

RIVADALVE COELHO GONÇALVES

**ETIOLOGIA DA MANCHA BACTERIANA DO EUCALIPTO
NO BRASIL**

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

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2003**

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

T

G635e
2003
Gonçalves, Rivaldalve Coelho, 1970-
Etiologia da mancha bacteriana do eucalipto no Brasil /
Rivaldalve Coelho Gonçalves. – Viçosa : UFV, 2003.
xiii, 79f. : il. ; 29cm.

Inclui apêndice.

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

Inclui bibliografia.

1. Mancha bacteriana - Etiologia. 2. Xanthomonas. 3.
Eucalipto - Doenças e pragas. I. Universidade Federal de
Viçosa. II. Título.

CDD 20.ed. 632.32

RIVADALVE COELHO GONÇALVES

**ETIOLOGIA DA MANCHA BACTERIANA DO EUCALIPTO
NO BRASIL**

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

APROVADA: 6 de novembro de 2003.

Prof. Luiz Antonio Maffia
(Conselheiro)

Prof. José Rogério de Oliveira
(Conselheiro)

Prof. Júlio César Mattos Cascardo

Dr. Miguel Angel Dita Rodríguez

Prof. Acelino Couto Alfenas
(Orientador)

Ao professor Acelino Couto Alfenas

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, provedor de vida, inteligência e limite no tempo.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Fitopatologia, pela oportunidade de convivência com pessoas de tamanho brilhantismo, pelo profissionalismo e pela realização deste trabalho.

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

Ao professor Acelino Couto Alfenas, pela oportunidade, pela atenção, pelo empenho, pela contribuição com seus conhecimentos, pela convivência bem humorada, pelo estímulo à realização deste trabalho e pelo norteamento à minha formação.

Ao professor Luiz Antonio Maffia, pelos conhecimentos ensinados, pela atenção, pela prestatividade contínua e pelo apoio irrestrito.

Ao professor José Rogério de Oliveira, pela atenção, pela prestatividade, pela amizade e pelo apoio contínuo e ilimitado.

Ao professor Júlio César de Mattos Cascardo, pelo seqüenciamento dos clones no momento crucial deste trabalho, pela contribuição e pela disponibilidade em ajudar-nos.

Ao professor Francisco Murilo Zerbini Júnior, pelo apoio e ensinamentos durante minha formação e contribuição nas análises das seqüências.

Ao professor Sérgio Hermínio Brommonschenkel, pelas orientações, pelas sugestões, pela contínua disponibilização de ensinamentos, pela amizade, pelo estímulo e pelo apoio moral.

Ao professor Francisco Alves Ferreira, pelas amostras colhidas, pelas informações cedidas, pelos conhecimentos ensinados, pelo apoio e pela amizade.

Ao professor Reginaldo da Silva Romeiro, pelos ensinamentos em bacteriologia e pela amizade.

Aos demais professores do Departamento de Fitopatologia, pela dedicação e pelo empenho.

Ao professor Marcos Rogério Tótola – DMI/UFV, pela oportunidade de aprendizado e realização das análises no sistema Sherlock® MIS.

À professora Célia Alencar de Moraes – DMI/UFV, pelos ensinamentos na identificação bioquímica com o sistema MicroLog™ BIOLOG.

À professora Elza Fernandes de Araújo DMI/UFV, pelo apoio e pelo exemplo de dedicação e compromisso com a universidade.

Ao professor José Rodrigues de Souza, pelo apoio moral e pela sincera amizade.

À Márcia Brandão, incansável em sua luta diária para atender com profissionalismo nossas inúmeras solicitações.

Ao Délio Duarte, pela prestatividade e competência junto à secretaria de Pós - Graduação do Departamento de Fitopatologia.

À minha esposa, companheira e amiga Luciana Lopes Rodrigues, que tem estado ao meu lado neste tempo.

Aos meus amigos e colegas de Laboratório Douglas, Diogo, Edgar, Edgard, Júlio, Klaus, Elene, Lúcio, Miguel, Carlos Eduardo, Eduardo Chumbinho, Ana Verônica, Daniele, Daniela, Leonardo, Michelle, Gabi, Renildo, Eraclides, Reginaldo, Edival, Aderlan, Rodrigo, Francismar e Juliana.

À Sandra Kunieda, pelos primeiros ensinamentos no Laboratório de Patologia Florestal.

Às empresas do setor florestal e as pessoas que nos ajudaram na coleta das amostras, a saber: Teotônio (Aracruz - Guaíba), Eduardo, Shinitiro, Silvana e Nerino (Suzano Bahia Sul), Doraci (International Paper), CAF e Jari.

Aos meus novos amigos e colegas da EMBRAPA – Acre, notadamente à Majú e ao Dr. Ivandir Soares Campos.

BIOGRAFIA

RIVADALVE COELHO GONÇALVES, filho de Rosa Coelho Gonçalves, nasceu em 5 de março de 1970, em Goiabal, MG.

Concluiu a graduação de Engenharia Florestal pela Universidade Federal de Viçosa em setembro de 1996. Durante a graduação, trabalhou nos laboratórios de Entomologia Florestal, Ecologia Florestal e Patologia Florestal. Em janeiro de 1997, iniciou o mestrado em Fitopatologia – Patologia Florestal – na Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, sob orientação do professor Acelino C. Alfenas, o qual foi concluído em 1999. No mesmo ano, iniciou o curso de Doutorado em Fitopatologia – Patologia Florestal – na mesma instituição, orientado pelo professor Acelino C. Alfenas, tendo desenvolvido seus trabalhos no Laboratório de Patologia Florestal e Genética da Interação Planta-Patógeno do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária – BIOAGRO até 2003.

Atualmente, é pesquisador da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Centro de Pesquisa Agroflorestal do Acre (EMBRAPA-Acre), localizada em Rio Branco, Acre.

ÍNDICE

RESUMO	x
ABSTRACT	xii
INTRODUÇÃO GERAL	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	4
ARTIGO 1	
ETIOLOGIA DA MANCHA BACTERIANA DO EUCALIPTO NO BRASIL.....	7
RESUMO	7
ABSTRACT	8
1. INTRODUÇÃO	9
2. MATERIAL E MÉTODOS	10
2.1. Sintomatologia	10
2.2. Isolamento e características das colônias	10
2.3. Patogenicidade	10
2.4.. Identificação de bactérias ao nível de gênero	11
2.5. Utilização de fontes de carbono no sistema MicroLog™ BIOLOG.....	12
2.6. Análise filogenética de rDNA 16S	12
2.6.1. Extração de DNA genômico total de bactérias e reação de PCR...	13
2.6.2. Clonagem, seqüenciamento e desenho de oligonucleotídeos internos de rDNA16S.....	13

2.6.3. Correlações filogenéticas de rDNA16S	14
2.6.4. Perfil de ácidos graxos no sistema Sherlock® MIS	15
3. RESULTADOS	16
3.1. Sintomatologia	16
3.2. Isolamento e características das colônias.....	17
3.3. Patogenicidade	17
3.4. Identificação de bactérias ao nível de gênero	17
3.5. Utilização de fontes de carbono no sistema MicroLog™ BIOLOG	18
3.6. Análise filogenética de rDNA 16S	18
3.7. Perfil de ácidos graxos no sistema Sherlock® MIS	19
4. DISCUSSÃO.....	20
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	26
ARTIGO 2 (COMUNICAÇÃO)	
GAMA DE HOSPEDEIROS DE <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>eucalypti</i> ISOLADA DE MANCHAS FOLIARES DO EUCALIPTO.....	36
RESUMO	36
ABSTRACT	37
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	39
ARTIGO 3	
ESCALA DIAGRAMÁTICA PARA A MANCHA BACTERIANA DO EUCALIPTO.....	41
RESUMO	41
ABSTRACT	42
1. INTRODUÇÃO	43
2. MATERIAL E MÉTODOS	43
2.1. Coleta de amostras, obtenção e processamento de imagens.....	43
2.2. Determinação dos níveis de severidade e obtenção da escala diagramática.....	44
2.3. Estimativa da severidade da mancha bacteriana do eucalipto por meio de escala diagramática.....	44
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47

CONCLUSÕES GERAIS	53
APÊNDICE	55

RESUMO

GONÇALVES, Rivaldalve Coelho, D.S., Universidade Federal de Viçosa, novembro de 2003. **Etiologia da mancha bacteriana do eucalipto no Brasil.** Orientador: Acelino Couto Alfenas. Conselheiros: Luiz Antônio Maffia e José Rogério de Oliveira.

Estudou-se a etiologia da mancha bacteriana do eucalipto a partir de amostras de folhas de plantas, coletadas em condições de viveiro e campo nos Estados do Rio Grande do Sul, São Paulo, Minas Gerais, Bahia, Mato Grosso do Sul, Amapá e Pará. Os sintomas da doença são caracterizados por anasarca, lesões internervurais no limbo, perfurações no centro das lesões, lesões no pecíolo e nos ramos, concentração de lesões ao longo da nervura principal e lesões lineares nas bordas e no ápice da folha. Identificaram-se vinte e cinco isolados incitadores de reação de hipersensibilidade (HR) em plantas não-hospedeiras e patogênicos a *Eucalyptus* spp., quando inoculados nas folhas por injeção. Baseado em testes bioquímicos, utilização de fontes de carbono (MicroLog™ BIOLOG), análise filogenética de rDNA16S e perfil de ácidos graxos, identificaram-se dez isolados de *Xanthomonas axonopodis*, quatro de *X. campestris*, quatro de *Pseudomonas syringae*, dois de *Pseudomonas putida*, dois de *Pseudomonas cichorii*, dois de *Rhizobium* sp. e um de *Erwinia* sp. Apenas os isolados de *P. syringae* e *Erwinia* sp. não foram patogênicos a *Eucalyptus* spp. quando inoculados, por atomização de suspensão de inóculo (10^8 ufc/mL), em mudas. Tendo em vista a maior frequência de isolados de *X. axonopodis*, avaliou-se sua gama de hospedeiros por meio de inoculações por atomização de inóculo (10^8 ufc/mL) em mudas de espécies ou clones

pertencentes às seguintes famílias botânicas: Myrtaceae (*Corymbia maculata*, *Eugenia jambolana*, *E. camaldulensis*, *E. cloeziana*, *E. grandis*, *E. robusta*, *E. saligna*, *E. urophylla*, *E. urophylla* x *E. maidenii*, *E. globulus*, *Myrciaria jaboticaba* e *Psidium guajava*), Caricaceae (*Carica papaya*), Fabaceae (*Phaseolus vulgaris* e *Pisum sativum*), Rosaceae (*Prunus persicae*), Rutaceae (*Citrus limon*) e Solanaceae (*Lycopersicon esculentum*). Apenas as plantas da família Myrtaceae foram suscetíveis, e dentre essas, apenas espécies de *Corymbia* e *Eucalyptus* apresentaram sintomas. A frequência de plantas com sintomas variou com a espécie, sendo que *E. cloeziana* e o clone de *E. urophylla* x *E. maidenii* foram os materiais mais suscetíveis. Para embasar a quantificação da doença em eucalipto, desenvolveu-se uma escala diagramática contendo oito níveis de severidade. Na validação da escala por três grupos de avaliadores inexperientes, concluiu-se que não houve acurácia nas estimativas com ou sem a escala, mas houve tendência de maior precisão para avaliadores com a escala sem treinamento prévio.

ABSTRACT

GONÇALVES, Rivaldalve Coelho, D.S., Universidade Federal de Viçosa, November 2003. **Etiology of bacterial leaf spot on eucalyptus in Brazil.** Advisor: Acelino Couto Alfenas. Committee members: Luiz Antonio Maffia and José Rogério de Oliveira.

The etiology of *Eucalyptus* bacterial leaf blight was studied on plants in nurseries and plantations in the states of Rio Grande do Sul, São Paulo, Minas Gerais, Bahia, Mato Grosso do Sul, Amapá and Pará. The disease is characterized by water soaked, angular and interveinal spots on the leaf limb followed by shot holes and lesions in petioles and branches. The lesions can be found along the main vein, at the leave edge and at the upper portion of the limb. Of the several isolates obtained during isolations, 25 induced hypersensitive reaction in non-host plants, and were pathogenic to *Eucalyptus* spp.. Identification of these isolates by biochemical tests using carbon sources (MicroLog™ BIOLOG), filogenetic analysis of rDNA16S and FAME profile, revealed that 10 isolates belonged to *Xanthomonas axonopodis*, four each to *X. campestris* and *Pseudomonas syringae*, two each to *P. putida*, *P. cichorii*, and *Rhizobium* sp., and one to *Erwinia* sp.. When the *Eucalyptus* seedlings were inoculated by spraying the bacterial suspension (10^8 ufc/ml) of any isolate, only *P. syringae* e *Erwinia* sp. did not produce typical disease symptoms. Because of the higher frequency of *X. axonopodis* isolates, it was evaluated for its host range. Plants from the botanical families Myrtaceae (*Corymbia maculata*, *Eugenia jambolana*, *E. camaldulensis*, *E. cloeziana*, *E. grandis*, *E. robusta*, *E. saligna*, *E. urophylla*, *E. urophylla* x

E. maidenii, *E. globulus*, *Myrciaria jaboticaba* and *Psidium guajava*), Caricaceae (*Carica papaya*), Fabaceae (*Phaseolus vulgaris* and *Pisum sativum*), Rosaceae (*Prunus persicae*), Rutaceae (*Citrus limon*) and Solanaceae (*Lycopersicon esculentum*) were spray inoculated with the bacterial suspension (10^8 ufc/ml). Only plants of Myrtaceae family showed susceptibility, but the symptoms developed only seedlings of *Eucalyptus* and *Corymbia*. The frequency of symptomatic plants varied among the species with *E. urophylla* x *E. maidenii* clones and *E. cloeziana* being the more susceptible hosts. A diagrammatic scale of eight disease severity levels was developed for disease quantification on eucalyptus leaves. The validation of the scale by three groups of inexperienced evaluators showed that although there was no accuracy in disease estimation with or without the scale, the group of untrained evaluators using the scale had higher precision.

INTRODUÇÃO GERAL

A área plantada com eucalipto no mundo é cerca de 17.861.000 ha, sendo 10.994.000 ha na Ásia, 4.837.000 ha na América do Sul, 1.799.000 ha na África, 198.000 ha na América Central e do Norte e 33.000 ha na Oceania (FAO, 2000). No Brasil, o setor de Papel e Celulose projeta ampliar a área cultivada para 14 milhões de hectares até 2012 e dobrar as exportações (BRACELPA, 2003). Segundo a Sociedade Brasileira de Silvicultura, o setor de base florestal brasileiro representou 4% do PIB nacional, com faturamento de US\$ 21 bilhões e pagamento de US\$ 2 bilhões em impostos, em 2001 (SOCIEDADE BRASILEIRA DE SILVICULTURA, 2002). Plantações de eucalipto (*Eucalyptus* spp. L'Her. e *Corymbia* spp. Hill & Johnson) ocupam, aproximadamente, 3 milhões de ha no Brasil e destinam-se à produção de madeira para celulose, papel, carvão vegetal, móveis, mourões, postes, dormentes, construção civil e à produção de óleos essenciais (EMBRAPA, 1996; CAMPINHOS JR., 1999, MORA & GARCIA, 2000).

Importantes doenças de origem fúngica ocorrem no eucalipto, no Brasil (ALFENAS *et al.*, 2004). Dentre estas, incluem-se o cancro, causado por *Cryphonectria cubensis* (Bruner) Hodges (HODGES *et al.*, 1976), a murcha, causada por *Ceratocystis fimbriata* (FERREIRA *et al.*, 1999), a ferrugem, causada por *Puccinia psidii* (Winter) (FERREIRA, 1983) e a mancha de

Quambalaria eucalypti Simpson 2000 (ALFENAS *et al.*, 2001). A maioria das manchas foliares do eucalipto no Brasil é causada por *Cylindrocladium* spp. Morgan (ALFENAS, 1986), *Mycosphaerella* spp. e *Rhizoctonia solani* Khün (FERREIRA, 1989; KRUGNER e AUER, 1997).

Além de fungos, algumas bactérias foram relatadas como agentes causais de diferentes doenças do eucalipto. Na Austrália, *Xanthomonas campestris* pv. *eucalypti* (Truman 1974) Dye 1978 (= *Xanthomonas eucalypti* Truman 1974), foi relatada como agente causal do declínio de árvores de *Corymbia citriodora* (= *Eucalyptus citriodora*) (TRUMAN, 1974) e na África do Sul, *Pantoea ananatis* (Serrano 1928) Mergaert *et al.* 1993 foi recentemente descrita como agente causal de seca de ponteiros e manchas foliares de *Eucalyptus* spp. (COUTINHO *et al.*, 2002). No Brasil, *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896) Yabuuchi *et al.*, 1996 foi relatada como agente etiológico de murcha e morte de plantas de *E. grandis* no campo, em Prata, MG (SUDO *et al.*, 1983) e de *E. urophylla*, *E. grandis* e *E. pellita* no Vale do Jarí, nos Estados do Pará e Amapá (DRISTIG *et al.*, 1988, DIANESE, 1986).

Os primeiros registros de manchas foliares de origem bacteriana no Brasil datam de meados da década de 90, quando *Pseudomonas cichorii* (Swingle 1925) Stapp 1928 (POMELLA *et al.*, 1995) e *Xanthomonas campestris* (Pammel 1895) Dowson 1939 (REIS *et al.*, 1996) foram reportados em mudas de *Eucalyptus* spp., em viveiros no Estado de São Paulo.

Em 1998, numa inspeção de rotina efetuada em plantas de *E. grandis* com menos de um ano de idade em Itapetininga - SP, foram coletadas amostras de folhas contendo lesões encharcadas (anasarca), de etiologia desconhecida, denominada Ziguizira. No laboratório, em testes de exsudação em gota a partir de segmentos de lesões foliares, detectou-se pus bacteriano. Desde então, a enfermidade tem sido observada na maioria das regiões eucaliptoculturas brasileiras. Em estudos preliminares sobre a etiologia da doença (GONÇALVES *et al.*, 2001) em plantas de *Eucalyptus* spp. de até um ano de idade no campo, identificaram-se, preliminarmente, *Xanthomonas* spp. Dowson 1939, *Erwinia psidii* Neto *et al.* 1988 e *Pantoea aglomerans* (Erwin & Fife 1972) Gavini *et al.*

1989 como agentes causais da enfermidade. Concomitante e subsequente, *Erwinia* sp. foi reportada em associação à seca de ponteiros de *E. grandis* no Paraná (MASCHIO *et al.*, 1997), e a manchas foliares em árvores de um clone híbrido de *E. grandis* x *E. urophylla* em Teixeira de Freitas, BA (FERREIRA e MILANI, 2002).

Apesar desses relatos, pouco se conhece sobre a etiologia desta enfermidade, objeto desta tese, a qual foi dividida em três artigos. No primeiro, identificaram-se os agentes etiológicos da mancha bacteriana de mudas de eucalipto em viveiro e plantas no campo, coletadas em várias regiões do país; no segundo, em vista da maior frequência de *Xanthomonas axonopodis* nas amostras colhidas, avaliou-se sua gama de hospedeiros; e no terceiro, desenvolveu-se uma escala diagramática para quantificar a severidade da doença.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFENAS, A.C. Fungos do gênero *Cylindrocladium* como patógenos foliares no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, v.11, n.6, p.275-277. 1986.
- ALFENAS, A.C., ZAUZA, E.A.V., ROSA, O.P.P., ASSIS, T.F. *Sporothrix eucalypti* a new pathogen of eucalyptus in Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, v.26, n.2, p.221. 2001.
- ALFENAS, A.C., ZAUZA, E.A., MAFIA, R.G., ASSIS, T.F. **Clonagem e doenças do eucalipto**. Viçosa, MG: Editora UFV. 2004. 442p.
- BRACELPA. **Associação Brasileira de Celulose e Papel**. 2003. (www.bracelpa.org)
- CAMPINHOS JR., E. Sustainable plantations of high-yield Eucalyptus trees for production of fiber: the Aracruz case. **New Forests**, v.17, p.129-143. 1999.
- COUTINHO, T., PREISIG, O. MERGAERT, J., CNOCKAERT, M.C., RIEDEL, K.H., SWINGS, J., WINGFIELD, M.J. Bacterial blight and dieback of *Eucalyptus* species, hybrids, and clones in South Africa. **Plant Disease**, v.86, p.20-25. 2002.
- DIANESE, J.C. Problemas patológicos das florestas plantadas no vale do rio Jari. **Fitopatologia Brasileira**, v.11, p.274-275. 1986.
- DRISTIG, M.C.G., DIANESE, J.C. TAKATSU, A. Characterization of *Pseudomonas solanacearum* isolated from *Eucalyptus*. **Fitopatologia Brasileira**, v.13, n.2., p.106. 1988.

- EMBRAPA. Brasil tem reserva estratégica de eucalipto. **Folha da Floresta**, v.8, p.6-8. 1996.
- FAO. The global outlook for future wood supply from forest plantations. Working paper GFPOS/WP/03, Rome, Italy. 2000.
- FERREIRA, F.A. Ferrugem do eucalipto. **Revista Árvore**. v.7, p.91-109. 1983.
- FERREIRA, F.A. **Patologia florestal: Principais doenças florestais no Brasil**. Viçosa, MG: UFV, SIF, 1989. 570p.
- FERREIRA, F.A., DEMUNER, A.M., DEMUMER, N.L., PIGATO, S. Murcha de Ceratocystis em eucalipto no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, v.24, p.284. 1999.
- FERREIRA, F.A., MILANI, D. **Diagnose visual e controle das doenças abióticas e bióticas do eucalipto no Brasil**. Mogí Guaçú, SP: International Paper. 2002. 98p.
- GONÇALVES, R.C., ALFENAS, A.C., OLIVEIRA, J.R., SILVA, I.T., ODA, S., ASSIS, T.F., TONON, A. Mancha foliar e seca de ponteiros do eucalipto causada por fitobactérias, no Brasil e na Argentina. **Fitopatologia Brasileira**, v.26, p.294. 2001.
- HODGES, C.S., REIS, M.S., FERREIRA, F.A., HENFLING, J.D.M. O cancro do eucalipto causado por *Diaporthe cubensis*. **Fitopatologia Brasileira**, v.1, p.129-170. 1976.
- KRUGNER, T.L., AUER, C.G. Doenças do eucalipto. In: KIMATI, H. AMORIN, L., BERGAMIN FILHO, A., CAMARGO, L.E.A., RESENDE, J.A.M. (Eds.) **Manual de fitopatologia. Doenças das plantas cultivadas**. São Paulo. 1997. p.358-375.
- MASCHIO, L.M.A., ANDRADE, F.M., LEITE, M.S.P., BELLOTE, F.J., FERREIRA, C.A., IEDE, E.T., NARDELI, A.M.B., AUER, C.G., GRIGOLETI, A., WIECHETEK, M. Seca dos ponteiros do eucalipto em Arapoti-PR. In: CONFERÊNCIA IUFRO DE SILVICULTURA E MELHORAMENTO DE EUCALIPTOS, 3. 1997. Salvador, BA. **Anais...** p.353-359.
- MORA, A.L., GARCIA, C.H. **A cultura do eucalipto no Brasil**. São Paulo, SP: Sociedade Brasileira de Silvicultura. 2000. 112p.
- POMELLA, A.W.V., ROMEIRO, R.S., FERREIRA, F.A. OLIVEIRA, J.R. Lesões foliares em viveiro de eucalipto incitadas por uma espécie fluorescente de *Pseudomonas*. **Fitopatologia Brasileira**, v.20, p.374. 1995.

REIS, A.V., SOUZA, R.M., CASTRO, H.A., CARDOSO, M.A.F.C., KOBAYASTI, L. Uma nova bacteriose em mudas de eucalipto incitada por *Xanthomonas campestris*. **Fitopatologia Brasileira**, v.21, p.342. 1996.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE SILVICULTURA (SBS). **O Setor Florestal Brasileiro. Fatos e Números**. São Paulo, SP. 2002. (CD-ROM).

SUDO, S., OLIVEIRA, G.H.N., PEREIRA, A.C. Eucalipto (*Eucalyptus* spp.) e bracatinga (*Mimosa scabrella* Penth), novos hospedeiros de *Pseudomonas solanacearum* E. F. SMITH. **Fitopatologia Brasileira**, v.8, p.631. 1983.

TRUMAN, R. Die-back of *Eucalyptus citriodora* caused by *Xanthomonas eucalypti* sp. n. **Phytopathology**, v.64, p.143-144. 1974.

ARTIGO 1

Etiologia da Mancha Bacteriana do Eucalipto no Brasil*

Rivaldalve C. Gonçalves^{1**}, Acelino C. Alfenas², José R. Oliveira², Luiz A. Maffia², Júlio C. M. Cascardo³, Douglas Lau².

¹ Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária — Centro de Pesquisa Agroflorestal do Acre, EMBRAPA-Acre, CEP: 69908-970, Caixa Postal: 321, Rio Branco, Acre. Tel: (682123233). E-mail: riva@cpafac.embrapa.br.

² Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, CEP:36570000 – Viçosa, MG. Tel: (3138992937).

³ Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Santa Cruz, CEP-45662-000. Ilhéus,BA.

Aceito para publicação em (...../...../.....)

Autor para correspondência: Acelino Couto Alfenas

GONÇALVES, R. C. ALFENAS, A. C., OLIVEIRA, J. R., MAFFIA, L. A., CASCARDI, J. C. M., LAU, D. Etiologia da mancha bacteriana do eucalipto no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**

RESUMO

Determinou-se a etiologia da mancha bacteriana do eucalipto, a partir de amostras de folhas colhidas em várias regiões do Brasil. A doença caracteriza-se por anasarca, lesões internervurais angulares no limbo, necrose de pecíolo e ramos, perfurações nos pontos lesionados, concentração de lesões ao longo da nervura principal, lesões longilíneas nas margens da folha e exsudação, em folha, de pus bacteriano visualizado ao microscópio (200 X). Vinte e cinco isolados causadores de reação de hipersensibilidade em plantas não-hospedeiras e patogênicos ao eucalipto, quando inoculados por injeção nas folhas, foram escolhidos para identificação por meio de testes bioquímicos, utilização de fontes de carbono (MicroLog™ BIOLOG), análise filogenética a partir de seqüência do rDNA16S e perfil de ácidos graxos. Identificaram-se dez isolados de *Xanthomonas axonopodis*, quatro isolados de *X. campestris*, quatro

* Parte da tese de doutorado do primeiro autor. Universidade Federal de Viçosa, 2003.

** Bolsista do CNPq.

de *Pseudomonas syringae*, dois de *P. putida*, dois de *P. cichorii*, dois de *Rhizobium* sp. e um de *Erwinia* sp.. Os isolados de *X. axonopodis*, *X. campestris*, *P. syringae*, *P. cichorii*, *Rhizobium* sp. e *Erwinia* sp., foram inoculados por atomização em mudas de eucalipto. Dentre esses, apenas os isolados de *P. syringae* e *Erwinia* sp. não causaram sintomas típicos da doença.

Palavras-chave adicionais: mancha de folha, *Eucalyptus*, *Xanthomonas*, *Pseudomonas*, *Erwinia*, *Rhizobium*.

ABSTRACT

Etiology of bacterial leaf blight of eucalyptus in Brazil

The etiology of eucalyptus bacterial leaf blight was studied by examining leaf samples collected from different regions of Brazil. The disease is characterized by water soaked, angular and interveinal spots on leaf limb followed by shot holes and necrosis on petioles and branches. The leaf lesions generally concentrate along the main vein, and along the leaf edge. Bacterial pus exudates from the lesions. Bacterial strains that induced hypersensitive reaction in non-hosts plants but were pathogenic to eucalyptus, when injected in the leaves were identified by biochemical assays using carbon sources (MicroLog™ BIOLOG), filogenetic analysis (rDNA16S), and fatty acid profiles. Of the 25 isolates examined ten isolates were identified as *Xanthomonas axonopodis*, four each as *X. campestris* and *Pseudomonas syringae*, two each as *P. putida* and *P. cichorii*, and *Rhizobium* sp., and one as *Erwinia* sp.. In pathogenicity test the isolates of *P. syringae* and *Erwinia* sp. did not cause typical disease symptoms when spray inoculated on the eucalyptus seedlings.

1. INTRODUÇÃO

A partir de 1995, têm-se relatado manchas foliares de origem bacteriana em *Eucalyptus* spp. no Brasil. A doença, originalmente constatada em mudas de *Eucalyptus* spp. em viveiro, no Estado de São Paulo, foi atribuída a *Pseudomonas cichorii* (Swingle 1925) Stapp 1928 (Pomella *et al.*, 1995) e *Xanthomonas campestris* (Pammel 1895) Dowson 1939 (Reis *et al.*, 1996). Em outubro de 1998, amostras de folhas de *E. grandis* Hill ex Maiden contendo lesões foliares, de etiologia desconhecida, denominada Ziguizira, foram coletadas na região de Itapetininga-SP, para posterior análise laboratorial. Exames microscópicos, pelo teste de exsudação em gota, comprovaram a presença de pus bacteriano que surgia do interior dos tecidos a partir de segmentos foliares lesionados. Desde então, a enfermidade tem sido constatada, em viveiro e campo, na maioria das regiões eucaliptocultoras brasileiras. Estudos iniciais sobre a etiologia da doença no Brasil, permitiram identificar, preliminarmente, *Xanthomonas* spp. Dowson 1939, *Erwinia psidii* Neto *et al.* 1988 e *Pantoea aglomerans* (Erwin & Fife 1972) Gavini *et al.* 1989, associadas a manchas foliares e à seca de ponteiros (Gonçalves *et al.*, 2001). Concomitante e subseqüentemente, *Erwinia* sp. foi associada à seca de ponteiros de *E. grandis* no Paraná (Maschio *et al.*, 1997), e a manchas foliares de *E. grandis* x *E. urophylla* no sul da Bahia (Ferreira e Milani, 2002). Na Austrália, *Xanthomonas campestris* pv. *eucalypti* (Truman 1974) Dye 1978b (= *Xanthomonas eucalypti* Truman 1974) foi relatada como agente causal do declínio de árvores de *Corymbia citriodora* (Hook.) K. D. Hill & L. A. S. Johnson (= *E. citriodora* Hook.) (Truman, 1974) e na África do Sul, *Pantoea ananatis* (Serrano 1928) Mergaert *et al.* 1993 foi recentemente descrita como agente etiológico de seca de ponteiros e manchas foliares de *Eucalyptus* spp. (Coutinho *et al.*, 2002).

