



THAISSA DE PAULA FARIAS DOS SANTOS

**INFLUÊNCIA DA ADUBAÇÃO COM CÁLCIO E
POTÁSSIO NA RESISTÊNCIA DE EUCALIPTO À
*Calonectria pteridis***

**LAVRAS - MG
2019**

THAISSA DE PAULA FARIAS DOS SANTOS

**INFLUÊNCIA DA ADUBAÇÃO COM CÁLCIO E
POTÁSSIO NA RESISTÊNCIA DE EUCALIPTO À**
Calonectria pteridis

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitopatologia, área de concentração em Fitopatologia, para a obtenção do título de Doutora

Prof(a). Dr(a). Maria Alves Ferreira
Orientadora

LAVRAS - MG
2019

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Santos, Thaissa de Paula Farias dos.

Influência da adubação com cálcio e potássio na resistência de eucalipto à *Calonectria pteridis* / Thaissa de Paula Farias dos Santos. - 2019.

69 p. : il.

Orientador(a): Maria Alves Ferreira.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2019.
Bibliografia.

1. Patologia florestal. 2. Adubação mineral. 3. Resistência. I. Ferreira, Maria Alves. II. Título.

THAISSA DE PAULA FARIAS DOS SANTOS

**INFLUÊNCIA DA ADUBAÇÃO COM CÁLCIO E
POTÁSSIO NA RESISTÊNCIA DE EUCALIPTO À**
Calonectria pteridis

Tese apresentada à Universidade Federal
de Lavras, como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Agronomia/Fitopatologia, área de
concentração em Fitopatologia, para a
obtenção do título de Doutora

APROVADA em, Lavras MG, setembro 25, 2019.

Dra. Roselaine Cristina Pereira

UFLA

Dr. Lucas Amaral de melo

DCF – UFLA

Dr. Hudson Teixeira

EPAMIG

Prof(a). Dr(a). Maria Alves Ferreira
Orientadora

LAVRAS - MG
2019

A Deus, acima de tudo,

Por ser meu refúgio e minha esperança.

Aos meus pais, irmãos e esposo,

Por serem meus pilares e minha inspiração.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ser minha completude, meu abrigo, meu consolo e minha força.

Aos meus pais, pelas constantes orações e aos meus irmãos, pelo incentivo, companheirismo e carinho.

Ao meu esposo, pelo apoio, compreensão e motivação a sempre buscar meus objetivos.

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Fitopatologia, pela estrutura e os conhecimentos obtidos durante toda a minha caminhada nesta excelente universidade.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

À professora Maria Alves Ferreira, pela orientação, dedicação, disposição, pelos valiosos ensinamentos e por não medir esforços pela ciência!

Aos professores do Departamento de Fitopatologia-DFP/UFLA, em especial aos professores: Dr. Edson Ampélio Pozza e Dr. Eduardo Alves por cederem seus laboratórios para realização dos experimentos.

Aos membros da banca, por aceitarem o convite.

Aos técnicos e demais funcionários do DFP, em especial ao Silvio por toda dedicação e solicitude, sua ajuda foi primordial para que o experimento fosse realizado!

Aos amigos do Laboratório de Patologia florestal, Gizeli, Mara, Gessyca, Gabrielle, Iêda, Cesar (Ubi), Hallém, Júlia, Renata, Luiza (Técnica) e a Aline, por toda ajuda e momentos maravilhosos que me proporcionaram.

Aos amigos que mesmo distante, me alegram e tornam a jornada mais leve.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para que esta etapa fosse concluída, obrigada!

RESUMO GERAL

Calonectria pteridis é conhecido por atacar diversos hospedeiros, causando doenças em mudas e plantas adultas. Entre elas, a mancha foliar em eucalipto é uma importante doença na cultura, pois em condições ideais ao patógeno, causa severa desfolha. O método de controle largamente utilizado para as principais doenças da cultura é o uso de genótipos resistentes. Com o intuito de aliar métodos culturais como alternativa de controle a doença em situações que o clima regional contribui para uma elevada suscetibilidade da planta, o objetivo dos experimentos realizados foi investigar a influência da adubação com cálcio e potássio no controle de *C. pteridis* em eucalipto. Os experimentos consistiram em submeter mudas de eucalipto a diferentes combinações de doses de Ca^{+2} e K^{+} em solução nutritiva. No primeiro estudo, foi utilizado um esquema fatorial 5×5 , perfazendo 25 tratamentos no total. As mudas foram inoculadas com suspensão de esporos do fungo. Foram avaliadas as variáveis: severidade, desfolha, altura, teor de clorofila, peso da parte aérea e raiz seco. Foi observado em combinações com elevada concentração de K^{+} uma elevada severidade da doença, porém com baixa desfolha. Em tratamento com elevadas concentrações de ambos nutrientes, observou-se elevada severidade e elevada desfolha (82% e 64%, respectivamente). Constatou-se também desfolha não relacionada à doença. Nesse caso, a desfolha foi atribuída ao desbalanço de um ou de ambos nutrientes. No tratamento $6,0 \text{ mmol L}^{-1} \text{ K} \times 8,0 \text{ mmol L}^{-1} \text{ Ca}$ foi observado baixa severidade e desfolha, além de conferir com elevado teor de clorofila, peso da parte aérea e da raiz. Entre os 25 tratamentos, três foram selecionados baseados nesses resultados para a condução do segundo experimento. Os tratamentos foram escolhidos com base na dose padrão da solução de Clark (6 mmol L^{-1} de $\text{K} \times 4 \text{ mmol L}^{-1}$ de Ca) com uma dose apenas com a concentração de cálcio maior e outra com ambas concentrações de cálcio e potássio elevadas. O segundo experimento teve como objetivo verificar a distribuição e concentração de Ca e K na região do tecido foliar lesionada pelo patógeno. Foram destacadas folhas às 24, 48 e 72 horas após a inoculação (h.a.i.) e avaliadas em Microanálise de raio-X (MAX). O teor de cálcio e potássio foi crescente ao longo do tempo no tratamento $6,0 \text{ mmol L}^{-1} \text{ K} \times 8,0 \text{ mmol L}^{-1} \text{ Ca}$, atingindo as maiores médias às 72 h.a.i., no tecido sintomático e assintomático, respectivamente. Nos demais tratamentos, nesse mesmo tempo, o teor de ambos nutrientes decresceu, com maiores médias observadas às 48 h.a.i.. O teor elevado de cálcio e potássio às 72 h.a.i. ao redor da lesão indica a persistência na sinalização de mecanismos de defesa ao fungo. Ambos estudos demonstraram que o fornecimento equilibrado de cálcio e potássio influencia diretamente na severidade da doença, desfolha, variáveis morfológicas e define as respostas de defesa precoces e tardias de eucalipto à *C. pteridis*.

