ml contendo 500 µL de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1), seguida de homogeneização em *TissueLayser* por 2 min a 4 Hz e centrifugação a 13200 rpm/10 min.

Transferiu-se a fase aquosa para um novo tubo de 1,5 ml contendo 600 µL de isopropanol gelado e homogeneizou-se cuidadosamente invertendo os tubos algumas vezes. Incubou-se os tubos por 30 min a -20°C, seguido de centrifugação por 10 min a 13200 rpm, invertendo os tubos para formação do pellet. Descartou-se o sobrenadante e adicionou-se 600 µL de etanol (70%) gelado, agitando em *TissueLayser* por 2 min a 4 Hz, seguido de centrifugação por 3 min a 13200 rpm. Essa etapa foi realizada por duas vezes. Subsequentemente os pellets de DNA formados foram secos em estufa a 37°C por 20 min. Após a secagem, o *pellet* de DNA foi ressuspensão em 30 µL de “DNA rehydratation” e 2 µL de Rnase e mantidos em banho maria a 37 °C por 12 h, seguido de

armazenamento a -20°C . Posteriormente, o DNA foi quantificado em espectrofotômetro NanoDrop (Thermo Scientific®) e a concentração ajustada para $10\text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$.

As reações de PCR foram realizadas com $25\text{ } \mu\text{L}$ de solução, contendo $5\text{ } \mu\text{L}$ de tampão para PCR 5X (Promega®), $2\text{ } \mu\text{L}$ de MgCl_2 a 25mM (Promega®), $2\text{ } \mu\text{L}$ dNTP a 10 mM , $1,75\text{ U}$ de Taq polimerase (Promega®), $1,5\text{ } \mu\text{L}$ dos primers MN1R/MN1F específicos para *T. nubilosa* a $0,2\text{mM}$ (Tabela 1) e $2\text{ } \mu\text{L}$ de DNA genômico ($10\text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$) e água esterilizada suficiente para completar o volume final. As amplificações foram realizadas em termociclador nas condições originalmente descritas para cada iniciador (Kularatne et al., 2004; Maxwell et al., 2005; Glen et al., 2007). Os produtos resultantes da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,2%, contrastados em GelRed (Uniscience®) e visualizados no sistema de fotodocumentação L - PIX EX (Loccus Biotecnologia®).

Tabela 1. Primers utilizados para identificação das espécies mais comuns de *Teratosphaeria* e *Mycosphaerella* associadas a manchas foliares do eucalipto (Extraído de Hunter et al., 2011)

Species	Primer name	Sequence (5' - 3')	Annealing temp	Amplicon size (bp.)	Reference
<i>Teratosphaeria cryptica</i>	MCF	TTTTCCAACCATGTTGCC	45	267	Kularatne et al., 2004
	MCR	TGTAATGACGCTCGAACAG			
	MC2F	CCCGCCCGACCTCCAACC	58	-	Maxwell et al., 2005
	MC2R	CGGTCCCGGAAGCGAAACAG			
	McrypF	CATCTITGCGTCTGAGTGATAACG	-	331	Glen et al., 2007
	McrypR	GGGGGTIGACGGCGCGAC			
<i>Teratosphaeria nubilosa</i>	MNF	CGTCGGAGTAATACAACC	50	199	Kularatne et al., 2004
	MNR	AGGCTGGAGTGGTGAAATG			
	MN1F	GCGCCAGCCCGACCTCC	57	-	Maxwell et al., 2005
	MN1R	GGTCCCGTCAGCGAAACAGT	56		
	MnubF	CAACCCCATGTTTTCCACCACG	-	395	Glen et al., 2007
	MnubR	CGCCAGACCGGTCCCCGTC			
<i>Mycosphaerella lateralis</i>	ML1F	AAACGCCGGGGCCTTCG	54	-	Maxwell et al., 2005
	ML1R	CGACGTCTCCGCCGATGTTTTCC	61		
<i>Mycosphaerella marksii</i>	MM1F	CGGCCCGACCTCCAACC	57	-	Maxwell et al., 2005
	MM1R	GATGCCACAACGCTCGGAGA	55		
<i>Mycosphaerella parva</i>	MP1F	CCTCCGGGCTCGACCTCCA	60	-	Maxwell et al., 2005
	MP1R	TCTCGCAAGCGGATGATTAACC	55		
	MgpF	CCCATIGTATICCGACCTCTIG		359	Glen et al., 2007
	MgpR	CGCTIAGAGACAGTIGGCTCAG			
<i>Mycosphaerella tasmaniensis</i>	MtasF	GTCACGCGGCCGACCGC		298	Glen et al., 2007
	MtasR	CATIAGGGCACGCGGGCTG			

4.2. Determinação da ejeção ativa de ascósporos de *T. nubilosa* sob diferentes temperaturas e ao longo do tempo

Avaliaram-se quatro temperaturas para ejeção de ascósporos a partir das folhas doentes: 15, 20, 25 e 30° C. Empregou-se a técnica de ejeção ativa de ascósporos (Crous, 1998), conforme descrita a seguir. Discos de folhas de 5 x 5 mm contendo lesões foram cortados e fixados em tampas de caixas de poliestireno transparente (Germbox), medindo 11x11x3,5 cm. Em cada tampa da caixa foram montadas duas áreas com 12 discos cada, por baixo das quais foi colocada uma lâmina de microscopia contendo ágar-água 2% (AA), na qual delimitaram-se três áreas de 2 x 2 mm em cada uma, onde foram realizadas as contagens dos esporos ejetados. Como repetição, utilizaram-se três caixas de poliestireno (caixas plásticas tipo Germbox®), com duas lâminas cada, para cada temperatura avaliada. Dentro de cada caixa depositou-se um pedaço de algodão embebido em água, para formação da câmara úmida. As caixas foram seladas com filme plástico e incubadas por 24 h nas respectivas temperaturas. As contagens dos ascósporos ejetados foram feitas em cada área de ejeção delimitada nas lâminas, sob microscópio ótico, no aumento de 4x. O ensaio foi repetido uma vez.

Determinada a melhor temperatura de ejeção, avaliou-se, num segundo ensaio, o número de ascósporos ejetados ao longo do tempo, conforme mesma metodologia descrita no ensaio anterior. No entanto, neste ensaio as contagens do número de esporos ejetados foram feitas de três em três horas, a partir do início da incubação, até quando não foram mais visualizados acréscimos significativos no número de esporos ejetados nas áreas delimitadas nas lâminas. Ambos ensaios foram repetidos uma vez.

4.3 Avaliação do método de inoculação e reação de mudas clonais de *Eucalyptus spp.* à *T. nubilosa*

Todos os experimentos de inoculação foram conduzidos nas instalações da Empresa Clonar Resistência a Doenças Florestais (CLONAR®), vinculada ao Laboratório de Patologia Florestal (LPF) da Universidade Federal de Viçosa (UFV), localizados na região de Viçosa, MG. Todos os genótipos e mudas clonais

(híbridos) utilizados nos experimentos pertencem às coleções mantidas pelas empresas CMPC® Celulose Riograndense e CLONAR®.

Foram conduzidos inicialmente dois ensaios de inoculação com mudas clonais. Para se avaliar o método de inoculação, além dos genótipos (clones), testou-se as seguintes disposições das fontes de inóculo (folhas doentes) em câmaras de inoculação: (1) folhas dispostas na parte superior das câmaras (em cima da tela de arame) (sobre as plantas); (2) folhas dispostas em cima e abaixo das plantas (no piso das baias ao redor dos vasos); (3) folhas somente abaixo das plantas (sobre o piso ao redor dos vasos; e (4) Testemunha, plantas não-inoculadas (camâras sem fontes de inóculo) (Figura 1).

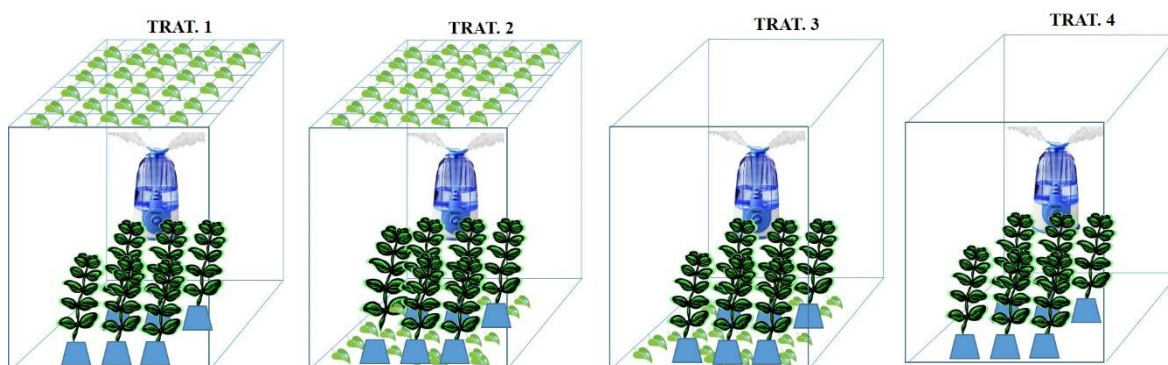


Figura 1. Disposição das folhas na câmara de inoculação, para inoculação de mudas de eucalipto por ejeção direta de esporos em câmara úmida, preconizada em câmaras teladas com umidificadores de ar. TRAT 1: folhas sobre as mudas; TRAT 2: folhas sobre e sob as folhas; TRAT 3: Folhas sob as mudas; TRAT 4: Testemunhas não inoculada.

No primeiro ensaio, utilizaram-se mudas clonais de cinco genótipos de eucalipto: *E. nitens* x *E. globulus* (C1), *E. nitens* x *E. globulus* (C2), *E. grandis* x *E. urophylla* (386) e *E. globulus* (373), *E. globulus* (354). Num segundo ensaio, foram utilizadas mudas clonais dos seis genótipos a seguir: *E. globulus* x *E. urophylla* (C3), *E. bentamii* (C4), *E. dunnii* (C5), *E. grandis* x *E. urophylla* (386) e *E. globulus* (373), *E. globulus* (354).

As mudas clonais foram produzidas pela técnica de microestaquia em tubetes (50 cm³) e transplantadas aos 70 dias para vasos de 3 L, contendo

substrato Carolina[®] (Sphagnum 70%, palha de arroz torrefada 20%, perlita 10%), complementado com 6 Kg.m⁻³ de fosfato supersimples e 1,5 Kg.m⁻³ de Osmocote[®] (19-6-10). As inoculações foram conduzidas aos 60 dias após o transplante das mudas. Foram utilizadas 10 mudas de cada clone por tratamento, totalizando 200 plantas no primeiro ensaio de inoculação e 240 no segundo. O delineamento foi inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial (tratamento x genótipo).

A inoculação foi por meio da ejeção direta de ascósporos nas mudas, a partir de folhas doentes utilizadas como fontes de inóculo, conforme metodologia adaptada de Crous (1998). As câmaras de inoculação foram constituídas de estrutura metálica retangular medindo 2,52 x 1,25 x 1,00 m, e contendo na parte superior uma tela de aço galvanizado, com laterais protegidas por plástico translúcido (Figura 2). As folhas utilizadas como fontes de inóculo foram mantidas por duas horas imersas em água estéril, para favorecer a liberação e ejeção de ascósporos e, em seguida, dispostas nas câmaras com a superfície abaxial voltada para as mudas a serem inoculadas. Em cada ensaio, utilizaram-se cerca de 1800 folhas como fonte de inóculo, sendo utilizadas 600 folhas para cada câmara, independente da sua disposição, exceto no tratamento 4, não-inoculado. As folhas doentes (fontes de inóculo) foram mantidas nas câmaras para ejeção de esporos por até 24 horas. Para manter a saturação de umidade e o molhamento foliar, as câmaras foram cobertas com plástico transparente e no interior de cada câmara foi instalado umidificador de ar (Modelo Fresh Air 5,8 litros), o qual permaneceu ligado continuamente por 72 h após início da incubação (Figura 2 D). Neste período, as condições de temperatura e umidade relativa no interior de todas as câmaras foram monitoradas com auxílio de Datalogger (Novus, Modelo Log Box - RTH - LCD) e mantiveram-se em torno de 24 °C e 97% (UR), no primeiro ensaio, e 25 °C e 96% (UR), no segundo ensaio, durante todo período de incubação na câmara de inoculação.