Apesar dessas constatações freqüentes e dos relatos preliminares de fitobacterioses em mancha foliar do eucalipto no Brasil, pouco se conhece sobre a etiologia da doença, objeto deste estudo.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Sintomatologia

Amostras de folhas e ramos de eucalipto com sintomas de bacteriose, foram obtidas nos Estados do Rio Grande do Sul, São Paulo, Minas Gerais, Bahia, Mato Grosso do Sul, Amapá e Pará. Após exames sob microscópio estereoscópico, lesões sem esporulação fúngica foram submetidas ao teste de exsudação em gota sob microscópio de luz comum (Romeiro, 2001). Para isso, fragmentos foram retirados das margens da lesão, depositados em uma gota de água destilada, cobertos com lamínula e observados ao microscópio (200 X).

2.2. Isolamento e características das colônias

Folhas inteiras, contendo lesões com exsudação de células bacterianas, foram lavadas em água corrente de torneira e detergente neutro. Em seguida, procedeu-se ao isolamento em meio 523 de Kado e Heskett (1970). Após 48 h a 28°C, as colônias morfolologicamente distintas foram transferidas para tubos de ensaio (15 cm x 1,5 cm) contendo meio 523 sólido e incubadas a 28 °C, no escuro. Após 24 h, culturas puras foram imediatamente emulsificadas em glicerina e congeladas a -80°C (Moore *et al.*, 1988). Isolados, comprovadamente fitopatogênicos foram posteriormente armazenados por liofilização em ampolas de vidro de 3 ml (Dhingra e Sinclair, 1995), veiculados em 10% p/v de trealose:peptona (3:1) v/v. As colônias foram morfolologicamente caracterizadas por meio do cultivo em meio 523 de Kado e Heskett (1970) por 72 h a 28°C no escuro.

2.3. Patogenicidade

Cinco isolados bacterianos de cada população clonal ou por sementes de eucalipto, num total de 90 isolados, foram inoculados por injeção de inóculo em plantas de *Lycopersicon esculentum* Mill., *Nicotiana tabacum* L., *Capsicum annum* L., *Coffea arabica* L. e em *Eucalyptus* spp. Para inoculação em *Eucalyptus* spp., na ausência do próprio hospedeiro, empregaram-se os clones híbridos *E. grandis* W. Hill ex Maiden x *E. urophylla* S. T. Blake, e *E. urophylla* x *E. maidenii* (F. Muell.) Kirkpatr, de comprovada suscetibilidade à bacteriose. Plantas com 4-6 pares de folhas, cultivadas em

vasos de polietileno com 2 l da mistura de solo:esterco bovino (3:1) e 4g/l de NPK (4:14:8), foram inoculadas por injeção de suspensão de células bacterianas. Cada isolado foi inoculado em três plantas, sendo três folhas por planta. Para o preparo do inóculo, os isolados foram cultivados em meio 523 sólido em placas de Petri, a 28°C por 24 h e recolhidos em solução salina estéril (0,85% de NaCl), pH=7,0. A suspensão foi ajustada para $AB_{600nm} = 0,1$, correspondente a, aproximadamente, 10^8 ufc/ml. Em três plantas testemunha, injetou-se solução salina estéril. Em seguida, as plantas foram mantidas a 25°C com fotoperíodo de 12 h a 40 μ moles de fótons. $s^{-1}.m^{-2}$. A constatação de necrose seca na área foliar infiltrada, após 24 h de inoculação nas plantas não-hospedeiras, indicou teste de hipersensibilidade positivo (Klement *et al.*, 1964). A presença de necrose na área infiltrada ao 12 dias após inoculação, com extensa exsudação de pus bacteriano, indicou patogenicidade positiva, confirmando-se os postulados de Koch.

A fim de confirmar a patogenicidade de alguns isolados HR positivos, os mesmos foram inoculados em cinco mudas do próprio hospedeiro ou em plantas do clone híbrido de *E. urophylla* x *E. maidenii*, com 90 dias de idade, previamente mantidas em câmara de nevoeiro intermitente (1 min de nevoeiro a cada 10 min) a 25°C por 24 h sob fotoperíodo de 12 h a 4,0 μ moles de fótons. $s^{-1}.m^{-2}$. Para tanto, atomizou-se suspensão de bactérias, preparada conforme descrito previamente, em ambas as faces das folhas. Em três plantas testemunhas, atomizou-se solução salina estéril. As plantas inoculadas foram mantidas em câmara de nevoeiro nas mesmas condições em que se encontravam. Após 48 h, foram transferidas para câmara de crescimento a 28°C com fotoperíodo de 12 h a 40 μ moles de fótons. $s^{-1}.m^{-2}$, onde permaneceram até o aparecimento dos sintomas.

2.4. Identificação de bactérias ao nível de gênero

Isolados com resultado de reação de hipersensibilidade positiva ao maior número de plantas não-hospedeiras, patogênicos ao eucalipto e morfologicamente distintos, foram escolhidos para identificação por meio de testes bioquímicos, utilização de fontes de carbono (MicroLog™ BIOLOG), análise de rDNA16S e perfil de ácidos graxos. Isolados de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, *Pectobacterium carotovorum* pv. *carotovorum* (sin. = *Erwinia carotovora* pv. *carotovora*) e *Xanthomonas*

axonopodis pv. *phaseoli*, obtidos da coleção do Laboratório de Bacteriologia da Universidade Federal de Viçosa, foram utilizados como controle nos testes bioquímicos e moleculares.

Para a identificação dos isolados ao nível de gênero, foram realizados os testes de Gram e KOH, produção de pigmentos em meio King B, crescimento a 33°C em meio YDC (Yeast Dextrose Calcium – extrato de levedura - dextrose - carbonato de cálcio), utilização de asparagina, produção de xantomonadina e teste de Hugh e Leifson (Schaad, 2001).

2.5. Utilização de fontes de carbono no sistema MicroLog™ BIOLOG

Os testes foram conduzidos em microplacas BIOLOG (GN Microplate, Biolog Inc., CA), onde se avaliou a utilização de 95 fontes de carbono (Jones *et al.*, 1993). Os isolados foram multiplicados em meio BUG™ Agar (BIOLOG Universal Growth Agar) por 24 h a 28°C, seguindo-se o protocolo do fabricante. As microplacas foram aferidas após 24 h, em leitor de placas com filtro 540 nm (Titerk Multiskan® PLUS). Os resultados foram comparados na base de dados do sistema BIOLOG e a identificação foi indicada pelo programa do sistema. Valores de similaridade acima de 0,5 indicaram resultados positivos para a identificação de cada isolado (BIOLOG, MicroLog™ System, 4.0, User Guide). Nos casos de resultados não-conclusivos (isolados com valores de similaridade abaixo de 0,5), repetiu-se o teste pelo menos uma vez.

2.6. Análise filogenética de rDNA 16S

A identificação de bactérias pela análise filogenética de seqüências parciais ou totais do gene *rrs*, correspondente ao RNA ribossomal 16S (Hauben *et al.*, 1997), consistiu na amplificação da região 16S a partir do DNA genômico das mesmas, por meio de reação em cadeia da polimerase (PCR), seqüenciamento, análise filogenética e estudo da similaridade das seqüências de nucleotídeos. As seqüências do rDNA 16S obtidas, foram comparadas às seqüências de rDNA 16S de organismos representados na base de dados do GenBank (Benson *et al.*, 1999). Os nomes de bactérias utilizados neste estudo, foram atualizados segundo Garrity *et al.* (2002).

2.6.1. Extração de DNA genômico total de bactérias e reação de PCR

Cada isolado bacteriano foi cultivado em 10 ml de meio líquido 523 de Kado e Heskett (1970), em tubos de vidro com 15 cm x 1,5 cm com tampa de rosca, em agitador orbital a 150 rpm, a 28°C por 48 h. De cada cultura líquida, centrifugaram-se 10 ml a 6.000 rpm por 2 min, à temperatura ambiente, em centrífuga Eppendorf™ (mod. 5415C). O DNA genômico total foi extraído, segundo protocolo de Ausubel *et al.* (1992), e quantificado em gel de agarose a 1% em Tris Acetato EDTA (TAE), corado com brometo de etídeo a 0,5µg/ml. A imagem, em luz UV, foi fotodocumentada em Eagle Eye II (Stratagene™) acoplado a um computador.

Para a PCR, 1,0 µl do DNA bacteriano (100 ng/µl) foi adicionado a uma solução de 24 µl, contendo 1 unidade de Taq polimerase (Boehringer Mannheim, Germany), tampão de reação 10X (Boehringer), 2,5 mM de MgCl₂ (Boehringer), 10 mM de dNTPs e 1,0 µl de cada oligonucleotídeo universal para amplificação de rDNA 16S de bactérias (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' e 5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3') a 100 pM (Weinsburg *et al.*, 1991). A reação de amplificação consistiu da desnaturação das fitas de DNA a 94°C por 2 min e 35 ciclos de: 1 min a 92°C, para separação das fitas; 30s a 58°C, para anelamento dos oligonucleotídeos; e 1 min a 72°C, para extensão do fragmento de DNA. A extensão final foi de 7 min a 72°C. O produto de PCR foi quantificado em gel de agarose 1,0%.

2.6.2. Clonagem, sequenciamento e desenho de oligonucleotídeos internos de rDNA16S

Aplicaram-se 24 µl/ml do produto de PCR em gel de agarose 1% em TAE e recortaram-se as bandas desejadas em blocos de gel, orientando-se por fitas de gel coradas com brometo de etídeo, posicionadas nas laterais do gel e visualizadas sob luz UV.

Os fragmentos foram recortados e o DNA foi purificado com o kit Concert™ Gel Extraction System, segundo o protocolo do fabricante (GIBCO BRL® - Life Technologies Inc.). O DNA foi quantificado novamente e clonado em vetor plasmidial pGEM®-T e p-GEM®-T easy vector (Promega Co.). Plasmídeos recombinantes foram transferidos para células competentes de *Escherichia coli* DH 5α (Hanahan, 1983) por choque térmico de 1 min a 42°C. De cada isolado, dois clones transformados foram armazenados em glicerol (25%) a -80°C. Os plasmídeos transformados foram extraídos

e purificados. Os fragmentos de rDNA16S foram seqüenciados aplicando-se 300 a 500 ng de DNA por reação, em seqüenciador capilar MegaBace™ 1000 (Applied Biosystems). Seqüências parciais de sentido “reverse” foram alinhadas no CLUSTALW (European Bioinformatics Institute) para desenho de oligonucleotídeos internos, com seqüências de rDNA16S de bactérias das famílias Xanthomonadaceae, Pseudomonadaceae, Rhizobiaceae e Enterobacteriaceae, obtidas no GenBank, pelo procedimento BLAST (Stephen *et al.*, 1997). A matriz de distância foi calculada pelo índice de Kimura de dois parâmetros (Kimura, 1980) e o dendrograma filogenético foi obtido pela topologia do vizinho mais próximo (Saitou e Nei, 1987), no programa MEGA 2.1. (Molecular Evolutionary Genetic Analysis©). Os pares de oligonucleotídeos internos foram testados em cada grupo de clones respectivos, em nova PCR, sob condições já descritas. Seqüências complementares foram obtidas com os oligonucleotídeos internos, e a seqüência completa de cada gene foi obtida no programa DNA Man 4.0 (Lynnon BioSoft) pela união de seqüências externas e internas com 100% de identidade na região de sobreposição.

2.6.3 Correlações filogenéticas de rDNA16S

Os genes obtidos foram submetidos à busca por similaridade entre as seqüências de nucleotídeos de espécies do banco de dados (GenBank), comparadas com outras 1.837.000 seqüências. Às espécies de maior similaridade, foram adicionadas espécies de bactérias consideradas em Garrity *et al.* (2002) para análise filogenética. As seqüências foram alinhadas no programa CLUSTALW e a análise filogenética foi realizada no programa MEGA 2.1. Uma matriz de distância genética foi obtida com o índice de Kimura de dois parâmetros (Kimura, 1980) e o dendrograma, pelo método do vizinho mais próximo (Saitou e Nei, 1987), conforme previamente descrito. As análises foram feitas separadamente para cada isolado. Cada dendrograma foi submetido à análise de “bootstrap” com 2.000 repetições (Felseinstein, 1985). O critério para definição de espécie constou da análise de seqüências de comprimento maiores que 1.400 pb e maior valor de identidade dentro do agrupamento (Garrity *et al.* 2002). Seqüências acima de 500 pb foram utilizadas para definição do gênero.

2.7. Perfil de ácidos graxos no sistema Sherlock® MIS

A classificação de bactérias baseia-se, atualmente, em análise de dados bioquímicos e moleculares numa abordagem multifásica. Deste modo, adicionalmente aos testes de utilização de fontes de carbono e análise de rDNA 16S, avaliou-se o perfil de ácidos graxos pelo sistema MIS (Sherlock® Microbial Identification System v. 4.0, MIDI Inc. 2001) dos isolados R57BN4, BSC475a e RVV11, para complementar os estudos de identificação. Colônias com 48 h de incubação em meio Tryptic Soy Agar (Merck) pH = 7,3, em placas de Petri, foram recolhidas a partir do terceiro quadrante, com uma alça estéril de polipropileno, e submetidas às etapas de saponificação, metilação, extração e lavagem. Alíquotas correspondentes a 2/3 da fase orgânica, foram transferidas para tubos de vidro de 3 ml de capacidade. Em seguida, a amostra foi submetida à leitura no cromatógrafo a gás Agilent 6890 GC. Os resultados do perfil de ácidos graxos totais (FAME) foram comparados na base de dados do sistema pelo programa Sherlock®, e as prováveis espécies, indicadas com respectivos valores de similaridade ao isolado testado (Stead *et al.*, 1992).

3. RESULTADOS

3.1. Sintomatologia

A mancha bacteriana em folhas de *Eucalyptus* spp. é visível a partir de pontos de infecção de 1 mm de diâmetro do tipo anasarca, os quais evoluem para pontos escuros visíveis contra a luz, a olho nu (Figura 1F). As lesões são tipicamente internervurais, angulare, anfigenas e apresentam exsudação de pus bacteriano (Figura 1G). Pequenas diferenças sintomatológicas podem ser observadas dependendo da espécie de *Eucalyptus*, idade da folha e do estágio de desenvolvimento da lesão. Por exemplo, em *E. grandis*, *E. urophylla* e *E. saligna*, as lesões apresentam halo avermelhado na face adaxial de folhas jovens em expansão ou completamente expandidas, e em folhas maduras (Figura 1J), e as lesões velhas são necróticas de cor palha (Figura 1I e J). Lesões necróticas em ramos (Figura 1K) e no pecíolo das folhas (Figura 1L) também foram observadas em *E. grandis*. Já, em *E. robusta* (Figura 1C) e clone de *E. urophylla* x *E. maidenii* (Figura 1H), lesões bacterianas são marrons e escuras, sem halo clorótico, e em *E. cloeziana* ocorrem lesões necróticas marrom-avermelhadas (Figura 1E).

Lesões isoladas atingem até 4 mm de diâmetro, coalescem no limbo e ao longo da nervura principal, em folhas jovens completamente expandidas e maduras, resultando num formato de espinha de peixe, típico de manchas foliares causadas por bactérias em *Eucalyptus* spp. (Figura 1B). O patógeno causa intensa desfolha, por induzir senescência da folha (Figura 1A) ou necrose do pecíolo (Figura 1L). Em alguns materiais genéticos, observa-se aborto da área foliar lesionada, restando limbos recortados (Figura 1I). A infecção em folha nova inicia-se com a anasarca pontual, mas desenvolve para necroses de bordas corticosas, orifícios no limbo no centro da lesão (Figura 1F e I) e limbo curvado lateralmente em relação ao plano da nervura principal. Em geral, as lesões distribuem-se aleatoriamente no limbo, apesar de se observar o padrão de lesões concentradas numa metade lateral da folha, além de necroses lineares ao longo da nervura lateral coletora do limbo foliar (Figura 1D). A coalescência de lesões na porção superior do limbo resulta na necrose e quebra da ponta da folha. Em viveiro, observa-se a desfolha de mudas, folhas com porção superior do limbo quebrado – ponta quebrada – e lesões nos bordos foliares.

3.2. Isolamento e características das colônias

Obtiveram-se 500 isolados, os quais apresentaram ampla variabilidade na morfologia das colônias, podendo ser agrupados em 4 classes: classe 1) colônias circulares, lisas, altas, convexas, amarelas brilhantes e mucóides; classe 2) colônias circulares, lisas, altas, convexas, beges brilhantes e mucóides; classe 3) colônias circulares, lisas, baixas, convexas, translúcidas, fluorescente em meio King B com exceção do isolado R203BN10; e classe 4) colônias circulares, lisas, baixas, convexas, beges claras, translúcidas, e brilhantes.

3.3. Patogenicidade

Dos 90 isolados inoculados, 25 foram selecionados para identificação, por terem sido patogênicos ao eucalipto e induzido reação de hipersensibilidade nas plantas não-hospedeiras. Dentre os isolados selecionados, todos induziram reação de hipersensibilidade em *Lycopersicon esculentum*, 19 em *Nicotiana tabacum*, 14 em *Coffea arabica* e sete em *Capsicum annum* (Tabela 1).

Todos os 25 isolados foram patogênicos a *Eucalyptus* spp., quando inoculados por injeção nos tecidos foliares. Todavia, quando o inóculo foi atomizado na superfície foliar, apenas os isolados ECLCAF03, BSC475a, RVV11, BSV16, BSV04 e AMP03 incitaram sintomas típicos da doença, com intensa exsudação de pus bacteriano a partir das lesões. No entanto, os sintomas causados pelos isolados ECLCAF03 e BSC475a são distintos daqueles causados por RVV11, BSV16 e AMP03. O reisolamento e a reinoculação comprovaram a patogenicidade destes isolados, cuja identificação foi confirmada pelo sistema MicroLog™ BIOLOG. Por outro lado, os isolados R203BN10, EGS15 e R57BN4 não causaram doença quando atomizados em eucalipto.

3.4. Identificação de bactérias ao nível de gênero

Dos 25 isolados selecionados, 14 foram típicos do gênero *Xanthomonas*, oito de *Pseudomonas* e apenas um isolado de *Erwinia*. Três isolados (R203BN10, RVV11 e BSV16) não se agruparam em quaisquer dos gêneros comumente conhecidos como patógenos foliares (Tabela 2).

3.5. Utilização de fontes de carbono no sistema MicroLog™ BIOLOG

À exceção de R57BN4, RVV11 e BSV16, todos os outros isolados foram identificados pelo sistema MicroLog™ BIOLOG (Tabela 3). Quatro isolados foram identificados como *Pseudomonas syringae* van Hall 1902, dois como *P. cichorii* e dois como *P. putida* (Trevisan 1889) Migula 1895. O perfil de utilização de fontes de carbono dos isolados MSF, BSV04, BSC475a, ESS01, BSC23, IP1-36, MST07, IP2-23, ECLCAF03, CAF05 foi idêntico ao da espécie *Xanthomonas axonopodis* Starr & Garces 1950 emend. Vauterin *et al* 1995, para resultados positivos e negativos. Os isolados R57-5, EUS14, EGS09 e AMPV1 apresentaram perfis de utilização de fontes de carbono comuns ao de *X. campestris*.

3.6. Análise filogenética de rDNA 16S

Os oligonucleotídeos universais amplificaram o rDNA16S de todos os isolados em estudo e resultaram numa banda de aproximadamente 1550pb, à exceção do isolado CAF05, o qual resultou num fragmento de 1.000 pb (Figura 2). Pela análise de agrupamento de seqüências parciais obtidas na primeira fase do trabalho, definiram-se quatro grupos de isolados, a partir dos quais foram desenhados os oligonucleotídeos internos (Tabela 4).

A seqüência completa da maioria dos genes foi obtida a partir de tais oligonucleotídeos e resultou em comprimento variável de 1.496 a 1.558 pb. No entanto, alguns clones renderam apenas seqüências parciais entre 400 e 1.000 pb. Os taxa indicados na análise filogenética (Figura 3) foram idênticos àqueles obtidos nas etapas anteriores.

Baseado na seqüência parcial de rDNA 16S do isolado RVV11, obteve-se 97% de similaridade com *Rhizobium* sp. (Frank 1879) Frank 1889, *Agrobacterium tumefaciens* (Smith & Townsend 1907) Conn 1942 e *Alpha proteobacterium*. No entanto, este isolado agrupou-se em *Rhizobium* sp.. A similaridade da seqüência de rDNA 16S do isolado RVV11 com outras espécies de bactérias fitopatogênicas foi de 41% com *E. psidii* Neto *et al* 1988, 74% com *X. axonopodis*, 75% com *Pantoea ananatis* e 76% com *Pseudomonas syringae*. A partir da seqüência completa de rDNA 16S do isolado BSV16, obteve-se 94% de similaridade com *Rhizobium* spp., *Allorhizobium undicola* de Lajudie *et al.* 1998 (= *Rhizobium undicola* Lajudie *et al.* 1998), *Agrobacterium tumefaciens*, *Agrobacterium radiobacter* (Beijerinck & van Delden 1902) Conn 1942

emend. Sawada *et al.* 1993 e *Alpha proteobacterium*, classe Proteobacteria. A similaridade deste isolado com espécies de outros gêneros fitopatogênicos foi de apenas 78% com *Erwinia psidii*, 80% com *Pseudomonas syringae* e *Pantoea ananatis*, e 81% com *Xanthomonas campestris*. O isolado BSV16 agrupou-se em *Rhizobium* spp. As demais espécies com valores de similaridade semelhante, formaram agrupamentos distintos.

3.7. Perfil de ácidos graxos no sistema Sherlock® MIS

Com base no perfil de ácidos graxos, o isolado R57BN4 foi identificado como *Erwinia* sp., apresentando similaridade de 61,2% com *Erwinia amylovora* (Burril 1882) Winslow *et al.* 1920 Hauben *et al.* 1998, 57,2% com *Enterobacter agglomerans* Ewing & Fife 1972 e 49,7% com o biótipo VI de *Pectobacterium chrysanthemi* Burkholder *et al.* 1953 Brenner *et al.* 1973 emend. Hauben *et al.* 1998 (= *Erwinia chrysanthemi* Burkholder *et al.* 1953). O isolado BSC475a foi identificado como *Xanthomonas axonopodis* (sim.= 45,0%) e o isolado RVV11 não pôde ser identificado devido à inexistência de ácidos graxos de referência na base de dados do sistema (Tabela 5).

4. DISCUSSÃO

Manchas foliares de *Eucalyptus* spp., causadas por bactérias, caracterizam-se por anasarca, lesões angulares, halos cloróticos, lesões longilíneas nas bordas da folha, perfurações no limbo foliar, necrose na porção superior do limbo e lesões em forma de espinha de peixe ao longo da nervura principal. Manchas foliares de causa fúngica e abiótica são bem descritas e ilustradas para *Eucalyptus* spp. (Ferreira, 1989; Ferreira e Milani, 2001; Alfenas *et al.*, 2004), sendo distintas do quadro sintomatológico de manchas causadas por bactérias. A mancha bacteriana do eucalipto diferencia-se das demais manchas foliares da cultura pelos sintomas descritos e pela exsudação de pus bacteriano. Dentre as doenças causadas por fungos, a mancha de *Phaeophleospora epicoccoides* (Cooke & Masee) Crous, Ferreira & Sutton, em plantas que resultam em clorose avermelhada na face adaxial, pode ser confundida com a mancha bacteriana, em vista do aspecto angular da lesão em ambas as doenças. Contudo, a esporulação escura do patógeno na face abaxial da folha e a ausência de anasarca na lesão fúngica, permitem a distinção entre estas doenças.

Pela reação de hipersensibilidade em plantas não-hospedeiras, selecionaram-se isolados bacterianos patogênicos a *Eucalyptus* spp., sendo que *Lycopersicon esculentum* foi mais sensível em indicar isolados fitopatogênicos que *Nicotiana tabacum*, *Capsicum annum* e *Coffea arabica*. A injeção de suspensão de bactérias no mesófilo foliar de plantas não-hospedeiras, visa selecionar isolados fitopatogênicos, os quais possuem a capacidade de incitar reação de hipersensibilidade (Romeiro, 2001). A inoculação em *Eucalyptus* spp. por injeção de suspensão de inóculo permitiu selecionar isolados fitopatogênicos, fato comprovado em inoculações por atomização sem ferimento. Por outro lado, isolados de *Pseudomonas syringae* e *Erwinia* sp., causadores de necrose, quando injetados na folha, não induziram doença quando atomizados no próprio hospedeiro ou em híbrido de *E. urophylla* x *E. maidenii*.

A inoculação de hospedeiros com fitobactérias pode ser realizada pela deposição do inóculo sobre o órgão da planta com ou sem ferimento, ou pela introdução de suspensão de células da bactéria por injeção. A infiltração de células bacterianas no mesófilo do hospedeiro, para testes de patogenicidade, propicia o rápido desenvolvimento da doença e a seleção de isolados fitopatogênicos (Schaad *et al.*, 2001). Isolados bacterianos fitopatogênicos, quando infiltrados no hospedeiro, podem não causar doença quando atomizados em plantas sem ferimentos. Nestes casos, a

presença de ferimentos no hospedeiro pode ser importante na resposta quimiotóxica do patógeno para mobilidade e penetração (Josenhans e Suerbaum, 2002). Dentre os 25 isolados fitopatogênicos, nove foram atomizados em *Eucalyptus* spp. e seis resultaram em sintomas típicos da doença, os quais foram identificados como *X. axonopodis* (BSC475a e ECLCAF03), *X. campestris* (AMPV01), *P. cichorii* (AMP03) e *Rhizobium* sp. (RVV11 e BSV16). Os isolados R203BN10 e EGS15 (*P. syringae*) quando atomizados em seu próprio hospedeiro, não causaram sintomas, embora tenham incitado reação de hipersensibilidade em *Nicotiana tabacum*, *Lycopersicon esculentum* e *Capsicum annum*. Do mesmo modo, R57BN4 (*Erwinia* sp.) quando inoculado por atomização em plantas de *E. urophylla* x *E. maidenii*, também não causou sintomas. A prova de patogenicidade requer a inoculação de bactéria virulenta em hospedeiro suscetível sob condições favoráveis à doença. Bactérias causadoras de manchas foliares respondem a estímulos químicos das portas de entrada – ferimentos, estômatos, hidatódios e lenticelas - penetram e multiplicam-se nos espaços intercelulares (Swings e Civerolo, 1993). Para estabelecer a infecção sob condições naturais, o patógeno requer água livre na superfície da folha e congestionamento de água nos espaços intercelulares. O condicionamento prévio de plantas sob nevoeiro a 25 °C por 24 h, e a manutenção das plantas às mesmas condições por mais 48 h são consideradas condições favoráveis ao estabelecimento de infecção por bactérias fitopatogênicas (Swings e Civerolo, 1993). A ausência de sintomas em plantas de *E. robusta* e *E. grandis* atomizadas com *Pseudomonas syringae*, indica a necessidade de estudos sobre condições que favoreçam a doença. Dentre os possíveis fatores envolvidos, a agressividade do isolado bacteriano, os ferimentos nos órgãos inoculados e o estado nutricional e fisiológico do hospedeiro, devem ser avaliados. Os isolados MRP03 e MST09 de *P. putida*, causaram reação de hipersensibilidade em *Nicotiana tabacum* e *Lycopersicon esculentum*, bem como sintomas necróticos quando infiltrados em folhas de *E. urophylla* x *E. maidenii*. No entanto, esta espécie é considerada não-fitopatogênica (Bradbury, 1986). Estudos posteriores deverão elucidar a associação desta espécie em manchas foliares do eucalipto.

A análise filogenética de seqüências de rDNA16S de 13 isolados bacterianos do eucalipto, posicionou estes isolados em quatro gêneros: *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Erwinia* e *Rhizobium*. O isolado BSC475a, previamente classificado em *X. axonopodis*, ficou fora do grupo da espécie-tipo. Analogamente, EUS14, previamente classificado como *X. campestris*, ficou entre as espécies tipo de *X. campestris* e

X. axonopodis na análise conjunta dos 13 isolados. A análise de seqüências completas de rDNA 16S do isolado BSC475a e de todas as espécies fitopatogênicas de *Xanthomonas* spp., permitiu seu posicionamento no grupo de *X. axonopodis*, *X. codiaei* e *X. vasicola*, com 99% de identidade com o isolado de eucalipto. Por outro lado EUS14 agrupou-se com seis espécies de *Xanthomonas*, inclusive *X. campestris*. A definição do táxon para isolados agrupados em mais de uma espécie, baseou-se nos resultados obtidos nos testes de utilização de fontes de carbono. No caso do isolado BSC475a, a análise de perfil de ácidos graxos complementou a identificação. A utilização de técnicas moleculares e bioquímicas numa abordagem complementar, é o método mais apropriado para a identificação de microrganismos. A reclassificação do gênero *Xanthomonas* estabeleceu 20 espécies a partir da similaridade de DNA total, análise filogenética de rDNA 16S e perfil de utilização de fontes de carbono (Vauterin *et al.*, 1995), e outros estudos taxonômicos têm utilizado abordagens multifásicas, tal como neste trabalho. As árvores filogenéticas, com seqüências de rDNA 16S, e o perfil de utilização de fontes de carbono dos isolados de bactérias do eucalipto, classificados em *Xanthomonas*, permitiram separá-los em *X. campestris* e *X. axonopodis*. Foram encontrados quatro isolados de *P. syringae*, dois isolados de *P. cichorii* e dois isolados de *P. putida*. A análise de rDNA16S dos isolados BSV16 e RVV11 permitiu classificá-los em *Rhizobium* sp.. A análise bioquímica no sistema MicroLog™ BIOLOG não permitiu a identificação destes, uma vez que os mesmos utilizaram todas as 95 fontes de carbono da microplaca. O isolado RVV11 também foi submetido à identificação pela análise do perfil de ácidos graxos no sistema Sherlock® MIS. Contudo, o sistema não permitiu sua identificação por ausência de ácidos graxos de referência em sua base de dados. O gênero *Rhizobium* abrange espécies simbióticas fixadoras de nitrogênio, não-simbióticas e espécies rizogênicas e tumorogênicas (Young *et al.*, 2001). A classificação definitiva dos isolados bacterianos causadores de manchas foliares do eucalipto, RVV11 e BSV16, requer mais estudos a fim de melhor caracterizar bioquímica e geneticamente estes isolados. A classificação destes em *Rhizobium* sp. pode ser devido à ausência de seqüência com maior homologia na base de dados do GenBank. Para tanto, estudos de reassociação de DNA total com espécies de *Rhizobium*, e espécime-tipo de cada gênero de bactérias fitopatogênicas, além de testes bioquímicos e fisiológicos básicos, devem ser realizados.

