

ISSN 1980-041X

Outubro, 2007

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária*

*Embrapa Florestas*

*Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

# ***Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 31***

## **Gomose da Acácia-Negra: Etiologia, Análise Temporal, Perdas e Controle Genético**

*Álvaro Figueredo dos Santos*

*Edna Dora Martins Newman Luz*

*Luiz Antonio Maffia*

*Jorge Teodoro de Souza*

Embrapa Florestas

Colombo, PR

2007

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

**Embrapa Florestas**

Estrada da Ribeira, Km 111, CP 319  
83411 000 - Colombo, PR - Brasil  
Fone/Fax: (41) 3675 5600  
www.cnpf.embrapa.br  
sac@cnpf.embrapa.br

**Comitê de Publicações da Unidade**

Presidente: Luiz Roberto Graça  
Secretária-Executiva: Elisabete Marques Oaida  
Membros: Álvaro Figueredo dos Santos, Edilson Batista de  
Oliveira, Honorino Roque Rodigheri, Ivar Wendling, Maria  
Augusta Doetzer Rosot, Patrícia Póvoa de Mattos, Sandra Bos  
Mikich, Sérgio Ahrens

Supervisão editorial: Luiz Roberto Graça  
Revisão de texto: Mauro Marcelo Berté  
Normalização bibliográfica: responsabilidade do autor  
Fotos da capa: Álvaro Figueredo dos Santos  
Editoração eletrônica: Mauro Marcelo Berté

**1ª edição**

1ª impressão (2007): sob demanda

**Todos os direitos reservados**

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em  
parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

***Embrapa Florestas***

---

Gomose da acácia-negra: etiologia, análise temporal, perdas e  
controle genético [recurso eletrônico] / Álvaro Figueredo  
dos Santos ... [et al.]. Dados eletrônicos - Colombo :  
Embrapa Florestas, 2007.

1 CD-ROM. - (Boletim de pesquisa e desenvolvimento /  
Embrapa Florestas, ISSN 1980-041X ; 31)

ISSN 1676-9449 (impresso)

1. *Phytophthora*. 2. *Acacia mearnsii* - Fungo. 3. Doença  
de planta. I. Santos, Álvaro Figueredo dos. II. Luz, Edna Dora  
Martins Newman. III. Maffia, Luiz Antonio. IV. Souza, Jorge  
Teodoro de. V. Série.

CDD 579.546 (21. ed.)

# Sumário

Resumo .....	5
Abstract .....	6
Introdução .....	7
Material e Métodos .....	9
Resultados e Discussão .....	17
Conclusões .....	26
Referências .....	27

# Gomose da acácia-negra: etiologia, análise temporal, perdas e controle genético

---

Álvaro Figueredo dos Santos<sup>1</sup>

Edna Dora Martins Newman Luz<sup>2</sup>

Luiz Antonio Maffia<sup>3</sup>

Jorge Teodoro de Souza<sup>4</sup>

## Resumo

A gomose é um dos mais sérios problemas fitossanitários da acácia-negra (*Acacia mearnsii*) no Rio Grande do Sul. Este trabalho teve como objetivos: 1) identificar a(s) espécie(s) de *Phytophthora* associada(s) à gomose; 2) analisar a distribuição temporal da gomose; 3) quantificar as perdas causadas pela doença; e 4) agrupar os materiais genéticos de acácia-negra de acordo com o nível de resistência à gomose. Os principais resultados foram: *Phytophthora nicotianae* e *P.boehmeriae* são os agentes causais da gomose da acácia-negra no Brasil. A gomose de *Phytophthora* foi encontrada em todos os plantios de acácia-negra e, no levantamento, evidenciou-se a predominância de *P. nicotianae*, mostrando que este patógeno é o principal agente da gomose da acácia-negra no Brasil. As avaliações em plantios comerciais em idade de corte apresentaram até 48 % de indivíduos atacados. Tanto plantas mortas por outras causas quanto plantas mortas por gomose cresceram exponencialmente, e as mortes começaram a partir do 34º mês. Os dados mostraram perdas de produção de até 3,5 % para casca e até 0,5 % para madeira nas árvores com gomose. Tanto por infecção natural quanto por inoculação artificial, ocorreram variações entre as procedências quanto a resistência à gomose.

**Palavras-chave:** *Acacia mearnsii*, *Phytophthora*

---

Referência Processo:474280/2003-9 – Edital Universal 01/2002 / Edital CNPq 01/2002–Faixa A Relatório Final)

<sup>1</sup>Engenheiro Agrônomo, Doutor, Pesquisador da *Embrapa Florestas*, Bolsista do CNPq. E-mail: alvaro@cnpf.embrapa.br

<sup>2</sup>Engenheiro Agrônomo, Doutor, Pesquisadora da CEPLAC/CEPEC, Ilhéus-BA

<sup>3</sup>Engenheiro Agrônomo, Doutor, Professor da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG

<sup>4</sup>Engenheiro Agrônomo, Doutor, Professor da Universidade Federal do Reconcavo Bahiano, Cruz das Almas-BA

# Gummosis in Black Wattle: Etiology, Temporal Distribution, Losses and Genetic Control

---

*Álvaro Figueredo dos Santos*

*Edna Dora Martins Newman Luz*

*Luiz Antonio Maffia*

*Jorge Teodoro de Souza*

## Abstract

Gummosis is one of the most serious phytosanitary problems of black wattle (*Acacia mearnsii*) in the State of Rio Grande do Sul, Brazil. The objectives of this work were: 1) to identify the species of *Phytophthora* associated with gummosis; 2) to analyze the temporal distribution of the gummosis; 3) to quantify losses caused by this disease; and 4) to rank black wattle lines based on resistance to gummosis. The major results were: *Phytophthora nicotianae* and *P. boehmeriae* are the causal agent of gummosis on black-wattle in Brazil. This disease was found in all the surveyed black-wattle plantations and the species *P. nicotianae* was the major species found in the samples, suggesting that this is the main species causing this disease in Brazil. It was found two kinds of symptoms: 1) gummosis at the base of the trunks, associated to *P. nicotianae*; e 2) gummosis spread on the trunk, associated to *P. boehmeriae*. Plants killed by gummosis or other causes showed exponential growth, and started to die after 34 months. Plants showing gummosis had losses ranging from 3,5 to 0,5% for bark and timber production, respectively. Both, natural and artificial inoculations assays showed variation on the resistance of plants to gummosis.