Após as 72 horas de incubação nas câmaras-úmidas, as mudas foram transferidas para casa de vegetação, com temperatura e umidade monitoradas. Neste período, a irrigação manual passou a ser realizada de 3-4 vezes ao dia, conforme necessidade, sendo duas de forma manual (com mangueira) e duas irrigações por miniaspersão automática (Modelo de emissor: Green spin; Espaçamento entre emissores: 2,0 m x 3,20 m; Vazão por emissor (l/h): 160; Uniformidade da aplicação: 94%; Lâmina de aplicação: 25 mm/h) de 3 minutos de

duração. As mudas foram avaliadas diariamente quanto a severidade e a desfolha incitada por *T. nubilosa*. Para as avaliações de doença, as mudas tiveram seis ramos marcados e etiquetados, em cujas etiquetas constavam os registros do número de folhas totais inicialmente em cada ramo. Os ramos foram marcados abrangendo toda a planta, sendo dois na região apical, dois intermediários e dois na base da muda (Figura 3 A).

A incidência da doença foi calculada pela razão entre o número de folhas com sintomas de TLD e o número de folhas totais em cada um dos seis ramos marcados. A severidade foi determinada com auxílio de escala de notas proposta por Passador et al. (2013) (Figura 3. B). O índice de desfolha (ID%) foi calculado pela diferença entre o número inicial total de folhas (NT) nos ramos e o número de folhas remanescentes (NR) (que não caíram), aos 50 dias após a inoculação das plantas, conforme a fórmula a seguir:

$$\text{ID\%} = \text{NR} * 100 / \text{NT}, \text{ em que:}$$

ID%: Índice de Desfolha;

NR: Número de folhas remanescentes;

NT: Número Total de Folhas

Devido à possibilidade de as mudas portarem infecções ainda latentes de TDL ou de outras doenças que provocam sintomas similares à doença, uma folha contendo lesão foi coletada em cada um dos seis ramos marcados nas plantas inoculadas. As folhas que apresentaram sintomas da doença foram analisadas no Lab. de Patologia Florestal (UFV), para confirmação da espécie do patógeno, mediante reisolamento em cultura-pura e pelo exame de lâminas das estruturas reprodutivas (sinais) ao microscópio de luz. As culturas-puras obtidas foram submetidas a análise molecular via PCR, utilizando-se a mesma metodologia e primers descritos anteriormente.



Figura 2. Imagens do processo de inoculação de *T. nubilosa* em mudas de eucalipto e das câmaras utilizadas. A) Mudanças de eucalipto utilizadas no ensaio; B) Disposição das mudas dentro das câmaras de inoculação; C) Vista superior da câmara com as folhas doentes (fontes de inóculo); D) Umidificador de ar utilizado para manutenção da umidade; E) Plantas no interior das câmaras, sob nebulização. F) Câmaras de inoculação cobertas com filme plástico.

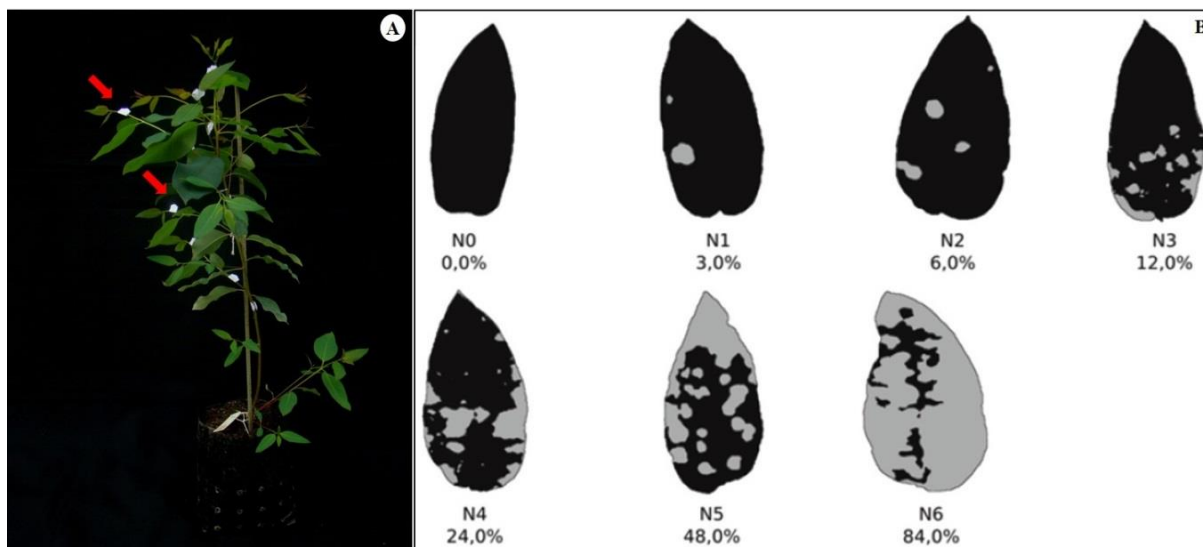


Figura 3. A) Muda de eucalipto com os seis ramos marcados e enumerados para avaliação da incidência, severidade e desfolha causada pela doença. B) Escala de notas utilizada para determinação da severidade incitada por *T. nubilosa*, conforme Passador et al. (2013).

4.4. Resistência de *Eucalyptus* spp. a *Teratosphaeria nubilosa*

Avaliou-se a resistência de mudas de espécies seminais de *Eucalyptus* spp., conforme método de inoculação selecionado nos ensaios precedentes, dispondo-se as folhas (fonte de inóculo) na parte superior das câmaras (sobre as mudas) e no piso, ao redor dos vasos (sob as mudas), no interior das câmaras de inoculação. Para tanto, foram avaliadas progênies intraespecíficas de *E. pilularis*, *E. brassiana*, *E. dunnii*, *E. tereticornis*, *E. grandis* (Atherton), *E. grandis* (Coffs Harbour), *E. saligna*, *E. urophylla*, *E. torelliana*, *E. siderophloia*, *E. citriodora*, *E. camaldulensis*, *E. punctata*. Essas espécies foram escolhidas em virtude de sua importância silvicultural no Brasil e pela disponibilidade de sementes. Foram inoculadas 10 mudas de cada procedência ou espécie, totalizando 130 plantas. O clone 373 (*E. globulus*) foi incluído como comparador suscetível. As mudas seminais foram produzidas em tubetes, contendo substrato Carolina Soil® (Sphagnum 70%, palha de arroz torrefada 20%, perlita 10%) e enriquecido com superfosfato ($6,0 \text{ Kg m}^{-3}$) e Osmocote® (19:06:10 em $1,5 \text{ Kg m}^{-3}$). Após germinação das sementes, realizou-se o desbaste das mudas excedentes, mantendo apenas a muda mais vigorosa em cada recipiente (tubete). Aos 60 dias após o semeio, as mudas foram transplantadas para sacolas com capacidade de

2L, contendo o mesmo substrato e foram fertilizadas quinzenalmente irrigando-se solução NPK (05: 10: 30) a 6 g.L⁻¹). Aos 60 dias após o transplante, as mudas foram submetidas à inoculação, conforme descrito.

O experimento foi montado em delineamento inteiramente casualizado, com duas unidades experimentais (parcelas), cada uma constituída de cinco mudas de cada procedência ou espécie avaliada. Para tanto, foram ocupadas duas câmaras de inoculação, contendo 75 mudas cada uma, distribuídas em linhas de cinco plantas. Após a inoculação e incubação em câmara úmida por 72 h, as plantas foram transferidas para casa de vegetação, sendo as condições de temperatura e umidade monitoradas, como descrito no ensaio anterior.

4.5 Análises estatísticas

No estudo da ejeção de esporos sob diferentes temperaturas e ao longo do tempo, efetuou-se análise de variância (ANOVA) e análise de regressão linear do número de ascósporos ejetados ao longo do tempo. Os modelos de regressão foram selecionados com base no coeficiente de determinação na distribuição dos resíduos.

Nos experimentos de inoculação, as variáveis de incidência, severidade e percentuais de desfolha foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e à testes de comparação de médias (Tukey ao nível de 5% de significância do erro). Em todas as análises estatísticas empregou-se o programa Estatístico Genes (Cruz, 2013).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Isolamento e identificação de *T. nubilosa*

Foram obtidos 39 isolados monoascospóricos, dos quais: 16 foram provenientes das amostras de folhas utilizadas como fonte de inóculo no primeiro ensaio de inoculação; 9 foram de folhas das mudas de *Eucalyptus* spp. inoculadas no primeiro ensaio; 8 das folhas utilizadas como fonte de inóculo no segundo ensaio de inoculação; 6 foram isolados das mudas inoculadas no segundo ensaio de inoculação (Tabela 2).

A morfologia das colônias dos isolados obtidos e cultivados em meio de cultura (MEA) foi como descrita para a espécie *T. nubilosa*. O crescimento dos isolados monospóricos se deu após 15 dias de incubação, cujas colônias apresentaram cerca de 1,0 cm de diâmetro, com coloração esbranquiçada e bordas irregulares. À medida que as culturas se desenvolveram o micélio adquiriu coloração verde pálida à acinzentada na periferia da cultura (Figura 5: D, E e F). Teodoro et al. (2012), em estudo de espécies de *Teratosphaeria* e *Micosphaerella* associadas à mancha e desfolha em *E. globulus* no sul do Brasil, observaram o mesmo padrão de crescimento e coloração das culturas de *T. nubilosa* no meio MEA, bem como colônias semelhantes foram produzidas noutros meios de cultura testados para induzir a esporulação do fungo.

Adicionalmente, observações das preparações microscópicas feitas a partir das folhas inoculadas e com sintomas, confirmaram a presença de estruturas reprodutivas características de *T. nubilosa*. Ainda, amostras de esporos

ejetados apresentaram germinação bipolar dos ascósporos, como descrito para esta espécie (Figura 5 C) (Passador, 2011).

Os primers (MN1F/MN1R) específicos para *T. nubilosa* possibilitaram a amplificação de fragmentos de DNA de aproximadamente 400 pb, para todos os isolados obtidos (Figura 4), o que, segundo Teodoro et al. (2012), é característica diagnóstica de *T. nubilosa*. Teodoro et al. (2012), em trabalho de identificação de espécies de *Teratosphaeria* spp. e *Mycosphaerella* spp. ocorrendo em *E. globulus* na região Sul do Brasil, identificou de um total de 15 isolados, 9 da espécie *T. nubilosa* utilizando o par de primers MN1F (5'- gcgccagccccgacctcc-3') e MN1R (5'- ggtccccgtcagcgaaacagt-3'), desenvolvidos por Maxwell et al., (2005).

Tabela 2. Isolados de *T. nubilosa* obtidos a partir de folhas com sintomas de TDL*, utilizadas como fonte de inóculo em experimentos de inoculação, bem como de mudas doentes, que foram previamente inoculadas com esporos ejetados do mesmo material.

Isolado	Identificação	Hospedeiro	Empresa	Local de coleta	Coletor
PFO1	<i>T. nubilosa</i>	<i>E. globulus</i>	CMPC	Rio Grande do Sul	Norton Borges
PF02	<i>T. nubilosa</i>	<i>E. globulus</i>	CMPC	Rio Grande do Sul	Norton Borges
PF03	<i>T. nubilosa</i>	<i>E. globulus</i>	CMPC	Rio Grande do Sul	Norton Borges
PF04	<i>T. nubilosa</i>	<i>E. globulus</i>	CMPC	Rio Grande do Sul	Norton Borges
PF05	<i>T. nubilosa</i>	<i>E. globulus</i>	CMPC	Rio Grande do Sul	Norton Borges
PF06	<i>T. nubilosa</i>	<i>E. globulus</i>	CMPC	Rio Grande do Sul	Norton Borges
PF07	<i>T. nubilosa</i>	<i>E. globulus</i>	CMPC	Rio Grande do Sul	Norton Borges
PF08	<i>T. nubilosa</i>	<i>E. globulus</i>	CMPC	Rio Grande do Sul	Norton Borges
PF09	<i>T. nubilosa</i>	<i>E. globulus</i>	CMPC	Rio Grande do Sul	Norton Borges
PF10	<i>T. nubilosa</i>	<i>E. globulus</i>	CMPC	Rio Grande do Sul	Norton Borges
PF11	<i>T. nubilosa</i>	<i>E. globulus</i>	CMPC	Rio Grande do Sul	Norton Borges
PF12	<i>T. nubilosa</i>	<i>E. globulus</i>	CMPC	Rio Grande do Sul	Norton Borges
PF13	<i>T. nubilosa</i>	<i>E. globulus</i>	CMPC	Rio Grande do Sul	Norton Borges
PF14	<i>T. nubilosa</i>	<i>E. globulus</i>	CMPC	Rio Grande do Sul	Norton Borges

Tabela 2. Cont.