O isolado R57BN4 foi classificado em *Erwinia* sp. pela análise filogenética da seqüência parcial de rDNA16S. Este isolado utilizou todas as fontes de carbono

utilizadas por mais de 80% dos isolados de *Erwinia amylovora* (MicroLog, 4.01 Guia do Usuário); porém, o sistema indicou valores de similaridade abaixo de 0,5. Pela análise de perfil de ácidos graxos, o isolado apresenta similaridade com *Erwinia amylovora* (similaridade = 61,2%), *Pantoea agglomerans* (= *Enterobacter agglomerans* Ewing & Fife 1972) (similaridade=57,2%) e *Pectobacterium chrysanthemi* (Burkholder 1953) Brenner et al. 1973 emend. Hauben et al. 1998 (= *Erwinia chrysanthemi* Burkholder 1953 biótipo VI (similaridade = 49,7%). Seis espécies do grupo *Erwinia/Pantoea* (*Pantoea agglomerans*, *Pantoea ananatis*, *Pantoea stewartii* (Smith 1898) Megaert et al. 1993, *Erwinia amylovora*, *Pectobacterium chrysanthemi* e *Erwinia rhapontici* (Millard 1924) Burkholder 1948 emend. Hauben et al. 1998) são consideradas na base de dados do sistema (Sherlock® MIS v. 4.0). Deste modo, embora valores de similaridade acima de 0,3 (=30%) indiquem a espécie, a ausência de ácidos graxos de referência de outras espécies de *Erwinia*, *Pantoea*, *Brenneria* Hauben et al. 1999 e *Pectobacterium* Waldee 1945 na base de dados, limita a confirmação da identificação. *Erwinia* sp. foi relatada em *Eucalyptus* spp. no Paraná, associada à seca de ponteiros (Maschio et al., 1997) e em Teixeira de Freitas, Bahia, causando manchas foliares (Ferreira e Milani, 2003).

Testes de utilização de fontes de carbono em microplacas são apropriados para identificar fitobactérias por possibilitar ampla análise de perfil bioquímico combinado à taxonomia numérica (Jones et al., 1993). No entanto, este sistema apresenta limitações para identificação de isolados atípicos e não contempla a diversidade de bactérias existentes. Esta mesma limitação encontra-se no sistema de análise de perfil de ácidos graxos, Sherlock® MIS.

Xanthomonas campestris e *P. syringae* encontravam-se associadas às lesões de *E. grandis* e *E. saligna*, bem como *X. axonopodis* e *P. syringae* em *E. urophylla*, e *X. axonopodis* e *Rhizobium* sp. em híbrido de *E. grandis* x *E. urophylla*. No gênero *Xanthomonas*, há isolados considerados patógenos oportunistas ou secundários, os quais se associam com *P. syringae* ou com outros patógenos em manchas foliares (Gitaitis et al., 1987). Por outro lado, diferentes bactérias podem causar manchas foliares com sintomas semelhantes no mesmo hospedeiro (Bouzar et al., 1993). O isolamento de bactérias fitopatogênicas de diferentes espécies a partir de lesões numa mesma planta de eucalipto, pode indicar que ambas as espécies estão causando manchas foliares no mesmo hospedeiro. A importância relativa de cada patógeno, nestes casos, pode

determinar a orientação de medidas de controle, tal como a seleção de genótipos resistentes (Louws *et al.*, 1999).

Análises fenotípicas como morfologia, reação de Gram, sorologia com antígenos específicos (ELISA), utilização de fontes de carbono MicroLog™ BIOLOG, perfil de ácidos graxos (FAME) e perfis isoenzimáticos têm sido avaliadas num enfoque multifásico para identificação de bactérias fitopatogênicas (Schaad *et al.*, 2001). Contudo, características bioquímicas podem variar de acordo com as condições do meio e podem conduzir a uma classificação incorreta, que não expressa o relacionamento genético entre microrganismos, sendo necessário, portanto, a utilização de métodos moleculares baseados no estudo de ácidos nucléicos (Louws *et al.*, 1999). Dentre os métodos de análise de ácidos nucléicos em bactérias, a análise direta de DNA plasmidial e, ou, genômico é menos desejável que métodos baseados em PCR, uma vez que este último é geralmente mais específico, sensível e rápido (Louws *et al.*, 1999). A análise de correlações filogenéticas de seqüências de rDNA16S de bactérias, tem sido amplamente utilizada em bacteriologia para a identificação ao nível de espécie, dada a sua distribuição universal e função preservada, possuindo seqüências variáveis e conservadas (Cilia *et al.*, 1996). Contudo, em casos de espécies geneticamente próximas, a separação das mesmas pela análise filogenética de rDNA16S pode ser limitada (Cilia *et al.*, 1996), uma vez que o isolado de interesse pode não agrupar unicamente com a espécie a qual pertence, e os valores de similaridade do rDNA 16S podem ser idênticos dentro do grupo. Adicionalmente, testes fenotípicos devem ser realizados para separar taxa muito próximos.

Os resultados deste trabalho permitem concluir que manchas foliares do eucalipto no Brasil, não-associadas a fungos e com exsudação de pus, são causadas por diferentes espécies de bactérias, classificadas em *X. axonopodis*, *X. campestris*, *P. syringae*, *P. cichorii*, *P. putida*, *Erwinia* sp. e *Rhizobium* spp.. *Erwinia* spp. e *P. syringae* estão associadas à doença no campo e causam sintomas em *Eucalyptus* spp., quando inoculadas por injeção, além de causar HR em plantas não-hospedeiras. Por outro lado, estes isolados não causaram sintomas quando inoculados por atomização. *Pseudomonas putida*, isolada de manchas foliares de eucalipto, induziu HR em plantas não-hospedeiras e necrose em *Eucalyptus* spp. quando inoculada por injeção. A constatação de *X. campestris*, *P. cichorii* e *Erwinia* sp., confirma os relatos preliminares destas espécies causando doença em eucalipto no Brasil (Reis *et al.*, 1996; Pomella *et al.*, 1995; Maschio *et al.*, 1997).

O grande número de espécies de bactérias encontradas associadas às manchas foliares do eucalipto no Brasil, deve-se, provavelmente, à ausência de um levantamento abrangente, tal como o realizado neste trabalho. As mudanças no manejo da cultura do eucalipto, a partir da seleção e plantio em larga escala de clones com características industriais superiores, são apontadas como favoráveis ao aparecimento desta e de outras doenças.

Xanthomonas axonopodis foi a espécie com maior distribuição geográfica e mais frequentemente detectada, sendo encontrada em plantas no viveiro e no campo nos Estados de São Paulo, Minas Gerais, Bahia e Mato Grosso do Sul.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFENAS, A. C.; ZAUZA, E. A.; MAFIA, R. G. ASSIS, T. F. **Clonagem e doenças do eucalipto**. Viçosa, MG. Editora UFV. 2004. 442p.
- AUSUBEL, F. M., BRENT, R., KINGSTON, R. E., MOORE, D. D., SEIDMAN, J. G., SMITH, J. A., STRUHL, K. **Current protocols in molecular Biology**. Vol. I. New York: Greene Publishing Association; Wiley-Interscience. 1992.
- BENSON, D. A., BOGUSKI, M.S., LIPMAN, D.J., OSTELL, J., OUELLETTE, B.F., RAPP, B.A., WHEELER, D.L. GenBank. **Nucleic Acids Research**, 27: 12-17. 1999.
- BOUZAR, H., JONNES, J. B., STALL, R. E., HODGE, N. C., MINSAVAGE, G. V., ALVAREZ, A., BEAULIEU, C. Abstract of the Sixth Congress of Plant Pathology, p.36. 1993.
- BRADBURY, J.F. **Guide to the plant pathogenic bacteria**. CAB International Mycological Institute, Kew, UK. 1986.
- COUTINHO, T., PREISIG, O. MERGAERT, J., CNOCKAERT, M. C., RIEDEL, K. H., SWUINGS, J., WINGFIELD, M. J. Bacterial blight and dieback of *Eucalyptus* species, hybrids, and clones in South Africa. **Plant Disease**, 86: 20-25. 2002.
- CILIA, V., LAFAY, B., CHRISTEN, R. Sequences heterogeneities among 16S ribosomal RNA sequences and their effects on phylogenetics analyses at the species level. **Molecular Microbiology Evolutionary**, 13: 451-461. 1996.
- DHINGRA, O. D., SINCLAIR, J. B. **Basic plant pathology methods**. CRC Press. Inc. 1995.
- FELSEINSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: An approach to using the bootstrap. **Evolution**, 39: 783-791. 1985.
- FERREIRA, F. A. **Patologia florestal: Principais doenças florestais no Brasil**. Viçosa, UFV: SIF, 1989. 570p.
- FERREIRA, F. A., MILANI, D. **Diagnose visual e controle das doenças abióticas e bióticas do eucalipto no Brasil**. Mogi Guaçu, SP: International Paper. 2002.
- JONES, J.B., CHASE, A.R., HARRIS, G.K. Evaluation of the BIOLOG GN MicroPlate system for identification of some plant-pathogenic bacteria. **Plant Disease**, 77: 553-558. 1993
- GARRITY, G. M., JOHNSON, K. L., BELL, J., SEARLES, D. B. **Taxonomic outline of the procaryotes**. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2th ed. New York, Springer - Verlag. 2002. (Release 3.0; DOI: 101007 / bergueyoutline 200210).

- GITAITIS, R. D., SASSER, M. J., BEAVER, R. W., MCILNNE, T. B., STALL, R. E. Pectolytic xanthomonads in mixed infections with *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *P. syringae* pv. *tomato*, and *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in tomato and pepper transplants. **Phytopathology**, 77: 611-615. 1987.
- GONÇALVES, R. C., ALFENAS, A. C., OLIVEIRA, J. R., SILVA, I. T., ODA, S., ASSIS, T. F., TONON, A. Mancha foliar e seca de ponteiros do eucalipto causada por fitobactérias, no Brasil e na Argentina. **Fitopatologia Brasileira**, 26: 294. 2001. (Abstract).
- HANAHAN, D. Studies on transformation of *E. coli* with plasmids. **Journal Molecular Biology**, 166: 557-580. 1983.
- HAUBEN, L., VAUTERIN, L., SWINGS, J., MOORE, E. R. B. Comparison of 16S ribosomal DNA sequences of all *Xanthomonas* species. **International Journal of Systematic Bacteriology**, 47, 328-335. 1997.
- JOSEPHANS C, SUERBAUM S. The role of motility as a virulence factor in bacteria. **International Journal of Medical Microbiology**, 291(8): 605-614. 2002.
- KADO, E. I., HESKETT, M. G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. **Phytopathology**, 60: 969-976. 1970.
- KLEMENT, Z., FARKAS, G. L., LOVREKOVICH, L. Hypersensitive reaction induced by phytopathogenic bacteria in the tobacco leaf. **Phytopathology**, 54: 474-477. 1964.
- KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal Molecular Evolutionary**, 16: 111-20.1980.
- LOUWS, F. J., RADEMAKER, J. L. W., BRUIJN, F. J. The three Ds of pcr-based genomic analysis of phyto bacteria: diversity, detection, and disease diagnosis. **Annual Review of Phytopathology**, 37: 81-125. 1999.
- MASCHIO, L. M. A., ANDRADE, F. M., LEITE, M. S. P., BELLOTE, F. J., FERREIRA, C. A., IEDE, E. T., NARDELI, A. M. B., AUER, C. G., GRIGOLLETI, A., WIECHETEK, M. Seca dos ponteiros do eucalipto em Arapoti-PR. In: CONFERÊNCIA IUFRO DE SILVICULTURA E MELHORAMENTO DE EUCALIPTOS, 3. Salvador – BA. 1997. **Anais...** p.353-359.
- MOORE, L. W., KADO, C. I., BOUZAR, H. *Agrobacterium*. In: SCHAAD, N. W. (Ed.) 2 th. **Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria**. St. Paul: The American Phytopathological Society. 1988. p.16-36.
- POMELLA, A. W. V., ROMEIRO. R. S., FERREIRA, F. A. OLIVEIRA, J. R. Lesões foliares em viveiro de eucalipto incitadas por uma espécie fluorescente de *Pseudomonas*. **Fitopatologia Brasileira**, 20: 374. 1995.

- REIS, A. V., SOUZA, R. M., CASTRO, H. A., CARDOSO, M. A. F. C., KOBAYASTI, L. Uma nova bacteriose em mudas de eucalipto incitada por *Xanthomonas campestris*. **Fitopatologia Brasileira**, 21: 342. 1996.
- ROMEIRO, R. S. **Métodos em bacteriologia de plantas**. Viçosa, MG: Editora UFV. 2001.
- SAITOU, N., NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology Evolution**, 4: 406-425. 1987.
- SCHAAD, N. W. Initial identification of common genera. In: SCHAAD, N. W., JONES, J. B., CHUN, W. (Ed.). **Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria**. 3th. ed. St. Paul. Minnesota: The American Phytopathological Society. 2001.
- SCHAAD, N. W., JONES, J. B., LACY, G. H. *Xanthomonas*. In: SCHAAD, N. W., JONES, J. B., CHUN, W. (Ed.). **Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria**. 3th. ed. St. Paul. Minnesota: The American Phytopathological Society. 2001.
- STEAD, D. E., SELLWOOD, J. E., WILSON, J., VINEI, I. Evaluation of a comercial microbial identification system based on fatty acid profiles for rapid accurate identification of plant pathogenic bacteria. **Journal Applied of Bacteriology**, 72:315-321. 1992.
- STEPHEN, A. F., MADDEN T. L., SCHAFFER, A. A., ZHANG, J., ZHANG, Z., MILLER, W., LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, 25: 3389-3402. 1997.
- SWINGS, J. CIVEROLO, E.L. *Xanthomonas*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. 1993. 416p.
- VAUTERIN, L., HOSTE, B., KERSTERS, K., SWINGS, J. Reclassification of *Xanthomonas*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, 45: 472-489. 1995.
- YOUNG, J. M.; KUYKENDALL, L. D.; MARTINEZ-ROMERO, E.; KERR, A.A. A revision of *Rhizobium* Frank 1889, with an emended description of the genus, and the inclusion of all species of *Agrobacterium* Conn 1942 and *Allorhizobium undicola* de Lajudie *et al* 1998 as new combinations: *Rhizobium radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. rubi*, *R. undicola* and *R. vitis*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 51: 89-103. 2001.
- WEINSBURG, W. G., BARNS, S. M., PELLETIER, D. A., LANE, D. J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal Bacteriology**, 173: 697-703. 1991.

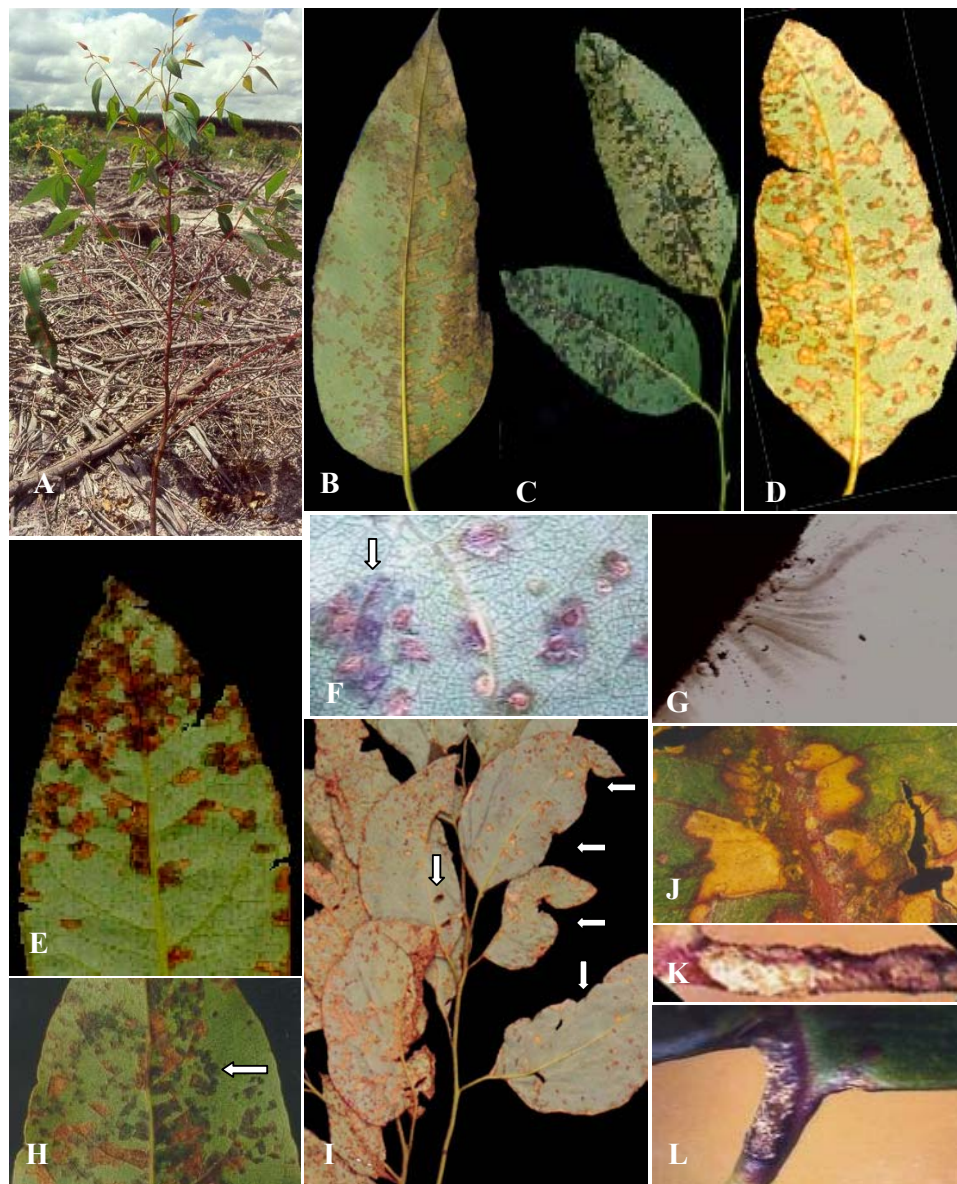


FIG. 1 – Sintomas da mancha bacteriana em *Eucalyptus* spp.. A - desfolha em *E. grandis* x *E. urophylla*; B - lesões angulares em formato espinha de peixe em *E. grandis*; C – mancha bacteriana em *E.robusta*; D - lesões coalescidas no limbo e nas bordas de folha de *E. urophylla*; E - lesões escuras e avermelhadas de formato angular no centro e nas bordas de folha de *E. cloeziana*; F– congestionamento de água nos espaços intercelulares e lesões pontuais em *E. grandis*; G – exsudação de pus bacteriano a partir do tecido lesionado; H – anasarca e lesões necróticas em folha de *E. urophylla* x *E. maidenii*; I – limbos recortados e perfurados em *E. grandis*; J - coalescência de lesões e halo clorótico avermelhado em folhas de *E. grandis*; K – lesões em ramos de *E. grandis*; e L – lesões no pecíolo de folha de *E. grandis*.

TABELA 1 – Isolados de bactérias fitopatogênicas, obtidos de plantas de *Eucalyptus* spp. de diferentes idades, inoculados em plantas de fumo (*Nicotiana tabacum*), café (*Coffea arabica*), pimentão (*Capsicum annum*), tomate (*Lycopersicon esculentum*) e eucalipto *Eucalyptus* spp.

Isolado	Plantas inoculadas					Isolado	Plantas inoculadas				
	fumo	café	pimentão	tomate	eucalipto		fumo	café	pimentão	tomate	eucalipto
IP1-03	HR	-	-	HR	+	IP2-12	-	-	-	HR	+
IP1-05	HR	HR	HR	HR	+	IP2-15	-	-	-	HR	+
IP1-10	-	-	-	HR	+	IP2-18	-	-	-	HR	+
IP1-27	-	-	-	-	-	IP2-23	-	-	-	HR	+
IP1-36	HR	-	-	HR	+	IP2-40	-	-	-	-	-
EGS-02	HR	HR	-	HR	+	EUS-07	-	-	-	-	-
EGS-07	HR	-	-	HR	-	EUS-11	HR	-	HR	HR	+
EGS-09	HR	HR	-	HR	+	EUS-14	HR	HR	-	HR	+
EGS-15	HR	-	HR	HR	+	EUS-16	HR	HR	-	HR	+
EGS-29	HR	HR	-	HR	+	EUS-31	HR	HR	-	HR	+
ESS-01	HR	HR	-	HR	+	BSV-04	-	-	-	HR	+
ESS-08	HR	-	HR	HR	+	BSV-09	-	-	-	HR	+
ESS-11	HR	HR	-	-	+	BSV-16	HR	HR	HR	HR	+
ESS-27	HR	HR	-	HR	+	BSV-17	-	-	-	HR	+
ESS-28	HR	-	-	-	+	BSV-25	-	-	-	HR	+
BSC-04	-	HR	-	HR	+	RV-01	-	-	-	-	-
BSC-12	-	HR	-	-	+	RV-04	-	-	HR	-	-
BSC-14	-	-	-	-	+	RV-05	-	-	HR	-	-
BSC-17	HR	-	-	HR	+	RV-11	HR	HR	HR	-	+
BSC-23	HR	HR	-	HR	+	RV-16	HR	HR	HR	-	+
AMF-01	HR	HR	HR	HR	+	R203BN-01	-	HR	-	-	-
AMF-02	HR	HR	HR	HR	+	R203BN-03	-	HR	-	HR	+
AMF-03	HR	-	HR	HR	+	R203BN-04	-	HR	-	HR	-
AMF-04	HR	HR	HR	HR	+	R203BN-08	-	-	-	HR	+
AMF-05	-	-	-	-	-	R203BN-10	HR	-	HR	HR	+
AMPV-01	-	-	HR	HR	+	CAF-01	-	-	-	-	-
AMPV-02	-	-	HR	HR	+	CAF-02	-	-	-	-	-
AMPV-03	-	-	HR	HR	+	CAF-03	-	-	-	-	-
AMPV-04	-	-	HR	HR	+	CAF-04	-	-	-	-	-
AMPV-05	-	-	HR	HR	+	CAF-05	HR	-	-	HR	+
ECLCAF-01	-	-	-	-	-	MST-01	HR	-	-	HR	+
ECLCAF-02	-	-	-	HR	+	MST-07	HR	-	HR	HR	+
ECLCAF-03	-	-	-	HR	+	MST-09	-	-	-	HR	+
ECLCAF-04	-	-	-	HR	+	MST-14	HR	-	HR	HR	+
ECLCAF-05	-	-	-	HR	+	MST-15	HR	-	HR	HR	+
MRP-03	HR	-	HR	HR	+	MS-A	-	-	-	HR	+
MRP-04	-	-	HR	HR	+	MS-B	-	-	-	-	+
MRP-05	-	-	HR	HR	+	MS-C	-	-	-	HR	+
MRP-07	-	-	-	-	+	MS-D	-	-	-	-	+
MRP-09	-	-	-	-	-	MS-F	-	-	-	HR	+
R57-02	HR	-	HR	HR	+	BSC475A	-	-	-	HR	+
R57BN-04	HR	-	HR	HR	+	BSC475F	-	-	-	HR	+
R57-05	HR	-	HR	HR	+	BSC475H	-	-	-	HR	+
R57-06	-	-	-	-	-	BSC475I	-	-	-	HR	+
R57-07	-	-	HR	HR	+	BSC475J	-	-	-	HR	+

+ = patogênico; - = não-patogênico e HR negativo; HR = reação de hipersensibilidade. Os isolados em negrito foram selecionados para identificação.

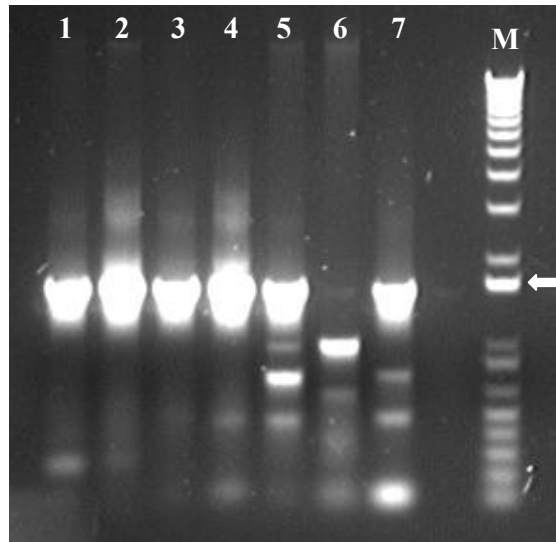


FIG. 2 – Produto de amplificação de rDNA 16S de isolados bacterianos (1 a 7), obtidos de manchas foliares de eucalipto. A seta no marcador de tamanho (M) indica a banda de 1.636 pb.

TABELA 2 – Isolados de bactérias fitopatogênicas obtidos de plantas de *Eucalyptus* spp. de diferentes idades a partir de diferentes populações em viveiro e campo e testes indicativos de gênero.

Isolado	Hospedeiro de origem	Região	Idade (meses)	Local	KOH	Gram	A	B	C	D	E	Classe morfológica da colônia ²	Gênero
AMP03	<i>E. grandis</i> ¹	Porto Grande – AP	06	campo	+	-	+	-	-	-	+	3	<i>Pseudomonas</i>
AMPV01	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i> *	Porto Grande – AP	02	viveiro	+	-	-	+	-	+	-	1	<i>Xanthomonas</i>
BSV04	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i> *	Teixeira de Freitas – BA	02	viveiro	+	-	-	+	-	+	-	1	<i>Xanthomonas</i>
BSV16	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i> *	Teixeira de Freitas – BA	02	viveiro	+	-	+	-	-	-	-	2	Indeterminado
BSC475a	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i> *	Teixeira de Freitas - BA	06	campo	+	-	-	+	-	+	-	1	<i>Xanthomonas</i>
BSC23	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i> *	Teixeira de Freitas - BA	06	campo	+	-	+	+	-	+	-	1	<i>Xanthomonas</i>
CAF05	<i>E. grandis</i> *	Bom Despacho – MG	02	viveiro	+	-	-	+	-	+	-	1	<i>Xanthomonas</i>
ECLCAF03	<i>E. clöziana</i>	Dionísio - MG	02	viveiro	+	-	-	+	-	+	-	1	<i>Xanthomonas</i>
ESS01	<i>E. saligna</i>	Itapetininga – SP	12	campo	+	-	-	+	-	+	-	1	<i>Xanthomonas</i>
ESS08	<i>E. saligna</i>	Itapetininga – SP	12	campo	+	-	+	-	-	-	+	3	<i>Pseudomonas</i>
EGS09	<i>E. grandis</i>	Itapetininga – SP	12	campo	+	-	-	+	-	+	-	1	<i>Xanthomonas</i>
EGS15	<i>E. grandis</i>	Itapetininga – SP	12	campo	+	-	+	-	-	-	+	3	<i>Pseudomonas</i>
EUS11	<i>E. urophylla</i>	Itapetininga – SP	12	campo	+	-	+	-	-	-	+	3	<i>Pseudomonas</i>
EUS14	<i>E. urophylla</i>	Itapetininga – SP	12	campo	+	-	-	+	-	+	-	1	<i>Xanthomonas</i>
IP1-05	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i> *	Mogi Guaçú – SP	02	viveiro	+	-	+	-	-	-	+	3	<i>Pseudomonas</i>
IP1-36	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i> *	Mogi Guaçú – SP	02	viveiro	+	-	-	+	-	+	-	1	<i>Xanthomonas</i>
IP2-23	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i> *	Mogi Guaçú – SP	02	viveiro	+	-	-	+	-	+	-	1	<i>Xanthomonas</i>
MSF	<i>E. grandis</i> *	Três Lagoas – MS	06	campo	+	-	-	+	-	+	-	1	<i>Xanthomonas</i>
MST07	<i>E. grandis</i> *	Monte Dourado - PA	06	campo	+	-	-	+	-	+	-	1	<i>Xanthomonas</i>
MST09	<i>E. grandis</i> *	Monte Dourado – PA	06	campo	+	-	+	-	-	-	+	3	<i>Pseudomonas</i>
MRP03	<i>E. grandis</i> *	Porto Grande – AP	06	campo	+	-	+	-	-	-	+	3	<i>Pseudomonas</i>
R57BN4	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i> x <i>E. robusta</i>	Barra do Ribeiro - RS	18	campo	+	-	+	-	+	-	-	4	<i>Erwinia</i>
R203BN10	<i>E. robusta</i>	Barra do Ribeiro - RS	18	campo	+	-	+	-	-	-	-	3	Indeterminado
R57.5	<i>E. robusta</i>	Barra do Ribeiro - RS	18	campo	+	-	-	+	-	+	-	1	<i>Xanthomonas</i>
RVV11	<i>E. urophylla</i> x <i>E. maidenii</i> *	Barra do Ribeiro - RS	02	viveiro	+	-	+	-	-	-	-	2	Indeterminado

¹ populações clonais. A – asparagina, B – xantomonadina, C – anaerobiose facultativa, D – crescimento mucóide em YDC a 33 °C, E – fluorescência em meio King B.

²1: colônias circulares, lisas, altas, convexas, amarelas brilhantes e mucóides; 2: colônias circulares, lisas, altas, convexas, beges brilhantes e mucóides; 3: colônias circulares, lisas, baixas, convexas, translúcidas e fluorescente em meio King B; 4: colônias circulares, lisas, baixas, convexas, beges claras, translúcidas e brilhantes.