**Keywords:** *Acacia mearnsii*, *Phytophthora*, Brazil.

## Introdução

A acácia-negra (*Acacia mearnsii* De Wild.) é uma espécie florestal originária da Austrália, plantada em diversos países e que foi introduzida no Brasil, no Estado do Rio Grande do Sul, na década de 30. Atualmente, com uma área de mais de 150.000 ha, compõe um dos maciços florestais daquele estado, onde desempenha um importante papel socioeconômico para mais de 10 mil pequenas propriedades rurais (FLEIG, 1993).

O rápido crescimento da acácia-negra, associado ao aproveitamento integral da madeira, torna essa espécie ideal para reflorestamento e para utilização industrial. A contribuição dessa planta aos mais variados segmentos econômicos e industriais é ampla, tanto para a extração do tanino, a partir da casca, como para o uso da madeira, na produção de energia, celulose, papel e chapa de fibra. No Brasil, é plantada principalmente para a produção de tanino.

A gomose é um dos mais sérios problemas fitossanitários da acácia-negra e ocorre nas regiões produtoras do mundo. No Brasil, encontra-se distribuída em grande parte das áreas produtoras do Rio Grande do Sul. Avaliações em plantios comerciais em idade de corte (8 anos) apresentaram 23 % de indivíduos atacados (SOTTA et al., 1994). Essa doença acarreta prejuízos relevantes à acácia-negra por danificar a casca, principalmente nas porções basal e mediana do tronco. A gomose manifesta-se no tronco na forma de lesões necróticas, de cor escura e com exsudação ou não, dependendo da época do ano (SANTOS et al., 1998). Quando presente no campo, a abundante exsudação gomosa é o sintoma que chama a atenção nas árvores doentes. A queda no rendimento de casca e, em casos extremos, a morte de árvores, são os principais prejuízos.

Estudos etiológicos conduzidos por Santos et al. (1998) e Santos (2001) confirmaram *Phytophthora* sp. como agente causal da gomose. No entanto, desconhece-se, até o momento, quais as espécies de *Phytophthora* que ocorrem no Brasil. Na África do Sul, já foram descritas três espécies: *Phytophthora nicotianae* Breda de Haan (1896), *P. boehmeriae* Sawada

(1927) e *P. meadii* McRae (1918) (ROUX et al., 1997).

Praticamente não existem pesquisas epidemiológicas sobre a gomose. As poucas informações disponíveis referem-se a estudos feitos por Santos (1998) e Santos e Auer (1998a).

Não se dispõe de uma medida de controle da doença. O uso de plantas resistentes pode ser uma alternativa viável, no entanto, pouco se conhece acerca da resistência da acácia-negra à gomose. Os estudos feitos na África do Sul referem-se à seleção de plantas em campo (DUNLOP, 1993), onde a resistência à gomose é uma das características avaliadas e tem sido feita através do uso de escala com notas variando de 0 a 4, onde 0 = ausência de gomose e 4 = árvores mortas ou que encontram-se com podridão acentuada no tronco e com excesso de exsudação de goma, quase secas. No Brasil os trabalhos envolvendo estudos sobre a resistência são ainda escassos e limitam-se à avaliação da incidência da doença. Santos (2001) propôs um método para quantificação da severidade da gomose.

O conhecimento sobre o agente causal e os fatores predisponentes e o estabelecimento de estratégias adequadas de controle poderão minimizar os danos e as perdas provocados pela gomose de *Phytophthora* em plantios de acácia-negra da Região Sul. A importância socioeconômica que a acácia-negra tem para o setor florestal brasileiro, notadamente na Região Sul do Brasil, indica a necessidade de um trabalho mais aprofundado sobre a gomose de *Phytophthora* e as possíveis medidas de controle.

Este trabalho teve como objetivos: 1) identificar a(s) espécie(s) de *Phytophthora* associada(s) à gomose; 2) proceder a análise temporal da gomose; 3) quantificar as perdas causadas pela gomose; e 4) agrupar os materiais genéticos de acácia-negra de acordo com o nível de resistência à gomose.

## Material e Métodos

### Parte I. Identificação das espécies de *Phytophthora*

#### Exp. 1. Caracterização morfofisiológica dos isolados de *Phytophthora*

**Levantamento.** No levantamento foram visitadas plantações comerciais de acácia-negra nos municípios de Triunfo, Montenegro, Encruzilhada do Sul, Piratini, Canguçu, Cristal, Cerro Grande do Sul, Ivoti e Sapiranga, no Rio Grande do Sul, e duas áreas experimentais em Ponta Grossa e Colombo, no Paraná. Em cada propriedade coletaram-se informações sobre o plantio e os tipos de sintomas que ocorriam na área, altitude e coordenadas geográficas, sendo retiradas amostras de casca do tronco de árvores com sintomas de gomose.

**Isolamento.** Para o isolamento utilizou-se o meio ágar-água 2 % suplementado com ampicilina (50 ppm), benomil (10 ppm) e cloranfenicol (20 ppm) (Santos et al., 1998). As placas foram incubadas no escuro, a 25 °C. Micélio com características do gênero *Phytophthora* crescendo a partir dos tecidos doentes foram transferidos para o meio BDA (200 g de batata, 20 g de dextrose, 18 g de ágar e 1.000 mL de água destilada) e conservados neste meio de cultura através de repicagens periódicas.

**Identificação.** Procederam-se as avaliações das características morfofisiológicas dos isolados. Para a identificação, foram usadas as chaves de Waterhouse (1963), Waterhouse (1970), Neehook et al. (1978) e Stamps et al. (1990), além de Erwin e Ribeiro (1996) e Frezzi (1950).

Para estudar o tipo de colônia, foram usados os meios BDA, cenoura-ágar (CA) (200 g de cenoura, 15 g ágar e 1.000 mL de água destilada) ou V8 (200 ml de suco V8 da “Campbell”, 3 g de carbonato de cálcio, 18 g de ágar e 800 ml de água destilada). Como os isolados produziram poucos esporângios nesses meios de cultura, utilizou-se, então, para estimular a produção de esporângios, solução de  $\text{KNO}_3$ , conforme segue: os isolados de *Phytophthora* foram crescidos em meio CA, incubados no escuro contínuo

por sete dias. Após este período, o meio de cultura contendo micélio fúngico foi cortado em tiras paralelas de aproximadamente 4 mm de largura. Em seguida, as tiras foram transferidas para placas de Petri esterilizadas e distribuídas de maneira que ficassem cerca de meio centímetro distanciadas entre si. Foi adicionada solução de KNO<sub>3</sub>, pH = 6, 0,001 M, em quantidade suficiente para deixar as tiras de meio de cultura com micélio fúngico submergidas. O conjunto foi distribuído em prateleiras e submetido à iluminação constante, fornecida por lâmpadas fluorescentes (General Electric, 40 Watts, luz do dia), a cerca de 40 cm de altura (2000 lux), por um período de dez dias. Para as determinações biométricas dos esporângios, foram preparadas lâminas para microscopia coletando-se um pouco da massa micelial contendo esporângios e/ou clamidósporos em lactofenol. As medidas foram feitas em 50 unidades de cada um dos tipos de esporos.