Isolado	Identificação	Hospedeiro	Empresa	Local de coleta	Coletor
PF15	<i>T. nubilosa</i>	<i>E. globulus</i>	CMPC	Rio Grande do Sul	Norton Borges
PF16	<i>T. nubilosa</i>	<i>E. globulus</i>	CMPC	Rio Grande do Sul	Norton Borges
PF17	<i>T. nubilosa</i>	<i>E. nitens x E. globulus</i> (C1)	CMPC	Rio Grande do Sul	Norton Borges
PF18	<i>T. nubilosa</i>	<i>E. nitens x E. globulus</i> (C1)	CMPC	Rio Grande do Sul	Norton Borges
PF19	<i>T. nubilosa</i>	<i>E. nitens x E. globulus</i> (C1)	CMPC	Rio Grande do Sul	Norton Borges
PF20	<i>T. nubilosa</i>	<i>E. nitens x E. globulus</i> (C1)	CMPC	Rio Grande do Sul	Norton Borges
PF21	<i>T. nubilosa</i>	<i>E. nitens x E. globulus</i> (C2)	CMPC	Rio Grande do Sul	Norton Borges
PF22	<i>T. nubilosa</i>	<i>E. globulus</i> (373)	CMPC	Rio Grande do Sul	Norton Borges
PF23	<i>T. nubilosa</i>	<i>E. globulus</i> (373)	CMPC	Rio Grande do Sul	Norton Borges
PF24	<i>T. nubilosa</i>	<i>E. globulus</i> (354)	CMPC	Rio Grande do Sul	Norton Borges
PF25	<i>T. nubilosa</i>	<i>E. globulus</i> (354)	CMPC	Rio Grande do Sul	Norton Borges
PF26	<i>T. nubilosa</i>	<i>E. globulus</i>	CMPC	Rio Grande do Sul	Norton Borges
PF27	<i>T. nubilosa</i>	<i>E. globulus</i>	CMPC	Rio Grande do Sul	Norton Borges
PF28	<i>T. nubilosa</i>	<i>E. globulus</i>	CMPC	Rio Grande do Sul	Norton Borges
PF29	<i>T. nubilosa</i>	<i>E. globulus</i>	CMPC	Rio Grande do Sul	Norton Borges
PF30	<i>T. nubilosa</i>	<i>E. globulus</i>	CMPC	Rio Grande do Sul	Norton Borges
PF31	<i>T. nubilosa</i>	<i>E. globulus</i>	CMPC	Rio Grande do Sul	Norton Borges
PF32	<i>T. nubilosa</i>	<i>E. globulus</i>	CMPC	Rio Grande do Sul	Norton Borges
PF33	<i>T. nubilosa</i>	<i>E. globulus</i>	CMPC	Rio Grande do Sul	Norton Borges
PF34	<i>T. nubilosa</i>	<i>E. globulus</i> (373)	CMPC	Rio Grande do Sul	Norton Borges
PF35	<i>T. nubilosa</i>	<i>E. globulus</i> (373)	CMPC	Rio Grande do Sul	Norton Borges
PF36	<i>T. nubilosa</i>	<i>E. globulus</i> (C3)	CMPC	Rio Grande do Sul	Norton Borges
PF37	<i>T. nubilosa</i>	<i>E. globulus</i> (373)	CMPC	Rio Grande do Sul	Norton Borges
PF38	<i>T. nubilosa</i>	<i>E. globulus</i> (354)	CMPC	Rio Grande do Sul	Norton Borges
PF39	<i>T. nubilosa</i>	<i>E. globulus</i> (354)	CMPC	Rio Grande do Sul	Norton Borges

* Coletas feitas em plantios de *Eucalyptus* spp. da Empresa CMPC Celulose Riograndense no Estado do Rio Grande do Sul.

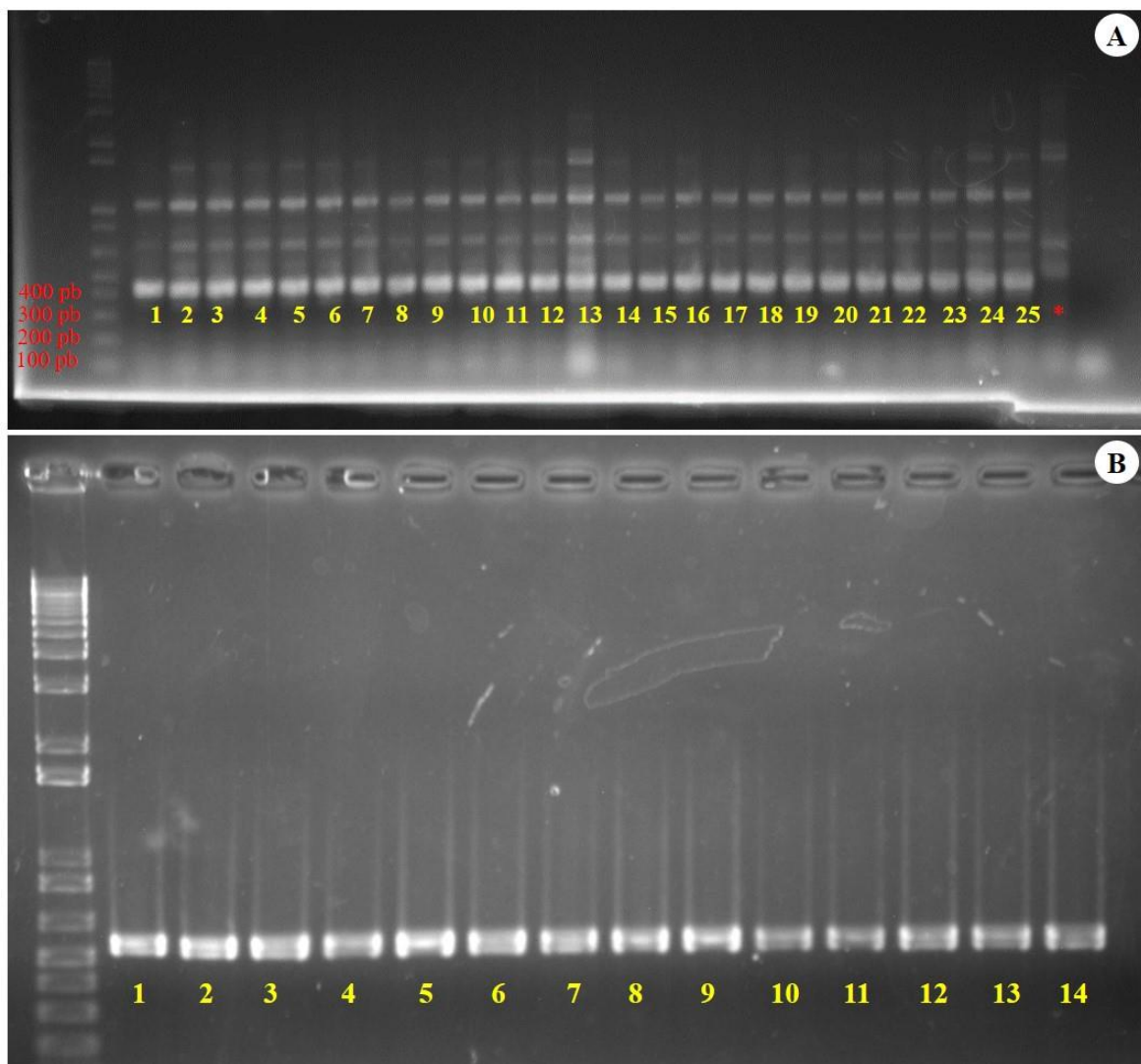


Figura 4. Géis de agarose com DNA amplificado via PCR utilizando primers específicos para identificação de *T. nubilosa*, evidenciando fragmentos de 400 pb nas amostras de folhas contendo lesões de TLD coletadas nos dois ensaios de inoculação. A) Gel com amostras do DNA amplificado de 25 isolados obtidos no primeiro ensaio de inoculação: 1-16 (isolados obtidos da fonte de inóculo), 17-25 (isolados obtidos das mudas inoculadas); B) Idem A, com amostras de 14 isolados obtidos do segundo ensaio de inoculação, sendo: 1-8 (isolados da fonte de inóculo) e 9-14 (isolados das mudas inoculadas). *Comparador negativo (*Kirramyces epicoccoides*).

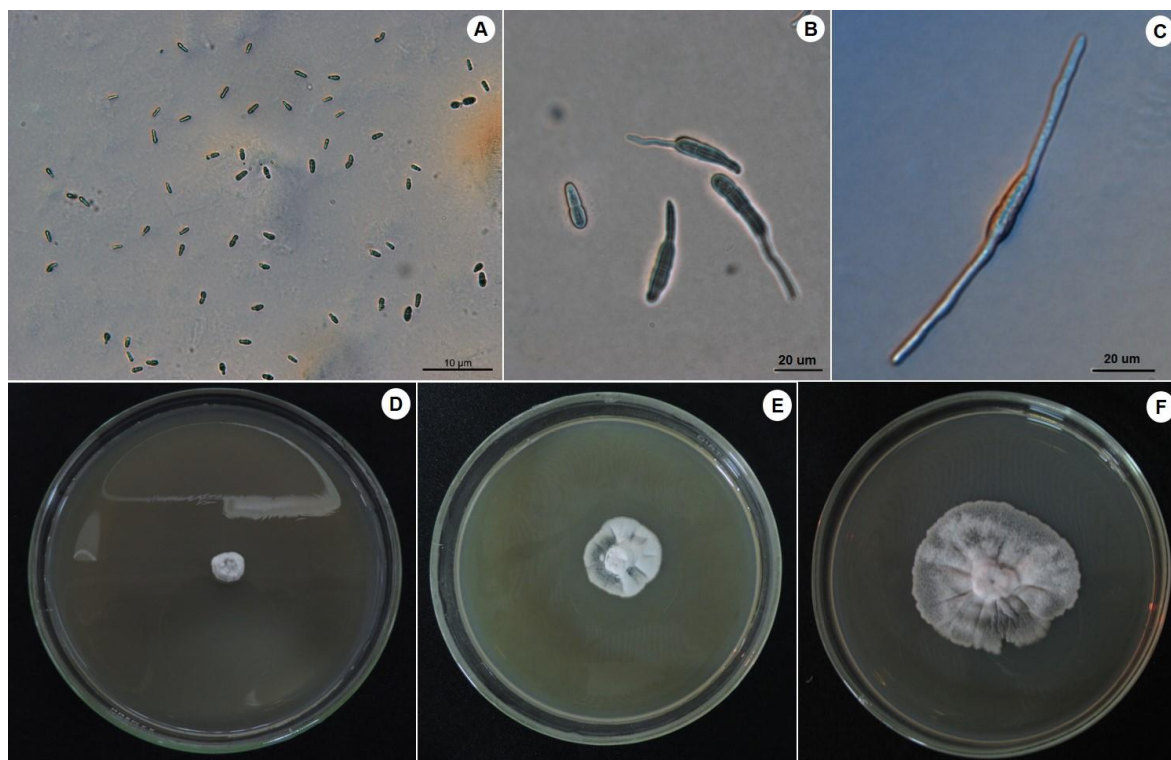


Figura 5. Ascósporos de *Teratosphaeria nubilosa* ejetados em meio de ágar-água e colônias em meio MEA. A: Ascósporos ejetados; B: Ascósporos em início de germinação; C: Ascósporo apresentando germinação bipolar; D-F: Colônias de *T. nubilosa* em meio MEA, aos 30, 45 e 70 dias de incubação, respectivamente, incubadas a 24°C com fotoperíodo de 12 horas.

Os resultados das análises morfológicas e moleculares sugerem que todos os isolados obtidos, originários das coletas de folhas em plantios de eucalipto do Estado do Rio Grande do Sul, são da mesma espécie, *T. nubilosa*; e corroboram o trabalho de Teodoro et al (2012), cujo levantamento aponta *T. nubilosa* como a espécie predominante, causando TLD em *E. globulus* no sul do Brasil.