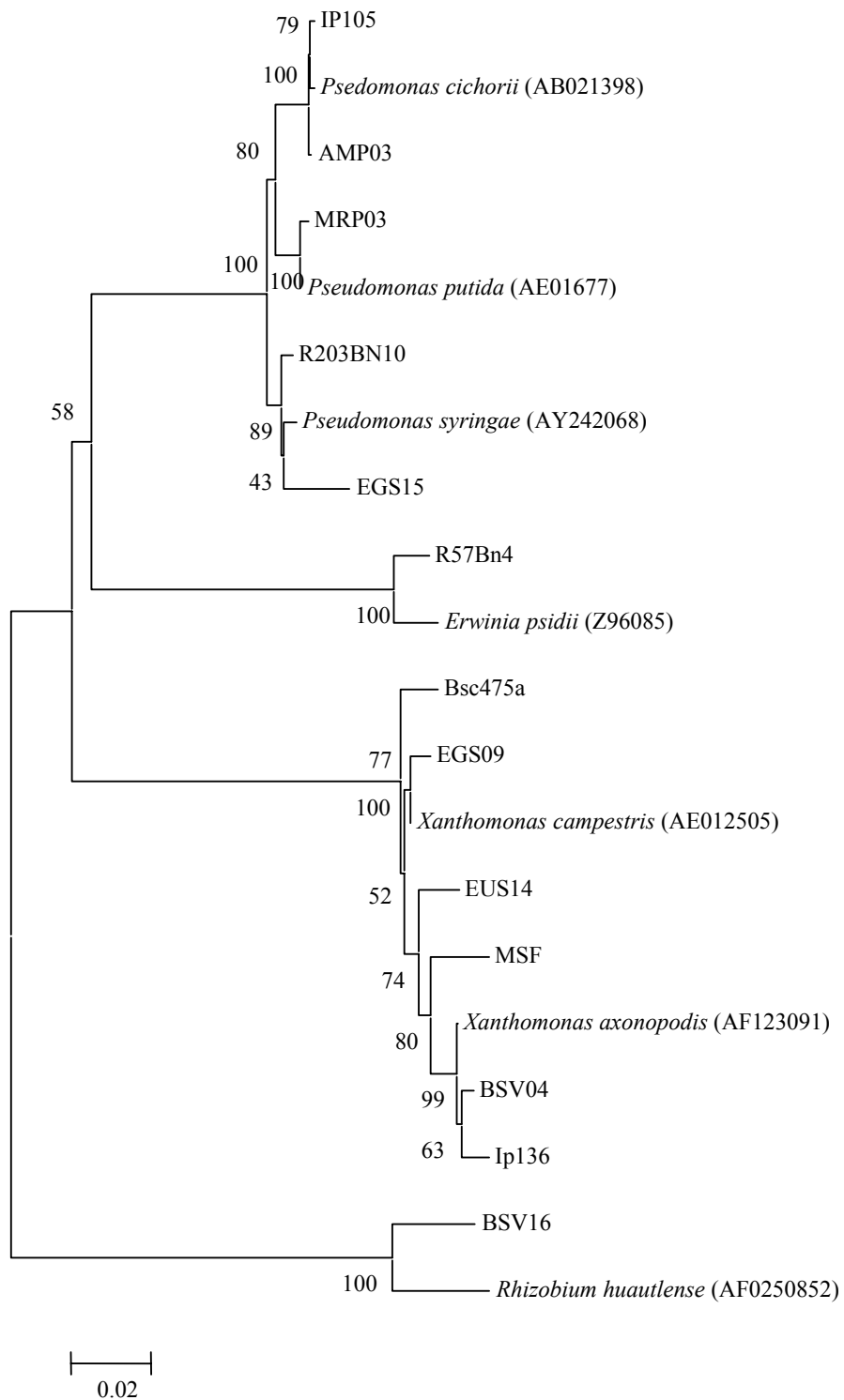


FIG. 3 – Dendrograma filogenético de seqüências completas de rDNA16S de bactérias fitopatogênicas isoladas de manchas foliares de eucalipto. Topologia construída no programa Mega pelo método do vizinho mais próximo e análise de “bootstrap” sobre 2.000 árvores.

TABELA 3 - Identificação bioquímica e molecular ao nível de gênero e espécie de bactérias fitopatogênicas, associadas a manchas foliares de *Eucalyptus* spp.

Código do isolado	Local	Gênero	Espécie identificada em MicroLog™ BIOLOG	P (%) / SIM	Espécie identificada pela análise filogenética do rDNA 16S ³	Identidade ²
AMP03 ⁴	Campo-AP	<i>Pseudomonas</i>	<i>P. cichorii</i>	100 / 0,7	<i>P. cichorii</i>	98
AMPV01 ⁴	Viveiro-AP	<i>Xanthomonas</i>	<i>X. campestris</i>	91 / 0,8	<i>Xanthomonas</i> sp.	96
BSV04	Viveiro-BA	<i>Xanthomonas</i>	<i>X. axonopodis</i>	91 / 0,8	<i>X. axonopodis</i>	98
BSV16 ⁴	Viveiro-BA	Indeterminado	Indeterminado	-	<i>Rhizobium</i> sp.	95
BSC475a ⁴	Campo-BA	<i>Xanthomonas</i>	<i>X. axonopodis</i>	100 / 0,8	<i>X. axonopodis</i>	99
BSC23	Campo-BA	<i>Xanthomonas</i>	<i>X. axonopodis</i>	100 / 0,5	<i>Xanthomonas</i> sp.	97
CAF05	Viveiro-MG	<i>Xanthomonas</i>	<i>X. axonopodis</i>	100 / 0,6	-	-
ECLCAF03 ⁴	Viveiro-MG	<i>Xanthomonas</i>	<i>X. axonopodis</i>	96 / 0,6	<i>Xanthomonas</i> sp.	95-97 ¹
ESS01	Campo-SP	<i>Xanthomonas</i>	<i>X. axonopodis</i>	99 / 0,6	<i>Xanthomonas</i> sp.	89-98 ¹
ESS08	Campo-SP	<i>Pseudomonas</i>	<i>P. syringae</i>	74 / 0,6	<i>P. syringae</i>	98
EGS09	Campo-SP	<i>Xanthomonas</i>	<i>X. campestris</i>	97 / 0,6	<i>X. campestris</i>	98
EGS15	Campo-SP	<i>Pseudomonas</i>	<i>P. syringae</i>	92 / 0,8	<i>P. syringae</i>	98
EUS11	Campo-SP	<i>Pseudomonas</i>	<i>P. syringae</i>	72 / 0,6	<i>Pseudomonas</i> sp.	90-98 ¹
EUS14	Campo-SP	<i>Xanthomonas</i>	<i>X. campestris</i>	100 / 0,6	<i>X. campestris</i>	98
IP1-05	Viveiro-SP	<i>Pseudomonas</i>	<i>P. cichorii</i>	100 / 0,7	<i>P. cichorii</i>	98
IP1-36	Viveiro-SP	<i>Xanthomonas</i>	<i>X. axonopodis</i>	100 / 0,8	<i>X. axonopodis</i>	99
IP2-23	Viveiro-SP	<i>Xanthomonas</i>	<i>X. axonopodis</i>	100 / 0,8	<i>Xanthomonas</i> sp.	92-96 ¹
MSF	Campo-MS	<i>Xanthomonas</i>	<i>X. axonopodis</i>	91 / 0,8	<i>X. axonopodis</i>	98
MST07	Campo-PA	<i>Xanthomonas</i>	<i>X. axonopodis</i>	88 / 0,6	<i>Xanthomonas</i> sp.	-
MST09	Campo-PA	<i>Pseudomonas</i>	<i>P. putida</i>	98 / 0,6	<i>Pseudomonas</i> sp.	-
MRP03	Campo-PA	<i>Pseudomonas</i>	<i>P. putida</i>	100 / 0,6	<i>P. putida</i>	99
R57BN4	Campo-RS	Indeterminado	Indeterminado	-	<i>Erwinia</i> sp.	93-97 ¹
R203BN10	Campo-RS	<i>Pseudomonas</i>	<i>P. syringae</i>	86 / 0,5	<i>P. syringae</i>	98
R57.5	Campo-RS	<i>Xanthomonas</i>	<i>X. campestris</i>	100 / 0,8	<i>Xanthomonas</i> sp.	95-98 ¹
RVV11 ⁴	Viveiro-RS	Indeterminado	Indeterminado	-	<i>Rhizobium</i> sp.	94-97 ¹
<i>Pectobacterium carotovorum</i>	-	<i>Pectobacterium</i>	-	-	<i>P. carotovorum</i>	98
<i>Xanthomonas axonopodis</i>	-	<i>Xanthomonas</i>	<i>Xanthomonas axonopodis</i>	100 / 0,8	<i>Xanthomonas</i> sp.	86-97 ¹

¹Identidade de seqüências com as espécies agrupadas. ²Maior valor de identidade com seqüências de espécies agrupadas. P (%) / SIM = Probabilidade / Similaridade. (-) dados não obtidos. ³Árvores filogenéticas (Anexo da Tese). ⁴Isolados inoculados por atomização que resultaram sintomas típicos.

TABELA 4 - Oligonucleotídeos internos utilizados na amplificação do gene rDNA16S de bactérias obtidas de manchas foliares de *Eucalyptus* spp.

Código	Seqüência-sentido 5'-3'	Organismo alvo
1iaF*	CCTACGGGAGGCAGCAGTGG	<i>Erwinia, Pseudomonas e Xanthomonas.</i>
1ibR	GCAGTCTCCTTTGAGTTCCC	<i>Erwinia</i>
3ibR	GCAGTCTCCTTAGAGTGCCC	<i>Pseudomonas</i>
4ibR	CCGGTCTCCTTAGAGTTCCC	<i>Xanthomonas</i>
2iaF	CCTGATCCAGCCATGCCGCG	<i>Rizobiaceae</i>
2ibR	CAACTAAGGGCGAGGGTTGC	<i>Rizobiaceae</i>

* - sentido de anelamento do oligonucleotídeo F – “forward” e R – “reverse”

TABELA 5 – Ácidos graxos totais presentes em bactérias isoladas de manchas foliares do eucalipto.

Isolado	Ácido graxo	%	Isolado	Ácido graxo	%
R57BN4	12:0	6,2	BSC475a	10:0	0,79
	13:0	0,36		10:0 3OH	0,49
	14:0	6,90		11:0 iso	5,76
	desconhecido	1,42		11:0 anteiso	0,19
	15:0	1,66		11:0 iso 3OH	2,28
	16:0	28,88		11:0 3OH	0,49
	17:0	1,11		12:0 iso 3OH	0,19
	17:0 cyclo	14,26		12:0 3OH	2,85
	18:0	0,45		13:0 iso	0,79
	18:1 w5c	0,25%		13:0 iso 2OH	0,28
	18:1 w7c	9,49		13:0 iso 3OH	5,78
	19:0 cyclo w8c	1,96		14:0	1,36
	20:1 w7c	0,16		14:0 iso	0,64
RVV11	16:0	2,58	15:0	1,83	
	16:0 3OH	2,72	15:0 iso	33,42	
	18:0	2,48	15:0 anteiso	6,70	
	18:0 3 OH	2,78	15:1 iso	0,39	
	18:1 w7c	73,85	15:1 w6c	1,29	
	19:0 10 metil	2,14	16:0	3,27	
	15:0 3 OH*	18,43	16:0 iso	1,72	
	Desconhecido*	20,92	16:1 w9c	1,33	
	20:1 w7c*	2,47	17:0 iso	4,57	
			17:0 anteiso	0,29	
			17:0 iso 3OH	0,20	
			17:1 w6c	0,32	
			17:1 w8c	1,22	
		17:1 iso w9c	5,04		
		18:1 w7c	0,24		

10:0 – Ácido cáprico, 11:0 – Undecanoic, 12:0 – Ácido láurico, 13:0 – Ácido tridecanóico, 14:0 – Ácido mirístico, 15:0 - Ácido pentadecanóico, 16:0 – Ácido palmítico, 17:0 – Margaric, 18:0 – Ácido esteárico, 18:1 - -Acido oléico, 19:0 – 20:0 Ácido araquídico. 20:1 – Ácido gadoléico. 16:0 – ácido graxo com 16 carbonos na cadeia linear, 16:1 – ácido graxo com uma ligação dupla entre carbonos na cadeia linear. w5c –ligação dupla no carbono 5 a partir da extremidade ω , conformação cis. w7t - ligação dupla no carbono 7 a partir da extremidade ω , conformação trans. cyclo – ciclopropano na cadeia. cyclo w8c – ciclopropano no carbono 8 a partir da extremidade ω , conformação cis. anteiso – o grupo metil ocorre no ante-penúltimo carbono da cadeia. cis – conformação cis significa ambos hidrogênios dos carbonos da ligação dupla estão do mesmo lado da cadeia. trans – conformação trans com hidrogênios em lados opostos da cadeia nos carbonos da ligação dupla. 16: 3OH – grupo hidroxila no carbono 3 da cadeia a partir da extremidade α . * - ácidos graxos presentes em uma das repetições.

ARTIGO 2 (COMUNICAÇÃO)

Gama de Hospedeiros de *Xanthomonas axonopodis* pv. *eucalypti* Isolada de Manchas Foliares do Eucalipto*

Rivaldalve C. Gonçalves^{1**}, Acelino C. Alfenas², José R. Oliveira², Luiz A. Maffia²

¹ Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária — Centro de Pesquisa Agroflorestal do Acre EMBRAPA-Acre, CEP: 69908-970, Caixa Postal: 321, Rio Branco, Acre. Tel: (682123233). E-mail: riva@cpafac.embrapa.br.

² Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, CEP:36570000 – Viçosa, MG. Tel: (3138992937)

Aceito para publicação em (...../...../.....)

Autor para correspondência: Acelino C. Alfenas

GONÇALVES, R. C., ALFENAS, A. C., OLIVEIRA, J. R., Maffia, L. A. Gama de hospedeiros de *Xanthomonas axonopodis* pv. *eucalypti* isolada de manchas foliares do eucalipto. **Fitopatologia Brasileira**.

RESUMO

Avaliou-se a gama de hospedeiros de *X. axonopodis* (COD - UFVBF00001), obtida de manchas foliares de *E. grandis* x *E. urophylla*, proveniente de Teixeira de Freitas, Bahia. *Xanthomonas axonopodis* causou sintomas de manchas foliares em todas as plantas de *E. urophylla* x *E. maidenii* e *E. cloeziana* inoculadas. Cerca de 50% das mudas de *E. globulus* e *Corymbia maculata* apresentaram sintomas de manchas foliares. Em outras espécies de *Eucalyptus*, a frequência de plantas com sintomas variou de 5 a 15%. *Psidium guajava*, *Myrciaria jaboticaba* e *Eugenia jambolana*, bem como plantas de outras famílias botânicas, não apresentaram sintomas. Pelos resultados obtidos, concluiu-se que há especificidade do isolado em causar doença somente em plantas do gênero *Eucalyptus* e *Corymbia*, sendo proposta a designação de um patovar.

* Parte da tese de doutorado do primeiro autor. Universidade Federal de Viçosa, 2003.

**Bolsista do CNPq.

ABSTRACT

Host range of *Xanthomonas axonopodis* pv. *eucalypti* isolated from eucalyptus leaf spot

The host range of *X. axonopodis* (COD – UFVBF00001) isolated from blighted leaves of *E. grandis* x *E. urophylla*, from Teixeira de Freitas, Bahia was determined. Leaf blight symptoms developed on all inoculated plants of *E. urophylla* x *E. maidenii*, and *E. cloeziana*, but only on 50% seedlings *Eucalyptus globulus* and *Corymbia maculata*. On other *Eucalyptus* species, the frequency of symptomatic plants has ranged from 5% to 15%. No disease symptoms developed on *Psidium guajava*, *Myrciaria jaboticaba*, *Eugenia jambolana* and plants of others botanic families. The results showed that there is specificity of the strain to cause disease only in plants of *Eucalyptus* and *Corymbia* genera. The designation of a pathovar is proposed.

Em recente trabalho realizado sobre a etiologia da mancha foliar do eucalipto, no Brasil, observou-se que *X. axonopodis* Starr and Garces 1950 é a espécie mais freqüente em plantios clonais e por sementes em várias regiões do país, em mudas na fase de viveiro e em plantas jovens no campo (Gonçalves *et al.*, 2004). Em vista da alta freqüência e distribuição geográfica deste patógeno e da escassez de informações desta nova doença, realizou-se um estudo da gama de hospedeiros de *X. axonopodis* em plantas da família *Myrtaceae* e de outras famílias botânicas, visando determinar a especificidade deste isolado.

Para tanto, 20 mudas de *Eucalyptus grandis*, *E. urophylla* Blake, *E. robusta* Sm., *E. saligna* Smith, *E. globulus* Labill., *E. cloeziana* F. Muell, *E. camaldulensis* Dehnh, *Corymbia maculata* (Hook.) KD Hill & LAS Johnson, *Psidium guajava* L., *Myrciaria jaboticaba* (Martius) Berg., *Eugenia jambolana* Lam, (Myrtaceae), *Prunus persica* (L.) Batsch (Rosaceae), *Caryca papaya* L. (Caricaceae), *Phaseolus vulgaris* L. cv. *Ouro negro*, *Pisum sativum* L. (Fabaceae), *Lycopersicon esculentum* cv. Santa Clara (Solanaceae) e *Citrus limon* (L.) Burm. (Rutaceae) cultivadas em mistura de solo:esterco (3:1) e NPK (4:14:8), 8 g/l, foram testadas quanto à suscetibilidade a

X. axonopodis. Cinco mudas do clone *E. urophylla* x *E. maidenii* serviram como comparadoras.

Após acondicionamento prévio das plantas em câmara de nevoeiro intermitente por 24 h a 25 °C, sob fotoperíodo de 12 h a 4,0 $\mu\text{moles de fótons}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$, atomizou-se a suspensão de inóculo da cultura de *X. axonopodis* (COD. UFVBF00001) a 2×10^8 ufc/ml em ambas as faces das folhas. Em três plantas clonais e seis plantas por semente de cada espécie, atomizou-se água destilada estéril como testemunha. Após a inoculação, as plantas foram recolocadas na mesma câmara de nevoeiro, e, após 48 h, foram transferidas para câmara de crescimento a 28 °C, onde permaneceram por 12 dias sob fotoperíodo de 12 h e 40 $\mu\text{moles de fótons}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$. Cada compartimento da câmara foi forrado com jornal molhado e fechado com plástico transparente para impedir o ressecamento das plantas. A avaliação constou da contagem do número de plantas com sintomas típicos da bacteriose, teste de exsudação em gota, reisolamento e inoculação do patógeno em hospedeiro suscetível, *E. grandis* x *E. urophylla*.

O isolado utilizado causou sintomas apenas em plantas de eucalipto pertencentes ao gênero *Eucalyptus* e *Corymbia*. Observou-se, contudo, variabilidade intraespecífica quanto à reação de suscetibilidade à doença. Todas as plantas de *E. cloeziana* e dos clones híbridos de *E. grandis* x *E. urophylla* e *E. urophylla* x *E. maidenii*, foram suscetíveis. Cerca de 50% das mudas de *Corymbia maculata* e *E. globulus* e apenas 5% das plantas de *E. grandis*, *E. urophylla*, *E. saligna*, *E. robusta* e *E. camaldulensis*, exibiram sintomas da doença. Plantas de *Psidium guajava*, *Myrciaria jaboticaba*, *Eugenia jambolana* (Myrtaceae) e de outras famílias botânicas não apresentaram sintomas.

Em uma lista estreita de espécies avaliadas quanto à suscetibilidade a *X. campestris* isolada de *Corymbia citriodora* (sin. = *Eucalyptus citriodora* Hook), Truman (1974) concluiu que, além do hospedeiro original, esta bactéria infectou apenas *Corymbia maculata*. Baseado nestes resultados, o autor propôs a classificação desta bactéria em *X. eucalypti*. Posteriormente, Dye (1978) reclassificou-a como *X. campestris* pv. *eucalypti* (Truman 1974) Dye 1978. Este patovar não foi contemplado na reclassificação realizada por Vauterin *et al.* (1995), permanecendo, portanto, como nome válido (Young *et al.*, 1996). A categoria patovar não é um taxon reconhecido pelo Código Internacional de Nomenclatura de Bactérias (Sneath, 1992). Contudo, um conjunto de regras foi estabelecido pela Sociedade Internacional de Patologia de Plantas para prover uma classificação infra-subespecífica de bactérias fitopatogênicas, que

represente a especificidade de hospedeiro (Dye *et al.*, 1980). A classificação do isolado UFVBF00001 em *X. axonopodis* pv. *eucalypti* é proposta neste trabalho, tendo-se depositado o isolado-tipo no Instituto Biológico de São Paulo, São Paulo, Brasil com o código UFVBF00001.

A patogenicidade de *X. axonopodis*, isolada de eucalipto, foi confirmada apenas para plantas dos gêneros *Eucalyptus* e *Corymbia*, ambos pertencentes à família Myrtaceae, o que indica o nível de especialização da bactéria. A gama de hospedeiros de *X. axonopodis* é extensa, sendo que grupos de isolados da espécie especializaram-se em causar doença apenas em plantas de uma ou poucas espécies. A especialização patogênica pode ser atribuída a variações nas seqüências de genes de patogenicidade e virulência. Segundo Preston *et al.* (1998), a especificidade de hospedeiros de *Xanthomonas* spp. pode ser definida por variações alélicas e não-alélicas. Após ter-se estabelecido a compatibilidade básica entre a espécie hospedeira e a bactéria fitopatogênica, variações alélicas nos genes de avirulência podem determinar a gama de hospedeiros na espécie (Vivian & Gibbon, 1997).

Um estudo de reclassificação e de gama de hospedeiros de *X. campestris* pv. *eucalypti*, descrita por Truman (1974), comparado com os resultados de isolados de *X. campestris* e *X. axonopodis*, patogênicas a *Eucalyptus* spp., deverá elucidar a existência de um patovar em cada uma destas espécies.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- DYE, D. W. Genus IX. *Xanthomonas* Dowson 1939. In: YOUNG, J. M., DYE, D. W., BRADBURY, J. F., PANAGOPOULOS, C. G. ROBS, C. F. (Ed.) **A proposed nomenclature on classification for plant pathogenic bacteria**. New Zealand of Agricultural Research, 20: 563-582. 1978.
- DYE, D. M., BRADBURY, J. F., GOTO, M., HAYWARD, A. C., LELLIOT, R. A., SCHROTH, M. N. International standards for naming pathovars of phytopathogenic bacteria and a list of pathovar names and pathogenic strains. **Review of Plant Pathology**, 59: 153-168. 1980.
- GONÇALVES, R. C. ALFENAS, A. C., OLIVEIRA, J. R., MAFFIA, L. A., CASCARDO, J. C. M., LAU, D. Etiologia da mancha bacteriana do eucalipto no Brasil. (Primeiro capítulo da Tese de Doutorado do primeiro autor).

- PRESTON, G. M., HAUBOLD, B., RAINEY, P. B. Bacterial genomics and adaptation to life on plants: implications for the evolution of pathogenicity and symbiosis. **Current Opinion in Microbiology**, 1: 589-597. 1998.
- SNEATH, P. H. A. **International code of nomenclature of bacteria: Bacteriological code, 1990 Revision**. Washington, D.C.: American Society for Microbiology Press. 1992. 232p.
- TRUMAN, R. Die-back of *Eucalyptus citriodora* caused by *Xanthomonas eucalypti* sp. n. **Phytopathology**, 64: 143-144. 1974.
- VAUTERIN, L., HOSTE, B., KERSTERS, K., SWINGS, J. Reclassification of *Xanthomonas*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, 45: 472-489. 1995.
- VIVIAN, A., GIBBON, M. J. Avirulence genes in plant-pathogenic bacteria: signals or weapons? **Microbiology**, 143: 693-704. 1997.
- YOUNG, J. M., SADDLER, G. S., TAKIKAWA, Y., DE BOER, S. H., VAUTERIN, L., GARDAN, L., GVOZDYAK, R. I., STEAD, D. E. Names of plant pathogenic bacteria 1864-1995. **Review of Plant Pathology**, 75: 721-763. 1996.

ARTIGO 3

Escala diagramática para quantificar a mancha bacteriana do eucalipto*

Rivaldalve C. Gonçalves^{1**}, Acelino C. Alfnas², Luiz A. Maffia², Cristian A. Souza²

¹ Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária — Centro de Pesquisa Agroflorestral do Acre, EMBRAPA-Acre, CEP: 69908-970, Caixa Postal: 321, Rio Branco, Acre. Tel: (682123233). E-mail: riva@cpafac.embrapa.br.

² Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, CEP:36570000 – Viçosa, MG. Tel: (3138992937).

Aceito para publicação em (...../...../.....)

RESUMO

GONÇALVES, R. C., ALFENAS, A C., MAFFIA, L. A., SOUZA, C. A. Escala diagramática para quantificar a mancha bacteriana do eucalipto. **Summa Phytopathologica**

Desenvolveu-se uma escala diagramática para quantificar a severidade da mancha bacteriana do eucalipto, contendo oito níveis de severidade: 0,2; 2,0; 4,0; 8,0; 16,0; 32,0; 48,0; e 64,0%. A escala foi submetida à avaliação por três grupos de avaliadores inexperientes, quanto ao uso de escalas diagramáticas ou quanto à avaliação de severidade de doenças. O grupo 1 avaliou a severidade da doença sem treinamento prévio e sem a escala. Os membros dos grupos 2 e 3 avaliaram a severidade da doença com a escala. Apenas os avaliadores do grupo 2 foram submetidos a um rápido treinamento prévio para avaliação de severidade da doença, mediante observações de diagramas foliares, sob animação, em programa de microcomputador. As estimativas dos avaliadores dos três grupos foram inacuradas pela análise dos parâmetros de inclinação e intercepto da reta obtida na análise de regressão entre os valores de severidade real e estimado, com ou sem o uso da escala diagramática. Os valores do coeficiente de determinação da reta foram ligeiramente superiores para os avaliadores com a escala diagramática sem treinamento prévio, indicando maior precisão neste

* Parte da tese de doutorado do primeiro autor. Universidade Federal de Viçosa, 2003.

** Bolsista do CNPq.

grupo. Concluiu-se que não houve acurácia para nenhum dos avaliadores, mas maior precisão foi obtida mediante o uso da escala, sem treinamento prévio.

Palavras-chave adicionais: *Eucalyptus*, doenças, epidemiologia, controle

ABSTRACT

GONÇALVES, R. C., ALFENAS, A. C., MAFFIA, L. A., SOUZA, C. A. Diagrammatic scale for quantification of eucalyptus leaf blight. **Summa Phytopathologica**

A diagrammatic scale containing eight disease severity levels (0,2; 2,0; 4,0; 8,0; 16,0; 32,0; 48,0 and 64,0%) was developed for quantification of bacterial leaf spot severity on eucalyptus. Three groups of inexperienced evaluators were designated to determine the applicability of the scale for disease severity estimation. The evaluators of group 1 estimated the disease severity without the scale, while those of group 2 and 3 used the scale. The group 2 received prior short training with leaf diagrams in a animation computer program. The estimates of the evaluators from the three groups were incurred by the inclination and the intercept analysis of the regression lines between the real and the estimated severity. The determination coefficients were slightly higher for the evaluators using the diagrammatic scale without prior training, indicating greater precision in this group. It was concluded that there was no accuracy among the evaluators, but higher precision was obtained by scale use without prior training.

Additional key-words: *Eucalyptus*, diseases, epidemiology, control

1. INTRODUÇÃO

Recentemente, têm-se registrado perdas significativas por bacterioses na cultura do eucalipto na fase de viveiro e campo, em consequência da severidade de manchas foliares e desfolha (Alfenas *et al.*, 2004). Diferentes espécies de bactérias foram identificadas causando manchas foliares no eucalipto no Brasil (Gonçalves *et al.*, 2004), as quais causam sintomas pouco diferenciados em condições de infecção natural. Medidas tradicionalmente empregadas para o controle de doenças fúngicas em viveiro de eucalipto, baseadas principalmente na redução de inóculo primário em miniestacas, substratos, bandejas e tubetes, não têm sido bem sucedidas. Para se efetuarem estudos sobre epidemiologia e controle de uma doença, é necessário dispor de métodos simples, práticos e de baixo custo que permitam estimativas rápidas e acuradas para a quantificação de doenças. Dentre as ferramentas disponíveis para estimar a severidade de doenças, sobretudo manchas foliares, escalas diagramáticas têm a vantagem de permitirem a avaliação não-destrutiva de grande número de amostras, de forma rápida e precisa, sendo importantes na avaliação de severidade de doenças (James, 1974; Diaz *et al.*, 2001). Em vista da importância das bacterioses foliares de eucalipto, urgem-se tais estudos. Portanto, este trabalho objetivou desenvolver uma escala diagramática para quantificar a severidade da mancha bacteriana em folhas de eucalipto.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Coleta de amostras, obtenção e processamento de imagens

Folhas de um clone híbrido de *E. urophylla* x *E. maidenii* com sintomas típicos de mancha bacteriana com diferentes níveis de severidade, sob infecção natural, foram amostradas. Para a obtenção de imagens, 100 folhas doentes foram escaneadas a 300 dpi e gravadas no formato bmp (Figura 1A) para processamento no programa QUANT 1.0 (Vale *et al.*, 2003). Cada imagem, com uma folha, foi processada no programa por meio dos procedimentos sucessivos de aumento de contraste (Figura 1B), mediana (Figura 1C), substituição de cores por seleção e amostragem, redução de cores (Figura 1D) e

resultados. A imagem, binarizada de cada folha, permitiu a determinação da área foliar total, área foliar sadia e área foliar lesionada com seus respectivos valores em porcentagem.

2.2. Determinação dos níveis de severidade e obtenção da escala diagramática

Os valores de severidade de doença em todas as folhas foram distribuídos em classes logarítmicas de severidade (Horsfall e Barrat, 1945) e calculado o valor médio de severidade. Selecionaram-se valores em progressão geométrica de razão 2, variando de 2 a 64%, acrescido do valor de 0,2% por ser o menor nível de severidade encontrado. Oito diagramas foliares, correspondentes aos pontos previamente escolhidos, foram desenhados no programa QUANT 1.0, a partir das imagens originais de folhas com valores de severidade próximos ou idênticos aos pontos da escala.

2.3. Estimativa da severidade da mancha bacteriana do eucalipto por meio de escala diagramática

Três grupos, cada um constituído por três avaliadores inexperientes na quantificação de doenças, foram escolhidos para avaliar a eficiência em estimar a severidade da mancha bacteriana com e sem a escala diagramática. Para tal, utilizaram-se as imagens das 100 folhas coletadas em viveiro com infecção natural e escaneadas para desenho da própria escala.

Os avaliadores do grupo 1 realizaram as estimativas sem conhecimento da escala. Os avaliadores do grupo 2 foram submetidos a treinamento prévio por 30 min. para estimar a severidade da mancha bacteriana do eucalipto, um dia antes da avaliação da escala. Para tal, três arquivos com 30 imagens de folhas cada, foram expostos com recurso de animação, no programa Power Point®. Os valores de severidade eram mostrados sobre o diagrama, imediatamente após a estimativa pelo avaliador em treinamento. Os avaliadores receberam a escala para estimar a severidade após serem considerados acurados, a partir da análise da inclinação e intercepto da reta, obtida pela regressão linear de 30 valores reais e estimados de severidade (Kranz, 1988; Nutter *et al.*, 1993). Os avaliadores do grupo 3 estimaram a severidade da mancha bacteriana com a escala em mãos, mas sem treinamento prévio.