Para determinar o grupo de compatibilidade, as culturas foram pareadas individualmente com os tipos padrões A1 (*Phytophthora capsici* Leonian) e A2 (*Phytophthora palmivora* (Butler) Butler), do cacauzeiro, da coleção da CEPLAC, Ilhéus-BA, em meio CA, no escuro a 25 °C. Avaliou-se a formação de oósporos a partir do sexto dia de incubação.

Foram testados os efeitos de diferentes temperaturas (8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 35 °C ou 36 °C) e de três meios de cultura (BDA, CA e V8-ágar) sobre o crescimento micelial dos isolados de *Phytophthora* sp. O crescimento radial de colônias de cada isolado foi medido diariamente por sete dias ou até atingir a borda da placa.

O teste de patogenicidade foi realizado em mudas de acácia-negra com dez meses de idade, conforme segue: na inoculação retirou-se do caule um disco de casca de 7 mm de diâmetro, a uma altura de 5 cm do solo e, em seguida, colocou-se um disco de 7 mm de diâmetro de meio BDA, contendo micélio do patógeno, que tinha sido previamente incubado no escuro à temperatura de 24 °C, por sete dias. O local foi envolto com fita adesiva. Foram inoculadas dez plantas para cada isolado. A testemunha consistiu em se colocar um disco de BDA sem o patógeno. A avaliação foi realizada após

60 dias de incubação, determinando-se o tamanho da lesão e a presença de exsudação de goma. Os fragmentos dos tecidos de casca obtidos a partir das margens das lesões foram usados para o reisolamento do patógeno.

### **Exp. 2. Especificidade de sintomas de gomose de *Phytophthora* nas plantações de acácia-negra.**

Os sintomas da gomose de *Phytophthora* ocorrem principalmente na região basal dos troncos das árvores. No entanto, têm-se observado lesões não exsudativas ocorrendo de forma generalizada nas porções superiores do tronco. Objetivando-se elucidar a associação de *Phytophthora* spp. a esses quadros sintomatológicos, procederam-se amostragens no Município de Piratini, RS, em dez árvores/plantação. As amostras, fragmentos de casca de troncos de árvores com sintomas, foram coletadas nas seguintes alturas: colo, 2, 4, 6, 8 e 10 m, procedendo-se em seguida os isolamentos segundo Santos (2001).

### **Exp. 3. Caracterização molecular de isolados de *Phytophthora***

Para extração do DNA, a massa micelial de cada um dos isolados foi produzida em placas de Petri contendo o meio líquido de batata-dextrose. O DNA genômico de cada isolado foi extraído a partir de aproximadamente 250 mg de massa micelial, utilizando-se o método do SDS com algumas modificações: o micélio foi macerado em cadinho de porcelana em contato com N<sub>2</sub> líquido. Em seguida, o macerado foi colocado em um tubo plástico de 1,5 mL, ao qual foram adicionados 700 µL de tampão de lise constituído por Tris-HCl 200 mM, pH 8,0, EDTA 25 mM, dodecil sulfato de sódio 1 %, NaCl 250 mM e 2-mercaptoetanol 1 %. O macerado foi misturado ao tampão de lise e os tubos mantidos em banho-maria (70 °C) por uma hora, sendo agitados a cada 10 min. Após a incubação, foi realizada a desproteínização, adicionando-se 600 µL de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1 v/v). Em seguida, as amostras foram agitadas por suaves inversões, por 10 min, e centrifugadas a 4 °C, a 18.845 g, por 10 min. O sobrenadante de cada amostra foi transferido para tubos de 1,5 mL limpos e o processo de desproteínização foi repetido. Para a precipitação do DNA, foi adicionado ao sobrenadante final 1/10 do seu volume de acetato de

sódio 3M, pH 5,2 e 2/3 de isopropanol gelado. Os tubos foram mantidos a -20 °C por duas horas e, a seguir, centrifugados como anteriormente. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado duas vezes com etanol 70 % (v/v) e seco à temperatura ambiente. Posteriormente, os ácidos nucléicos totais foram ressuspensos em 150 ml de água contendo RNase na concentração de 40 mg/mL e colocados em banho-maria a 37 °C para a completa ressuspensão. Após esse período, o DNA foi novamente precipitado, centrifugado e ressuspensado em 100 ml de água, como já descrito.

A quantidade do DNA foi estimada por espectrofotometria a 260 nm e a relação  $A_{260}/A_{280}$  foi utilizada para avaliar a pureza do DNA. Bandas de DNA genômico total separadas por eletroforese em gel de agarose 0,8 % foram usadas como indicadoras da integridade do DNA extraído. Após esse processo, as amostras de DNA foram diluídas para 10 ng/ml.

Os *primers* ITS1 e ITS4 descritos por White et al. (1990) foram usados na amplificação do fragmento de rDNA incluindo ITS 1, o gene 5,8 S do DNA ribossomal e ITS2 através da reação de cadeia de polimerase (PCR). As amplificações de PCR foram realizadas em reação a 25-ml contendo 30 ng de DNA, 1X PCR tampão (Invitrogen), 1.5 mM  $MgCl_2$  (Invitrogen), 200 mM de dATP, dCTP, dGTP, and dTTP (Promega), 40 pmol de cada primer, e 2.0 U de Taq polimerase (Invitrogen). O programa de PCR consistiu de uma desnaturação inicial de 5 min a 95 °C, seguida de 35 ciclos de 1 min a 94 °C, 2 min a 55 °C, e 3 min a 72 °C, com uma final de 5 min a 72 °C em termociclador MJ Research PTC-200. Alíquotas de 5 ml foram separadas em gel de agarose a 1 % (peso/vol) em tampão 1X TAE (40 mM Tris, 20 mM ácido acético, 1 mM EDTA [pH 8]), corado com ethidium bromide e fotografados por UV.

Antes do seqüenciamento, os produtos de PCR foram purificados com um kit QIAquick PCR (QIAGEN), de acordo com as especificações do fabricante. Cada isolado foi seqüenciado usando os *primers* ITS1 e ITS4. O seqüenciamento da região de rDNA incluindo os espaços ITS1, ITS2 e 5.8S rDNA foi feito em seqüenciador automático de DNA com terminais

florescentes usando um prisma sequenciador ABI 377.