Palavras chaves: mancha foliar, adubação mineral, controle, microanálise de Raio-X

GENERAL ABSTRACT

Calonectria pteridis is known to attack various hosts, causing diseases in seedlings and adult plants. Among them, leaf spot in eucalyptus is an important disease in the culture, because under ideal conditions to the pathogen, causes severe defoliation. The widely used control method for major crop diseases is the use of resistant genotypes. In order to combine cultural methods as an alternative to disease control in situations where the regional climate contributes to a high susceptibility of the plant, the objective of the experiments was to investigate the influence of calcium and potassium fertilization on the control of *C. pteridis* in eucalyptus. The experiments consisted of subjecting eucalyptus seedlings to different combinations of Ca⁺ and K⁺ doses in nutrient solution. In the first study, a 5 x 5 factorial scheme was used, totaling 25 treatments. The seedlings were inoculated with fungal spore suspension. The following variables were evaluated: severity, defoliation, height, chlorophyll content, area weight and dry root. It was observed in combinations with high K + concentration a high disease severity, but with low defoliation. In treatment with high concentrations of both nutrients, high severity and high defoliation were observed (82% and 64%, respectively). Non-disease-related defoliation was also found. In this case, defoliation was attributed to the imbalance of one or both nutrients. In the treatment 6.0 mmol L⁻¹ K × 8.0 mmol L⁻¹ Ca it was observed low severity and defoliation, besides conferring with high chlorophyll content, area and root weight. Among the 25 treatments, three were selected based on these results to conduct the second experiment. Treatments were chosen based on the standard dose of Clark's solution (6 mmol L⁻¹ K × 4mmol L⁻¹ Ca) at one dose with the highest calcium concentration and the other with both high calcium and potassium concentrations. The second experiment aimed to verify the distribution and concentration of Ca and K in the leaf tissue region injured by the pathogen. Leaves were detached at 24, 48 and 72 hours after inoculation (h.a.i.) and evaluated by X-ray Microanalysis (MAX). Calcium and potassium content increased over time in the treatment 6.0 mmol L⁻¹ K × 8.0 mmol L⁻¹ Ca, reaching the highest averages at 72 h.a.i., in symptomatic and asymptomatic tissue, respectively. In the other treatments, at the same time, the content of both nutrients decreased, with higher averages observed at 48 h.a.i.. The high calcium and potassium content at 72 h.a.i. around the lesion indicates persistence in the signaling of fungal defense mechanisms. Both studies have shown that balanced calcium and potassium supply directly influence disease severity, defoliation, morphological variables, and define early and late eucalyptus defense responses to *C. pteridis*.

Keywords: leaf spot, mineral fertilization, control, X-ray microanalysis

SUMÁRIO

CAPÍTULO	11
1 INTRODUÇÃO	11
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	12
2.1 Importância da mancha de <i>Calonectria</i> na eucaliptocultura.....	12
2.2 Diversidade de <i>Calonectria</i>	13
2.3 Controle do patógeno baseado em genótipos resistentes	14
2.4 A adubação mineral como auxílio no controle de doenças.....	14
2.4.1 Importância do cálcio na resistência da planta	15
2.4.1 Importância do potássio na resistência da planta	16
3 REFERÊNCIAS.....	17
CAPÍTULO 2: CALCIUM AND POTASSIUM IMBALANCE FAVORS LEAF BLIGHT AND DEFOLIATION CAUSED BY <i>Calonectria pteridis</i> IN EUCALYPTUS PLANTS.....	21
1. Introduction.....	23
2. Materials and methods	25
2.1. Plant preparation and implantation	25
2.2. Inoculum preparation and inoculation	27
2.3. Experimental evaluation.....	28
2.3.1. Disease and defoliation assessment	28
2.3.2. Plant growth and chlorophyll content	29
2.4. Determination of the leaf nutrient contents	30
2.5. Statistical analysis	30
3. Results	31
3.1. Disease severity.....	31
3.2. Plant growth and chlorophyll content	34
3.3. Determination of leaf nutrient contents.....	37
4. Discussion.....	38
5. Conclusions.....	42
6 Referências	42
CAPÍTULO 3: DISTRIBUIÇÃO DE CÁLCIO E POTÁSSIO EM EUCALIPTO NO PROCESSO PATOGÊNICO DE <i>Calonectria pteridis</i>	48
1 Introdução.....	50
2 Material e métodos.....	52
2.1 Preparo das mudas e implantação	52

2.2 Preparo do inóculo e inoculação	54
2.3 Coleta do material biológico e delineamento experimental	54
2.4 Preparo e análise das amostras vegetais para microanálise de raio-X.....	55
3 Resultados.....	56
4 Discussão	61
6 Conclusões.....	65
7 Referências	65

CAPÍTULO

1 INTRODUÇÃO

A cultura do eucalipto tem mostrado notável crescimento em muitas partes do mundo, em decorrência disso, inúmeros são os patógenos responsáveis por doenças na cultura, cuja incidência é variável de acordo com o estágio de desenvolvimento das mudas, hospedeiro e patógeno (ALFENAS et al., 2009).