Para avaliar a eficiência da escala, analisaram-se o coeficiente angular e o intercepto da linha de regressão entre 100 valores reais e estimados de severidade, bem como pela análise do erro absoluto das estimativas.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores de severidade da mancha bacteriana variaram de 0,2 a 60,9% (Tabela 1). Seis níveis de severidade foram estabelecidos, a partir dos valores médios de severidade calculados em cada classe. Em vista da distribuição de frequência dos valores de severidade por classe (Horsfall e Barrat, 1945) (Tabela 1), selecionou-se a razão 2 de progressão geométrica, a qual resulta em valores próximos ao valor médio de cada classe. Escalas em progressão aritmética também atendem aos trabalhos de avaliação de severidade de manchas foliares. Porém, dadas às respostas logarítmicas aos estímulos visuais, escalas estabelecidas dentro da lei Weber-Fechner são mais apropriadas para uma avaliação precisa de severidade (Campbell e Madden, 1990).

Para a escala final, adicionou-se, entre os dois níveis superiores da escala, o nível de 48% de severidade para diminuir a extensão deste intervalo. Com a inclusão de valor intermediário entre limites superiores de escalas logarítmicas, pode-se diminuir o erro absoluto e aumentar a resolução da escala (Zadoks e Schein, 1979). Incluíram-se, ainda, o valor de 0,2% por ser o menor nível de severidade encontrado, e o de 64%, para compor o último ponto na progressão geométrica de razão 2. Uma escala, com oito níveis de severidade e respectivos diagramas foliares, foi construída no programa QUANT 1.0, a partir de imagens com valores próximos ou idênticos a cada nível de severidade (Figura 2).

As estimativas de severidade das 100 folhas utilizadas não foram acuradas com ou sem o uso da escala, conforme o teste t aplicado ao coeficiente angular e ao intercepto da linha de regressão da severidade real e estimada. Apenas para o avaliador A do grupo 1, o coeficiente angular da reta (1,04) foi significativamente igual a 1 pelo teste t. O intercepto da linha de regressão foi significativamente igual a zero para os avaliadores E do grupo 2 (0,85), e G (0,02) e I (0,39) do grupo 3. O coeficiente de determinação da linha de regressão para os avaliadores que receberam a escala (grupo 3) foi consistentemente igual ou maior que 0,80, enquanto que para todos os avaliadores do grupo 1 (sem escala) e do grupo 2 (com escala e treinamento), os valores de R^2 foram abaixo de 0,80 (Figura 3). Valores de coeficiente de determinação de linhas de regressão, R^2 , entre valores estimados e valores reais de severidade, indicam a precisão dos avaliadores, sendo considerados mais precisos, aqueles avaliadores com maiores valores de R^2 (Campbell e Madden, 1990). A tendência de valores de R^2 em torno de

0,8 para os avaliadores do grupo 3, pode indicar uma melhoria na precisão das estimativas pelo uso da escala em relação aos avaliadores do grupo 1, que não utilizaram a escala. No entanto, para os avaliadores do grupo 2, que também receberam a escala, não se confirmou esta tendência. Os avaliadores do grupo 2 e o avaliador G do grupo 3, com a escala, mostraram tendência em superestimar a severidade da doença, porém em menor frequência que os avaliadores A e C, sem a escala, do grupo 1. Os avaliadores B do grupo 1 e H e I do grupo 3, subestimaram a severidade da doença.

A frequência de valores de erros absolutos menores ou iguais a 2 e a 5% para valores de severidade real de até 15%, bem como até o valor máximo de severidade (60,9%), variou entre avaliadores dentro de cada grupo e entre os grupos de avaliadores, sendo encontrada maior frequência de erros menores nos grupos 2 e 3, que utilizaram a escala, em relação aos avaliadores do grupo 1 que não a utilizaram (Figura 4). Verificou-se tendência de maior frequência de erro absoluto menor que 2% para valores de severidade real de até 15%, enquanto que maiores valores de erro absoluto foram associados a maiores valores de severidade real. Esta tendência é esperada, pois estimativas de severidade de doenças tendem a apresentar maiores valores de erro absoluto em valores de severidade mais elevados (Campbell e Madden, 1990).

Uma escala diagramática desenvolvida corretamente não garante uma estimativa acurada de severidade a partir da mesma, pois o sucesso no uso de escalas diagramáticas depende da percepção individual do avaliador (Godoy *et al.*, 1997). Alternativas para validação de escalas diagramáticas incluem a escolha de avaliadores experientes e o estreitamento do intervalo de severidade real (Godoy *et al.*, 1997). A avaliação de escalas por avaliadores sem experiência e o uso de todos os níveis de severidade, condicionam maior rigidez ao processo de validação. O treinamento de avaliadores em programas de computador é importante para assegurar estimativas acuradas de severidade (Tomerlin e Howell, 1988). No entanto, este treinamento deve ser por mais tempo que o aplicado neste trabalho e em programas apropriados. Escalas diagramáticas apresentam limitações quanto a sua aplicabilidade, por não representarem a diversidade de padrões de tamanho e distribuição de lesões encontrados no campo, cabendo ao avaliador realizar a estimativa ajustada à severidade real (Tomerlin e Howell, 1988). A inclusão de mais diagramas com diferentes padrões de sintomas para os mesmos níveis de severidade poderá proporcionar estimativas mais próximas dos valores reais. Este trabalho indica que avaliadores inexperientes não provêm estimativas acuradas com

escala diagramática, embora a precisão das estimativas feitas com escala sejam melhoradas para alguns avaliadores.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFENAS, A. C.; ZAUZA, E. A.; MAFIA, R. G. ASSIS, T. F. **Clonagem e doenças do eucalipto**. Viçosa, MG. Editora UFV. 2004. 442p.
- CAMPBELL, C. L., MADDEN, L. V. **Introduction to plant disease epidemiology**. New York, John Wiley & Sons. 1990.
- DIAZ, C. G., BASSANEZI, R. B., BERGAMIN FILHO, A. Desenvolvimento e validação de uma escala diagramática para *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em feijoeiro. **Summa Phytopathologica**, v. 27, n.1, 35-39, 2001.
- GODOY, C. V., CARNEIRO, S. M. T. P. G., IAMAUTI, M. T., PRIA, M. D., AMORIM, L., BERGER, R. D., BERGAMIN-FILHO, A. Diagrammatic scales for bean diseases: development and validation. **Journal of Plant Disease and Protection**, v.104, p.336-345, 1997.
- HORSFALL, J.G., BARRAT, R.W. An improved grading system for measuring plant disease. **Phytopathology**, St. Paul, v.35, p.655. 1945.
- JAMES, W. C. Assessment of plant diseases and losses. **Annual Review of Phytopathology**, v. 12, p. 27-48, 1974.
- KRANZ, J. Measuring Plant Disease. In: KRANZ, J. & ROTEM, J. (Eds.) **Experimental techniques in plant disease epidemiology**. Heidelberg. Springer-Verlag. pp.35-50. 1988.
- NUTTER, F. W. Jr., GLEASON, M. L., JENCO, J. H., CHRISTIANS, N. C. Assessing the accuracy intra-rater repeatability, and inter-rater releability of disease assessment systems. **Phytopathology**, St. Paul, v.83, p.806-812, 1993.
- TOMERLIN, J. R., HOWELL, T. A. DISTRAIN: A computer program for training people to estimate disease severity on cereal leaves. **Plant Disease**, v. 72, n. 5, p.455-459. 1988.
- VALE, F. X. R., FERNANDES FILHO, E. I., LIBERATO, J. R. QUANT. **A software plant disease severity assessment**. 8th International Congress of Plant Pathology, CHRISTCHURCH, New Zealand, v. 8, p. 105, 2003. (Abstract).

ZADOKS, J. C., SCHEIN, R. D. **Epidemiology and plant disease management:**
Oxford University Press, New York. 1979.

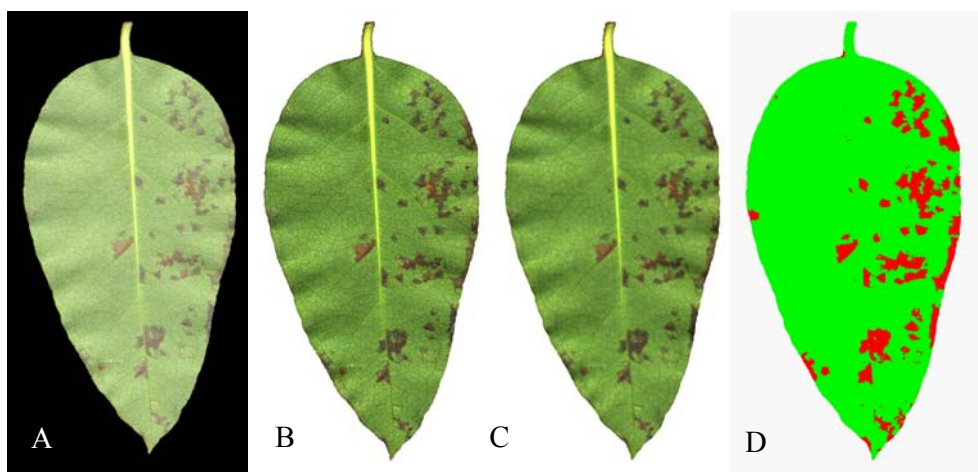


Figura 1 - Etapas de processamento de imagens para cálculo da severidade da mancha foliar no programa QUANT 1.0. A – Folha escaneada na resolução de 300 dpi; B – Imagem com contraste; C – imagem B submetida ao procedimento mediana; e D – imagem C submetida ao procedimento redução de cores.

Tabela 1 - Distribuição dos valores de severidade da mancha bacteriana do eucalipto em classes logarítmicas.

Classe de severidade	Amplitude (%)	Valor de severidade (%)*	Severidade média (%)	Frequência/classe
1	0,1-3,0	0,2-3,0	1,4	12
2	3,1-6,0	3,2-5,4	4,3	17
3	6,1-12,0	6,2-11,6	8,9	25
4	12,1-25,0	12,3-24,9	18,6	25
5	25,1-50,0	27,1-40,8	34,0	17
6	50,1-75,0	51,2-60,9	56,1	04

* - valores de severidade real.

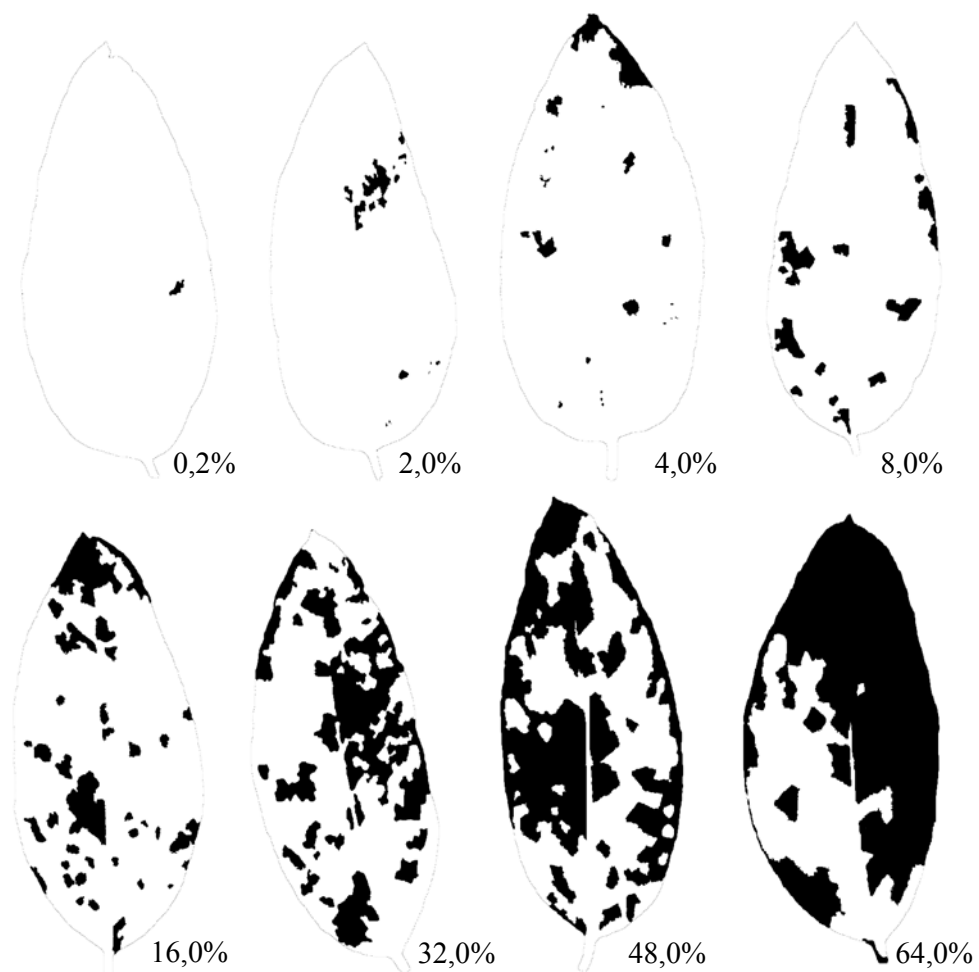


Figura 2 - Escala diagramática para avaliar a severidade de mancha foliar do eucalipto causada por bactéria, com valores de porcentagem de área foliar lesionada.

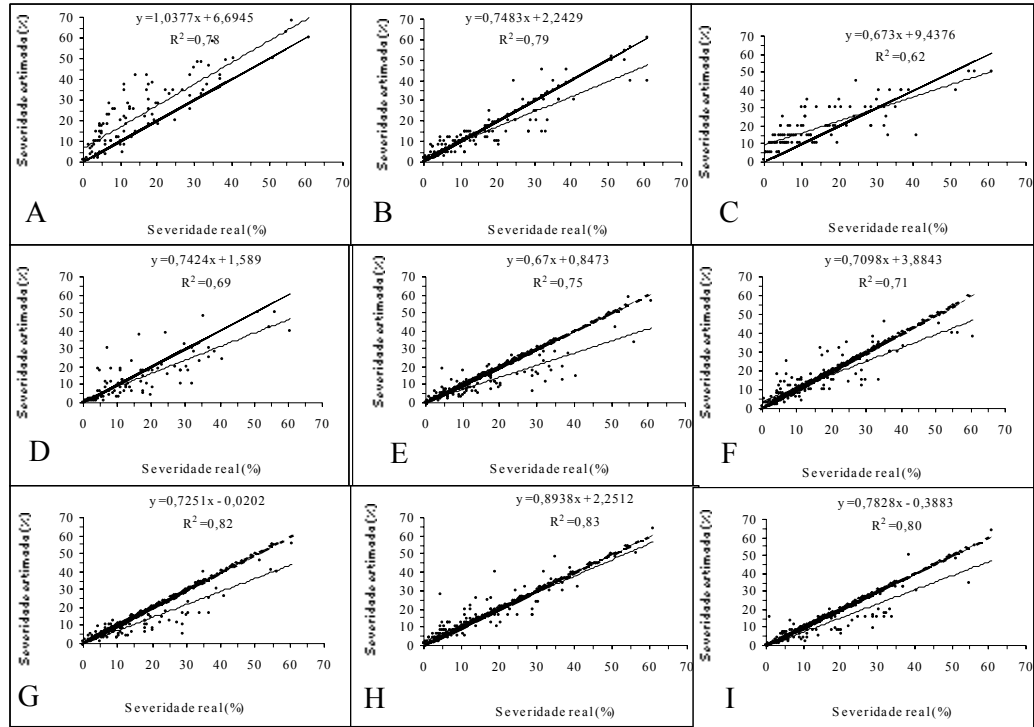


Figura 3 – Regressão linear de valores de severidade real e severidade estimada para três grupos de avaliadores. A-C – avaliadores do grupo 1 (sem escala), D-F – avaliadores do grupo 2 (com escala e treinamento prévio) e G-I – avaliadores do grupo 3 (com escala, sem treinamento prévio). Linhas grossas representam estimativas acuradas.

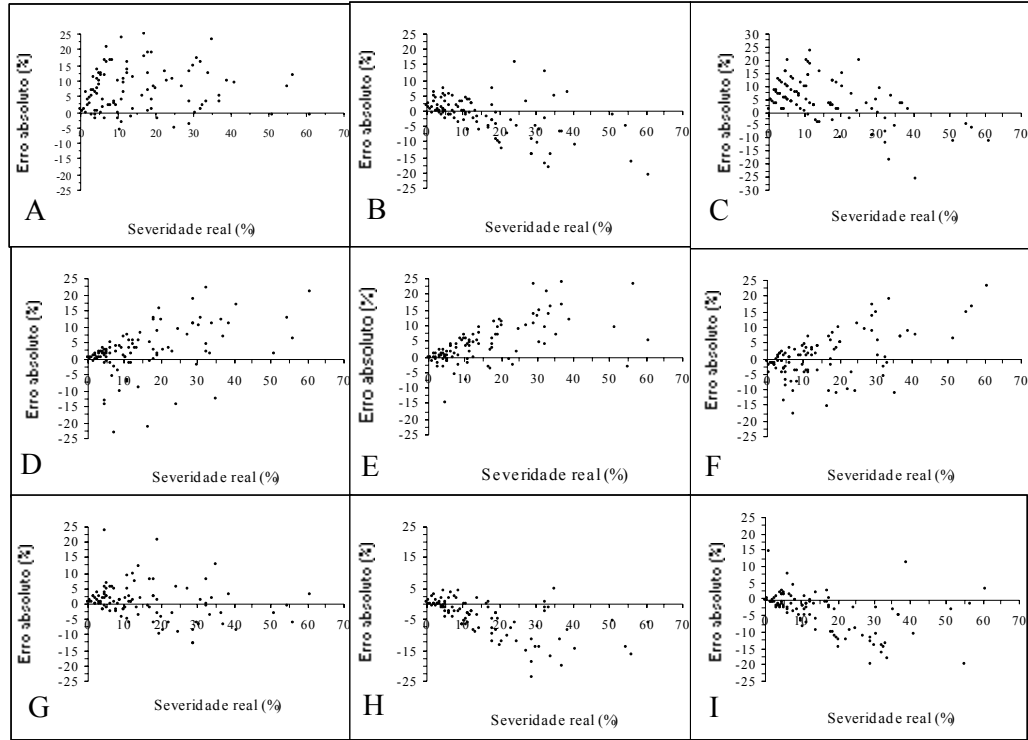


Figura 4 – Erro absoluto em estimativas de severidade da mancha bacteriana sem a escala diagramática (grupo 1 - A, B e C), com escala e treinamento prévio (grupo 2 – D, E e F) e com escala sem treinamento prévio (grupo 3 – G, H e I).

CONCLUSÕES GERAIS

A mancha bacteriana do eucalipto caracteriza-se por anasarca, lesões angulares e internervurais no limbo, halos cloróticos, perfurações no limbo, necroses no pecíolo e ramos, concentração de lesões ao longo da nervura principal, lesões lineares nas bordas da folha, necrose da porção superior do limbo e exsudação de pus bacteriano das lesões. A reação de hipersensibilidade em *Lycopersicon esculentum* e *Nicotiana tabacum*, a partir da injeção de suspensão de células bacterianas no mesófilo foliar, é um método eficaz em indicar isolados fitopatogênicos ao eucalipto. Vinte e cinco isolados patogênicos ao eucalipto foram escolhidos para identificação. A partir do perfil de utilização de fontes de carbono (MicroLog™ BIOLOG), análise filogenética de rDNA16S e análise de ácidos graxos (FAME), identificaram-se 10 isolados de *Xanthomonas axonopodis*, quatro de *Xanthomonas campestris*, quatro de *Pseudomonas syringae*, dois de *Pseudomonas putida*, dois de *Pseudomonas cichorii*, dois de *Rhizobium* sp. e um de *Erwinia* sp. A patogenicidade de *X. axonopodis*, *X. campestris*, *P. cichorii* e *Rhizobium* sp. foi confirmada em inoculações por atomização. Por outro lado, *P. syringae* e *Erwinia* sp. atomizadas em mudas de eucalipto, não causaram sintomas.

Tendo em vista a maior freqüência e ampla distribuição geográfica de *X. axonopodis*, estudou-se sua gama de hospedeiros em plantas de *Eucalyptus*

grandis, *E. urophylla*, *E. urophylla* x *E. maidenii*, *E. robusta*, *E. saligna*, *E. globulus*, *E. cloeziana*, *E. camaldulensis*, *Corymbia maculata*, *Psidium guajava*, *Myrciaria jaboticaba*, e *Eugenia jambolana*, (Myrtaceae), *Prunus persica* (Rosaceae), *Caryca papaya* (Caricaceae), *Phaseolus vulgaris* cv. Ouro negro, *Pisum sativum* (Fabaceae), *Lycopersicon esculentum* cv. Santa Clara (Solanaceae), e *Citrus limon* (Rutaceae). *Xanthomonas axonopodis* causou sintomas apenas em plantas dos gêneros *Eucalyptus* e *Corymbia*. Todas as plantas de *E. cloeziana* e de *E. urophylla* x *E. maidenii*, além do hospedeiro *E. grandis* x *E. urophylla*, foram suscetíveis. Cerca de 50% das mudas de *Corymbia maculata* e *E. globulus*, e apenas 5% das plantas de *E. grandis*, *E. urophylla*, *E. saligna*, *E. robusta* e *E. camaldulensis*, exibiram sintomas da doença. Plantas de *Psidium guajava*, *Myrciaria jaboticaba*, *Eugenia jambolana* (Myrtaceae) e de outras famílias botânicas não apresentaram sintomas. A designação do isolado em *Xanthomonas axonopodis* pv. *eucalypti* é proposta neste trabalho.

Para quantificar a mancha bacteriana do eucalipto desenvolveu-se uma escala diagramática com oito níveis de severidade: 0,2; 2,0; 4,0; 8,0; 16,0; 32,0; 48,0 e 64,0%. Estimativas obtidas com ou sem a escala diagramática por avaliadores inexperientes mostraram-se inacuradas. A precisão das estimativas foi variável entre avaliadores do mesmo grupo ou entre grupos distintos. Houve tendência de maior precisão nas estimativas feitas por avaliadores com a escala diagramática, sem treinamento prévio.

APÊNDICE

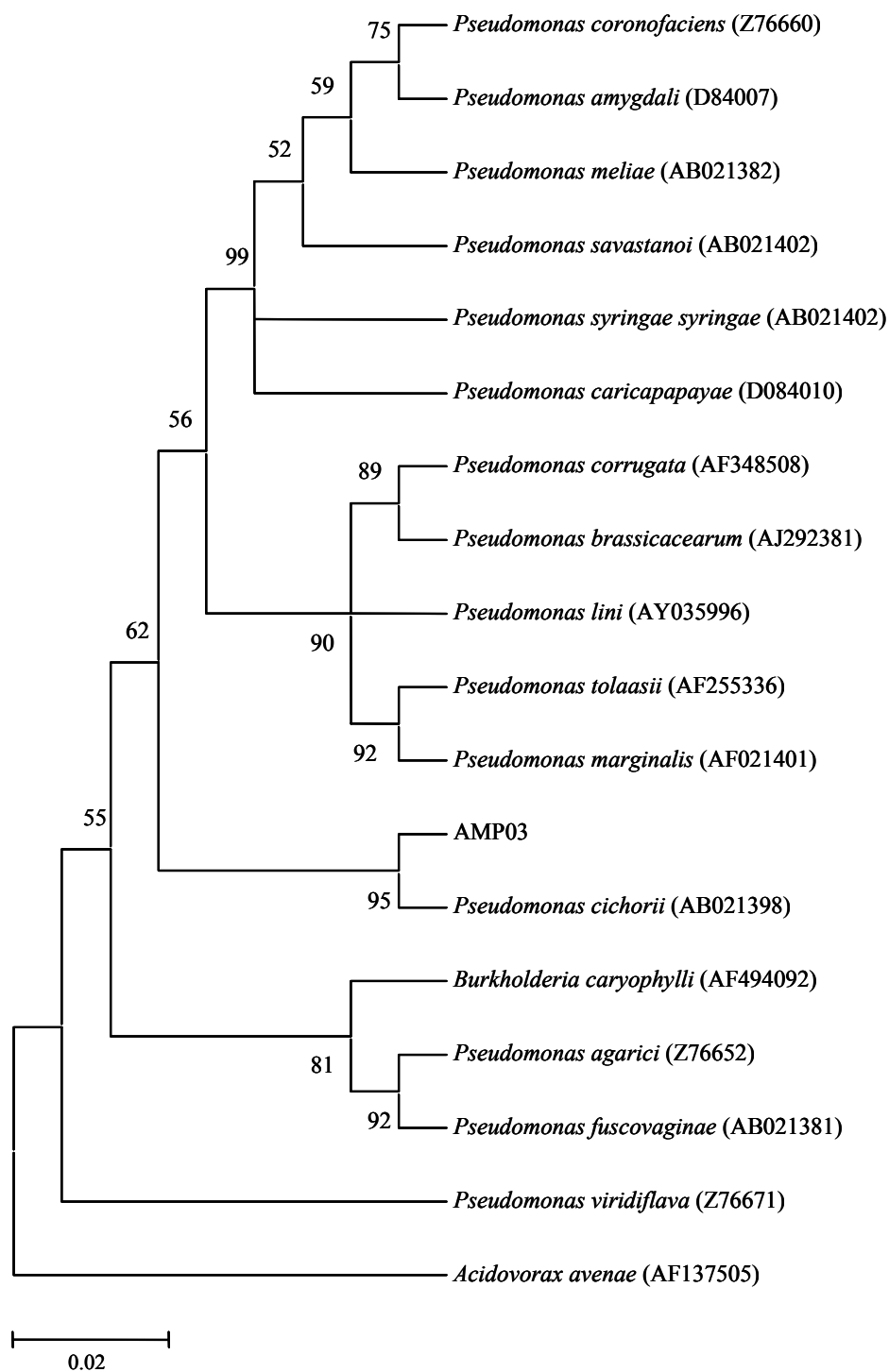


Figura 1A – Análise de agrupamento com seqüência completa de rDNA16S de bactéria isolada de mancha foliar de *Eucalyptus* spp., isolado AMP03, e de espécies de *Pseudomonas* spp., *Burkholderia caryophylli* e *Acidovorax avenae*, obtidas no GenBank. Dendrograma obtido a partir do método do vizinho mais próximo e valores de “bootstrap” a partir de 2.000 repetições. Código de acesso ao GenBank entre parênteses.

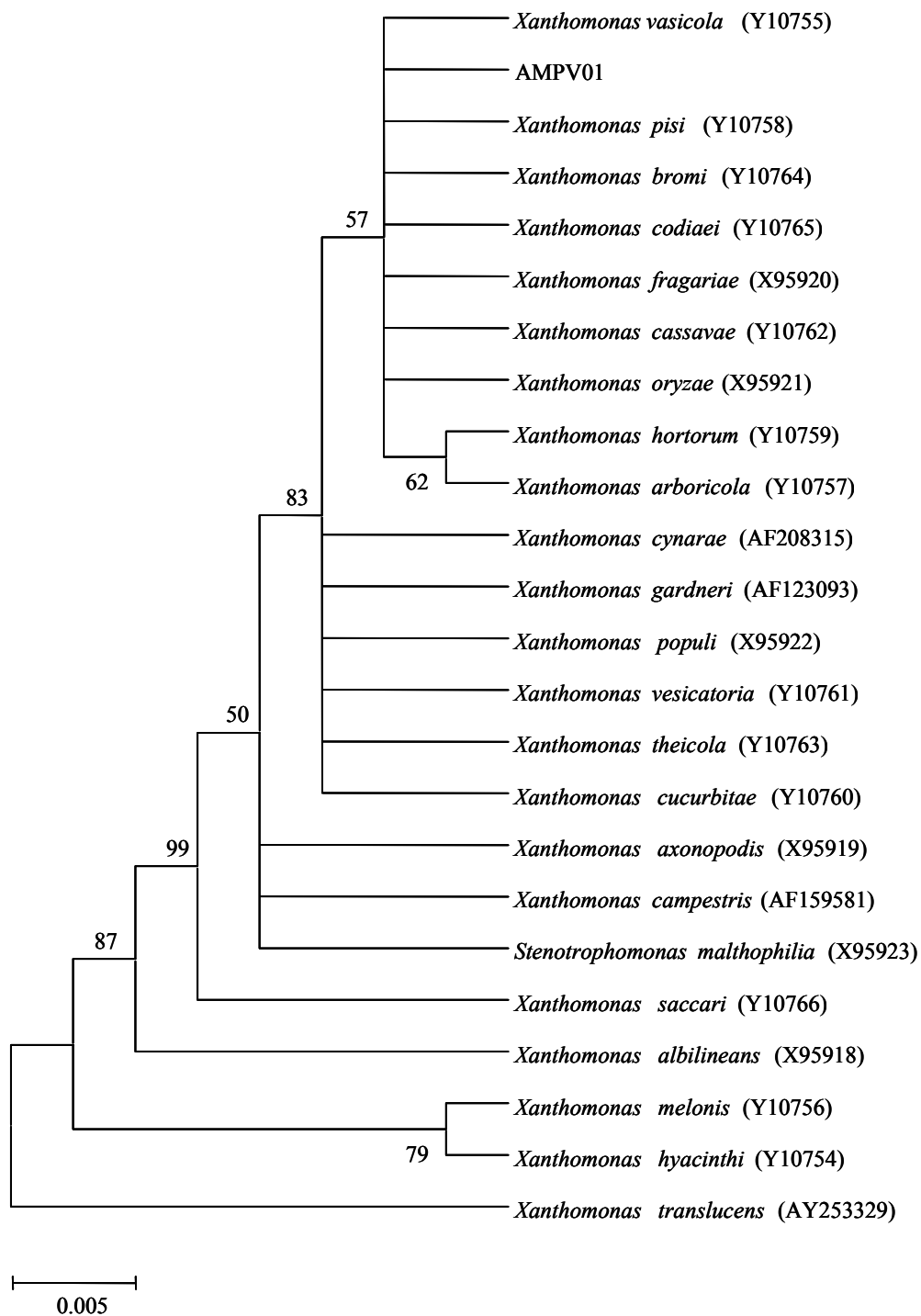


Figura 2A – Análise de agrupamento com seqüência parcial de rDNA16S de bactéria isolada de mancha foliar de *Eucalyptus* spp., isolado AMPV01, e de espécies de *Xanthomonas* spp., obtidas no GenBank. Dendrograma obtido a partir do método do vizinho mais próximo e valores de “bootstrap” a partir de 2.000 repetições. Código de acesso ao GenBank entre parênteses.