Outra espécie de *Teratosphaeria* relatada em *E. globulus* no Sul do Brasil é *Teratosphaeria pseudoecalypti* (Cândido et al., 2014). *T. pseudoecalypti* tem sido considerado um patógeno importante na Austrália, onde se relatam surtos da doença com impactos crescentes a cada ano (Andjic et al. 2010a). A identificação desta espécie no Brasil e seus danos crescentes na Austrália, coloca em prova o risco da disseminação de doenças incidentes no Brasil para outros países sulamericanos, como Uruguai, Chile, Colômbia, Equador e Peru (Poots et al., 2004).

Além disso o extenso plantio monoclonal no Brasil e em outros países da América do Sul, fazem com que os riscos de perdas por doenças cresçam consideravelmente.

Embora *T. nubilosa* possa ser a espécie mais abundante causando TLD em *Eucalyptus* spp. no Sul do Brasil, a identificação de mais uma espécie potencialmente danosa à eucaliptocultura, remete à importância de novos estudos de *Teratosphaeria* spp em *Eucalyptus* spp. no Brasil, visando embasar o melhoramento para resistência a TDL no país.

5.2 Ejeção de ascósporos de *Teratosphaeria nubilosa* sob diferentes temperaturas e ao longo do tempo

Houve interação significativa ($p < 0,01$) para temperatura e tempo de incubação, no número de ascósporos ejetados. Maior quantidade de ascósporos foi ejetada incubando-se a 25° C por 24 h. Pela análise de regressão, a temperatura ótima estimada para liberação de ascósporos de *T. nubilosa* foi de aproximadamente 24 °C, sob umidade relativa próxima a 100% (Figura 6).

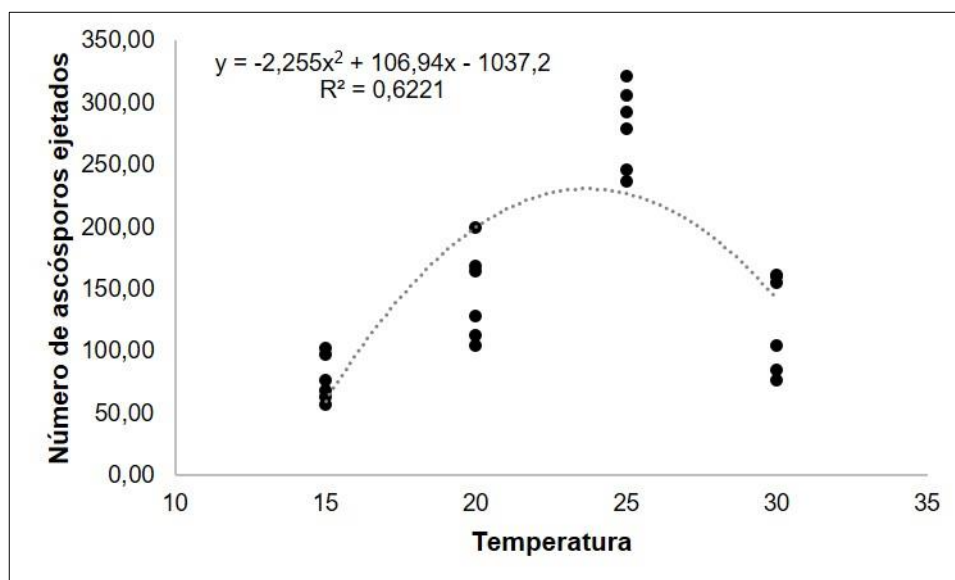


Figura 6. Número de ascósporos de *Teratosphaeria nubilosa* ejetados, em diferentes temperaturas, 24 horas após a inoculação.

A análise de variância mostrou efeito altamente significativo ($p < 0,01$) para o número de ascósporos ejetados ao longo do tempo após incubação. O número de ascósporos ejetados foi significativamente maior nas primeiras 3 horas de incubação e decresceu assintoticamente até atingir zero após 22-23 h em câmara úmida, conforme ajuste do modelo raiz quadrada ($R^2 = 95\%$) (Figura 7 A). Todavia, independentemente do ajuste do modelo, observou-se ainda algum acréscimo no número de esporos ejetados até a avaliação feita às 24 h de incubação das folhas em câmara-úmida. Ou seja, a soma ou acúmulo do número de esporos ejetados ao longo do tempo teve incrementos até 24h de incubação das folhas doentes em câmara úmida (Figura 7 B). Assim, nas inoculações sob condições controladas utilizando folhas com doentes como fonte de inóculo, estas deverão ser mantidas nas câmaras de inoculação por pelo menos 24 horas, tempo este suficiente para se garantir o máximo aproveitamento do inóculo coletado.

Resultados semelhantes a estes foram observados na Austrália, por Park e Keane (1982b) com folhas de *E. globulus* infectadas por *T. nubilosa* e mantidas em câmara úmida sob condições controladas. Os autores encontraram uma temperatura ótima de 25°C para ejeção de ascósporos e não observaram ejeção sob umidade relativa do ar inferior a 90%. Todavia, no campo, os mesmos autores registraram maior número de esporos ejetados na faixa de temperatura entre 5 e 15° C, sob clima úmido.

Park e Keane (1982b) também demonstraram que *T. nubilosa* necessita de no mínimo 24 h para penetrar e infectar folhas molhadas de *E. globulus*. Portanto, considerando que o acúmulo de ascosporos ejetados é máximo as 24 horas de incubação, o tempo total de 48 h de incubação em câmara úmida seria suficiente para propiciar ótima eficiência de inoculação, bem como de infecção, pela metodologia testada no presente trabalho.

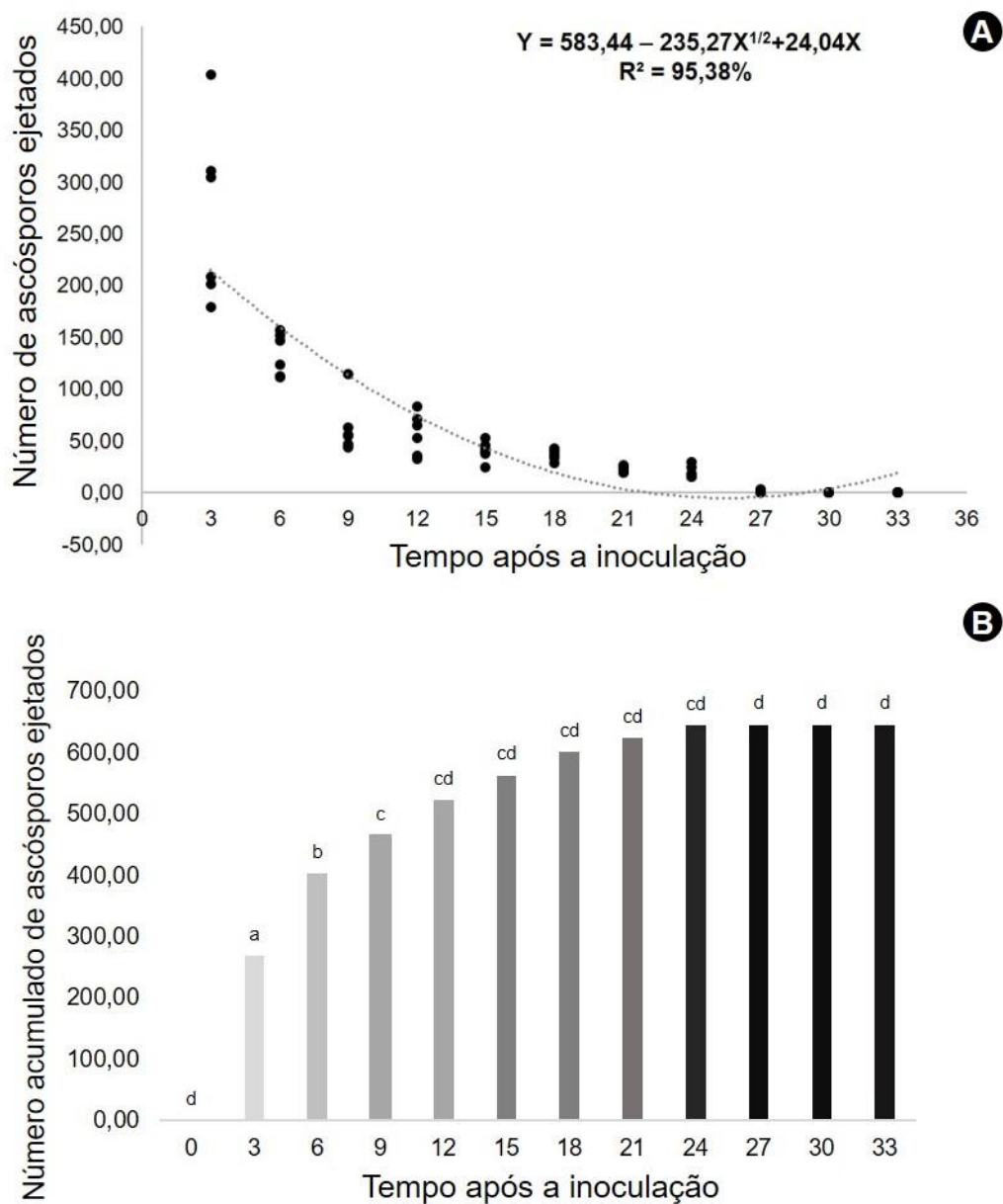


Figura 7. A) Declínio no tempo do número de ascósporos de *Teratosphaeria nubilosa* ejetados em ágar, após incubação de folhas doentes de *E. globulus* em câmara-úmida (100% UR), a 25°C; B) Acúmulo do número de ascósporos de *Teratosphaeria nubilosa* ejetados de folhas doentes de *E. globulus* e, incubadas em câmara úmida (100% UR), a 25°C.

5.3 Avaliação do método de inoculação e reação de mudas clonais de *Eucalyptus spp.* à *T. nubilosa*

As condições de inoculação e de incubação testadas nos dois ensaios foram adequadas à infecção e a expressão dos sintomas da TDL nas mudas de *Eucalyptus spp.* inoculadas. Nos dois ensaios conduzidos com mudas clonais, houve desenvolvimento de sintomas severos de manchas foliares e de desfolha nos genótipos suscetíveis.

Os primeiros sintomas após a inoculação foram observados a partir da quarta semana e se caracterizavam por lesões de coloração verde-amarelada e margens levemente arroxeadas. Após cerca de seis semanas, as manchas adquiriram cor palha (Figura 8 A e B), conforme quadro sintomatológico descrito para TDL em folhas de eucalipto (Alfenas et al., 2009).

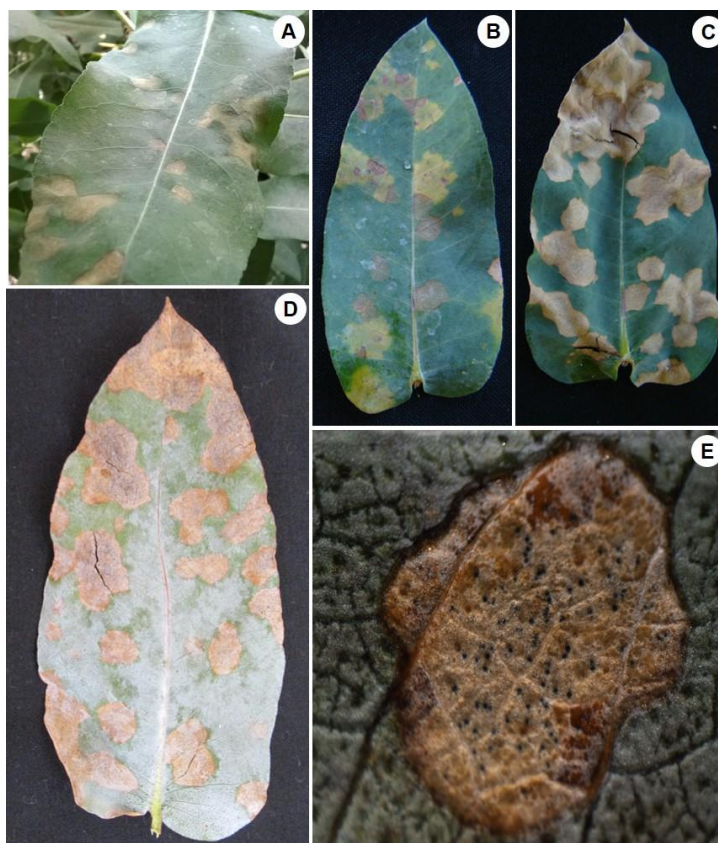


Figura 8. Lesões provocadas por *Teratosphaeria nubilosa* em folhas *Eucalyptus globulus* inoculadas. A e B: após quatro semanas da inoculação; C: nove semanas após inoculação; D e E: 12 semanas após inoculação.