Para análise filogenética, obteve-se através do GenBank as seqüências de *Phytophthora nicotianae* Breda de Haan 911 (A1) (AY208131), *P. nicotianae* UQ848 (AF266776), *P. palmivora* UQ1294 (AF266780), *P. capsici* 21170 (AY251662), *P. citrophthora* IMI209255 (L76536) e *P. boehmeriae* KACC40173 (AF228076) que foram incluídas na árvore filogenética para efeito de comparação. A análise de BLASTN usando o programa CLUSTAL W 1.81 (THOMPSON et al., 1994) foi aplicada e as distâncias de Pairwise foram estimadas com um modelo de diferenças numéricas usando o Mega2 (KUMAR et al., 2001). A interpretação das interferências filogenéticas foi feita pelo método do vizinho mais próximo (SAITOU; NEI, 1987). Os locais que apresentavam falhas não foram considerados nas interferências filogenéticas.

## **Parte II. Quantificação de perdas e análise temporal da acácia-negra**

### **Exp. 1. Análise temporal da gomose da acácia-negra**

Este experimento foi conduzido em plantio comercial de acácia-negra, em Encruzilhada do Sul, RS. As mudas foram produzidas em laminados, com sementes sem controle de qualidade. Utilizou-se o espaçamento de 1,5 m x 3 m. No sulco foi usada a adubação 5-30-15, base de 50 g/planta. Aos seis meses após o plantio, procedeu-se a amontoa do solo em torno das plantas. Quando o plantio atingiu três anos de idade, foi colocado gado nas áreas para pastoreio de gramíneas de campo natural (sistema agrosilvipastoril).

Nessas áreas, o progresso da gomose da acácia-negra (incidência de plantas sintomáticas) foi monitorado visualmente em blocos de 1.500 árvores avaliadas. Os dados disponíveis para análise consistiram de mapas de distribuição de plantas afetadas, onde foi registrada a posição da árvore afetada.

A avaliação da incidência da doença consistiu na contagem das árvores com gomose, a partir do terceiro mês de plantio. No primeiro ano,

procederam-se avaliações aos três e seis meses de idade e depois a intervalos anuais. Durante a avaliação foram registrados os tipos de lesões que ocorrem nas árvores, conforme caracterização feita por Santos *et al.* (1998). A avaliação foi realizada até o oitavo ano após o plantio, quando foi efetuado o corte das árvores.

Para a análise temporal da gomose, demarcaram-se duas áreas: - A1 (pastagem anteriormente) e A2 (histórico de plantio de acácia-negra) - cada uma com três parcelas de 500 plantas, contíguas a outros povoamentos de acácia-negra. Do plantio ao corte, realizaram-se nove avaliações/parcela, obtendo-se incidências de: plantas com gomose (Pg); plantas mortas por gomose (Mg); gomose total (Gt) = Pg + Mg; e plantas mortas por outras causas (Mo).

## **Exp. 2. Quantificação de perdas da gomose da acácia-negra**

Foram utilizadas seis áreas já demarcadas (500 árvores/área), em plantio comercial no Município de Encruzilhada do Sul, RS. Nessas áreas, o progresso da gomose da acácia-negra (incidência de plantas sintomáticas) foi monitorado. Os dados disponíveis para análise consistiram de mapas de distribuição de plantas afetadas, onde foram registradas as posições das árvores afetadas.

A avaliação da produção foi realizada no oitavo ano após o plantio, quando foram efetuados o corte das árvores e a quantificação dos danos provocados pela gomose: perdas de casca e de madeira. Em cada área foram selecionadas e abatidas duas árvores em cada classe de doença, conforme segue: 1 (ausência de sintomas); 2 (lesão tipo GCT em 1 a 5 % do tronco); 3 (lesão tipo GCT em 5 % a 25 % do tronco); e 4 (lesão tipo GCT em 25 % a 50 % do tronco). Foi determinada a altura comercial das árvores (até 4,5 cm de diâmetro, com casca comercial), o diâmetro da base, o diâmetro altura do peito (DAP), o diâmetro do topo do último torete com lesão na casca.

Após o corte das árvores, as cascas com sintomas (não aproveitadas

comercialmente) foram separadas das cascas sem sintomas e pesadas separadamente.

### **Parte III. Desenvolvimento de estratégia de controle**

#### **1. Avaliação de procedências de acácia-negra quanto à resistência a *Phytophthora***

Neste trabalho, acessos de acácia negra foram avaliados quanto à resistência a *P. nicotianae* sob infecção natural e inoculação artificial.

**Exp. 1. Infecção natural.** Neste projeto, desenvolveu-se um método para a quantificação da severidade da gomose em campo. Em levantamentos de campo, verificou-se que a maior frequência das lesões ocorrem no tronco, no segmento que se estende da região do colo até 1,5 m de altura. Por essa razão, essa porção foi estabelecida como área a ser avaliada.

O experimento constou de um teste de procedências em área com incidência de gomose. Procedeu-se à avaliação de cada árvore, colocando duas hastas graduadas no tronco, uma de cada lado, de maneira que fosse possível dividi-lo em três segmentos: a) segmento basal – correspondendo ao segmento que se estende do colo (nível do solo) até 0,50 m de altura; b) segmento mediano – correspondendo ao segmento de 0,51 m a 1,00 m de altura; c) e segmento superior – correspondendo ao segmento de 1,01 a 1,50 m de altura.

A severidade de ataque da gomose foi quantificada através do uso de uma chave descritiva (Tabela 1). Em cada lado do tronco foi verificado o tipo de lesão predominante: M = Mosqueado; GT = Gomose no tronco; GC = Gomose no colo; e GCT = Gomose no colo e no tronco. A quantificação da doença foi feita através de notas, variando de 0 a 6.