Espécies do gênero *Calonectria* são conhecidas por causar mancha foliar em eucalipto tanto na fase de viveiro como no campo e, portanto, pode ser considerada uma doença importante para a cultura (ALFENAS et al. 2009). Infecções pelo patógeno podem resultar em desfolha, que leva a perdas econômicas palpáveis. Além de causar manchas foliares, o fungo é responsável por causar *damping-off*, podridão de estacas, miniestacas e raízes (ALFENAS e FERREIRA, 1979; ALFENAS et al., 1979, ALFENAS et al., 2009). A espécie mais comum encontrada nas plantações comerciais no Brasil é *Calonectria pteridis* (ALFENAS et al., 2009).

A seleção de genótipos resistentes é a melhor estratégia de controle para o patógeno (ALFENAS et al., 2009). Entretanto, o uso indiscriminado de genótipos selecionados em locais que não foram testados é a principal causa para o surgimento de alta suscetibilidade, principalmente em regiões mais quentes e úmidas do país. Em vista disso, aliar métodos de controle alternativos a seleção de genótipos seria crucial para evitar grandes surtos da doença em locais com clima favorável a mancha foliar por *Calonectria*.

Sabe-se que o nível de nutrição da planta e seus mecanismos de defesa são altamente interrelacionados. Diversos estudos mostraram o efeito de alguns nutrientes minerais na participação do desenvolvimento das respostas de defesa da planta contra o ataque de fitopatógenos (POZZA et al., 2001; SANTOS et al., 2008; DATNOFF et al., 2007; PINHEIRO et al., 2011; CARVALHO et al., 2013). Devido à sua influência na resistência da planta, a adubação mineral é uma alternativa de controle de doenças de plantas, pois é um dos fatores ambientais de fácil manipulação com ação direta no desenvolvimento de estruturas e mecanismos bioquímicos de defesa pré e pós-formados.

Em vista disso, os principais objetivos dos artigos produzidos foram avaliar a influência da adubação de Ca e K no patossistema *C. pteridis*/eucalipto e quantificar e estudar a distribuição dos nutrientes nos tecidos foliares em torno das lesões por microanálise de Raio-X (MAX).

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Importância da mancha de *Calonectria* na eucaliptocultura

O cultivo de eucalipto mostra-se em expansão em diversas partes do mundo e é muito proeminente no Brasil. A cultura é importante devido, principalmente, a contribuição de seus subprodutos com fins industriais no PIB brasileiro, como a produção de papel e celulose. Seus plantios ocupam 5,7 milhões de hectares da área de árvores plantadas no País, localizados principalmente nos estados de Minas Gerais, São Paulo e Mato Grosso do Sul (IBÁ, 2017).

Em vista do crescente mercado mundial de papel, celulose e energias renováveis, as plantações de eucalipto no Brasil se expandiram para as regiões quentes e úmidas do Norte e Nordeste do Brasil (ALFENAS et al., 2009), culminando em condições ótimas para a incidência da mancha foliar causada por espécies de *Calonectria*, tornando-se uma importante doença, tanto em fase de viveiro, quanto no campo. Outras proeminentes doenças estão associadas com espécies de *Calonectria* em eucalipto, como *damping-off* (FERREIRA et al., 1995), cancro (SHARMA et al., 1984; CROUS et al., 1991), podridão das raízes (MOHANAN e SHARMA 1985; CROUS et al., 1991) e mancha foliar (FERREIRA et al., 1995, CROUS et al., 1998).

A mancha foliar causada por *Calonectria* causa desfolha em estágios iniciais de desenvolvimento da planta, podendo reduzir a produtividade volumétrica devido à interferência nos processos fisiológicos, como a fotossíntese, metabolismo dos nutrientes, hormônios e absorção de água (KOZLOWSKI, 1969).

No Brasil, em meados de 1990, a mancha foliar causada pela espécie *C. pteridis* no sudeste da Bahia e no Pará resultou na desfolha grave de árvores de *E. grandis* (FERREIRA et al., 1995). A partir disso, *C. pteridis* foi considerada a espécie mais comum relatada nas plantações comerciais, principalmente em *E. camaldulensis*, *E. cloeziana*, *E. grandis*, *E. saligna*, *E. tereticornis*, *E. urophylla* e *E. grandis* × *E. urophylla* (ALFENAS et al., 2009).

Embora os sintomas da doença possam variar com as espécies de *Calonectria* e *Eucalyptus* (ALFENAS et al., 2009), para a maioria das espécies de eucalipto, a doença é caracterizada por pontos inicialmente pequenos, circulares ou alongados, de coloração cinza ou castanho claro, que progridem e se estendem por todo o limbo foliar, resultando em queda das folhas e, em alguns casos, em desfolha grave (ALFENAS e FERREIRA, 1979; ALFENAS et al., 1979). Tal desfolha favorece o aumento da luminosidade no sub-bosque, o que propicia o crescimento de plantas invasoras (ALFENAS et al., 2009).