A formação dos pseudotécios (Figura 9 C) foi observada por volta da nona semana, ou seja, pouco mais de dois meses após a inoculação, indicando longo período de incubação da doença, conforme já observado anteriormente por Passador (2011). Cerca de 12 a 14 semanas após a inoculação, foi visualizada grande quantidade de pseudotécios nas manchas presentes nas folhas (Figura 9 D e E). Passador (2011), em mudas de *E. globulus* inoculadas com *T. nubilosa*, a partir de amostras de folhas de *E. globulus* coletadas no Sul e Sudeste do Brasil, observou início de aparecimento de lesões entre 3-4 semanas após inoculação e formação de pseudotécios a partir da oitava semana. Os resultados obtidos também estão de acordo com Park e Keane (1987), que realizaram inoculações em condições controladas com *T. nubilosa* e *T. cryptica*, cujo inóculo utilizado foi da ejeção direta a partir de folhas coletadas em plantios de *E. globulus* na Austrália. Os autores observaram a formação dos ascomas cerca de quatro a oito semanas após o aparecimento dos primeiros sintomas e a maturação dos pseudotécios, contendo as ascas e ascósporos, a partir de 12 semanas após a inoculação, para ambas as espécies.

Cogita-se a possibilidade de terem ocorrido novas infecções após remoção das mudas das câmaras úmidas, pois observou-se o aparecimento de novas lesões até as últimas avaliações. Passador (2011) verificou em cortes histológicos de folhas de mudas transferidas para casa de vegetação após a inoculação, que haviam nestas folhas ascomas e ascos remanescentes em vários estádios de desenvolvimento, o que levou ao desenvolvimento da doença mesmo após a incubação controlada, mas em condições sub-ótimas para infecção.

O surgimento de doença, mesmo em condições sub-ótimas, deve-se à resistência dos ascósporos em baixas condições de umidade. Esporos de *T. nubilosa* e *T. cryptica* podem resistir por até quatro dias sobre a folha seca. Ascósporos liberados por uma chuva leve diurna, mesmo que passageira, sobrevivem e germinam no período noturno, momento no qual perdura molhamento foliar no campo (Park, 1988; Park e Keane, 1982).

Todos as três posições das fontes de inóculo testadas resultaram na ocorrência de sintomas da TDL nas mudas de eucalipto. No entanto, as médias de incidência, severidade e desfolha variaram com o tratamento aplicado e com o clone ou genótipo do hospedeiro (Figuras 9 e 10; Tabelas 3 e 4).

A análise da variância mostrou efeito significativo ($p < 0,01$) da disposição da fonte de inóculo nas câmaras, do genótipo e da interação tratamento x genótipo sobre a incidência, a severidade e a desfolha incitada por *T. nubilosa*, nos dois ensaios de inoculação.

No primeiro ensaio de inoculação, o coeficiente de variação (CV%) foi de 19; 44,5 e 39% para incidência, severidade e desfolha, respectivamente. No segundo ensaio, o CV foi de 53,4; 61,9 e 50% para incidência, severidade e desfolha, respectivamente. Embora os valores do coeficiente de variação para as variáveis tenham sido elevados, o teste mostrou alta significância. Além disso, a variação entre o número de folhas presentes nos seis ramos marcados das mudas variou entre as repetições, o que contribuiu para o aumento do coeficiente de variação.

Nos dois ensaios de inoculação, em geral, o tratamento com folhas dispostas sobre e sob as mudas nas câmaras de inoculação apresentou valores superiores e mais regulares de incidência, de severidade e de desfolha, para os clones suscetíveis. Para os genótipos resistentes, em geral, estes índices foram baixos.

A maior quantidade de doença no tratamento 2 (folhas doentes em cima e abaixo das mudas) pode ser atribuída à posição das folhas ter favorecido a ejeção de esporos em ambas superfícies foliares (abaxial e adaxial), favorecendo a infecção na face abaxial, devido a maior quantidade de estômatos, e, na face adaxial, pela maior deposição de inóculo.

O tratamento 3 (folhas sobre o piso e ao redor das mudas) também resultou em índices satisfatórios de doença e desfolha, especialmente nas mudas de *E. globulus*, vez que nesta espécie a maioria dos estômatos localizam-se abaxialmente nas folhas jovens (Park, 1988).

No primeiro ensaio, o tratamento 2 (folhas sobre e sob as mudas) foi o que apresentou maior incidência, severidade e desfolha, na maioria dos genótipos avaliados, seguido pelo tratamento 3 (folhas sob as mudas), e pelo tratamento 1 (folhas sobre as mudas). Independente da disposição das fontes de inóculo, os clones C1 e C2, ambos híbridos de *E. nitens* x *E. globulus* foram os que apresentaram maiores valores de incidência, de severidade e de desfolha por *T. nubilosa* (Tabela 3). Para desfolha, não houve diferença estatística entre os

tratamentos 2 e 3, para o clone C1. Já para o clone C2, essa diferença não foi observada para as variáveis incidência e desfolha (Tabela 3).

Para os clones 373 e 354, ambos de *E. globulus*, houve diferença estatística ($p < 0,05$) entre os tratamentos 2 (fontes de inóculo abaixo e acima) e 3 (fontes de inóculo abaixo). Para o clone 373, esta diferença entre os tratamentos 2 e 3 foi significativa para as variáveis de incidência e severidade, somente. O clone 354, quando inoculado pelo método 2 (fontes de inóculo acima e abaixo das mudas), comportou-se como o mais suscetível, apresentando maiores valores para todas as variáveis analisadas, ou seja, foi o que mais desenvolveu sintomas da doença (Tabela 3).

Embora a intensidade da doença tenha sido menor no tratamento 1 (folhas sobre as mudas), ainda assim foi possível diferenciar os clones quanto a resistência a doença, sendo C1 e C2 os mais suscetíveis e os clones 373 e 354, os mais resistentes (Figura 9).

O clone 386 (*E. grandis* x *E. urophylla*) foi utilizado como comparador resistente pois não apresentando doença em nenhum dos tratamentos, comprovando a alta resistência desse híbrido à mancha e desfolha incitada por *T. nubilosa* (Figura 9).

O tratamento 4 (testemunha não inoculada) apresentou baixa porcentagem de incidência, severidade e desfolha nos clones C1, C2, 373 e 354, o que não era esperado neste tratamento. Isso ocorreu devido às mudas dos clones C1 e C2 virem da empresa já infectadas pelo patógeno, com a doença pré-incubada. As mudas dos clones C1 e C2, usadas como hospedeiras, chegaram aparentemente saudáveis da empresa, porém uma semana antes da montagem do ensaio de inoculação começaram a apresentar sintomas de TLD. Possivelmente, as mudas infectadas supriram inóculo aos demais clones (373 e 354) do tratamento testemunha (não inoculado), pois tratam-se de clones suscetíveis ao patógeno. No entanto, comprovou-se que a inoculação sob condições controladas foi efetiva, pois as médias de incidência, de severidade e de desfolha foram significativamente maiores quando as mudas foram inoculadas.

O aparecimento de doença nos clones vindos da empresa no primeiro ensaio de inoculação remete à importância da resistência genética no controle da doença no campo, vez que mudas aparentemente saudáveis de clones suscetíveis e

de *E. globulus* podem ser plantadas já contaminadas, condicionando o desenvolvimento de epidemias severas, a partir do transplante.

Tabela 3. Incidência (%), Severidade (%) e Desfolha (%) incitada por *T. nubilosa* em clones de *Eucalyptus* spp. no primeiro ensaio de inoculação

INCIDÊNCIA					
CLONES					
TRATAMENTO	1 - <i>E. nitens</i> x <i>E. globulus</i> (C1)	2 - <i>E. nitens</i> x <i>E. globulus</i> (C2)	3 - <i>E. globulus</i> (373)	4 - <i>E. globulus</i> (354)	5 - <i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i> (386)
1 - Folhas sobre as mudas	69,73 Ca	65,21 Ba	19,35 Bb	13,52 Bb	0,00 Ac
2 - Folhas sobre e sob as mudas	94,27 Aa	85,86 Aa	34,66 Ab	35,77 Ab	0,00 Ac
3 - Folhas sob as mudas	85,98 Ba	81,06 Aa	22,52 Bb	21,18 Bb	0,00 Ac
4 - Testemunha (não inoculada)	6,43 Dab	8,4 Ca	0,5 Cab	0,23 Cab	0,00 Ab

SEVERIDADE					
CLONES					
TRATAMENTO	1 - <i>E. nitens</i> x <i>E. globulus</i> (C1)	2 - <i>E. nitens</i> x <i>E. globulus</i> (C2)	3 - <i>E. globulus</i> (373)	4 - <i>E. globulus</i> (354)	5 - <i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i> (386)
1 - Folhas sobre as mudas	17,4 Ba	17,16 Ca	7,98 Bb	7,50 BCb	0,00 Ac
2 - Folhas sobre e sob as mudas	34,52 Aa	37,59 Aa	18,35 Ab	17,67 Ab	0,00 Ac
3 - Folhas sob as mudas	21,99 Ba	25,39 Ba	10,62 Bb	9,80 Bb	0,00 Ac
4 - Testemunha (não inoculada)	4,24 Ca	3,22 Da	0,71 Ca	2,38 Ca	0,00 Aa

DESFOLHA					
CLONES					
TRATAMENTO	1 - <i>E. nitens</i> x <i>E. globulus</i> (C1)	2 - <i>E. nitens</i> x <i>E. globulus</i> (C2)	3 - <i>E. globulus</i> (373)	4 - <i>E. globulus</i> (354)	5 - <i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i> (386)
1 - Folhas sobre as mudas	20,45 Ba	20,86 Ba	9,11 Bb	9,84 Bb	0,00 Ac
2 - Folhas sobre e sob as mudas	30,86 Ab	41,49 Aa	19,33 Ac	23,93 Abc	0,00 Ad
3 - Folhas sob as mudas	31,58 Aa	37,39 Aa	15,26 Abb	15,89 Bb	0,00 Ac
4 - Testemunha (não inoculada)	3,77 Ca	2,98 Ca	1,60 Ca	1,32 Ca	0,00 Aa

Médias seguidas de mesmas letras (maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas) não diferem entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