**Tabela 1.** Chave descritiva da severidade da gomose da acácia-negra.

<b>Tipo de lesão</b>	
<b>M</b>	Lesão escura, formato irregular, contrastando com a área verde do tronco, sem exsudação de goma e localizada acima do colo
<b>GT</b>	Lesão tipo M, com exsudação de goma
<b>GC</b>	Lesão escura, formato irregular, com exsudação ou não de goma, limitada à região do colo
<b>GCT</b>	Lesão tipo GC, iniciando na região do colo e se estendendo verticalmente no tronco
<b>Nota</b>	<b>Severidade da doença</b>
<b>0</b>	Ausência de sintomas
<b>1</b>	Lesões tipo M, GT ou GC, isoladas e abrangendo menos de 1 % da área da seção do tronco
<b>2</b>	Lesões tipo M, GT ou GC, isoladas ou coalescentes e abrangendo mais de 1 % e menos de 5 % da área da seção do tronco
<b>3</b>	Lesões tipo GT ou GCT, isoladas ou coalescentes e abrangendo mais de 5 % e menos de 25 % da área da seção do tronco
<b>4</b>	Lesões tipo GT ou GCT, coalescentes e abrangendo mais de 25 % e menos de 50 % da área da seção do tronco
<b>5</b>	Lesões tipo GT ou GCT, coalescentes e abrangendo mais de 50 % e menos de 75 % da área
<b>6</b>	Lesões tipo GT ou GCT, coalescentes e abrangendo mais de 75 % da área da seção do tronco

Para atenuar os erros subjetivos na avaliação da severidade, foi mantida a mesma equipe de avaliadores. A severidade foi expressa em termos de nota média por indivíduo na parcela, determinada pelo somatório das notas de todos os indivíduos de uma parcela, dividido pelo número de indivíduos desta parcela.

## **Exp. 2. Inoculação artificial de *P. nicotianae*.**

Este experimento foi conduzido em campo, em Ponta Grossa, PR, onde se

encontra estabelecida uma coleção de procedências de acácia-negra oriundas da Austrália, em plantas com idade de 12 meses.

O cultivo de *P. nicotianae* e o método de inoculação usado foi: na inoculação retirou-se do caule um disco de casca de 7 mm de diâmetro, a uma altura de 20 cm do solo e, em seguida, colocou-se um disco de 7 mm de diâmetro de meio BDA contendo micélio do patógeno, que tinha sido previamente incubado no escuro à temperatura de 24 °C, por sete dias. O local foi envolto com fita adesiva. Foram inoculadas dez plantas para cada isolado. A testemunha consistiu em se colocar um disco de BDA sem o patógeno. A avaliação foi realizada após 120 dias pós-inoculação, determinando-se o tamanho da lesão e a presença de exsudação de goma. Os fragmentos dos tecidos de casca obtidos a partir das margens das lesões foram usados para o reisolamento do patógeno.

## Resultados e Discussão

### Parte I. Identificação das espécies de *Phytophthora*

#### Exp. 1. Caracterização morfofisiológica e molecular dos isolados de *Phytophthora*

As características dos isolados de *P. nicotianae* e *P. boehmeriae* caracterizados neste trabalho encontram-se a seguir:

*Phytophthora nicotianae* Breda de Haan (1896). Os isolados de *P. nicotianae* da acácia-negra apresentaram o maior crescimento micelial em meio cenoura-ágar (CA) entre 24 °C e 32 °C e nenhum crescimento a 36 °C. As culturas em meio CA foram petalóides, apresentando esporângios papilados, persistentes, predominantemente ovóides, clamidósporos terminais ou intercalares, e oósporos apleróticos de paredes lisas formados heterotáticamente, sendo os anterídios anfígenos (Figura 2). Todos os isolados foram patogênicos à acácia-negra. Baseado nas seqüências parciais de ITS1 e ITS2, e no gene 5.8S do DNA ribossomal, os isolados apresentaram 100 % de seqüências idênticas entre si e com os isolados do GenBank 911 (A1), 6134(A2) e UQ848 de *P. nicotianae*.

*Phytophthora boehmeriae* Sawada (1927). Os isolados de *P. boehmeriae* da acácia-negra não apresentaram crescimento micelial a 32 °C. As culturas foram petalóides, apresentando esporângios ovóides, papilados e caducos, com presença de clamidósporos terminais e intercalares. Os isolados foram homotáticos, produzindo oósporos pleuróticos de paredes lisas, sendo os anterídios anfígenos. Todos os isolados foram patogênicos à acácia-negra. Baseado nas seqüências parciais de ITS1 e ITS2, e no gene 5.8S do DNA ribossomal, os isolados de *P. boehmeriae* apresentaram 97 % de seqüências idênticas com o isolado do GenBank KACC40173 de *P. boehmeriae*.

Embora a gomose de *Phytophthora* seja uma doença que já ocorra nas plantações brasileiras de acácia-negra há mais de quarenta anos (GOULART, 1959), até recentemente, desconhecia-se a sua etiologia. Há relatos associando a gomose com problemas fisiológicos (GOULART, 1959) e fisiogênicos (SCHUCH, 1975; SCHUCH e PEDERZOLLI, 1975). Santos *et al.* (1998) associaram os sintomas M, GC, GT e GCT de gomose com *Phytophthora* spp. A patogenicidade foi confirmada em árvores inoculadas com isolados de *Phytophthora* spp. obtidas destas lesões, reproduzindo sintomas similares com exsudação ou não de goma.

Neste trabalho, a gomose de *Phytophthora* foi encontrada em todos os plantios dos municípios gaúchos amostrados. No levantamento evidenciou-se a predominância de *P. nicotianae* em 100 % das amostras de todos os municípios, enquanto que, *P. boehmeriae* ocorreu em 10 % dos isolamentos, encontrada apenas em plantios localizados nos municípios de Piratini, Cristal e Cerro Grande do Sul (Tabela 2). Esses resultados evidenciam que *P. nicotianae* é o principal agente da gomose da acácia-negra no Brasil. Este constitui-se no primeiro relato da ocorrência de *P. boehmeriae* no Brasil e, em acácia-negra, na América do Sul (SANTOS e LUZ, 2003; SANTOS e LUZ, 2004; SANTOS e LUZ, 2005).

**Tabela 2.** Levantamento da gomose da acácia-negra no Rio Grande do Sul.

Municípios	Número de plantações amostradas	Altitude (m)	Idade dos plantios (anos)	Número de amostras	Espécies de <i>Phytophthora</i> <sup>1</sup>
Triunfo	04	75	5	8	Pn
		80	2,4	8	Pn
		85	5	3	Pn
		51	3,6	11	Pn
Montenegro	01	79	1,5	3	Pn
E. do Sul	04	243	3,8	10	Pn
		246	2,7	8	Pn
		241	5,5	19	Pn
		296	1,9	20	Pn
Piratini	05	305	2,8	14	Pn/Pb
		291	2,8	19	Pn
		290	2,8	14	Pn
		265	2,8	5	Pn
		223	4,8	10	Pn
Canguçu	02	136	2,8	21	Pn
		64	1,6	4	Pn
Cristal	01	81	5,8	22	Pn/Pb
Cerro G. do Sul	04	82	5	12	Pn
		80	4	7	Pn
		216	2,7	6	Pn/Pb
		97	4,7	3	Pn
Ivoti	01	92	2	5	Pn
Sapiranga	01	269	5	3	Pn

<sup>1</sup>Pn – *Phytophthora nicotianae* e Pb – *P. boehmeriae*

## **Exp. 2. Especificidade de sintomas de gomose de *Phytophthora* nas plantações de acácia-negra.**

Nos isolamentos, constatou-se que nas amostras da região basal houve predominância de *P. nicotianae* e, nas regiões superiores do tronco, encontrou-se apenas *P. boehmeriae*. Todos os isolados de *Phytophthora* foram patogênicos à acácia-negra.