2.2 Diversidade de *Calonectria*

A importância do gênero *Calonectria* (= *Cylindrocladium*) se dá pela ampla gama de hospedeiros, a maioria dos quais pertencentes às famílias Fabaceae, Mirtaceae e Pinaceae. As espécies florestais hospedeiras de maior importância acometidas pelo fungo são eucalipto, pinus e acácia (CROUS, 2002; LOMBARD et al., 2010).

O gênero *Calonectria* condiz à fase teleomórfica do fungo e caracteriza-se por apresentar peritécio brilhante, asco clavado, multiseptado hialino e fusiforme (CROUS, 2002). Sua fase anamórfica, denominada *Cylindrocladium*, em que se observa esporulação brilhante, conídios cilíndricos uni ou multiseptados (MORGAN, 1982), é a fase mais comum encontrada na natureza e crucial para identificação do fungo a nível de espécie (PEERALLY, 1991).

Mais de 150 espécies de *Calonectria* já foram descritas ao redor do mundo, baseadas principalmente em sua morfologia e estudos filogenéticos. Dentre elas, aproximadamente 45 ocorrem no Brasil, com ênfase nas espécies dos complexos *C. pteridis* e *C. candelabra*. Alfenas et al. (2015) constataram que dentre as amostras coletadas no Brasil, aquelas que não pertenciam ao complexo de espécies *C. pteridis* foram divididas entre os complexos *C. brasicae*, *C. cylindrospora*, *C. naviculata*, e *C. candelabra*.

As espécies do complexo *C. pteridis* são comumente relatadas causando queima das folhas e intensa desfolha em plantas no campo (ALFENAS et al., 2015), enquanto que espécies do complexo *C. candelabra* são relatadas causando desfolha nos viveiros e *damping-off* (CROUS, 2002).

A quantificação dos danos econômicos causados pela desfolha não é mensurada, mas estudos desenvolvidos por PULROLNIK et al., (2005) e PIRES (2000)

demonstraram que quando a poda artificial é igual ou maior que 75% em mudas de *E. grandis* de um ano de idade, o a produtividade volumétrica reduz em 45% quando completam sete anos de idade. De posse disso, é possível inferir que, em clones suscetíveis, o patógeno pode causar demasiada perda econômica no campo, uma vez que em condições favoráveis, a infecção por *C. pteridis* resulta em desfolha.

2.3 Controle do patógeno baseado em genótipos resistentes

Dentre as diversas espécies de eucalipto existentes, cerca de 700 espécies descritas, um número limitado delas é plantado comercialmente no Brasil, principalmente as espécies *E. grandis*, *E. urophylla* e seu híbrido (“urograndis”). A estratégia mais eficiente de controle do patógeno é o uso de genótipos resistentes no campo (ALFENAS et al., 2009), como o plantio de clones, progênies, procedências ou espécies resistentes. Portanto, determinar os mecanismos de defesa da planta é de suma importância para embasar os programas de melhoramento que visam a obtenção de genótipos resistentes.

Para tanto, o estudo dos fatores que contribuem na resistência de eucalipto à *C. pteridis* pode ser usado como um modelo e pode ser utilizado para expandir nossa compreensão sobre as respostas de defesa em espécies lenhosas. O proveito em se conhecer as estratégias de defesa da planta reside na capacidade de induzir mecanismos de defesa basais e induzidos que contribuem para limitar a propagação do patógeno. Além disso, evidenciar a fraqueza na planta que o fungo pode manipular (MANGWANDA et al., 2015).

2.4 A adubação mineral como auxílio no controle de doenças

Os nutrientes são indispensáveis nos processos fisiológicos da planta, requeridos em todas as fases de seu crescimento e desenvolvimento. Além disso, sabe-se que o estado nutricional da planta é um dos principais fatores que determina a capacidade de resposta a estresses bióticos e abióticos.

A resistência ou tolerância da planta a doenças é afetada direta e indiretamente pelo seu estado nutricional, uma vez que os nutrientes podem exercer forte efeito na penetração, desenvolvimento e reprodução de diversos patógenos invasores (GRAHAM

e WEBB, 1991). Em vista disso, a adubação mineral tem sido reconhecida como um importante componente nas práticas de controle a doenças (PÉREZ et al., 2017).

Os tipos de defesas induzidas pelos nutrientes envolvem, entre outras, a produção de toxinas, metabólitos e lignificação (ENGELHARD, 1989). Essa interação planta/patógeno modifica a dinâmica de mobilização e utilização dos nutrientes em vários tecidos e órgãos da planta. Assim, a distribuição mineral na planta depende da disponibilidade dos elementos minerais proveniente de uma adubação equilibrada.

Embora os elementos minerais sejam mobilizados em favor das respostas de defesa da planta, o desbalanço de alguns nutrientes favorece o estabelecimento de diversos patógenos, pois estes frequentemente manipulam o metabolismo da planta, retirando os nutrientes e aumentando a demanda da planta por assimilação (LANOUE et al., 2010). Um exemplo do efeito negativo da fertilização em demasia é observado no estudo realizado por JIANG et al. (2016). Os autores verificaram que a fertilização com nitrogênio em *Camelina sativa* aumenta a severidade e a incidência do míldio, afetando o desenvolvimento da copa das plantas. Isto se deve ao nitrogênio promover o desenvolvimento de tecidos jovens e suculentos e prolongar o estágio vegetativo, o que implica em plantas mais suscetíveis a patógenos (ZARAFI et al., 2005).

Em vista disso, o uso da adubação gera efeitos diretos na resistência da planta, podendo reduzir ou aumentar a incidência e a severidade de diversas doenças. Desse modo, é de crucial importância regular o uso de fertilizantes de forma eficiente e equilibrada, para que os nutrientes sejam utilizados de forma a mediar positivamente a resistência basal das plantas.