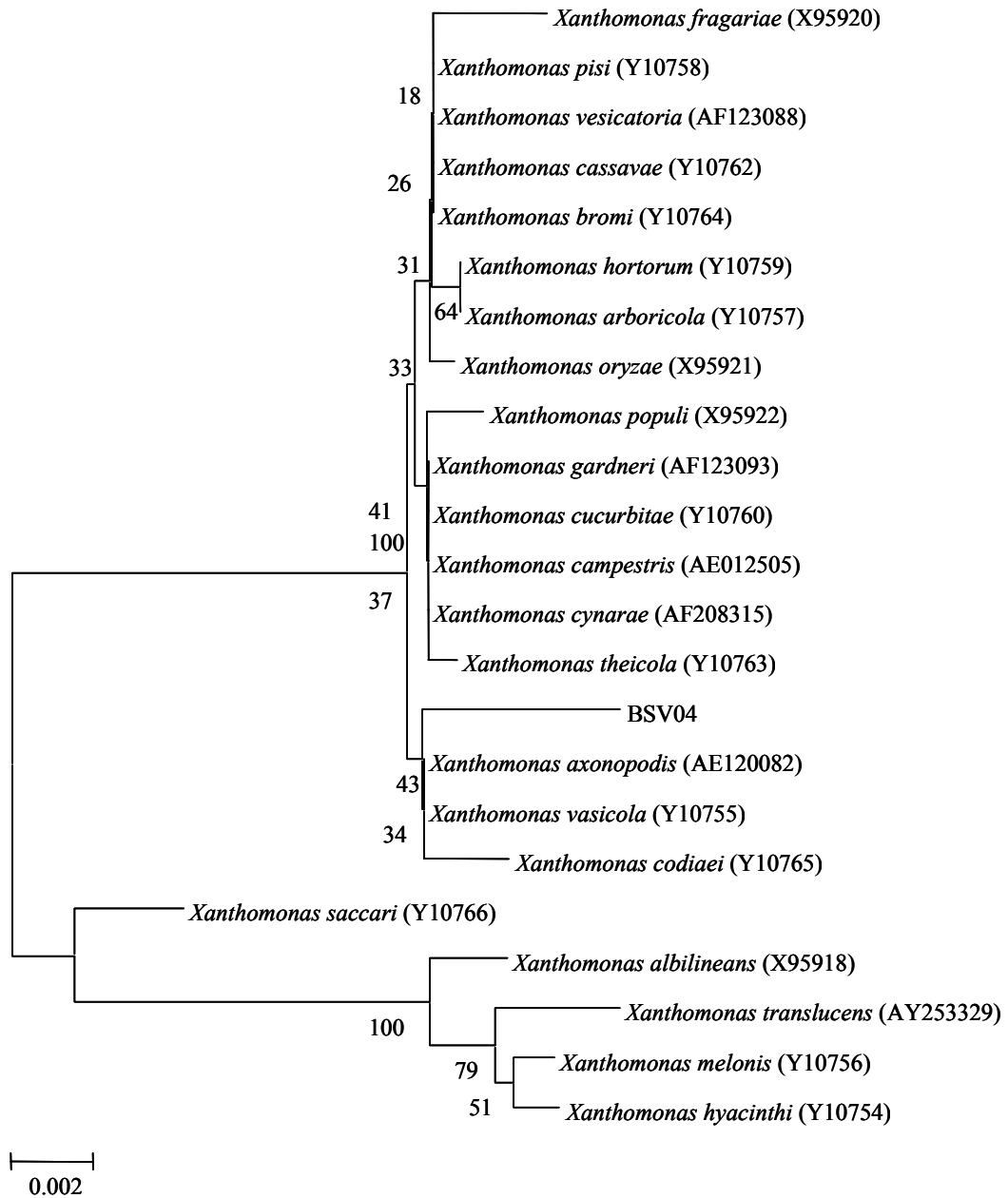


Figura 3A – Análise de agrupamento com seqüência completa de rDNA16S de bactéria isolada de mancha foliar de *Eucalyptus* spp., isolado BSV04, e de espécies de *Xanthomonas* spp., obtidas no GenBank. Dendrograma obtido a partir do método do vizinho mais próximo e valores de “bootstrap” a partir de 2.000 repetições. Código de acesso ao GenBank entre parênteses.

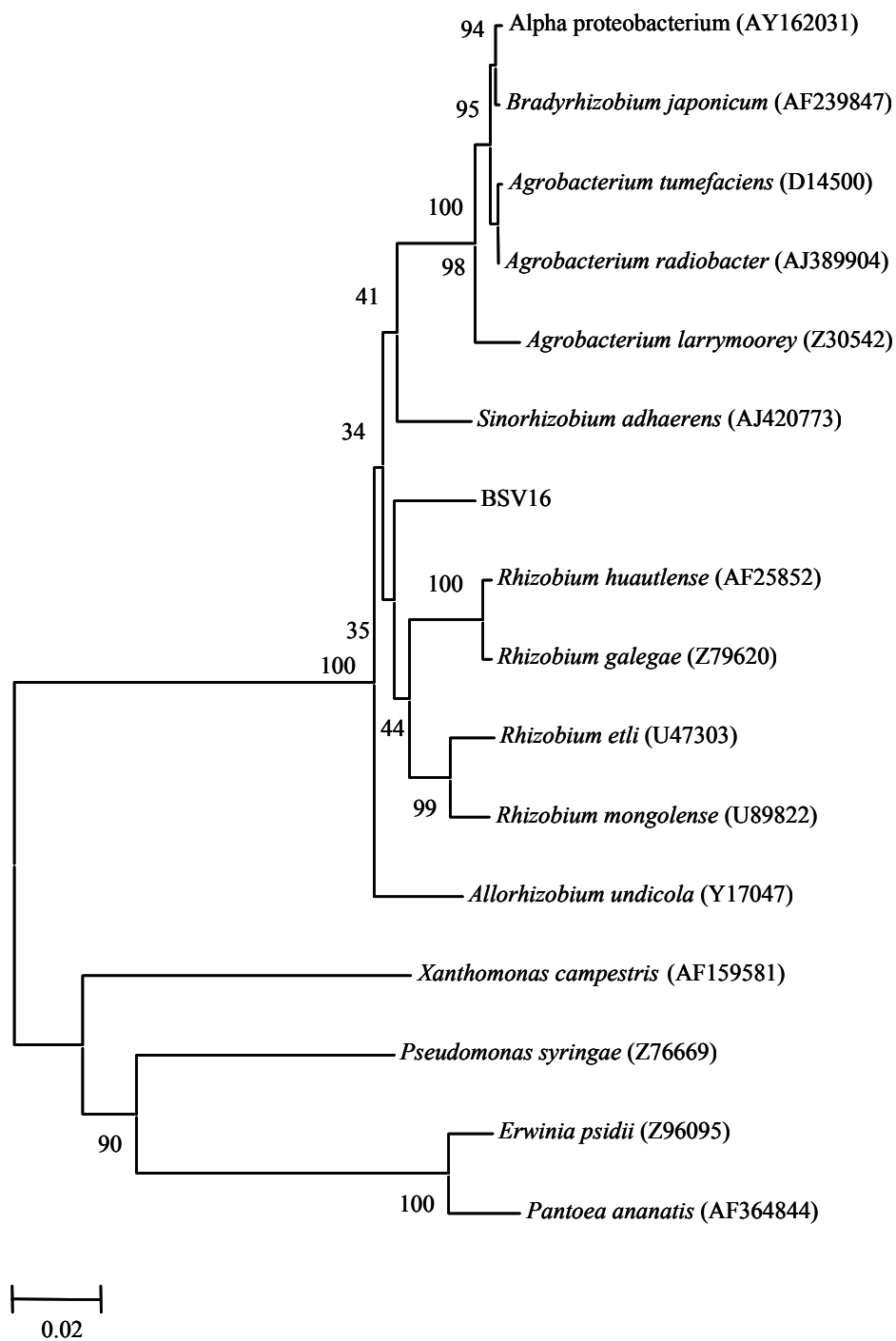


Figura 4A – Análise de agrupamento com seqüência completa de rDNA16S de bactéria isolada de mancha foliar de *Eucalyptus* spp., isolado BSV16, espécies de bactérias fitopatogênicas e de espécies da família Rhizobiaceae, obtidas no GenBank. Dendrograma obtido a partir do método do vizinho mais próximo e valores de “bootstrap” a partir de 2.000 repetições. Código de acesso ao GenBank entre parênteses.

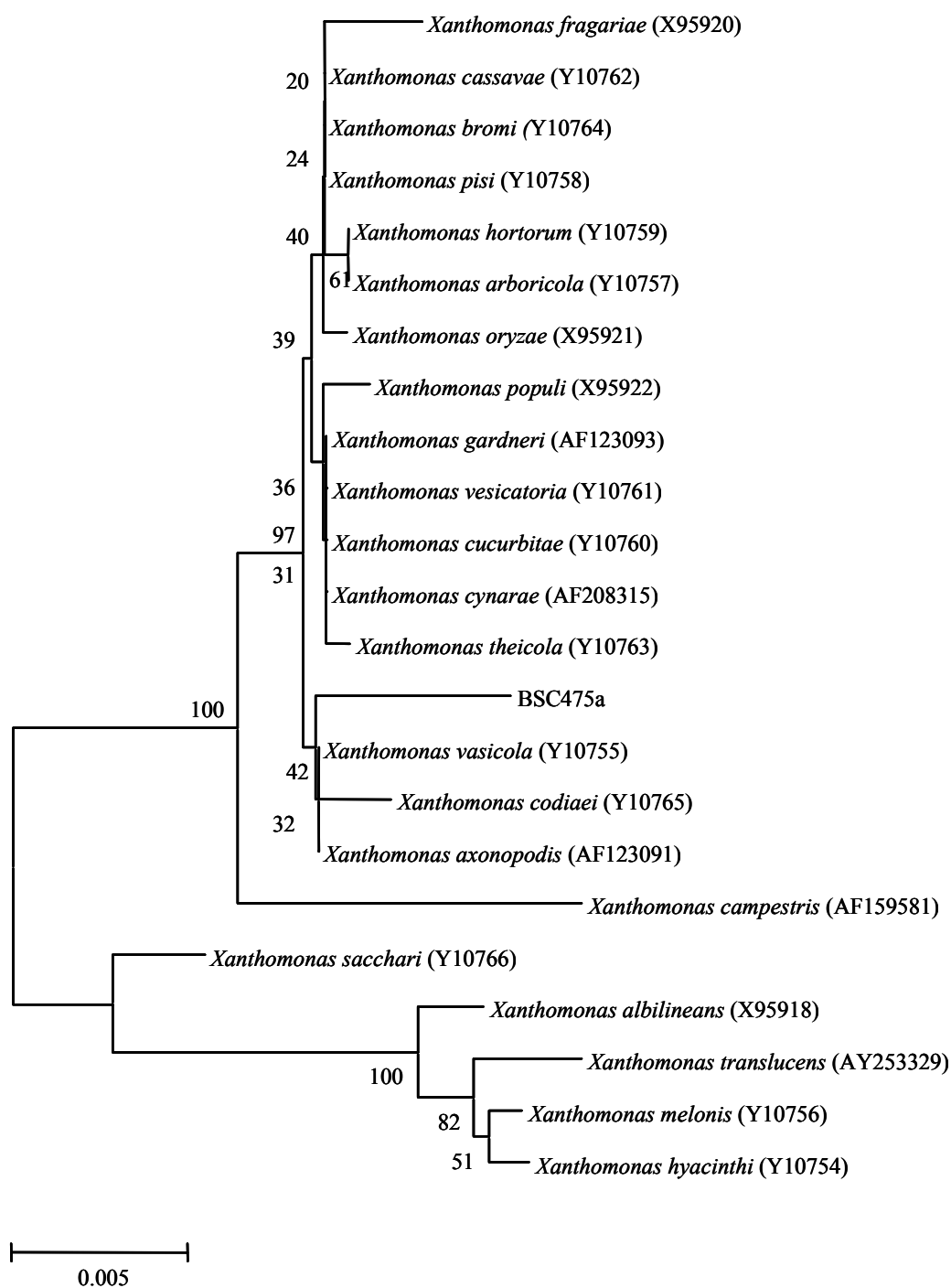


Figura 5A – Análise de agrupamento com sequência completa de rDNA16S de bactéria isolada de mancha foliar de *Eucalyptus* spp., isolado BSC475a, e de espécies de *Xanthomonas* spp., obtidas no GenBank. Dendrograma obtido a partir do método do vizinho mais próximo e valores de “bootstrap” a partir de 2.000 repetições. Código de acesso ao GenBank entre parênteses.

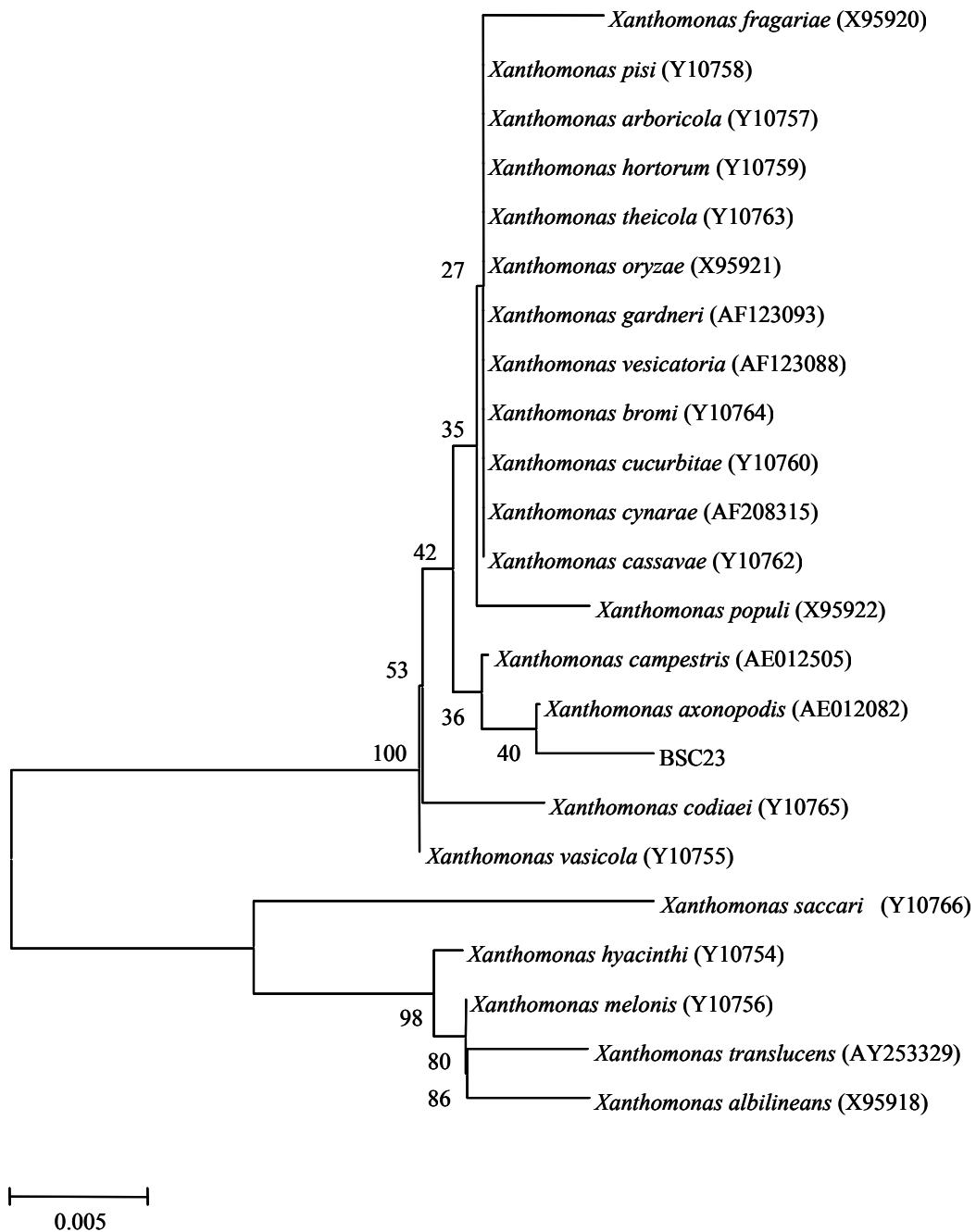


Figura 6A – Análise de agrupamento com seqüência parcial de rDNA16S de bactéria isolada de mancha foliar de *Eucalyptus* spp., isolado BSC23, e de espécies de *Xanthomonas* spp., obtidas no GenBank. Dendrograma obtido a partir do método do vizinho mais próximo e valores de “bootstrap” a partir de 2.000 repetições. Código de acesso ao GenBank entre parênteses.

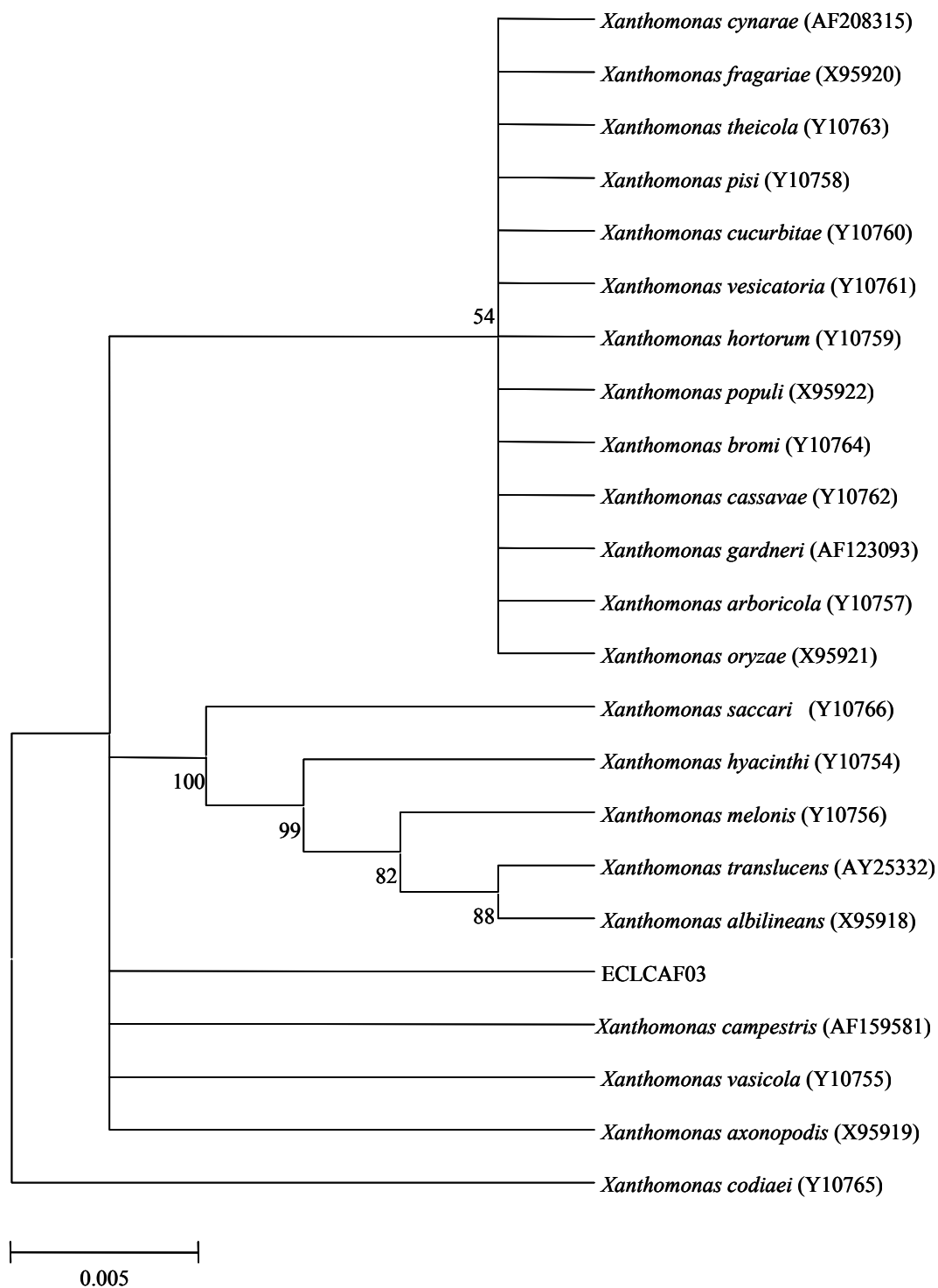


Figura 7A – Análise de agrupamento com seqüência parcial de rDNA16S de bactéria isolada de mancha foliar de *Eucalyptus* spp., isolado ECLCAF3, e de espécies de *Xanthomonas* spp., obtidas no GenBank. Dendrograma obtido a partir do método do vizinho mais próximo e valores de “bootstrap” a partir de 2.000 repetições. Código de acesso ao GenBank entre parênteses.

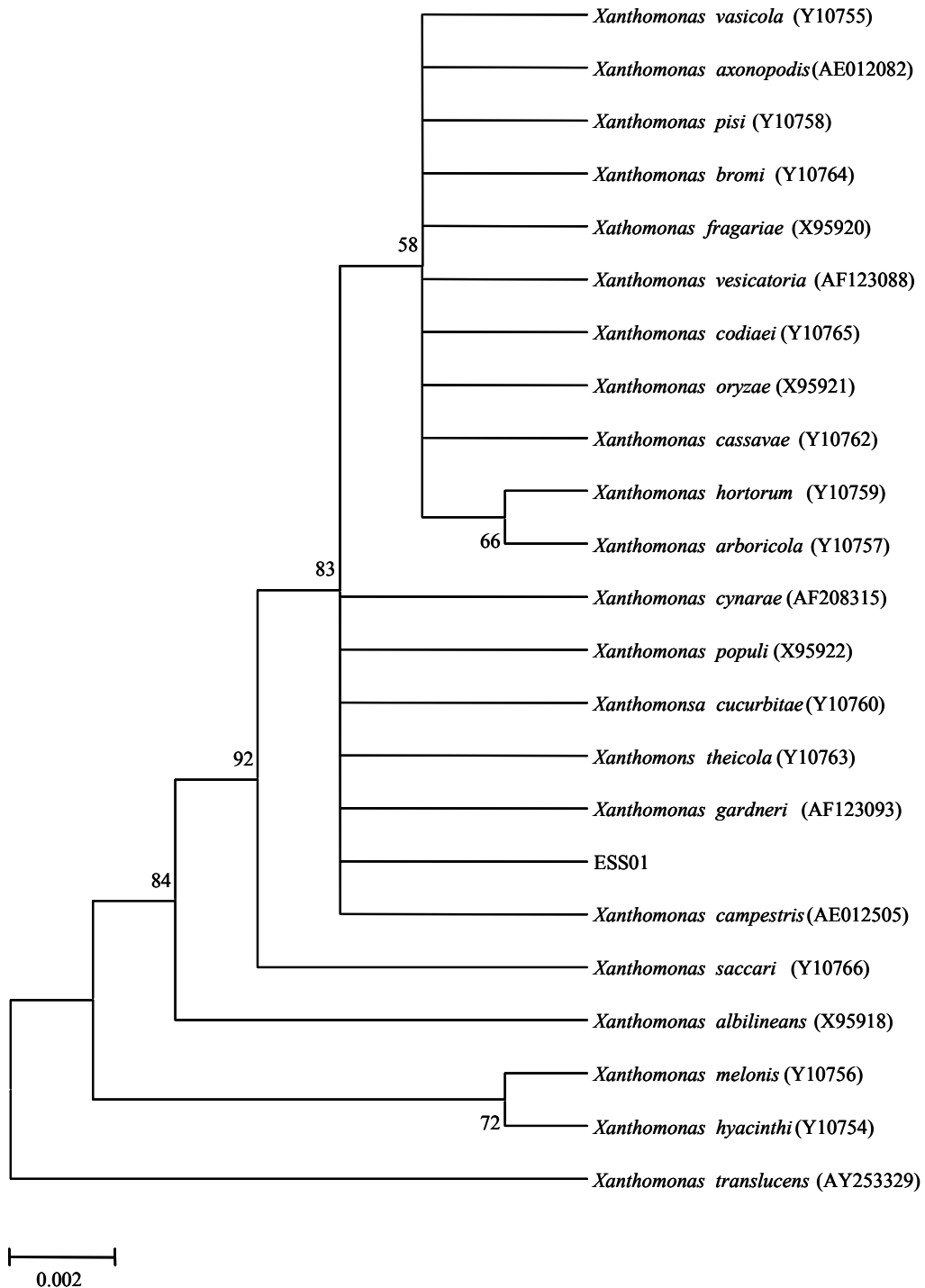


Figura 8A – Análise de agrupamento com seqüência parcial de rDNA16S de bactéria isolada de mancha foliar de *Eucalyptus* spp., isolado ESS01, e de espécies de *Xanthomonas* spp., obtidas no GenBank. Dendrograma obtido a partir do método do vizinho mais próximo e valores de “bootstrap” a partir de 2.000 repetições. Código de acesso ao GenBank entre parênteses.

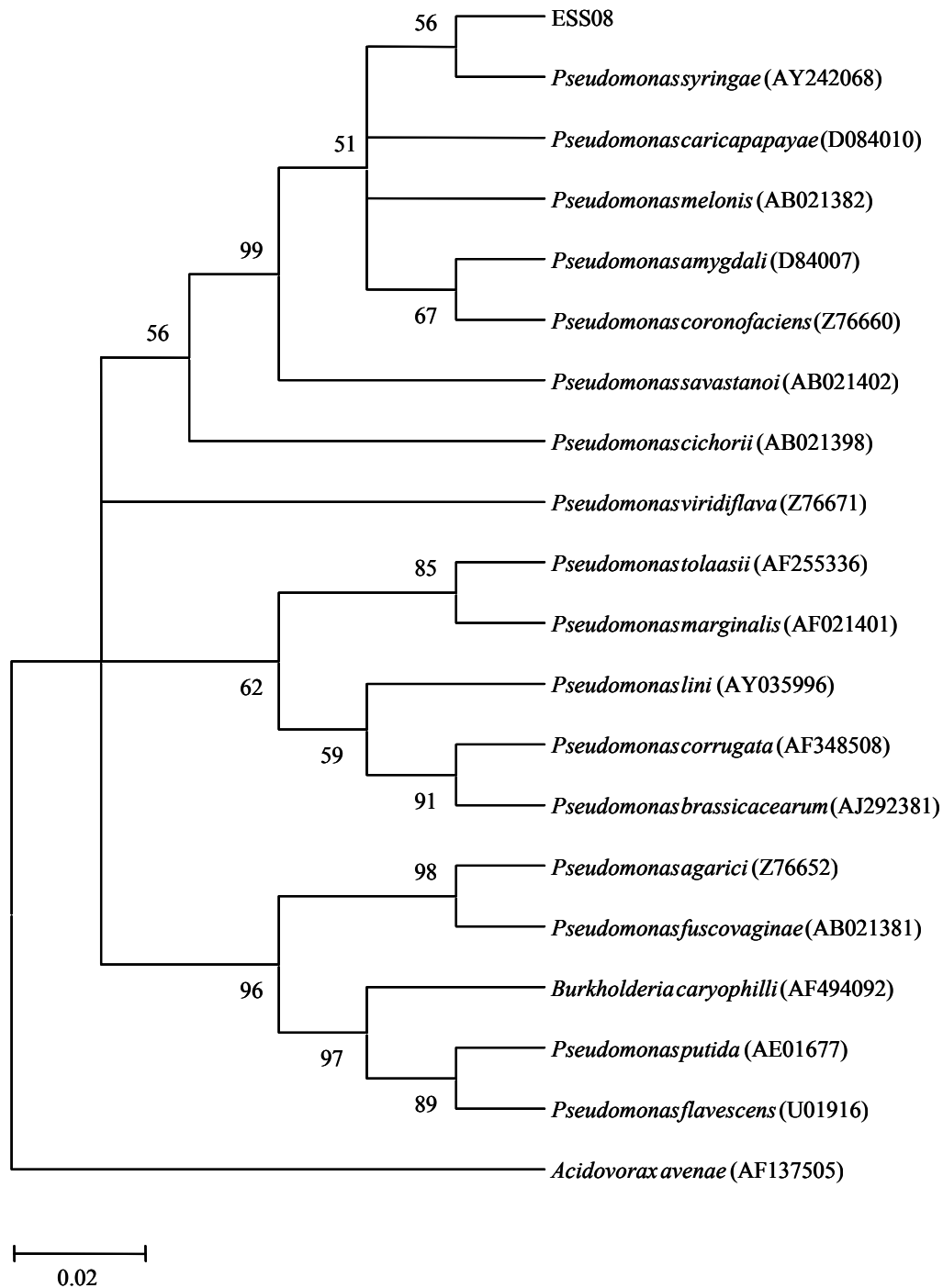


Figura 9A – Análise de agrupamento com seqüência completa de rDNA16S de bactéria isolada de mancha foliar de *Eucalyptus* spp., isolado ESS08, e de espécies de *Pseudomonas* spp., *Burkholderia caryophylli* e *Acidovorax avenae avenae*, obtidas no GenBank. Dendrograma obtido a partir do método do vizinho mais próximo e valores de “bootstrap” a partir de 2.000 repetições. Código de acesso ao GenBank entre parênteses.