Pode-se afirmar a existência de dois padrões de gomose nas plantações

brasileiras de acácia-negra: 1) gomose basal, associada a *P. nicotianae* e 2) gomose generalizada, associada a *P. boehmeriae*. O padrão 1 ocorre na maioria das plantações, não está associado a surtos e as lesões localizam-se principalmente no colo da planta, ou até no máximo 2 m de altura. O padrão 2 ocorre em surtos, em anos chuvosos, associados a ventos fortes, tem abrangência menor do que a gomose basal e as lesões distribuem-se generalizadamente ao longo do tronco até a altura de 10 m. Todos os isolados de *Phytophthora* foram patogênicos à acácia-negra.

## **Parte II. Quantificação de perdas e análise temporal da gomose da acácia-negra**

### **Exp. 1. Análise temporal da gomose da acácia-negra**

Os componentes epidemiológicos avaliados (meses de início e de incidência máxima, incidências inicial e máxima e área abaixo da curva de progresso-AACP) foram similares para as quatro estimativas nas duas áreas (Tabela 3). Tanto Mo quanto Mg cresceram exponencialmente e as mortes começaram a partir do mês 34 (Figura 1 e 2). Valores médios de AACP e de incidência máxima associados a Mo (7,40 e 0,34, respectivamente) foram superiores a Mg (3,10 e 0,20, respectivamente). Deve-se esclarecer a morte por outras causas (biótica(s) provavelmente) para haver redução de perdas.

**Tabela 3.** Componentes epidemiológicos da gomose de *Phytophthora* e de morte por outras causas em acácia negra em duas áreas de plantio em Encruzilhada do Sul, RS, 1995 a 2002.

<b>Componente</b>	<b>Doença</b>	<b>Área 1</b>	<b>Área 2</b>
Início de ocorrência (mês)	Gomose total	10	10
	Morte por gomose	34	34
	Morte por outras causas	10	4
Incidência máxima (mês)	Gomose total	82	82
	Morte por gomose	82	82
	Morte por outras causas	82	82
Incidência máxima (proporção)	Gomose total	0,44	0,45
	Morte por gomose	0,23	0,16
	Morte por outras causas	0,38	0,31
"Salto" na incidência (mês)	Gomose total	34	34
	Morte por gomose	70	70
	Morte por outras causas	70	70
AACPD (incidência x mês)	Gomose total	15,8	16,4
	Morte por gomose	3,7	2,5
	Morte por outras causas	7,7	7,1
Y <sub>0</sub> *	Gomose total	0,014	0,012
	Morte por gomose	3 x 10 <sup>-8</sup>	7 x 10 <sup>-8</sup>
	Morte por outras causas	3 x 10 <sup>-8</sup>	5 x 10 <sup>-5</sup>
r <sub>g</sub> *	Gomose total	0,021	0,022
	Morte por gomose	0,030	0,027
	Morte por outras causas	0,036	0,026

\*Estimadas com o modelo de Gompertz

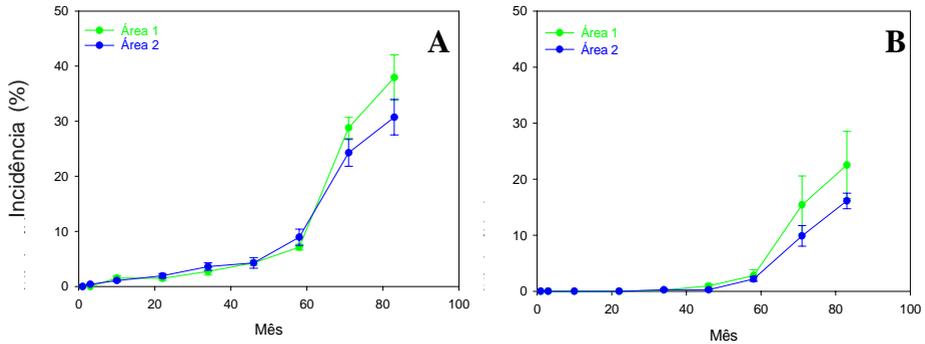


Figura 1. Progresso da incidência de plantas de acácia negra mortas: A) por outras causas que não a gomose; B) pela gomose. (Barras indicam o erro padrão da média).

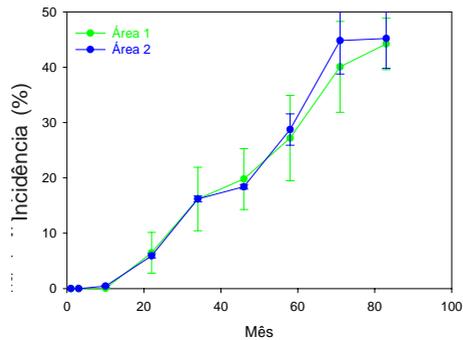
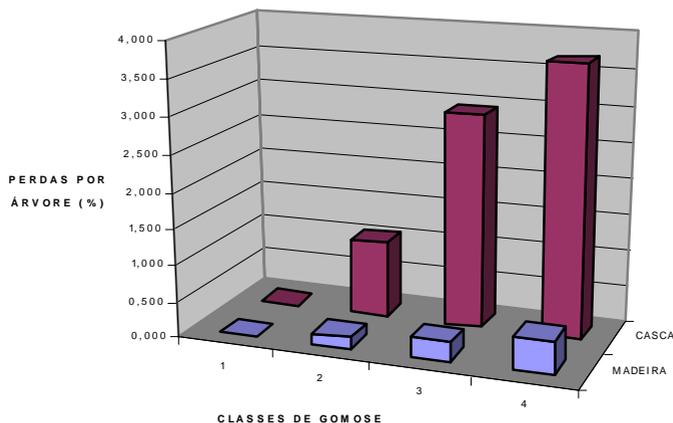


Figura 2. Progresso da gomose em acácia negra, avaliado pela incidência de plantas vivas doentes e de plantas mortas pela doença. (Barras indicam o erro padrão da média).