2.4.1 Importância do cálcio na resistência da planta

O cálcio é um elemento essencial na percepção dos estímulos externos à planta, agindo como mensageiro secundário para ativar uma cascata de sinais intracelulares (RANTY et al., 2016). Desse modo, ocorre a abertura do canal de íons que permitem o fluxo de Ca^{+2} do apoplasto para o citosol das células vegetais no momento em que a célula percebe a presença de um patógeno, culminando na ativação das respostas de defesa da planta (TAVERNIER et al., 1995).

A informação enviada pelo influxo de cálcio é decodificada por um conjunto de proteínas que dão origem a efeitos a jusante, como a fosforilação de proteínas e mudanças na expressão gênica (SANDERS et al., 2002). Essa decodificação ocorre pela

ligação do cálcio a diversos sensores de cálcio distintos, como a calmodulina (CaM) e as proteínas dependentes de cálcio (CDPK). Outras respostas de defesa induzidas pela sinalização por cálcio é a rápida produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), induzida precocemente pela percepção de elicitores do patógeno. O acúmulo de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é uma resposta ao influxo de cálcio e á fosforilação de proteínas (NEILL et al., 2002).

Assim como o Ca^{+2} , ERO também são largamente reconhecidas como um importante mensageiro secundário que atua em vários processos celulares na planta, incluindo abertura estomatal, sinalização hormonal e morte celular programada (QUAN et al., 2008). A morte celular programada é uma reação de hipersensibilidade frequentemente associada à resistência a doenças e modulada pela ação desses mensageiros secundários (DANGL et al., 1996).

Uma vez que o cálcio tem elevada relevância nos processos de sinalização de respostas de defesa da planta, funcionando como uma chave binária *on-off* para ativar componentes dependentes de cálcio, envolvidos em uma intrincada e complexa rede de sinais simultâneos (LECOURIEUX et al., 2006), é fator crucial o fornecimento racional deste nutriente.

2.4.1 Importância do potássio na resistência da planta

Outro importante nutriente envolvido na resistência da planta a fatores bióticos é o potássio. Sabe-se que a fertilização com potássio diminui a incidência e a severidade de diversas doenças (PERRENOUD, 1990). Por ser o cátion mais abundante nos tecidos vegetais, possui alta atividade nos processos metabólicos da célula vegetal e no crescimento da planta (MENGEL e KIRKBY, 2001). O K^+ está envolvido em processos celulares, como na ativação de numerosas enzimas, síntese de proteínas, transporte de solutos, regulação do pH citoplasmático, extensão celular, transporte de metabólitos e ânions inorgânicos, movimento estomático e fotossíntese (AMTMANN et al., 2008; WHITE e KARLEY, 2010).

Além disso, o potássio interage com vias de defesa hormonal em vários níveis (SHIN e SCHACHTMAN, 2004). Diversos estudos descreveram que a disponibilidade de potássio à planta modifica a produção de ácido jasmônico (AJ) e etileno (ET). Nesse sentido, os estudos observaram que a deficiência de potássio na planta induz um grande número de genes relacionados ao AJ e ET (ARMENGAUD et al., 2004;

SCHACHTMAN e SHIN, 2006). Ademais, o potássio participa de respostas de defesa mecânicas a doenças, uma vez que o estado nutricional da planta permite a alocação de recursos para desenvolver paredes celulares mais resistentes a infecção de patógenos. Estudo realizado por DEDATTA e MIKKELSON (1985) relatou um aumento na resistência do colmo do arroz contra patógenos como resultado do fornecimento adequado de K^+ .

Desse modo, o fornecimento de altas concentrações de potássio às plantas é comumente relacionado a uma alta resistência da planta a patógenos. Entretanto, diversos estudos já demonstraram que em alguns casos, a aplicação de K^+ em elevada quantidade tem efeito oposto na resistência da planta. NAM et al. (2006) observaram que morangos cultivados com excesso de K^+ apresentaram elevada suscetibilidade à infecção por *Colletotrichum gloeosporioides*. Portanto, é imprescindível o conhecimento acerca das doses adequadas para um manejo equilibrado com potássio, uma vez que este nutriente exerce forte influência na suscetibilidade e resistência da planta a doenças.

3 REFERÊNCIAS

ALFENAS, A. C., FERREIRA, F.A. A mancha de folha do eucalipto no Brasil causada por três espécies de *Cylindrocladium* – Uma revisão da descrição da doença. Revista Arvore, v.3, p.47-56, 1979.

ALFENAS, A. C., MATSUOKA, A. K., FERREIRA, F. A. Identificação, características culturais e patogenicidade de três espécies de *Cylindrocladium*, isoladas de manchas de folha de *Eucalyptus* spp. Fitopatologia Brasileira, v.4, p.445–459, 1979.

ALFENAS, A. C., ZAUZA, E. A. V., MAFIA, R. G. Clonagem e doenças do eucalipto. 2nd. ed. Editora UFV, Viçosa, MG, Brasil, 2009.

ALFENAS, R. F., LOMBARD, L., PEREIRA, O. L., ALFENAS, A. C., CROUS, P. P. Diversity and potential impact of *Calonectria* species in *Eucalyptus* plantations in Brazil. Studies in Mycology, v.80, p.89-130. 2015.

AMTMANN, A., TROUFFLARD, S., ARMENGAUD, P. The effect of potassium nutrition on pest and disease resistance in plants. Plant Physiology, v.133, p.682-691, 2008.

ARMENGAUD, P., BREITLING, R., AMTMANN, A. The potassium dependent transcriptome of *Arabidopsis* reveals a prominent role of jasmonic acid in nutrient signaling. Plant Physiology, v.136, p.2556–2576, 2004.