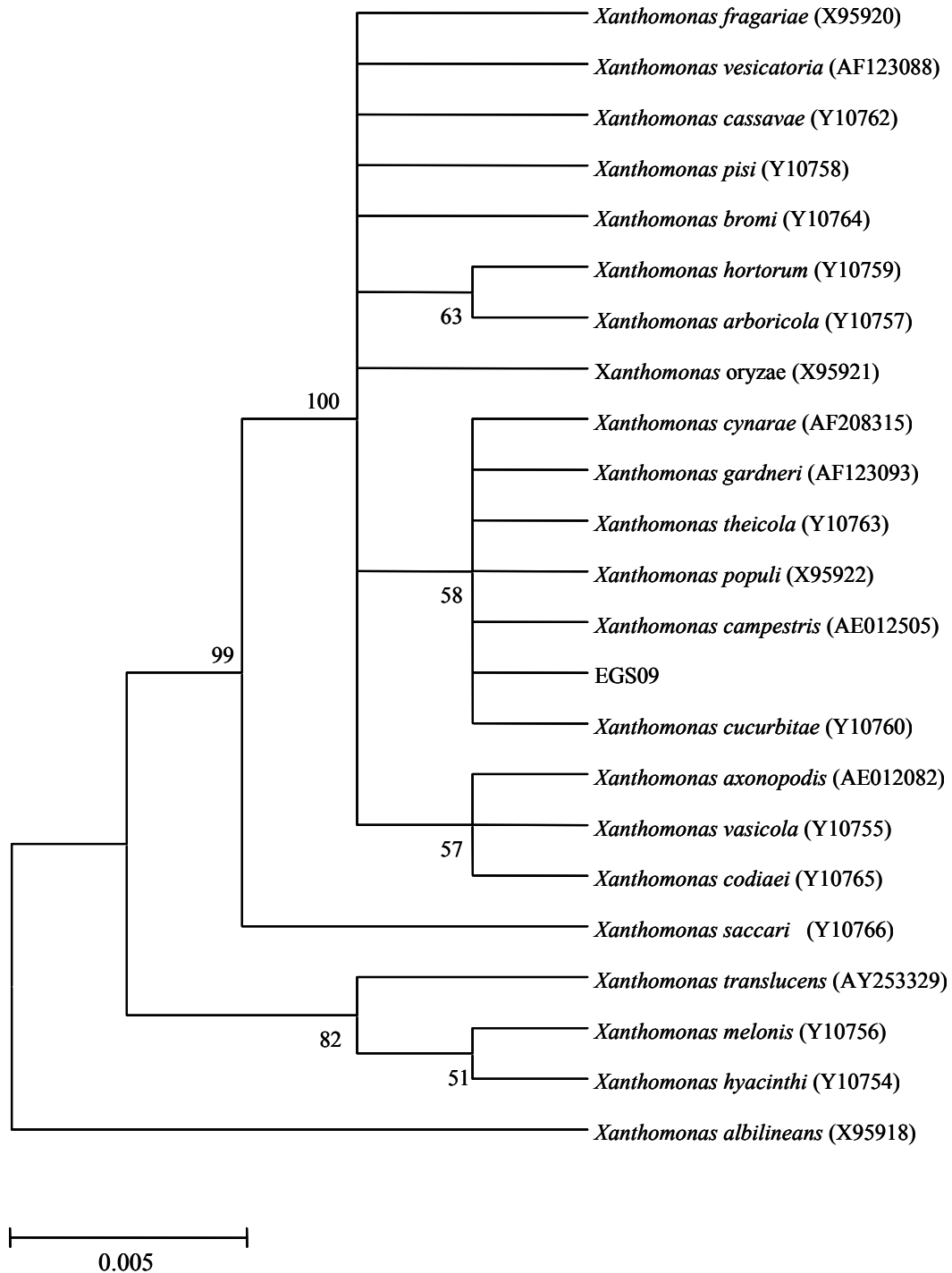


Figura 10A – Análise de agrupamento com seqüência parcial de rDNA16S de bactéria isolada de mancha foliar de *Eucalyptus* spp., isolado ESS01, e de espécies de *Xanthomonas* spp., obtidas no GenBank. Dendrograma obtido a partir do método do vizinho mais próximo e valores de “bootstrap” a partir de 2.000 repetições. Código de acesso ao GenBank entre parênteses.

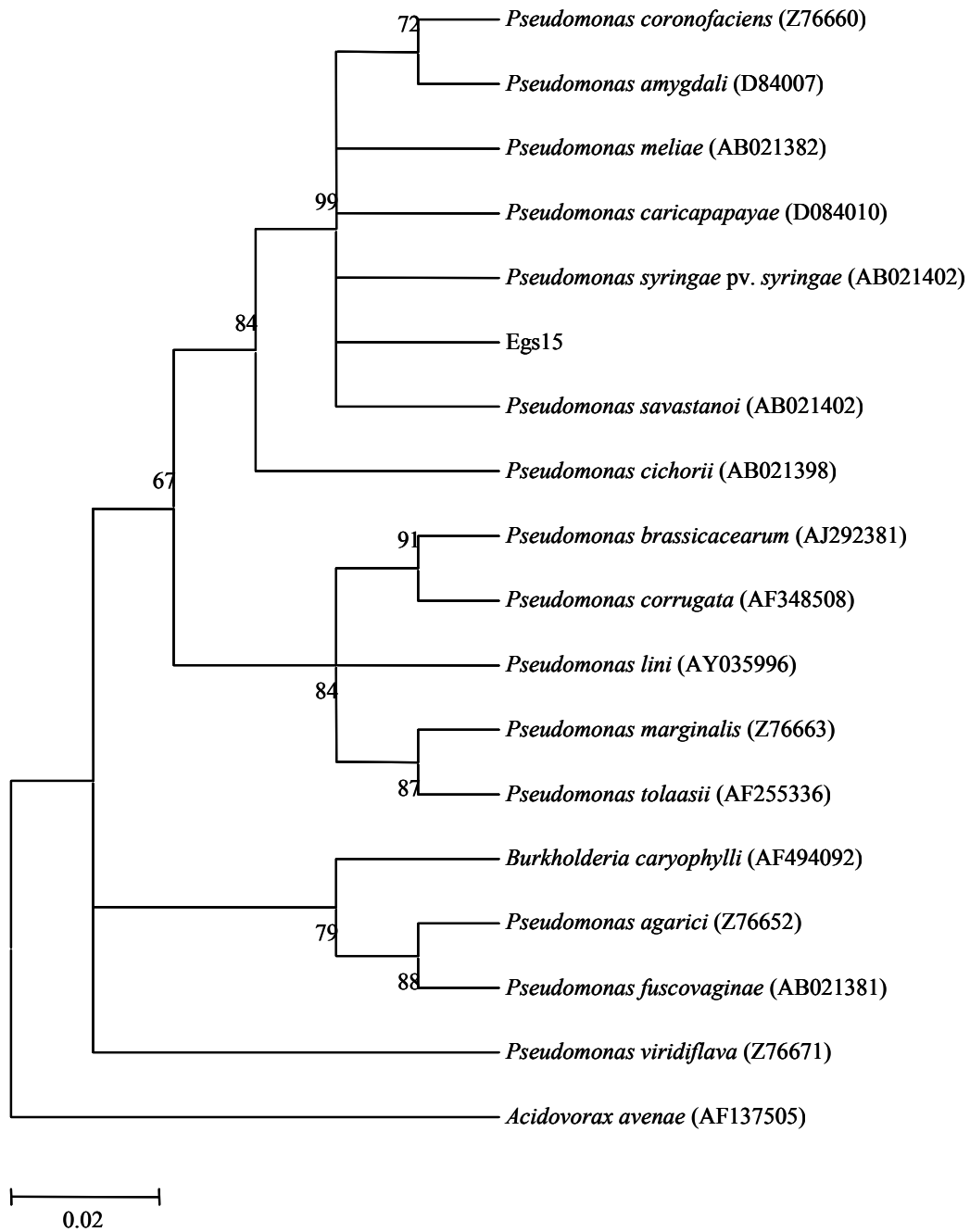
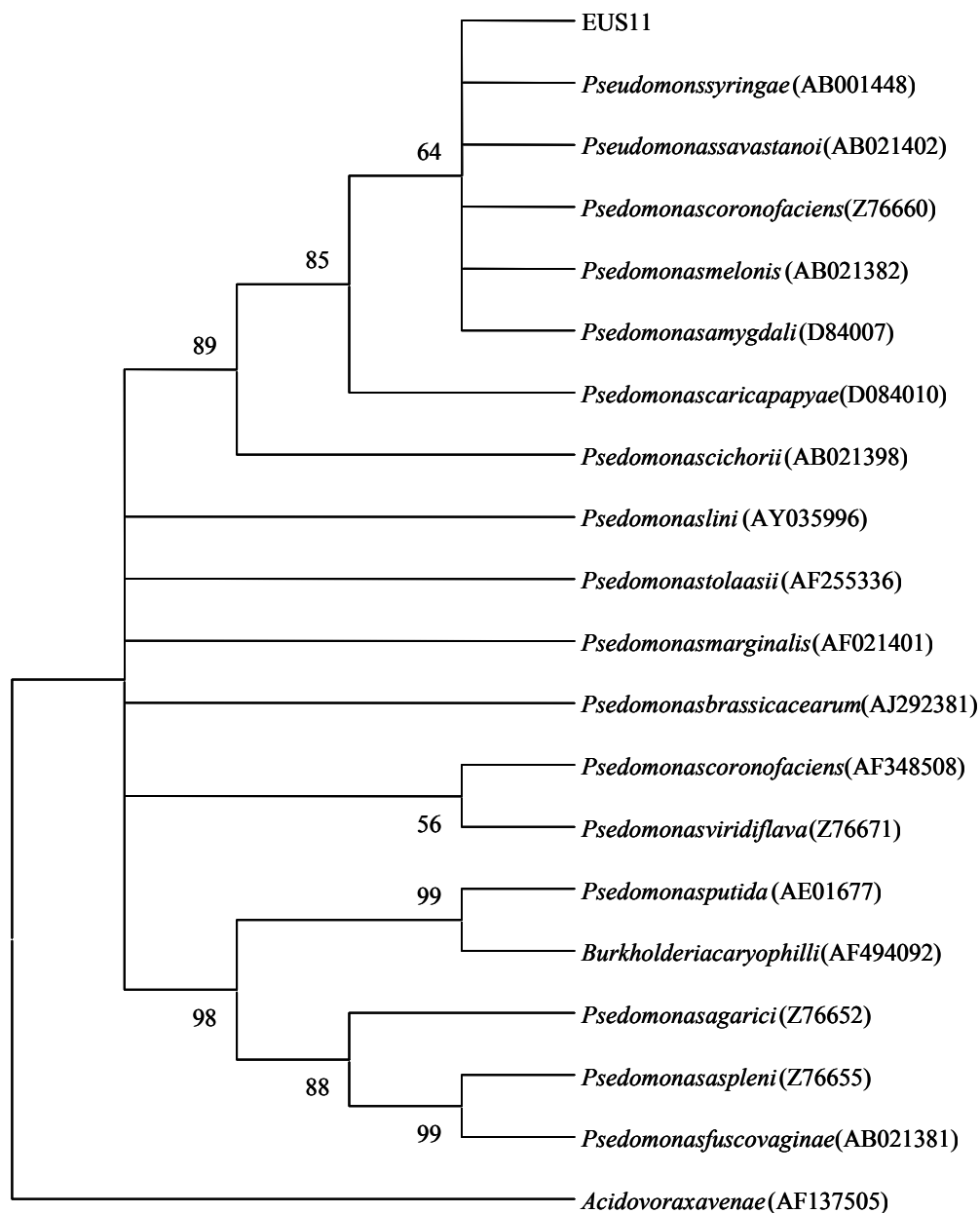


Figura 11A – Análise de agrupamento com seqüência completa de rDNA16S de bactéria isolada de mancha foliar de *Eucalyptus* spp., isolado EGS15, e de espécies de *Pseudomonas* spp., *Burkholderia caryophylli* e *Acidovorax avenae*, obtidas no GenBank. Dendrograma obtido a partir do método do vizinho mais próximo e valores de “bootstrap” a partir de 2.000 repetições. Código de acesso ao GenBank entre parênteses.



0.002

Figura 12A – Análise de agrupamento com seqüência de rDNA16S de bactéria isolada de mancha foliar de *Eucalyptus* spp., isolado EUS11, e de espécies de *Pseudomonas* spp., *Burkholderia caryophylli* e *Acidovorax avenae*, obtidas no GenBank. Dendrograma obtido a partir do método do vizinho mais próximo e valores de “bootstrap” a partir de 2.000 repetições. Código de acesso ao GenBank entre parênteses.

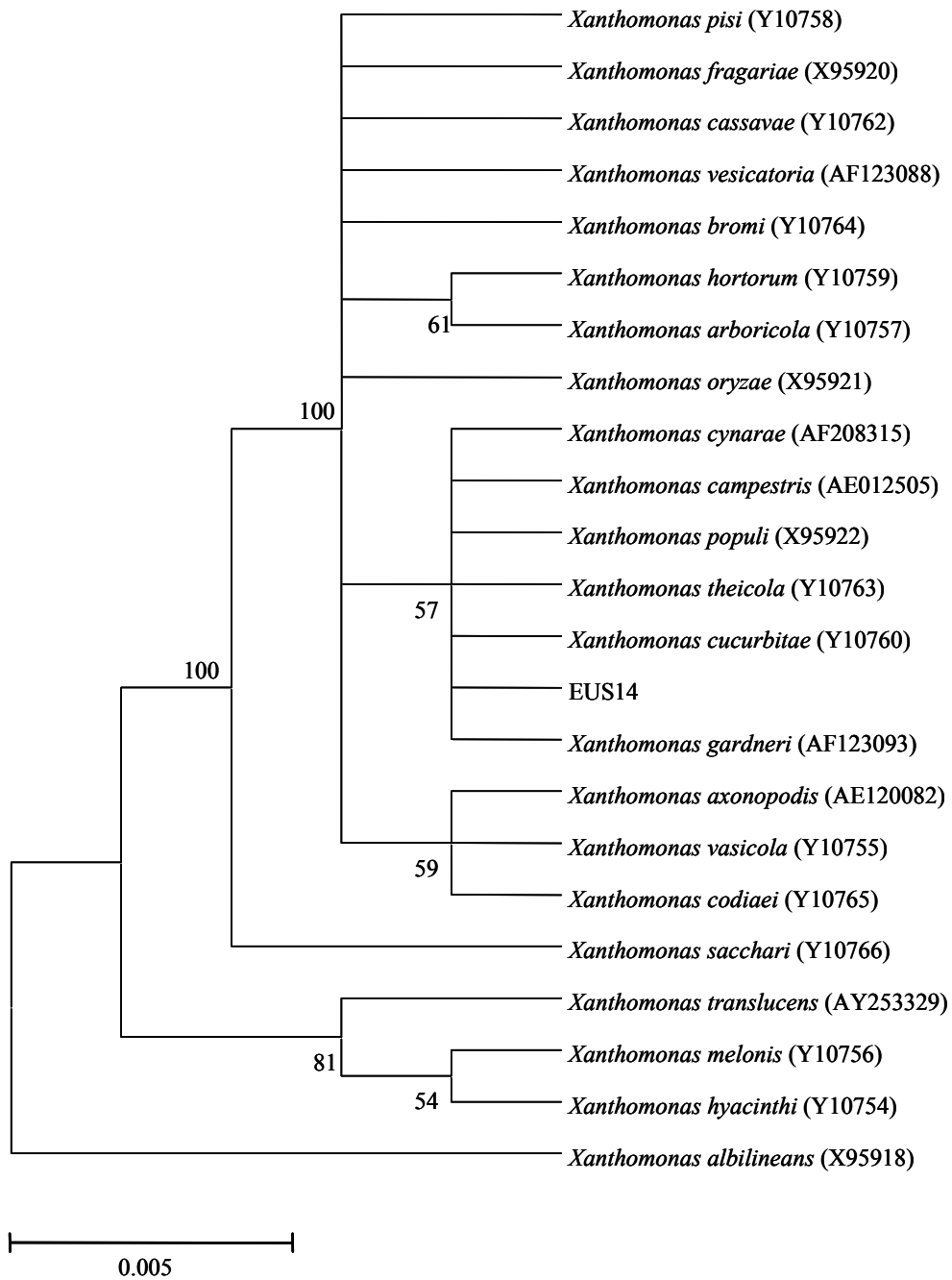


Figura 13A – Análise de agrupamento com seqüência completa de rDNA16S de bactéria isolada de mancha foliar de *Eucalyptus* spp., isolado EUS14, e de espécies de *Xanthomonas* spp., obtidas no GenBank. Dendrograma obtido a partir do método do vizinho mais próximo e valores de “bootstrap” a partir de 2.000 repetições. Código de acesso ao GenBank entre parênteses.

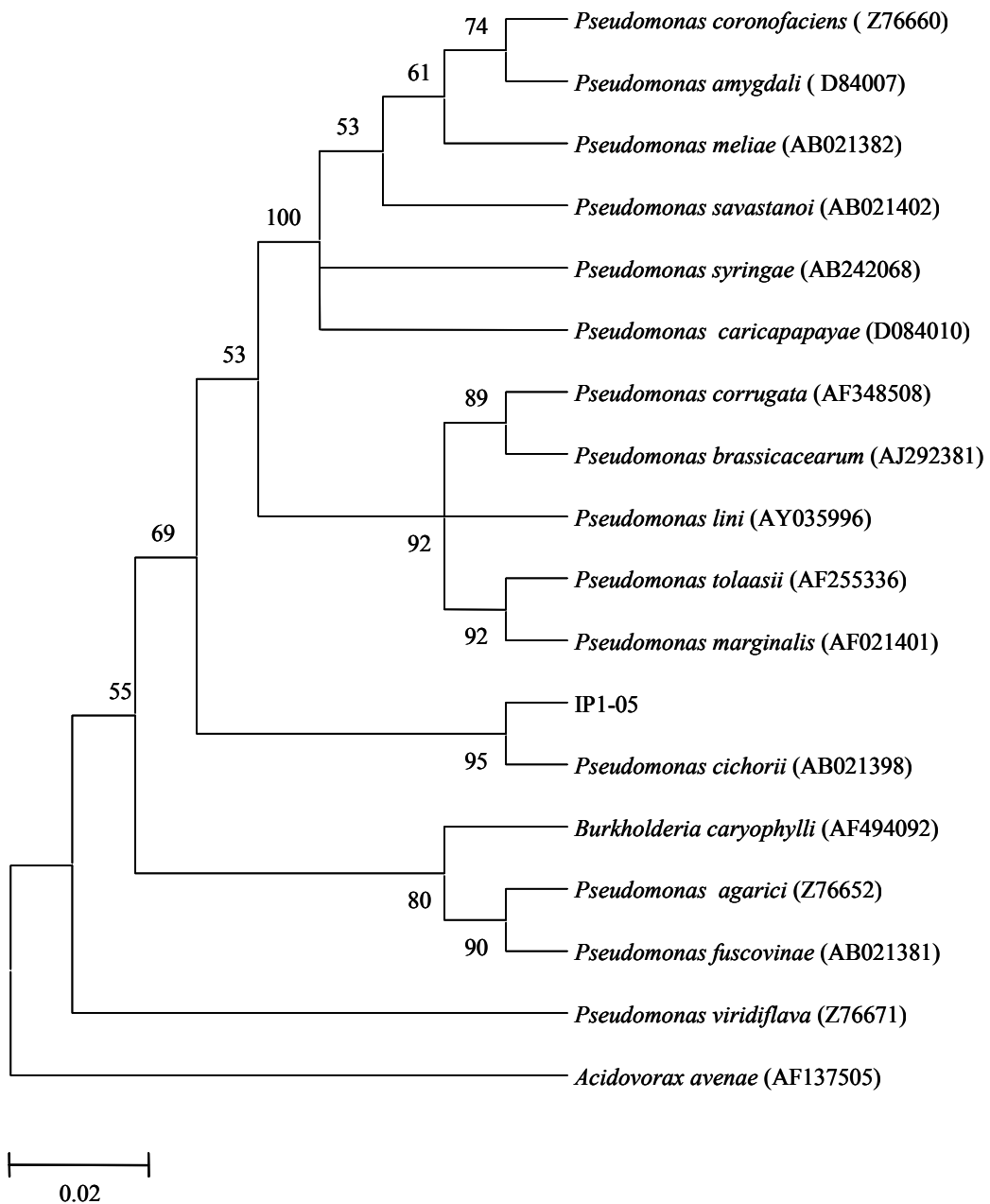


Figura 14A – Análise de agrupamento com seqüência completa de rDNA16S de bactéria isolada de mancha foliar de *Eucalyptus* spp., isolado IP1-05, e de espécies de *Pseudomonas* spp., *Burkholderia caryophylli* e *Acidovorax avenae*, obtidas no GenBank. Dendrograma obtido a partir do método do vizinho mais próximo e valores de “bootstrap” a partir de 2.000 repetições. Código de acesso ao GenBank entre parênteses.

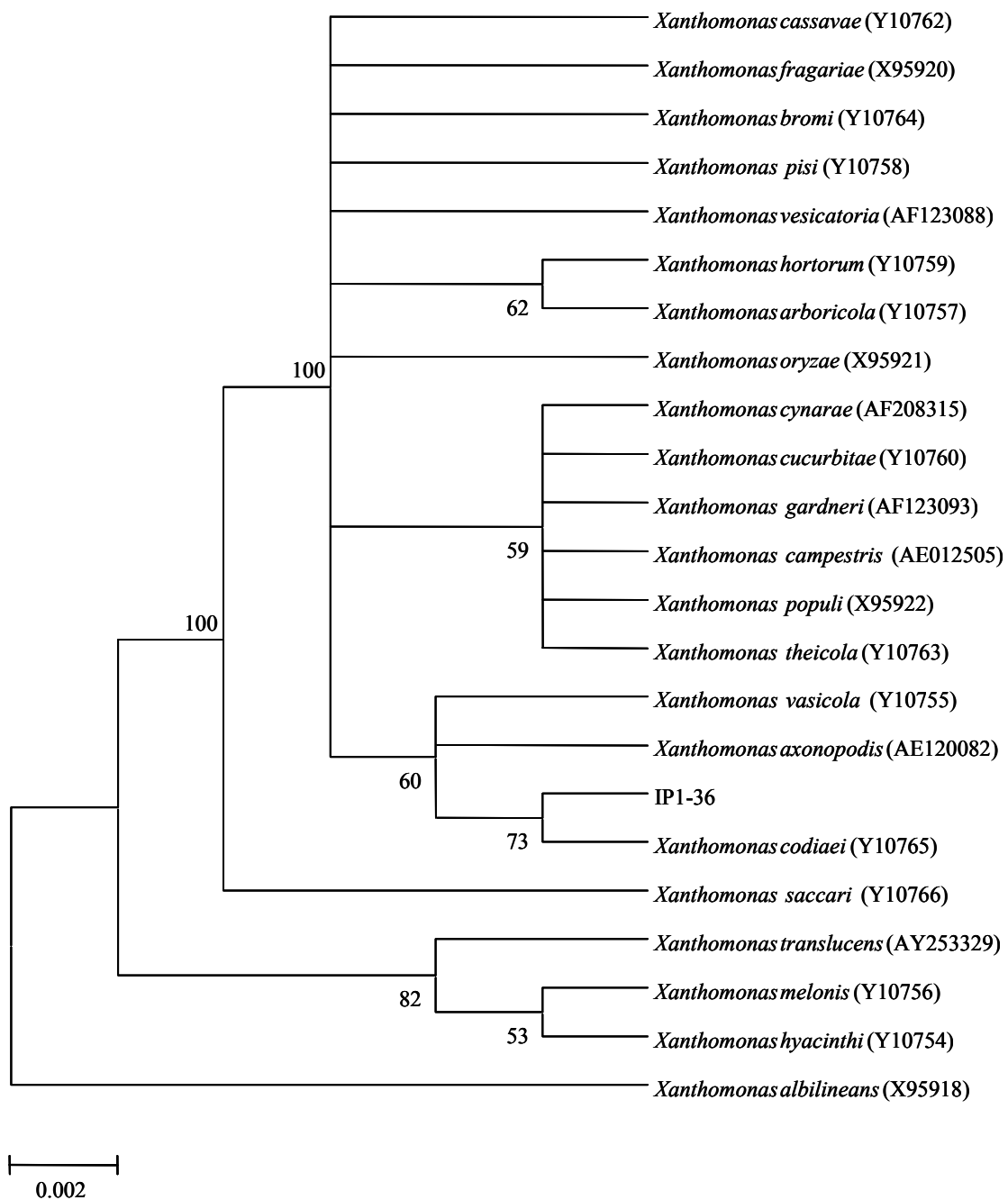


Figura 15A – Análise de agrupamento com seqüência completa de rDNA16S de bactéria isolada de mancha foliar de *Eucalyptus* spp., isolado IPI-36, e de espécies de *Xanthomonas* spp., obtidas no GenBank. Dendrograma obtido a partir do método do vizinho mais próximo e valores de “bootstrap” a partir de 2.000 repetições. Código de acesso ao GenBank entre parênteses.

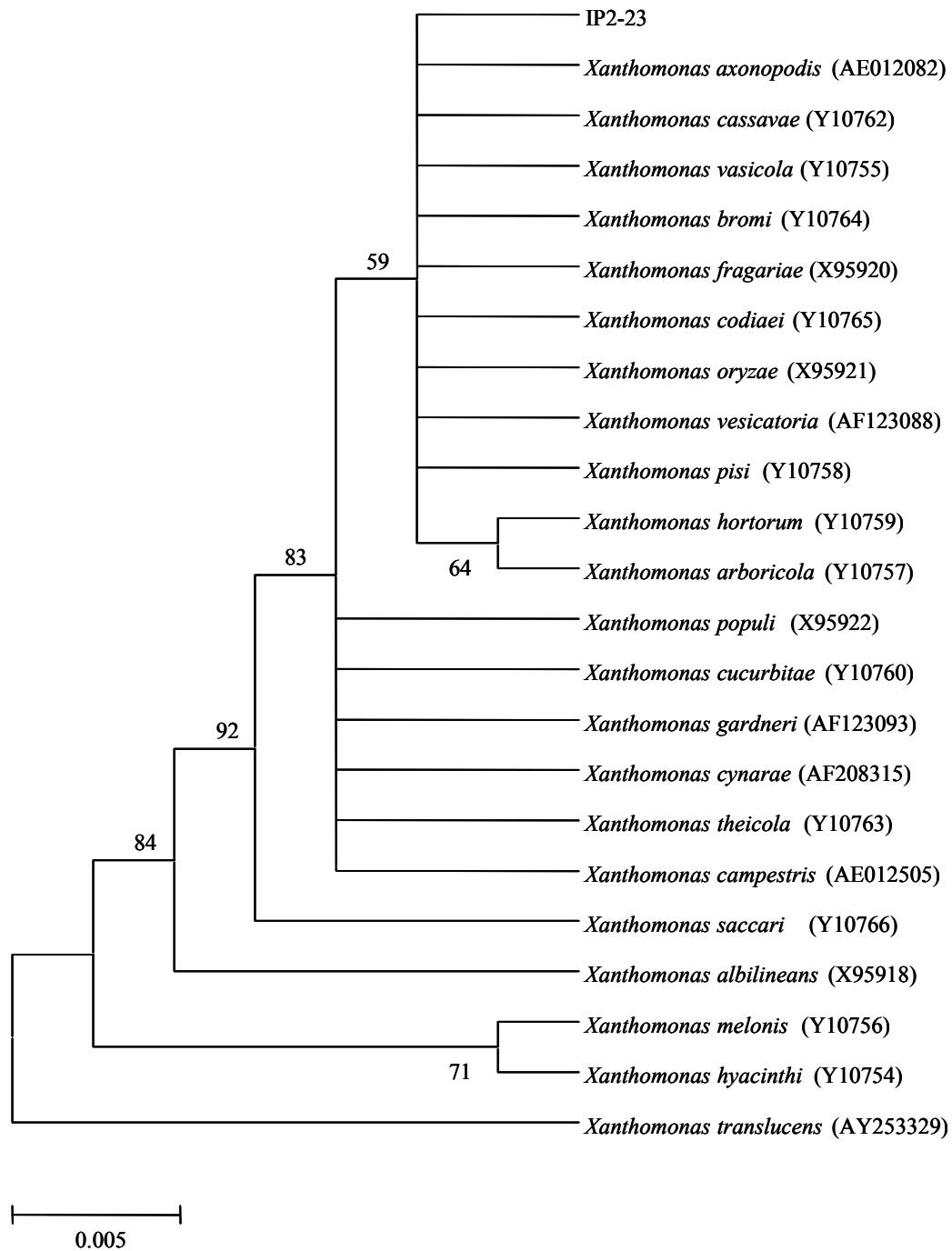


Figura 16A – Análise de agrupamento com seqüência parcial de rDNA16S de bactéria isolada de mancha foliar de *Eucalyptus* spp., isolada IP2-23, e de espécies de *Xanthomonas* spp., obtidas no GenBank. Dendrograma obtido a partir do método do vizinho mais próximo e valores de “bootstrap” a partir de 2.000 repetições. Código de acesso ao GenBank entre parênteses.