## Exp. 2. Quantificação de perdas da gomose da acácia-negra

Os dados mostraram decréscimos de produção de casca e madeira por árvore atingindo valores até 3,5 % e 0,5 %, respectivamente (Figura 3).



**Figura 3.** Perdas (%) de casca e madeira causadas pela gomose de *Phytophthora* em acácia-negra (Classes de gomose – 1 (ausência de sintomas) a 4 (lesão atingindo área de 25 % a 50 %)).

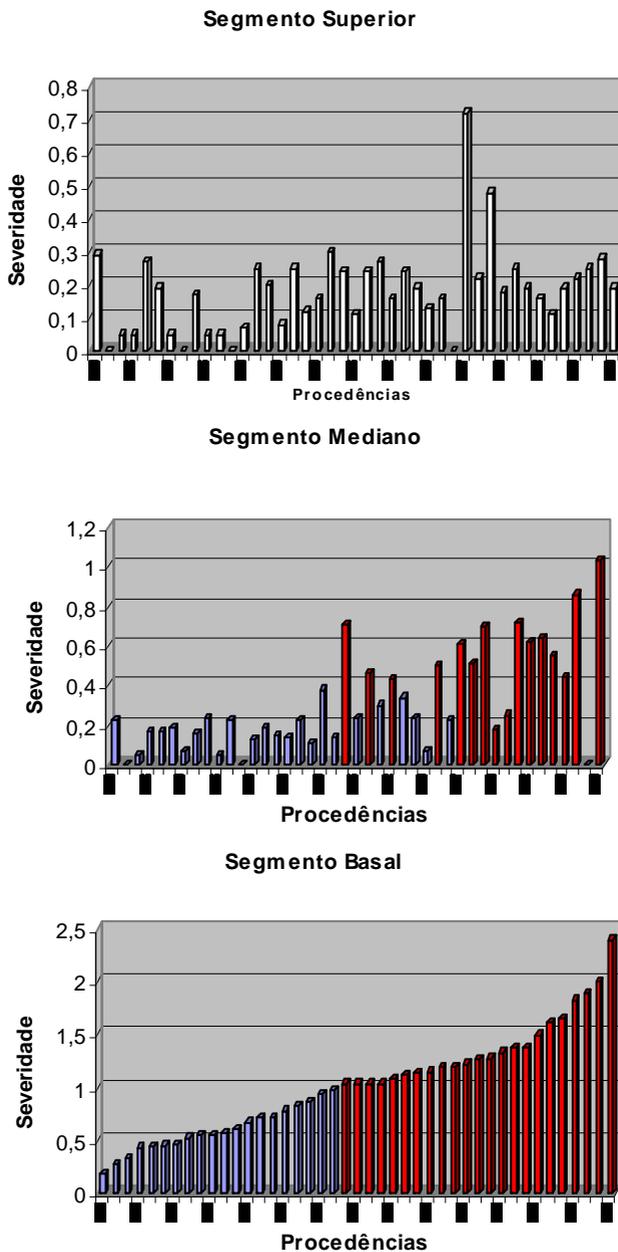
### Parte III. Desenvolvimento de estratégia de controle

#### 1. Avaliação de procedências de acácia-negra quanto à resistência a *Phytophthora*

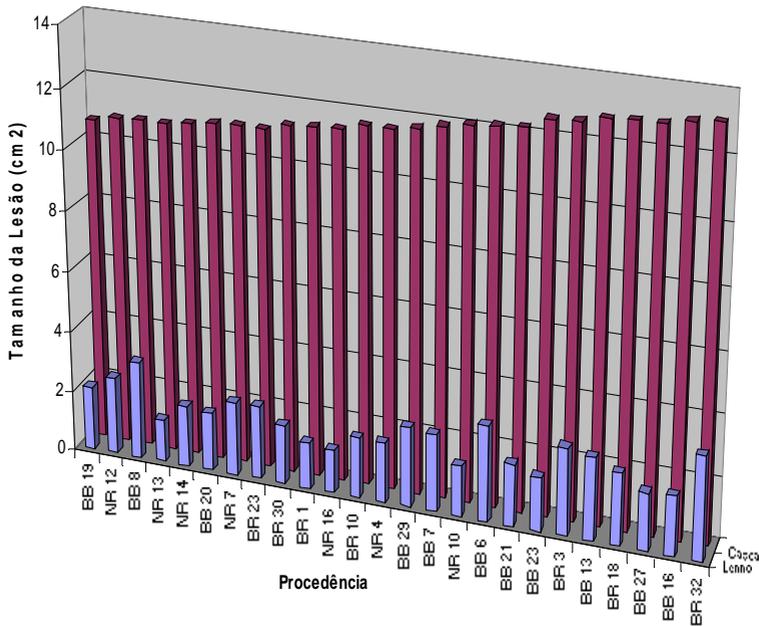
Os métodos utilizados mostraram-se satisfatórios para os estudos de resistência, no entanto, as avaliações de gomose por infecção natural são difíceis de quantificar por causa da distribuição irregular da doença dentro de uma plantação.

Nos dois experimentos, tanto por infecção natural (Figura 4) quanto por inoculação artificial (Figura 5), ocorreram variações entre as procedências quanto a resistência à gomose, o que aponta para a seleção de genótipos resistentes a *Phytophthora*. Na infecção natural, os sintomas mais acentuados ocorreram no segmento basal, enquanto que na inoculação

artificial ocorreram variações no tamanho da lesão entre as procedências, sendo a casca mais adequada para seleção dos genótipos (Figura 5). As procedências com as maiores notas podem ser classificadas como as mais suscetíveis. Este trabalho é um indicativo de que é possível encontrar material genético resistente a *Phytophthora* spp. proveniente da Austrália, o centro de origem do hospedeiro.



**Figura 4.** Severidade da gomose (área lesionada) nos segmentos basal, mediano e superior dos troncos de árvores de acácia-negra, sob infecção natural (barras da mesma cor não diferem entre si, pelo Teste de Scott-Knot).



**Figura 5.** Tamanho da lesão da gomose em caule (lenho e casca) de árvores de procedências de acácia-negra, inoculadas artificialmente com *Phytophthora nicotianae*.