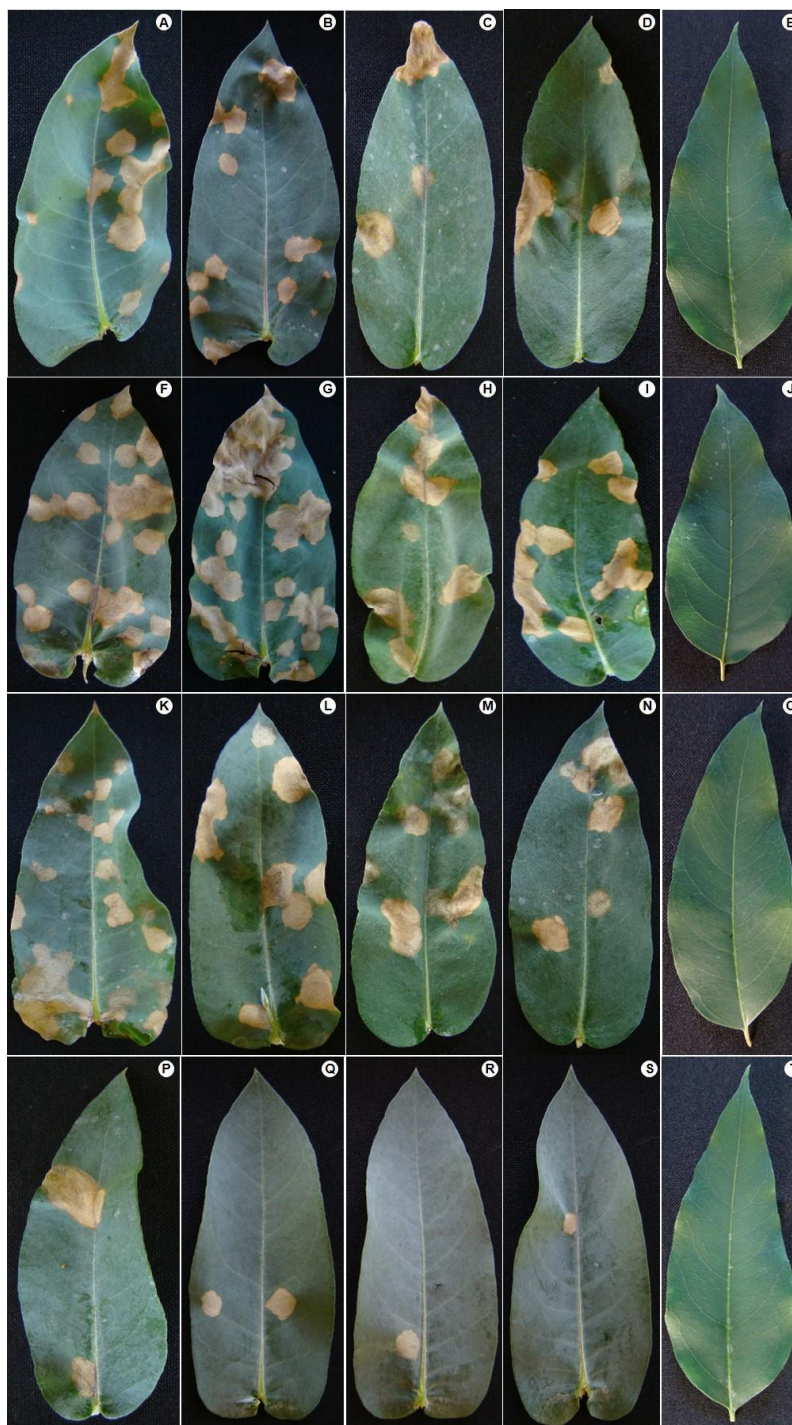


Figura 9. Severidade de *Teratosphaeria nubilosa* em clones de *Eucalyptus* spp., testados no primeiro ensaio de inoculação. A sequência de fotos na horizontal demonstra os clones: C1, C2, 373, 354 e 386, respectivamente. A- E: Tratamento 1 (fontes de inóculo acima das mudas); F-J: Tratamento 2 (fontes de inóculo acima e abaixo das mudas); K-O: Tratamento 3 (fontes de inóculo somente abaixo das mudas); P-T: Tratamento 4 (Testemunha não inoculada).

No segundo ensaio, os resultados foram similares ao primeiro ensaio. O tratamento 2 (folhas sobre e sob as mudas) também apresentou maiores valores

de incidência, severidade e desfolha, para a maioria dos genótipos avaliados, seguido pelo tratamento 3 (folhas sob as mudas) e do tratamento 1 (folhas sobre as mudas). Os clones 373 e 354, ambos híbridos de *E. globulus* foram os que apresentaram maiores valores de incidência severidade e desfolha causada por *T. nubilosa* (Tabela 4). Para o clone 354, não houve diferença estatística na severidade e desfolha entre os tratamentos 2 e 3. O clone C3, híbrido de *E. globulus* x *E. urophylla* apresentou maiores valores de incidência e severidade no tratamento 2. Já para desfolha, não houve diferença estatística dos três métodos de disposição das folhas com relação à testemunha, pois a desfolha foi mínima (Figura 10).

O híbrido de *E. globulus* x *E. urophylla* destacou-se pelos baixos valores de severidade e incidência da TDL, podendo ser considerado com resistência parcial a *T. nubilosa*. A utilização de híbridos interespecíficos, envolvendo a espécie *E. globulus* (suscetível) com outras espécies resistentes constitui ótima alternativa para o controle genético da TDL. A exemplo, como averiguado neste e em outros trabalhos, podem ser citados híbridos de *E. globulus*, com *E. urophylla* e *E. grandis*, muitos dos quais já são plantados no Brasil (Carnegie e Ades, 2002; Carnegie et al., 1998; Milgate et al., 2005).

Embora a incidência, severidade e desfolha tenha sido menor no tratamento 1 (folhas sobre as mudas), o padrão de resistência e suscetibilidade dos clones foi semelhante aos demais tratamentos, sendo os clones 373 e 354 os mais suscetíveis. O clone 386 (*E. grandis* x *E. urophylla*) foi utilizado como comparador resistente, não apresentando doença em nenhum dos tratamentos, comprovando a alta resistência desse híbrido à mancha e desfolha incitada por *T. nubilosa*. O clone C5 (*E. dunnii*) apresentou incidência de 2,11 % e severidade de 0,30 % apenas no tratamento 2, não apresentando a doença em nenhum dos demais tratamentos, dessa forma considerado com resistência intermediária a doença. O clone C4 (*E. benthamii*) foi altamente resistente a *T. nubilosa*, sendo, portanto, uma possível fonte de resistência para cruzamentos com *E. globulus* em programas de melhoramento, voltados para a transferência desta característica.

No segundo experimento, as plantas não-inoculadas, que não foram expostas as fontes de inóculo (tratamento 4) não apresentaram sintomas da doença em nenhum dos clones avaliados, o que demonstra a sanidade das mudas utilizadas no segundo experimento de inoculação (Figura 10)

Tabela 4. Incidência (%), Severidade (%) e Desfolha (%) incitada por *T. nubilosa* em clones de *Eucalyptus* spp. no segundo ensaio de inoculação

INCIDÊNCIA						
CLONES						
TRATAMENTO	1 - <i>E. globulus</i> (373)	2 - <i>E. globulus</i> (354)	3 - <i>E. urophylla</i> x <i>E. globulus</i> (C3)	4 - <i>E. dunnii</i> (C5)	5 - <i>E. benthamii</i> (C4)	6 - <i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i> (386)
1 - Folhas sobre as mudas	33,55 Ca	18,43Cb	4,68 Cc	0,00 Ac	0,00 Ac	0,00 Ac
2 - Folhas sobre e sob as mudas	58,82 Aa	45,65 Bb	31,27 Ac	2,11 Ad	0,00 Ad	0,30 Ad
3 - Folhas sob as mudas	47,68 Ba	56,49 Aa	17,67 Bb	0,00 Ac	0,00 Ac	0,00 Ac
4 - Testemunha (não inoculada)	0,00 Da	0,00 Da	0,00 Ca	0,00 Aa	0,00 Aa	0,00 Aa

SEVERIDADE						
CLONES						
TRATAMENTO	1 - <i>E. globulus</i> (373)	2 - <i>E. globulus</i> (354)	3 - <i>E. urophylla</i> x <i>E. globulus</i> (C3)	4 - <i>E. dunnii</i> (C5)	5 - <i>E. benthamii</i> (C4)	6 - <i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i> (386)
1 - Folhas sobre as mudas	11,20 Ca	6,90 Bb	1,00 BCc	0,00 Ac	0,00 Ac	0,00 Ac
2 - Folhas sobre e sob as mudas	24,4 Aa	17,40 Ab	9,95 Ac	0,30 Ad	0,00 Ad	2,69 Ad
3 - Folhas sob as mudas	17,60 Ba	17,18 Aa	3,70 Bb	0,00 Ac	0,00 Ac	0,00 Ac
4 - Testemunha (não inoculada)	0,00 Da	0,00 Ca	0,00 Ca	0,00 Aa	0,00 Aa	0,00 Aa

DESFOLHA						
CLONES						
TRATAMENTO	1 - <i>E. globulus</i> (373)	2 - <i>E. globulus</i> (354)	3 - <i>E. urophylla</i> x <i>E. globulus</i> (C3)	4 - <i>E. dunnii</i> (C5)	5 - <i>E. benthamii</i> (C4)	6 - <i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i> (386)
1 - Folhas sobre as mudas	2,70 Ca	1,19 Ba	0,00 Aa	0,00 Aa	0,00 Aa	0,00 Aa
2 - Folhas sobre e sob as mudas	13,16 Aa	8,72 Ab	1,64 Ac	0,00 Ac	0,00 Ac	0,00 Ac
3 - Folhas sob as mudas	8,06 Ba	6,76 Aa	0,27 Ab	0,00 Ab	0,00 Ab	0,00 Ab
4 - Testemunha (não inoculada)	0,00 Ca	0,00 Ba	0,00 Aa	0,00 Aa	0,00 Aa	0,00 Aa

Médias seguidas de mesmas letras (maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas) não diferem entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

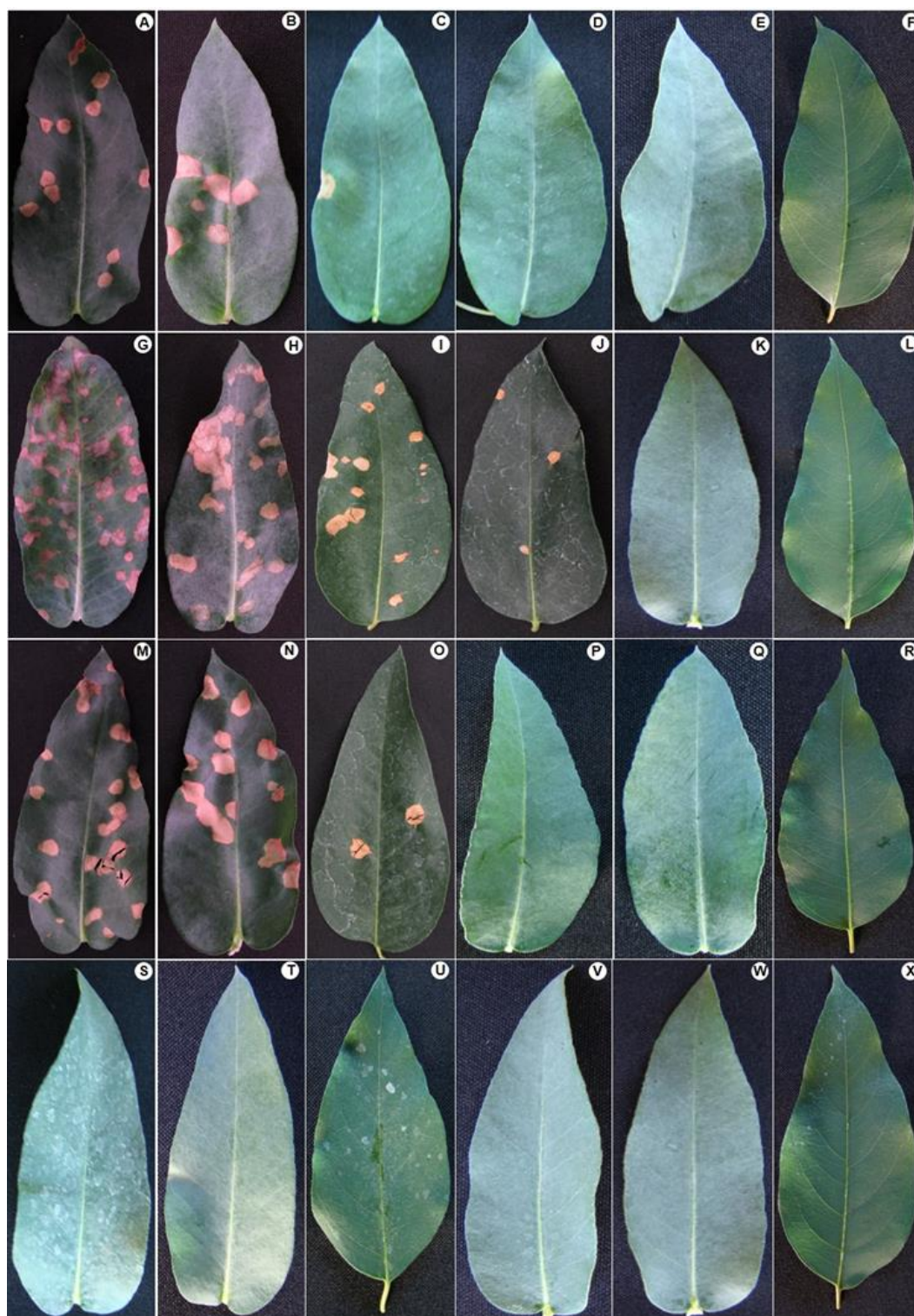


Figura 10. Severidade de *Teratosphaeria nubilosa* em clones de *Eucalyptus* spp., testados no segundo ensaio de inoculação. A sequência de fotos na horizontal demonstra os clones: 373, 354, C3, C5, C4 e 386, respectivamente. A-F: Tratamento 1 (fontes de inóculo acima das mudas); G-L: Tratamento 2 (fontes de inóculo acima e abaixo das mudas); M-R: Tratamento 3 (fontes de inóculo somente abaixo das mudas); S-X: Tratamento 4 (Testemunha não inoculada)

Nos dois ensaios de inoculação, os clones de *E. globulus*, bem como os híbridos de *E. globulus x E. nitens*, atingiram valores de severidade superior a 10% (Tabelas 3 e 4), o que, segundo Carnegie & Ades (2002), para *E. Globulus*, resulta em uma redução de incremento em altura e diâmetro das plantas.