CARVALHO, D. O., POZZA, E. A., CASELA, C. R., COSTA, R. V., POZZA, A. A. A.; CARVALHO, C.O. Adubação nitrogenada e potássica na severidade da antracnose em dois cultivares de milho. *Revista Ceres*, 60:380-387, 2013.

CROUS, P. W., PHILLIPS, A. J. L., WINGFIELD, M. J. The genera *Cylindrocladium* and *Cylindrocladiella* in South Africa, with special reference to forest nurseries. *South African Journal of Forestry*, v.157, p.69-85, 1999.

CROUS, P. W. Taxonomy and pathology of *Cylindrocladium* (*Calonectria*) and allied genera. The American Phytopathological Society PRESS, 278p. 2002.

CROUS, P. W., WINGFIELD, M. J., MOHAMMED, C., YUAN, Z. Q. New foliar pathogens of *Eucalyptus* from Australia and Indonesia. *Mycological Research*, V.102, p.527-532, 1998

DANGL, J. L., DIETRICH, R. A., RICHBURG, M. H. Death don't have no mercy: cell death programs in plant-microbe interactions. *Plant Cell*, v.8, p.1793-1807, 1996.

DATNOFF, L. E., RODRIGUES, F. A., SEEBOLD, K. W. SILICON AND PLANT NUTRITION. IN: DATNOFF, L.E., ELMER, W.H., HUBER, DM (Eds.) Mineral Nutrition and Plant Disease. Saint Paul MN. APS Press. pp. 233-Saint Paul MN. APS Press. p. 233-246, 2007.

DEDATTA, J. G., MIKKELSON, D. S. Potassium Nutrition in Rice. American Society of Agronomy, p.665-699, 1985.

ENGELHARD, A. W. Soil borne plant pathogens: management of diseases with macro and microelements. The American Phytopathological Society PRESS, 217p, 1989

FERREIRA, F. A., ALFENAS, A. C., MOREIRA, A. M., DEMUNER, N. L. J. Foliar eucalypt disease in tropical regions of Brasil caused by *Cylindrocladium pteridis*. *Fitopatologia Brasileira*, v.20, p.107-110, 1995

GRAHAM, D. R., WEBB, M. J. Micronutrients and disease resistance and tolerance in plants, in: MORTVEDT J. J., COX F. R., SHUMAN, L. M., WELCH, R. M. (Eds.), *Micronutrients in Agriculture*, 2nd ed., Soil Science Society of America, p.329-370, 1991.

HODGES, C. S., MAY, L. C. A root disease of pine, araucaria, and eucalyptus in Brazil caused by a new species of *Cylindrocladium*. *Phytopathology*, v.62, p.898-901, 1972.

IBÁ. IBÁ - Indústria Brasileira de Árvores. 2017. Disponível em: <http://www.iba.org/shared/iba_2014_pt.pdf>. Acesso em 07 ago. 2019

JIANG, Y., CLAUDE, D. C. Effect of nitrogen fertilization on camelina seed yield, yield components, and downy mildew infection. *Canadian Journal of Plant Science*, v.96, p.17-26, 2016

KOZLOWSKI, T. T. Tree physiology and forest pests. *Journal of Forestry*, Washington, v.67, p.118-123, 1969.

LANOUE, A., BURLAT, V., HENKES, G.J., KOCH, I., SCHURR, U., ROSE, U. S. R. De novo biosynthesis of defense root exudates in response to *Fusarium* attack in barley. *New Phytologist*, v.185, p.577-588, 2010.

LECOURIEUX, D., RANJEVA, R., PUGIN, A. Calcium in plant defence-signalling pathways. *New Phytologist*, v.171, p.249-269, 2006.

LOMBARD, L., CROUS, P. W., WINGFELD, B. D., WINGFELD, M. J. Species concepts in *Calonectria* (*Cylindrocladium*). *Studies in Mycology*, v.66, p.15-30, 2010.

MANGWANDA, R., MYBURG, A. A., NAIDOO, S. Transcriptome and hormone profiling reveals *Eucalyptus grandis* defence responses against *Chrysoporthe austroafricana*. *BMC Genomics*, v.16, p.319, 2015.

MENGEL, K., KIRKBY, E. A. Principles of plant nutrition, 5th edn. **Kluwer Academic Publishers**, p.849, 2001.

MOHANAN, C., SHARMA, J. K. *Cylindrocladium* causing seedling diseases of *Eucalyptus* in Kerala, India. *Transactions of the British Mycological Society*, v.84, p.538-539, 1985.

MORGAN, A. P. Two new genera of Hyphomycetes. *Botanical Gazette*, 17, 1025-1026p, 1892.

NAM, M. H., JEONG, S. K., LEE, Y. S., CHOI, J. M., KIM, H. G. Effects of nitrogen, phosphorus, potassium and calcium nutrition on strawberry anthracnose. *Plant Pathology*, v.55, p.246-249, 2006.

NEILL, S. J., DESIKAN, R., CLARKE, A., HURST, R. D., HANCOCK, J. T. Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants. *Journal of Experimental Botany*, v.53, p.1237-1247, 2002.

PEERALLY, A. The classification and phytopathology of *Cylindrocladium* species. *Mycotaxon*, v.40, p.367-366, 1991.

PERRENOUD, S. Potassium and Plant Health. *International Potash Institute*, Basel, v.3, 365p, 1990.

PÉREZ, C. D. P., POZZA, E. A., POZZA, A. A. A., FREITAS, A. S., SILVA, M. G. Nitrogênio e potássio na intensidade da mancha aureolada do cafeeiro em solução nutritiva. *Coffee Science*, v.12, p.60-68, 2017.