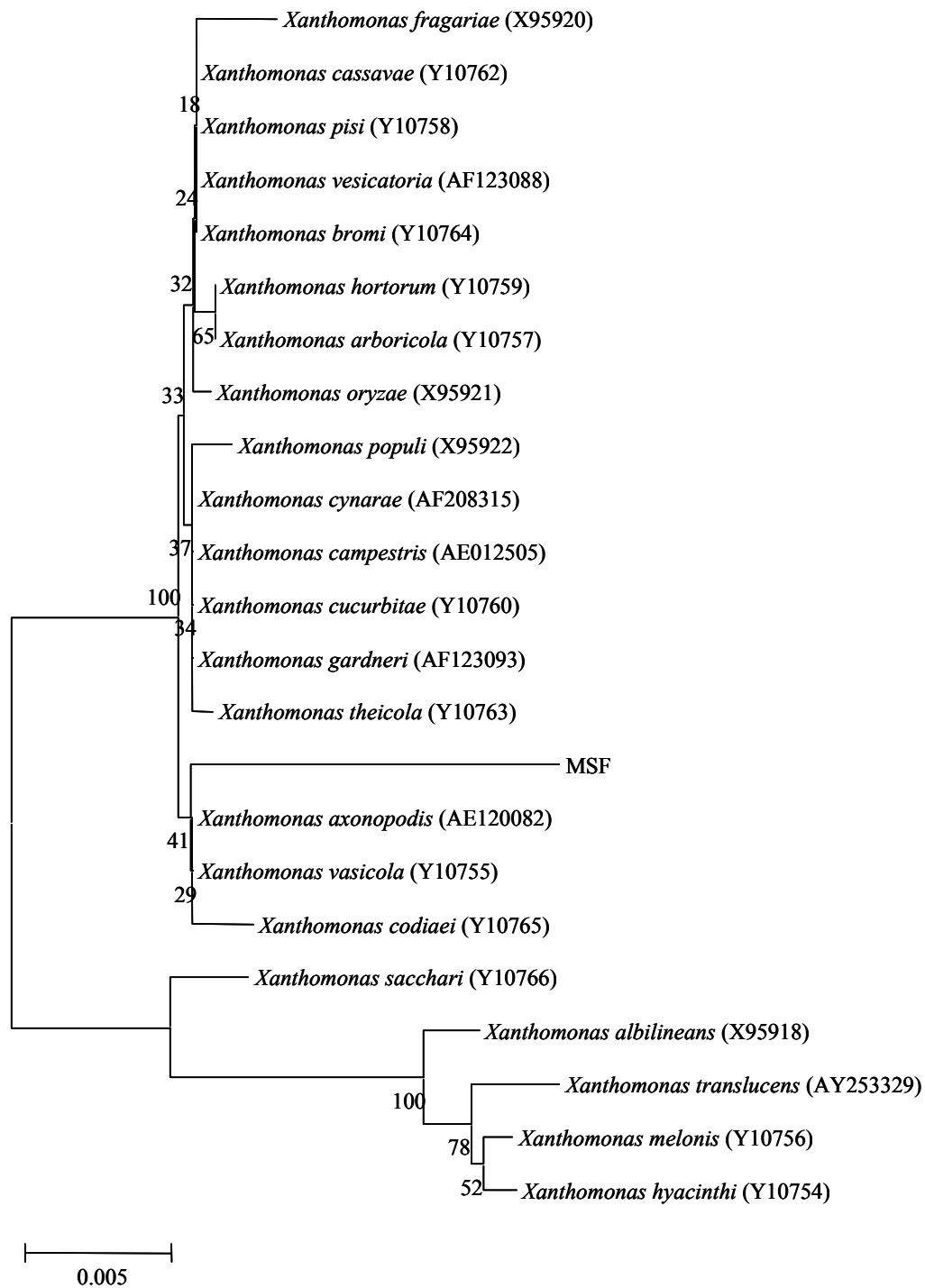
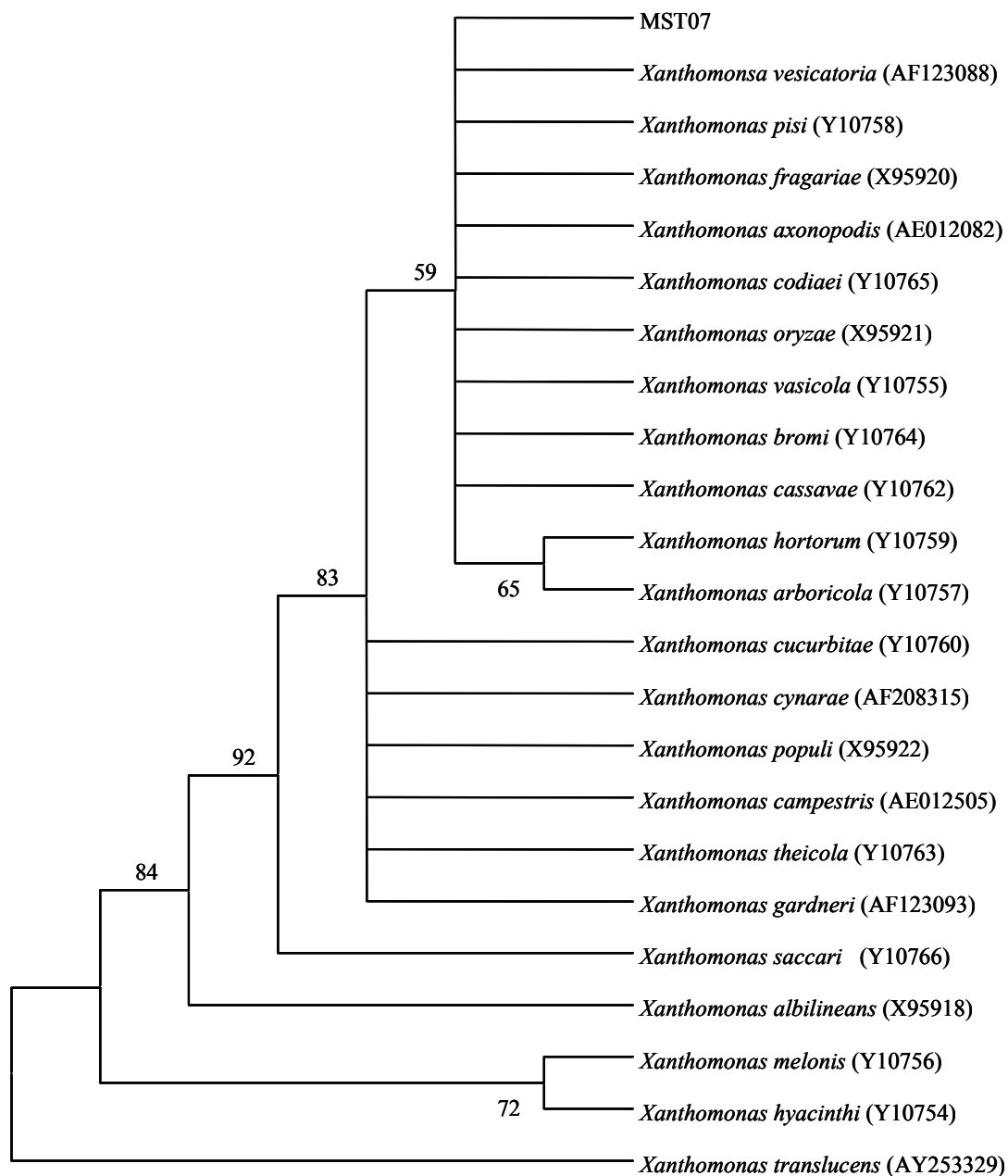


Figura 17A – Análise de agrupamento com seqüência completa de rDNA16S de bactéria isolada de mancha foliar de *Eucalyptus* spp., isolado MSF, e de espécies de *Xanthomonas* spp. Dendrograma obtido a partir do método do vizinho mais próximo e valores de “bootstrap” a partir de 2.000 repetições. Código de acesso ao GenBank entre parênteses. Código de acesso ao GenBank entre parênteses.



0.002

Figura 18A – Análise de agrupamento com seqüência parcial de rDNA16S de bactéria isolada de mancha foliar de *Eucalyptus* spp., isolado MST07, e de espécies de *Xanthomonas* spp., obtidas no GenBank. Dendrograma obtido a partir do método do vizinho mais próximo e valores de “bootstrap” a partir de 2.000 repetições. Código de acesso ao GenBank entre parênteses.

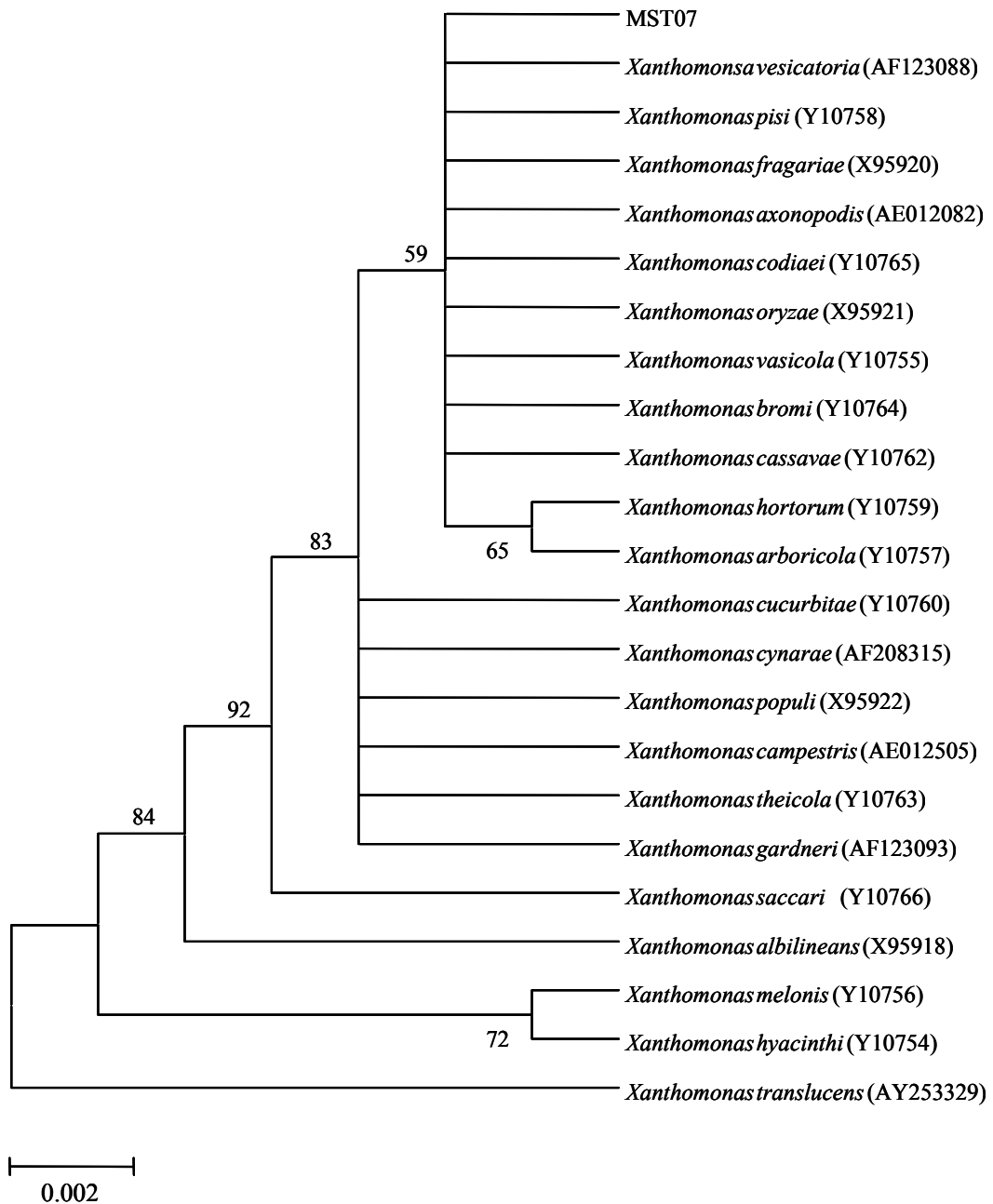


Figura 19A – Análise de agrupamento com seqüência parcial de rDNA16S de bactéria isolada de mancha foliar de *Eucalyptus* spp., isolado MST09, e de espécies de *Pseudomonas* spp., *Burkholderia caryophylli* e *Acidovorax avenae*, obtidas no GenBank. Dendrograma obtido a partir do método do vizinho mais próximo e valores de “bootstrap” a partir de 2.000 repetições. Código de acesso ao GenBank entre parênteses.

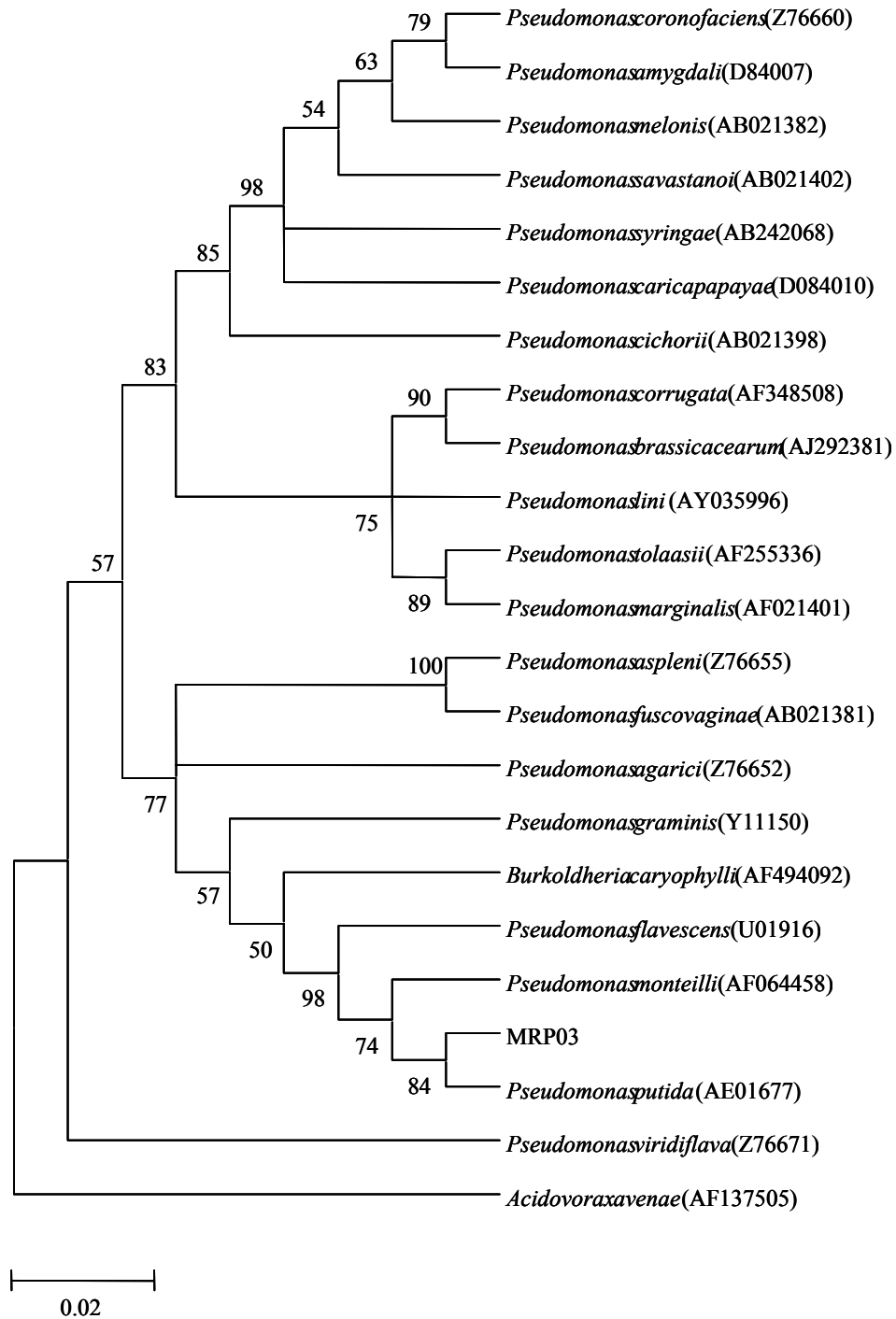


Figura 20A – Análise de agrupamento com seqüência parcial de rDNA16S de bactéria isolada de mancha foliar de *Eucalyptus* spp., isolado MRP03, e de espécies de *Pseudomonas* spp., *Burkholderia caryophylli* e *Acidovorax avenae*, obtidas no GenBank. Dendrograma obtido a partir do método do vizinho mais próximo e valores de “bootstrap” a partir de 2.000 repetições. Código de acesso ao GenBank entre parênteses.

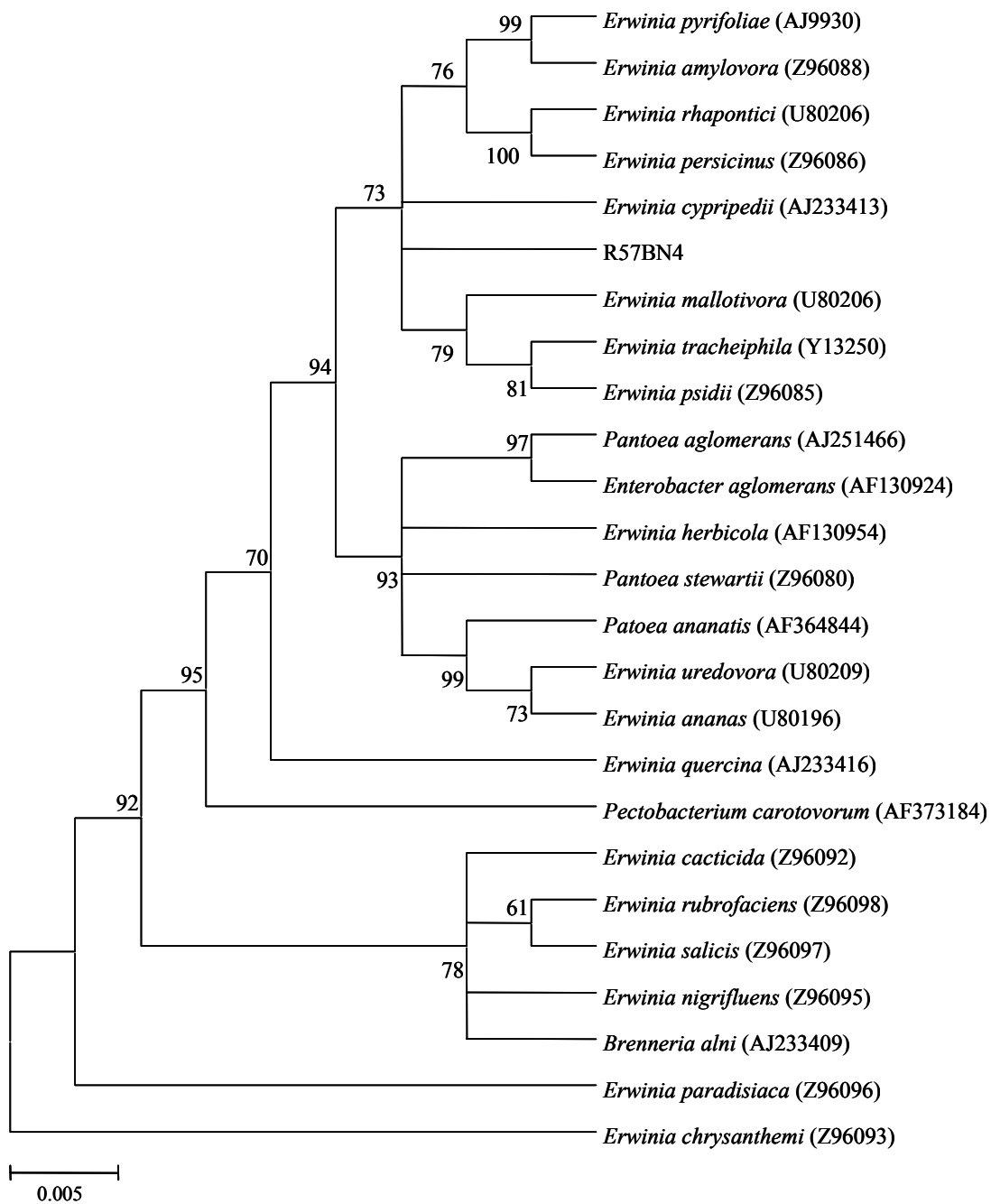


Figura 21A – Análise de agrupamento com seqüência parcial de rDNA16S de bactéria isolada de mancha foliar de *Eucalyptus* spp., isolado R57BN4, e de espécies de *Erwinia*, *Pantoea* e *Brenneria*, obtidas no GenBank. Dendrograma obtido a partir do método do vizinho mais próximo e valores de “bootstrap” a partir de 2.000 repetições. Código de acesso ao GenBank entre parênteses.

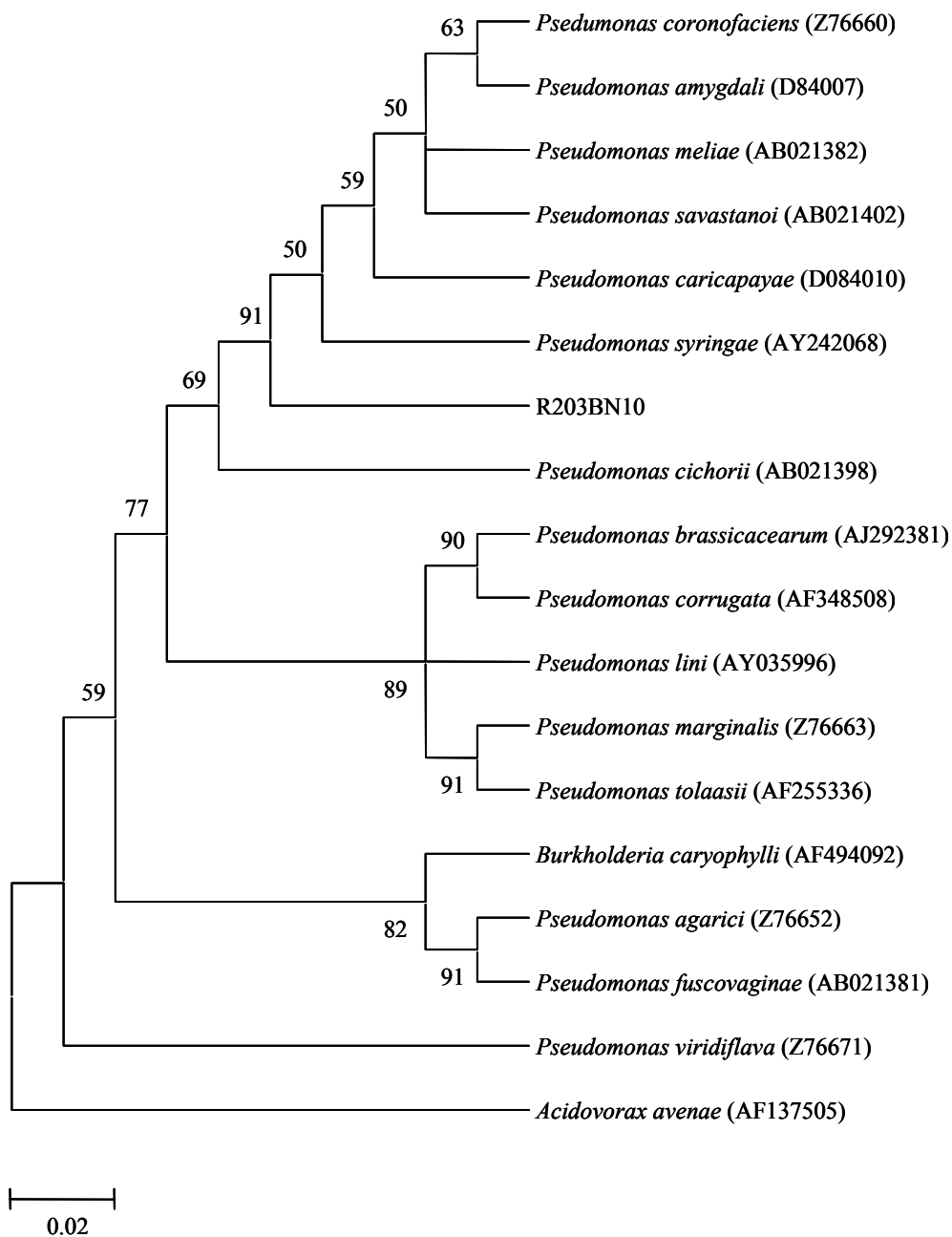


Figura 22A – Análise de agrupamento com seqüência completa de rDNA16S de bactéria isolada de mancha foliar de *Eucalyptus* spp., isolado R203BN10, e de espécies de *Pseudomonas* spp., *Burkholderia caryophylli* e *Acidovorax avenae*, obtidas no GenBank. Dendrograma obtido a partir do método do vizinho mais próximo e valores de “bootstrap” a partir de 2.000 repetições. Código de acesso ao GenBank entre parênteses.

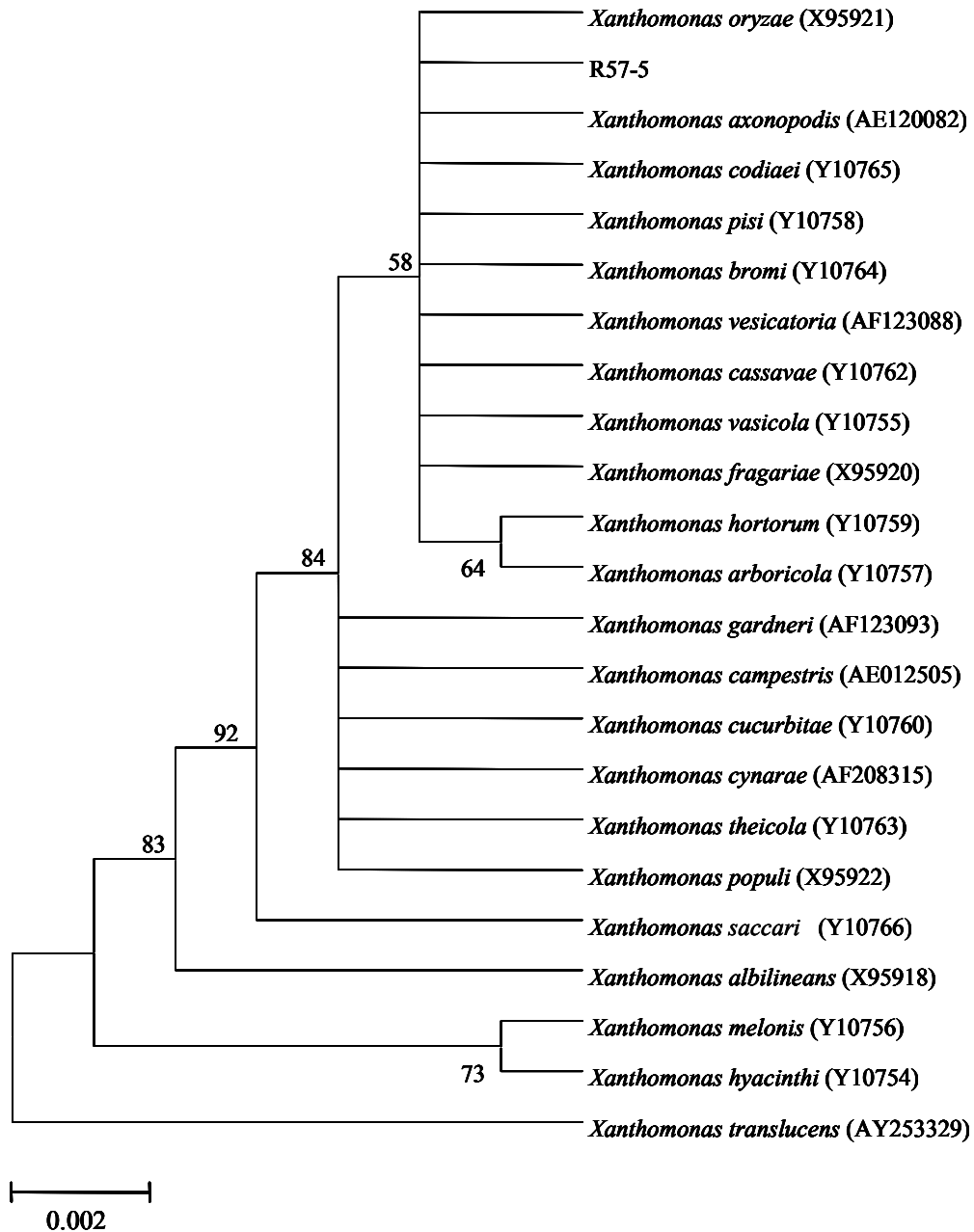


Figura 24A – Análise de agrupamento com seqüência parcial de rDNA16S de bactéria isolada de mancha foliar de *Eucalyptus* spp., isolado R57-5, e de espécies de *Xanthomonas* spp., obtidas no GenBank. Dendrograma obtido a partir do método do vizinho mais próximo e valores de “bootstrap” a partir de 2.000 repetições. Código de acesso ao GenBank entre parênteses.

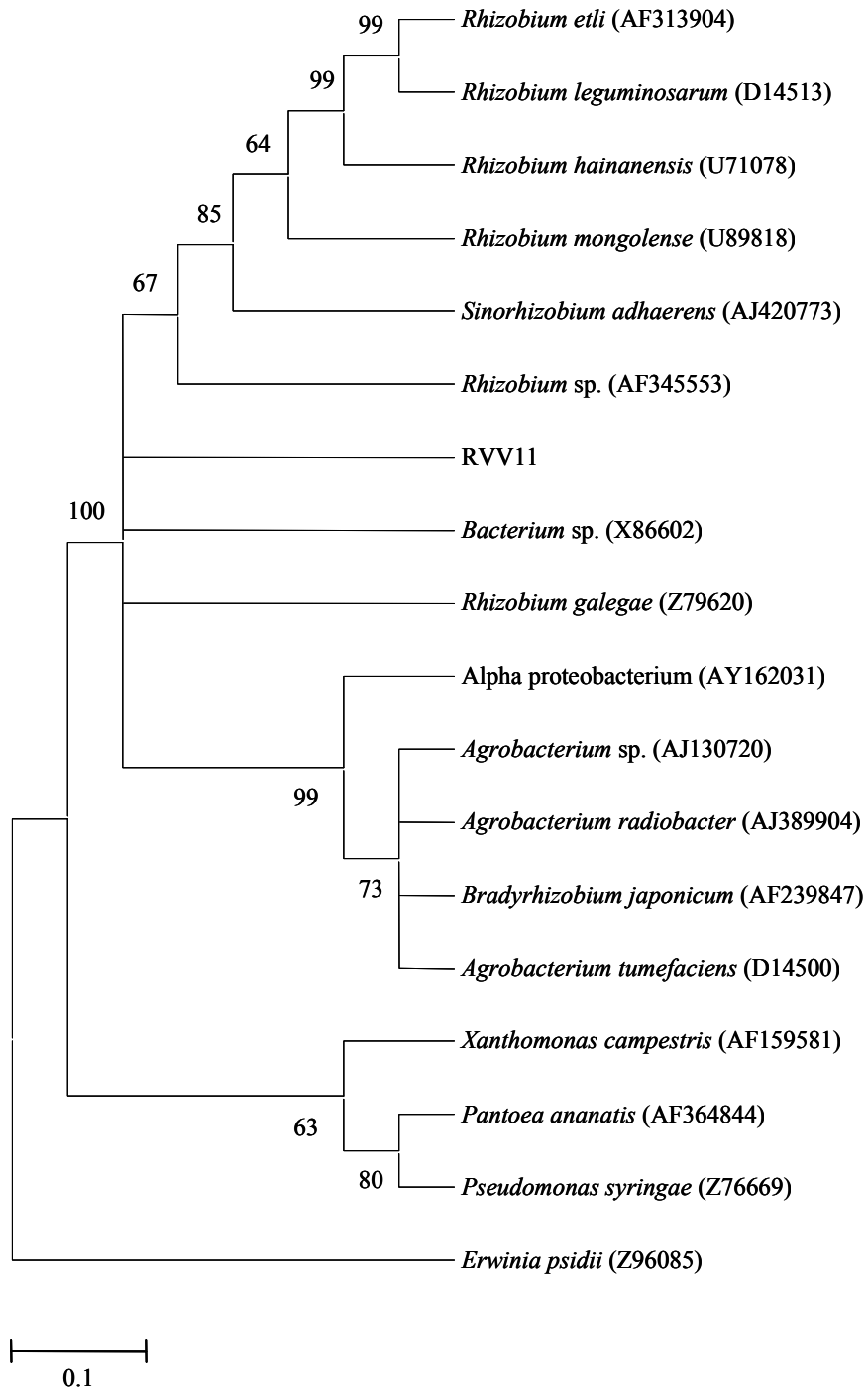


Figura 25A – Análise de agrupamento com seqüência parcial de rDNA16S de bactéria isolada de mancha foliar de *Eucalyptus* spp., isolado RVV11, espécies de bactérias fitopatogênicas e de espécies da família Rhizobiaceae, obtidas no GenBank. Dendrograma obtido a partir do método do vizinho mais próximo e valores de “bootstrap” a partir de 2.000 repetições. Código de acesso ao GenBank entre parênteses.