## Conclusões

As principais conclusões foram:

- *Phytophthora nicotianae* Breda de Haan (1896) e *P. boehmeriae* Sawada (1927) são os agentes causais da gomose da acácia-negra no Brasil;
- Este projeto originou o primeiro relato da ocorrência de *P. boehmeriae* no Brasil e, em acácia-negra, na América do Sul;
- A gomose de *Phytophthora* foi encontrada em todos os plantios de acácia-negra. No levantamento evidenciou-se a predominância de *P. nicotianae*, mostrando que este patógeno é o principal agente da gomose da acácia-negra no Brasil.
- Avaliações em plantios comerciais em idade de corte (8 anos) apresentaram até 48 % de indivíduos atacados;
- Constatou-se a existência de dois padrões de gomose nas plantações: 1)

- gomose basal (lesões do colo até 2 m de altura do tronco), associada à *P. nicotianae*; e 2) gomose generalizada (lesões atingem até a altura de 10 m), associada à *P. boehmeriae*;;
- Tanto plantas mortas por outras causas quanto plantas mortas por gomose cresceram exponencialmente, e as mortes começaram a partir do mês 34;
  - Os dados mostraram perdas de produção de até 3,5 % para casca e até 0,5 % para madeira nas árvore com gomose;
  - Tanto por infecção natural quanto por inoculação artificial, ocorreram variações entre as procedências quanto a resistência à gomose, o que aponta para a seleção de genótipos resistentes à *Phytophthora*;
  - Com base nas respostas de procedências, existe um indicativo de que é possível encontrar material genético resistente à *Phytophthora* spp, proveniente da Austrália, o centro de origem do hospedeiro.

## Referências

- DUNLOP, R.W. Genetic improvement of acacias. I.C.F.R. **Annual Report**, p.21. 1993.
- ERWIN, D. C.; RIBEIRO, O. K. (ed.) *Phytophthora* diseases worldwide. St. Paul, APS Press. 562p. 1996.
- FLEIG, F. D. Análise econômica de sistema de produção com acácia-negra (*Acacia mearnsii* De Wild.) no Rio Grande do Sul. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 1993. 104p. Tese Mestrado.
- FREZZI, M. J. Las especies de "Phytophthora" en la Argentina. **Revista de Investigaciones Agrícolas**, v. 4, p. 47-134, 1950.
- GOULART, C. T. Informações preliminares sobre adubação da acácia-negra. **Agronomia Sulriograndense**, Porto Alegre, v. 4, p. 65-68. 1959.
- KUMAR, S.; TAMURA, K.; JAKOBSEN, I. B.; NEI, M. MEGA 2: molecular evolutionary genetics analysis software. **Bioinformatics Applications Note**, n. 17, p. 1244-1245, 2001.
- NEEHOOK, F. J.; WATERHOUSE, G. M.; STAMPS, D. J. Tabular key to the species of *Phytophthora* de Bary. Kew, Commonwealth Mycological Institute. **Mycology, Papers** 143. 1978.
- ROUX, J.; WINGFIELD, M. J. Survey and virulence of fungi occurring on diseased *Acacia mearnsii* in South-Africa. **Forest Ecology and Management**, v. 99, p. 327-336, 1997.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Mol. Biol. Evol.** v. 4, p. 406-425, 1987.

SANTOS, A.F. dos. Caracterização da gomose da acácia-negra (*Acacia mearnsii*): I. Distribuição de lesões no tronco. Colombo: EMBRAPA-CNPQ, 1998e, 4p. (EMBRAPA-CNPQ, Pesquisa em Andamento, 47).

SANTOS, A.F. dos. Gomose de *Phytophthora* da acácia-negra. In: LUZ, E.D.M.N.; SANTOS, A.F. dos; MATSUOKA, K.; BEZERRA, J.L. Doenças causadas por *Phytophthora* no Brasil. Campinas, Livraria Rural, 2001. p. 67-90

SANTOS, A. F. dos; AUER, C. G. Caracterização da gomose da acácia-negra: III. Incidência em plantios. Colombo: EMBRAPA-CNPQ, 1998a, 3p. (EMBRAPA-CNPQ, Pesquisa em Andamento, 66).

SANTOS, A. F. dos; AUER, C. G. Avaliação da gomose da acácia-negra em materiais genéticos de diferentes procedências. Colombo: EMBRAPA-CNPQ, 1998b, 4p. (EMBRAPA-CNPQ, Pesquisa em Andamento, 62).

SANTOS, A.F. dos; LUZ, E.D.M.N. Gomose da acácia-negra causada por *Phytophthora nicotianae* no Brasil. *Fitopatologia Brasileira*, v. 28, supl., p-124. 2003.

SANTOS, A. F. dos; LUZ, E. D. M. N.; SOUZA, J. T. *Phytophthora boehmeriae* causando a gomose da acácia-negra no Brasil. *Fitopatologia Brasileira*, v. 29, supl., p-144. 2004.

SANTOS, A. F. dos; LUZ, E. D. M. N.; SOUZA, J. T. *Phytophthora nicotianae*: agente etiológico da gomose da acácia-negra no Brasil. *Fitopatologia Brasileira*, v. 30, n. 1, p-81-84. 2005.

SANTOS, A. F.; AUER, C. G.; GRIGOLETTI JÚNIOR., A. Caracterização de tipos de gomose da acácia-negra (*Acacia mearnsii*) no sul do Brasil. **Boletim de Pesquisa Florestal**, n. 37, p. 31-40, 1998.

SCHUCH, S.L.C. Sintomatologia da gomose da acácia-negra (*Acacia mollissima* Wild.) no Rio Grande do Sul. **Agronomia Sulriograndense**, Porto Alegre, v.11, n.1., p.129-137. 1975.

SCHUCH, S.L.C.; PEDERZOLLI, R.C.D. Ocorrência da gomose da acácia-negra (*Acacia mollissima* Wild.). *Agronomia Sulriograndense*, Porto Alegre, v. 11, n. 2., p. 313-317, 1975.

SOTTA, E. D.; HIGA, A. R.; LAVORANTI, O. J.; STEIN, P. P. Avaliação dos danos causados pela gomose em acácia-negra. Curitiba: EMBRAPA-CNPQ, 1994. 15 p.

STAMPS, D.J.; WATERHOUSE, G.M.; NEEHOOK, F.J.; HALL, G.S. Revised tabular key to the genus *Phytophthora*. Wallingford, CAB International Mycology Papers 162. 1990.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Res.**, v. 22, p. 4673-4680, 1994.

WATERHOUSE, G. M. Key to the species of *Phytophthora* de Bary. Kew, Commonwealth Mycological Institute. Mycology, Papers 92. 1963.

WATERHOUSE, G. M. The genus *Phytophthora* de Bary. Diagnoses (or descriptions) and figures from the original papers. Kew, Commonwealth Mycological Institute. Mycology, Papers 122. 1970.

WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR Protocols: a guide to methods and applications. M. A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky & T.J. White, eds., p. 315-322. Academic Press, San Diego. 1990.