O desenvolvimento da mancha foliar e a desfolha causada por *T. nubilosa* em *Eucalyptus* spp. foram influenciadas pelo genótipo do hospedeiro e pela forma de disposição das folhas fonte de inóculo sobre o hospedeiro. Embora o método de inoculação utilizado tenha algumas limitações, como não garantir a pureza genética do inóculo utilizado, nem tampouco fixar a densidade de esporos aplicados nas mudas, foi considerado satisfatório e prático para o estudo da resistência genética do eucalipto a TDL. Atenção deve ser dada a sanidade das mudas, antes da inoculação, bem com a temperatura das câmaras durante a inoculação, pois este é um fator que influencia a ejeção dos ascosporos e que deve afetar a eficiência do método de inoculação.

A severidade e a desfolha foram consideradas variáveis práticas de se avaliar e para discriminar os genótipos de *Eucalyptus* spp. quanto a resistência à TDL. A severidade foi proporcional a desfolha, ou seja, ramos com folhas com maior severidade, desfolharam mais.

5.4 Resistência de *Eucalyptus* spp. a *Teratosphaeria nubilosa*

Aos 30 dias após a inoculação, surgiram os primeiros sintomas de *T. nubilosa* nas folhas do clone suscetível e de algumas das espécies seminais avaliadas, caracterizadas por lesões de coloração verde-amarelada e margens levemente arroxeadas, que algumas semanas depois adquiriram cor palha.

Durante o período de casa de vegetação, as mudas do clone 373 foram infectadas por outro patógeno, identificado como *Pseudoplagiostoma eucalypti*, que levou a murcha, seguida de desfolha, principalmente nos ramos localizados do meio para o ápice das mudas (Figura 11). Embora outro patógeno tenha sido detectado, a avaliação da TLD não foi comprometida, uma vez manchas características de *T. nubilosa* foram visualizadas. Contudo, a desfolha nos clones foi precoce devido à segunda doença. Assim, para comparação dos genótipos neste ensaio, considerou-se apenas os valores de severidade, segundo escala proposta por Passador et al., (2013).

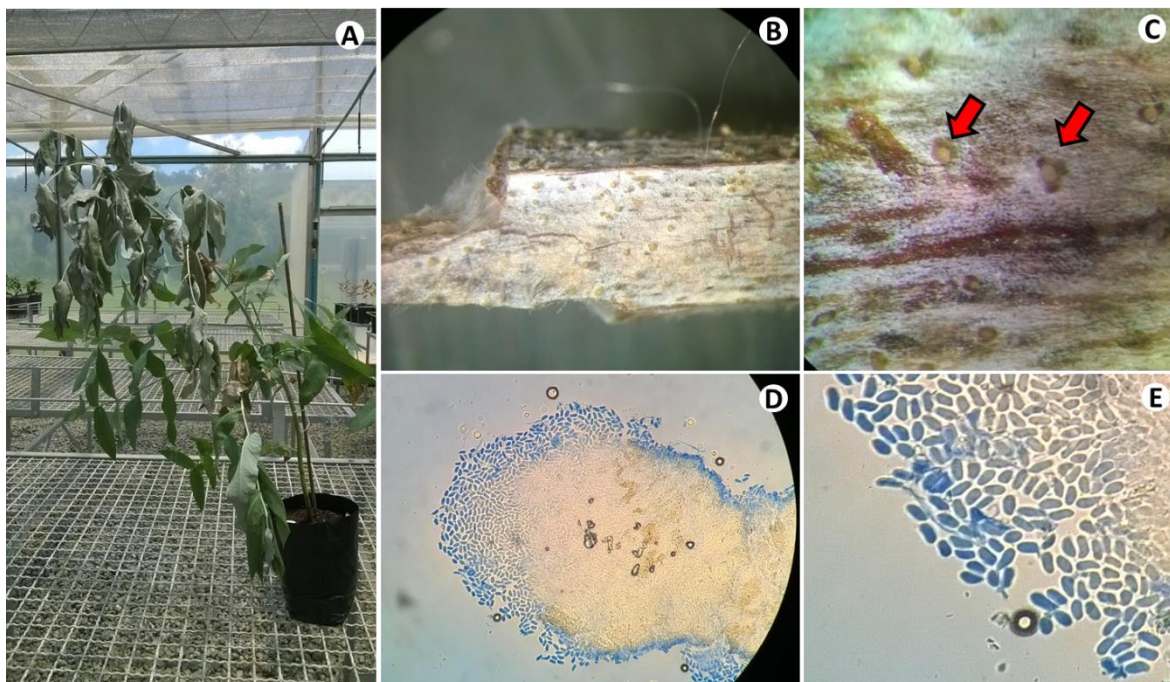


Figura 11. Sintomatologia de *Pseudoplagiostoma eucalypti* em *Eucalyptus* spp. A) Murcha intensa das mudas; B e C) Estruturas do fungo no coleto da muda; D e E) Esporos do fungo visualizados em microscópio estereoscópio de luz.

Houve diferença no nível de resistência inter e intra-específica (Tabela 4). Dentre as espécies, *E. dunnii* e *E. punctata* apresentaram plantas com sintomas de TDL induzida por *T. nubilosa*, com valores de 3 a 6% de área foliar lesionada. As demais espécies avaliadas foram consideradas imunes a *T. nubilosa*. O clone 373, comparador suscetível, apresentou 100% das plantas com valores de severidade variando de 12 e 24% (Tabela 5) (Figura 12).

Tabela 5. Número de plantas de *Eucalyptus* spp. resistentes e suscetível à Mancha de *Teratosphaeria*, baseada na escala de notas proposta por Passador et al., (2013)

Espécie	Rep.	Nº de plantas resistentes	Nº de plantas suscetíveis	Área foliar lesionada por planta
<i>E. pilularis</i>	10	10	0	0
<i>E. brassiana</i>	10	10	0	0
<i>E. dunnii</i>	10	6	4	3;3;6;6
<i>E. tereticornis</i>	10	10	0	0
<i>E. grandis</i> Harbour	10	10	0	0
<i>E. grandis</i> Coffs	10	10	0	0
<i>E. saligna</i>	10	10	0	0
<i>E. urophylla</i>	10	10	0	0
<i>E. torelliana</i>	10	10	0	0
<i>E. siderophloia</i>	10	10	0	0
<i>E. punctata</i>	10	7	3	3; 3; 6
<i>E. citriodora</i>	10	10	0	0
<i>E. camaldulensis</i>	10	10	0	0
<i>E. globulus</i>	10	0	10	12; 24 ;12 ;12 ;24 ;24 ;12 ;12 ;12 ;12



Figura 12. Plantas de *Eucalyptus* spp., suscetíveis a *Teratosphaeria nubilosa*. A: *E. globulus* (373); B e C: *E. punctata*; D e E: *E. dunnii*.

Dentre as estratégias de controle de doenças de eucalipto, o uso da resistência genética está entre as alternativas mais eficientes (Alfenas et al., 2009; Xavier et al., 2007). Portanto, a busca de novas fontes de resistência torna-se fundamental para nortear os programas de cruzamentos que visam a transferência da resistência genética (Mafia et al., 2011).

As procedências de *E. grandis* e de *E. urophylla* avaliadas apresentaram 100% das plantas resistentes a *T. nubilosa*. Esse resultado é muito importante do ponto de vista de controle da doença, já que *E. urophylla*, juntamente com *E. grandis*, são as principais espécies de eucalipto utilizadas no Brasil, tanto *per se* quanto como progenitoras de híbridos que após sofrerem seleção, são clonados e plantados em larga escala (Mafia et al. 2011). Dentre as medidas adotadas para evitar perdas por *T. Nubilosa*, a hibridação entre espécies de eucalipto é recomendada, como exemplo tem-se a hibridação entre *E. globulus* e *E. grandis*, que parece apresentar altos índices de resistência a danos foliares de *Teratosphaeria/Mycosphaerella* no Uruguai, mas ainda sem dados publicados (Hunter et al. 2009).

Das 13 progênies de eucalipto avaliadas, apenas *E. dunnii* e *E. punctata* apresentaram sintomas de TDL incitada por *T. nubilosa*, enquanto que as demais despontaram como fontes importantes de resistência, interessantes para programas de hibridação com a espécie *E. Globulus*. A variabilidade interespecífica e intraespecífica para resistência a TDL encontrada neste trabalho, também foi observada por outros autores, para outros patógenos, em estudo de espécies e procedências de *Eucalyptus* spp. (De Carvalho et al. 1998; Mafia et al. 2014; Mafia et al. 2011), o que permite a eucaliptocultura manter sua expansão e abrangência geográfica, desde que não se restrinja em demasia o número de genótipos cultivados e que se mantenha ampla a base genética nos programas de melhoramento florestal, incorporando-se as espécies e procedências resistentes as principais doenças desta cultura.

6. CONCLUSÕES

- Os métodos de inoculação e de avaliação da doença testados permitiram discriminar a reação dos materiais genéticos a TLD, sendo a inoculação via ejeção direta de ascósporos, dispondo-se as folhas infectadas sob e sobre o hospedeiro mantido em câmara úmida, o método mais recomendado;
- A temperatura é um importante fator a ser considerado na inoculação, pois afeta fortemente a ejeção dos esporos a partir das folhas doentes. A temperatura ótima para ejeção de ascósporos de *T. nubilosa* foi de 24°C, com pico de liberação às 3 h de incubação em câmara úmida, sob saturação de umidade do ar;
- A severidade e a desfolha foram consideradas variáveis práticas de se avaliar e para discriminar os genótipos de *Eucalyptus* spp. quanto a resistência à TDL. A severidade foi proporcional a desfolha, ou seja, ramos com folhas com maior severidade, desfolharam mais. Portanto, para uso rotineiro em trabalhos de melhoramento visando à seleção de materiais resistentes à TLD, deve-se levar em consideração a severidade e desfolha na classificação das espécies como resistentes ou suscetíveis à doença.
- Foram imunes à *T. nubilosa* as espécies *E. pilularis*, *E. brassiana*, *E. tereticornis*, *E. grandis* (Atherton), *E. grandis* (Coffs Harbour) *E. saligna*, *E. urophylla*, *E. torelliana*, *E. siderophloia*, *E. citriodora*, *E. camaldulensis*, *E. grandis* x *E. urophylla*. Foram suscetíveis à *T. nubilosa* as seguintes espécies: *E. dunnii*, *E. punctata*, *E. globulus* e *E. nitens* x *E. globulus*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAF, Associação Brasileira de Produtores de Florestas Plantadas. Anuário estatístico da ABRAF 2010. Disponível em <http://www.abraflor.org.br>
- Alexopoulos, C. J., C. W. Mims, M. Blackwell. (1996) *Introductory mycology*. Wiley, New York, New York, USA.
- Alfenas, A.C., Zauza E.A.V., Maffia R.G., Assis T.F. (2009) *Clonagem e Doenças do Eucalipto*. 2ª Edição. Viçosa MG. Editora UFV. 500p.
- Andjic, V., Pegg, G. S., Carnegie, A. J., Callister, A., Hardy, G. E., & Burgess, T. I. (2010a). *Teratosphaeria pseudoecalypti*, new cryptic species responsible for leaf blight of *Eucalyptus* in subtropical and tropical Australia. *Plant pathology*, 59(5): 900-912.
- Brooker, M.I.H. (2000) A new classification of genus *Eucalyptus* L'Her. (*Myrtaceae*). *Australian Systematic Botany* 13: 79-148.
- Cândido, T.D.S., Silva, A.C.D., Guimarães, L.M.D.S., Ferraz, H.G.M., Borges Júnior, N., Alfenas, A.C. (2014) *Teratosphaeria pseudoecalypti* on eucalyptus in Brazil. *Tropical Plant Pathology*, 39 (5): 407-412.