PINHEIRO, J. B., POZZA, E. A., POZZA, A. A. A., MOREIRA, A. S., ALVES, M. C. Severidade da ferrugem da soja em função do suprimento de potássio e cálcio em solução nutritiva. *Revista Ceres*, 58:43-50, 2011.

PIRES, B. M. Efeito da desrama artificial no crescimento e qualidade da madeira de *Eucalyptus grandis* para serraria. 96p. Dissertação (Mestrado em Ciência Florestal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2000.

POZZA, A. A. A., MARTINEZ, H. E. P., CAIXETA, S. L., CARDOSO, A.A., ZAMBOLIM, L., POZZA, E. A. Influência da nutrição mineral na intensidade da mancha-de-olho-pardo em mudas de cafeeiro. *Revista Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.36, p.53-60, 2001.

POZZA, A. A. A., ALVES, E., POZZA, E. A., CARVALHO, J. G., MONTANARI, M., GUIMARÃES, P. T. G., SANTOS, D.M. Efeito do silício no controle da cercosporiose em três variedades de cafeeiro. *Fitopatologia Brasileira*, v.29: p.185–188, 2004.

PULROLNIK, K., REIS, G. G., REIS, M. G. F., MONTE, M. A., FONTAN, I. C. I. Crescimento de plantas de clone de *Eucalyptus grandis* (Hill ex. Maiden) submetidas a diferentes tratamentos de desrama artificial, na região do cerrado. *Revista Árvore*, v.29, p.495–505, 2005.

QUAN, L. J., ZHANG, B., SHI, W. W., LI, H.Y. Hydrogen peroxide in plants: a versatile molecule of the reactive oxygen species network *J. Integr. Plant Biology*, v.50, p.2-18, 2008.

RANTY, B., ALDON, D., COTELLE, V., GALAUD, J. P., THULEAU, P., MAZARS, C. Calcium Sensors as Key Hubs in Plant Responses to Biotic and Abiotic Stresses. *Frontiers in Plant Science*, v.7, p.327, 2016.

SANDERS, D., PELLOUX, J., BROWNLEE, C., HARPER, J. F. Calcium at the crossroads of signalling. *Plant Cell*, v.14, p.S401–S417, 2002.

SANTOS, F.S., SOUZA, P.E., POZZA, E.A., MIRANDA, J.C., CARVALHO, E.A., FERNANDES, L.H.M., POZZA, A.A.A. Adubação orgânica, nutrição e progresso de cercosporiose e ferrugem-do-cafeeiro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.43, p.783-791, 2008.

SCHACHTMAN, D. P., SHIN, R. Nutrient sensing and signaling: NPKS. *Annual Review of Plant Biology*, v.58, p.47-69, 2006.

SHARMA, J. K., MOHANAN, C., FLORENCE, E. J. M. Nursery diseases of *Eucalyptus* in Kerala. *European Journal of Forest Pathology*, v.14, p.77-89, 1984.

SHIN, R., SCHACHTMAN, D. P. Hydrogen peroxide mediates plant root cell response to nutrient deprivation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v.101, p.8827–8832, 2004.

TAVERNIER, E., WENDEHENNE, D., BLEIN, J. P., PUGIN, A. Involvement of free calcium in action of cryptogein, a proteinaceous elicitor of hypersensitive reaction in tobacco cells. *Plant Physiology*, v.109, p.1025-1031, 1995.

WHITE PJ, KARLEY AJ (2010) Potassium. In: HELL R, MENDEL RR (eds) *Cell biology of metals and nutrients, plant cell monographs 17*. Springer, Berlin, pp 199–224

ZARAFI A, EMECHEBE AM, AKPA AD, ALABI O. 2005. Effect of fertilizer levels on grain yield, incidence and severity of downy mildew in pearl millet. Arch. Phytopathology Plant Protect. 38: 11-17

**CAPÍTULO 2: CALCIUM AND POTASSIUM IMBALANCE FAVORS LEAF
BLIGHT AND DEFOLIATION CAUSED BY *Calonectria pteridis* IN
EUCALYPTUS PLANTS**

**Calcium and potassium imbalance favors leaf blight and defoliation caused by
Calonectria pteridis in Eucalyptus plants**

Artigo aceito para publicação no periódico “Forests” em 13 de dezembro de 2018.

Preparado em concordância com o periódico.

**Thaissa P. F. Soares¹, Edson A. Pozza¹, Adélia A. A. Pozza², Reginaldo Gonçalves
Mafia³, Maria A. Ferreira¹**

¹ Universidade Federal de Lavras/UFLA - Departamento de Fitopatologia/DFP - C. P. 3037 - 37200-000 - Lavras - MG

² Universidade Federal de Lavras/UFLA - Departamento de Ciência do Solo/DCS - C. P. 3037 - 37200-000 - Lavras – MG. ³Centro de Tecnologia, Fibria Celulose S.A. Rod. Aracruz Barra do Riacho, Km 25. 29197-900, Aracruz-ES, Brasil

* Correspondence: mariaferreira@dfp.ufla.br; Tel.: +55-(35) 3829-1799

Received: 26 October 2018; Accepted: 13 December 2018; Published: 18 December 2018