- Carnegie, A.J., & Keane, P.J. (1998) *Mycosphaerella vespa* sp. nov. from diseased Eucalyptus leaves in Australia. *Mycological Research*, 102 (10): 1274-1276.
- Carnegie, A. J., Ades, P. K. (2002) The proportion of leaf spots caused by *Mycosphaerella cryptica* and *M. nubilosa* on *Eucalyptus globulus*, *E. nitens* and their F1 hybrids in a family trial in Tasmania, Australia. *Aust. Mycol*, 2: 53-63.
- Carnegie, A.J. (2007) Forest health condition in New South Wales, Australia, 1996-2005. II. Fungal damage recorded in eucalypt plantations during forest health surveys and their management. *Australasian Plant Pathology* 36, 225-239.
- Crous, P.W. (1998) *Mycosphaerella* spp. and their anamorphs associated with leaf spot diseases of *Eucalyptus*. *Mycologia Memoir* 21: 1-170.
- Crous, P.W., Wingfield, M.J., Mansilha, J.P., Alfenas, A.C., Groenewald, J.Z. (2006) Phylogenetic reassessment of *Mycosphaerella* spp. and their anamorphs occurring on *Eucalyptus* II. *Studies in Mycology* 55: 99-131.
- Crous, P.W., Braun, U., Groenewald, J. Z. (2007) *Mycosphaerella* is polyphyletic. *Studies in Mycology*, 58: 1-32.
- Crous P.W., Braun, U., Schubert, K., Groenewald, J.Z. (2007b) Delimiting *Cladosporium* from morphologically similar genera. *Studies in Mycology* 58: 33–56
- Crous, P. W., Summerell, B. A., Carnegie, A. J., Wingfield, M. J., Hunter, G. C., Burgess, T. I., Groenewald, J. Z. (2009) Unravelling *Mycosphaerella*: do you believe in genera?. *Persoonia*, 23, 99.
- De Carvalho, A. D. O., Alfenas, A. C., Maffia, L. A., & do Carmo, M. G. F. (1998) Resistência de espécies, progênies e procedências de *Eucalyptus* à ferrugem,

causada por *Puccinia psidii* Winter. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 33 (2): 139-147.

Eldridge, K.G., Davidson, J., Harwood, C.E., van Wyk, G. (1994) *Eucalypt domestication and breeding*. Clarendon Press; Oxford University Press, Oxford : New York ; Melbourne.

FAO, Food and Agriculture Organization Disponível em <http://faostat.fao.org/site/381/default.aspx>.

Ferreira, M. (1992) Melhoramento e a Sivilcutura intensiva clonal. IPEF 45: 8.

Fonseca, S.M., Resende, M.D.V., Alfenas, A.C., Guimarães, L.M.S., Assis, T.F., Grattapaglia, D. (2010) Manual prático de melhoramento genético do eucalipto. Viçosa, MG, Brasil: Editora UFV, 200p.

Glen, M., Smith, A.H., Langrell, S.R.H., Mohammed, C.L. (2007) Development of nested polymerase chain reaction detection of *Mycosphaerella* spp. and its application to the study of leaf disease in *Eucalyptus* plantations. *Phytopathology* 97:132–144.

Grattapaglia, D., Vaillancourt, R., Shepherd, M., Thumma, B., Foley, W., Klheim, C., Potts, B. e Myburg, A. (2012) Progress in *Myrtaceae* genetics and genomics: *Eucalyptus* as the pivotal genus. *Tree Genetics & Genomes* 8: 463-508.

Hunter, G.C., Wingfield, B.D., Crous, P.W., Wingfield, M.J. (2006) A multi-gene phylogeny for species of *Mycosphaerella* occurring on *Eucalyptus* leaves. *Studies in Mycology* 55: 147-161.

Hunter, G.C., Van der Merwe, N.A., Burgess, T.I., Carnegie, A. J., Wingfield, B.D., Crous, P.W., Wingfield, M.J. (2008) Global movement and population biology of *Mycosphaerella nubilosa* infecting leaves of cold-tolerant *Eucalyptus globulus* and *E. nitens*. *Plant Pathology* 57: 235-242.

- Hunter, G.C., Crous, P.W., Carnegie, A.J., & Wingfield, M. J. (2009) *Teratosphaeria nubilosa*, a serious leaf disease pathogen of *Eucalyptus* spp. in native and introduced areas. *Molecular Plant Pathology*, 10 (1): 1-14.
- Hunter, G.C., Crous, P.W., Carnegie, A.J., Burgess, T.I., Wingfield, M.J. (2011) *Mycosphaerella* and *Teratosphaeria* diseases of *Eucalyptus*; easily confused and with serious consequences. *Fungal Diversity* 50: 145-166.
- IBÁ, Anuário Estatístico da IBÁ de 2014 – ano base 2013. Brasília. Industria Brasileira de Árvores, 1, 100p., 2014.
- Jackson, S. L., Maxwell, A., Burgess, T. I., Hardy, G. S., & Dell, B. (2008) Incidence and new records of *Mycosphaerella* species within a *Eucalyptus globulus* plantation in Western Australia. *Forest Ecology and Management*, 255 (12): 3931-3937.
- Kularatne, H.A.G.C., Lawrie, A.C., Barber, P.A., Keane, P.J. (2004) A specific primer PCR and RFLP assay for the rapid detection and differentiation in planta of some *Mycosphaerella* species associated with foliar diseases of *Eucalyptus globulus*. *Mycol Res* 108:1476–1493.
- Mafia, R. G., Alfenas, A. C., Ferreira, E. M., Binoti, D. H. B. (2011) Método de seleção e identificação de fontes de resistência à murcha do eucalipto causada por *Ceratocystis fimbriata*. *Revista Árvore*, 35 (4): 817-824.
- Mafia, R. G., Alfenas, A. C., Ferreira, M. A. (2014) Avaliação da resistência do eucalipto à murcha-bacteriana causada por *Ralstonia solanacearum*. *Rev Árvore*, 38: 649-656.
- Maxwell, A., Jackson, S.L., Dell, B., Hardy, G.E.S.J. (2005) PCR identification of *Mycosphaerella* species associated with leaf diseases of *Eucalyptus*. *Mycol Res* 109:992-1004.

- Milgate, A. W., Potts, B. M., Joyce, K., Mohammed, C., Vaillancourt, R. E. (2005) Genetic variation in *Eucalyptus globulus* for susceptibility to *Mycosphaerella nubilosa* and its association with tree growth. *Australasian Plant Pathology*, 34 (1): 11-18.
- Mohammed, C. L., Wardlaw, T., Smith, A. D. M., Pinkard, E. A., Battaglia, M., Glen, M., Potts, B. M. (2003) *Micosphaerella* leaf diseases of temperate eucalypts around the southern Pacific rim. *New Zealand Journal of Forestry Science*, Rotorua, 33 (3): 362-372.
- Park, R.F., Keane, P.J. (1982) Three *Mycosphaerella* species from leaf disease of *Eucalyptus*. *Transactions of the British Mycological Society* 79: 95-100.
- Park, R.F., Keane, P.J. (1982b) Leaf diseases of *Eucalyptus* associated with *Micosphaerella* species. *Transactions of the British Mycological Society*, 79 (1): 101-115.
- Park, R. F., Keane, P. J. (1984) Further *Mycosphaerella* species causing leaf diseases of *Eucalyptus*. *Transactions of the British Mycological Society* 83: 93-105.
- Park, R. F., Keane, P. J. (1987) Spore production by *Mycosphaerella* species causing leaf diseases of *Eucalyptus*. *Transactions of the British Mycological Society*, 89 (4): 461-470.
- Park, R. F. (1988) Epidemiology of *Mycosphaerella nubilosa* and *M. cryptica* on *Eucalyptus* spp. in south-eastern Australia. *Transactions of the British Mycological Society*, 91 (2): 261-266.
- Passador, M. M. (2011) Mancha de micoserela em *Eucalyptus globulus*: características e ascogênese do patógeno, estrutura e composição química foliar.

- Passador, M. M., Lima, P. R. D., De Pieri, C., Harakava, R., Finkenauer, E., & Furtado, E. L. (2012) *Teratosphaeria nubilosa* em plantações comerciais de *Eucalyptus globulus* nas regiões Sul e Sudeste do Brasil. *Summa Phytopathologica*, 38 (1): 11-16.
- Passador, M. M., Porcena, A. S., Masson, M. V., de Pieri, C., Finkenauer, E., & Furtado, E. L. (2013). Escala diagramática para quantificação da severidade de manchas em folhas de *Eucalyptus globulus* Labill. causadas por *Teratosphaeria nubilosa* (Cooke) Crous & U. Braun. *Ciência Florestal*, 23 (2): 521-528.
- Pérez, G., Slippers, B., Wingfield, B.D., Finkenauer, E., Wingfield, M.J., (2009b) *Mycosphaerella* leaf disease (MLD) outbreak on *Eucalyptus globulus* in Brazil caused by *Teratosphaeria* (*Mycosphaerella*) *nubilosa*. *Phytopathologia Mediterranea* 48: 302-306.
- Pinkard, E.A., Mohammed, C.L. (2006) Photosynthesis of *Eucalyptus globulus* with *Mycosphaerella* leaf disease. *New Phytologist* 170: 119-27.
- Poke, F. S., Vaillancourt, R. E., Potts, B. M., & Reid, J. B. (2005) Genomic research in *Eucalyptus*. *Genetica*, 125 (1): 79-101.
- Potts, B. M. (2004) Genetic improvement of eucalypts. In: (Ed.). *Encyclopedia of forest sciences*. Oxford, UK: Elsevier 1480-1490p.
- Putzke, J., Putzke, M. T. L. (1998) O reino dos fungos. *EDUNISC, Santa Cruz do Sul*. SBS (2009) – Disponível em:
<http://www.sbs.org.br/FatoseNumerosdoBrasilFlorestal.pdf>.
- Teodoro, M. G., Ferreira, M. A., Guimarães, L. M., Reginaldo, G., Groenewald, J. Z., Crous, P. W., Alfenas, A. C. (2012) *Mycosphaerella* and *Teratosphaeria* species associated with leaf diseases on *Eucalyptus globulus* in southern Brazil. *Phytopathologia Mediterranea*, 51(2): 355-364.

Williams, J. E., Woinarski, J. (1997) *Eucalypt ecology: Individuals to ecosystems*. Cambridge University Press 430p.

Xavier, A. A., Junghans, D. T., Alfenas, A. C. (2007) Resistance of *Eucalyptus globulus* and *E. nitens* to rust. *Revista Árvore*, 31(4): 731-735.

APÊNDICE

Tabela 1A. Análise da variância para ejeção de ascósporos de *T. nubilosa*, em função da temperatura aplicada às folhas contendo lesões causadas pelo patógeno.

FV	GL	QM	F	P
EJEÇÃO				
Temperatura	3	45503,29	41,24**	<0,00001
Resíduo	20	1103,38		
CV%: 21,18				

Tabela 2A. Análise da variância para a incidência, severidade e desfolha incitada por *T. nubilosa* em função do tratamento de inoculação aplicado em mudas de seis clones de eucalipto.

ANOVA – Ensaio 2 de inoculação								
FV	G.L.	QM (Inc)	QM (sev)	QM (desf)	F (Inc)	F (sev)	F (desf)	P
Tratamento	3	6862,07	869,42	191,67	136,32**	107,98**	27,09**	0,0000
Clone	4	10031,95	1375,84	276,77	199,29**	170,87**	39,11**	0,0000
Clone x Tratamento	12	1651,22	225,17	67,06	32,80**	27,96**	9,48**	0,0000
Resíduo	140	50,34	8,05	7,07				

CV% (INC, SEV, DESF): 53,38; 61,94; 50,04

Tabela 3A. Análise da variância para a incidência, severidade e desfolha incitada por *T. nubilosa* em função do tratamento de inoculação aplicado em mudas de cinco clones de eucalipto.

ANOVA – Ensaio 1 de inoculação								
FV	G.L.	QM (Inc)	QM (sev)	QM (desf)	F (Inc)	F (sev)	F (desf)	P
Tratamento	3	16891,06	2623,56	3581,4	444,23**	94,46**	114,07**	0,0000
Clone	4	25714,5	2341,35	3197,24	676,28**	84,3**	101,83**	0,0000
Clone x Tratamento	12	2311,51	260,76	360,28	60,79**	9,39**	11,47**	0,0000
Resíduo	140	38,02	27,77	31,39				

CV% (INC; SEV; DESF): 19,12; 44, 55; 39,22