Abstract: Supplying nutrients in balanced proportions leads to greater crop yields and represents an alternative management practice for plant diseases. Accordingly, we investigated the effect of the dose and nutritional balance between calcium (Ca) and potassium (K) on the severity of leaf spot and defoliation caused by the fungus *Calonectria pteridis*. Moreover, the effect of the treatments on the growth of interspecific hybrid eucalyptus clone seedlings (*Eucalyptus grandis* × *E. urophylla*), which are highly susceptible to the disease, was evaluated. The treatments consisted of five doses of Ca (1.2, 3.0, 6.0, 9.0 and 12.0 mmol L⁻¹) combined with five doses of K (0.8, 2.0, 4.0, 8.0 and 12.0 mmol L⁻¹), for a total of 25 treatments, with five replicates. The supply of high concentrations of K favored *C. pteridis* infection, resulting in high disease severity, although defoliation was not observed. However, when both nutrients were supplied in excess (12.0 mmol L⁻¹ Ca × 9.0 mmol L⁻¹ K), higher disease severity and defoliation percentage were observed (82 and 64%, respectively). Defoliation not

associated with *Calonectria* Leaf Blight (CLB) disease was observed in treatments with an imbalance between Ca and K, in which one nutrient was deficient and the other was supplied in excess. The supply of K near the standard dose (6 mmol L⁻¹) and of doses of Ca above 4 mmol L⁻¹ (standard dose) ensured high mean values for the morphological variables root and shoot biomass, plant height and chlorophyll a and b contents. At these doses, low disease severity and defoliation percentages were also observed, indicating that a balanced supply of Ca and K ensures a reduction in disease severity and defoliation and contributes to higher growth.

Keywords: disease resistance, plant nutrition-disease relationship, eucalyptus disease, leaf spot; control

1. Introduction

Eucalyptus (*Eucalyptus* sp.) farming has grown rapidly to meet the growing world demand for pulp, paper and coal for the steel industry. In addition, eucalyptus biomass and pulp have been evaluated as raw materials for the production of biofuels and biomaterials [1,2,3]. Brazil is the world's largest producer of eucalyptus, with a planted area of 5.67 million hectares [1]. More recently, a rapid expansion of eucalyptus plantations towards the northern and north-eastern regions of the country, where warm temperatures and high humidity condition are favorable for several diseases, especially leaf blight caused by *Calonectria* species [4].

Calonectria species (anamorph: *Cylindrocladium*) are known to cause the disease *Calonectria* Leaf Blight (CLB) [5] mainly in eucalyptus trees, and beyond this, other diseases are associated with *Calonectria* sp, including damping-off, cutting rot and root rot [4]. Symptoms of CLB for most *Eucalyptus* species is characterized by spots that are initially small, circular or elongated of gray or light brown color, that progresses and extends throughout the leaf limb, resulting in leaf drop and in some cases severe defoliation [6,7]. Defoliation caused by the pathogen is mainly observed in stages of

plant development, and due to interfering with processes physiological, as in photosynthesis, causing the volumetric increase of the plant [8]

The leaf blight and severe defoliation caused by CLB in northern and north-eastern regions result mainly from infection with *Calonectria pteridis* and can occur during the seedling production phase in the field, especially in forests up to three years of age. In nurseries, the pathogen is favored by the environmental conditions implemented for the production of seedlings because these conditions, including high humidity, frequent irrigation and the plant spatial density, are also favorable for the disease. Disease control is performed by integrated cultivation and chemical methods as well as by the selection and multiplication of resistant genotypes, which is a much more effective approach. These integrated practices reduce the initial inoculum and render environmental conditions unfavorable to the pathogen [9]. In the field, the selection and use of resistant genotypes is the only commonly used control method [4].

However, planting clones considered resistant in regions other than those where the selective breeding was made is a major problem. In many cases, high severity of the disease is observed in clones considered resistant in regions with distinct and favorable fungal climate. The fact that the breeding programs do not consider a variety of regions and climatic factors generates the inappropriate use of these clones.

Therefore, the integrated management of CLB implementing an adequate nutritional balance may represent an alternative method for the control of leaf blight disease in eucalyptus in the nursery and field. Plant nutrition is known to have direct and indirect effects on the activation of defense mechanisms against infection by phytopathogens [10,11]. Mineral nutrients are critical in building physical and/or chemical barriers involved in plant resistance. Thus, balanced fertilization represents an alternative control method, although it requires knowledge about the interaction

between nutrients and their influence on the intensity of a given disease. Such data are important because of the synergism and antagonism between mineral elements, which occur mainly due to competition for the same absorption sites [12,13].

The balance between calcium and potassium has been well studied from a nutritional perspective because these nutrients play a key role in plant defense, growth and metabolism [11,14]. Potassium is involved in enzyme activation, protein synthesis, stomatal opening and plant water flow and interacts at various levels in hormone defense, such as in the jasmonic acid and ethylene pathways [15]. In turn, calcium influx through the plasma membrane signals plant defense responses, which demonstrates that calcium plays a fundamental role in pathogen recognition [16]; moreover, calcium participates in cell wall synthesis and may represent one of the more important nutrients in the management of plant diseases [17].

In eucalyptus, the influence of nutrients on the severity of leaf spot caused by CLB is unknown. In addition, little knowledge is available about how the unbalanced supply of these interferes in both the resistance and the morphological characteristics of the plant. Because balanced mineral fertilization is a strategy to limit the favorable condition for pathogens attack and symptoms expression and can be integrated management of eucalyptus diseases, the objective of this study was to investigate the effect of the calcium/potassium (Ca/K) ratio on the severity of leaf blight and degree of defoliation caused by *Calonectria pteridis* and to evaluate the growth responses of eucalyptus under nutrient imbalance.

2. Materials and methods

2.1. Plant preparation and implantation

The experiment was conducted in a greenhouse with temperature and relative humidity conditions of 25 +/- 2°C and 80%, respectively, which were monitored by a datalogger (Instrutherm® HT-500) located inside a meteorological shelter 2 m from the experimental site. Seedlings of the hybrid clone of *Eucalyptus grandis* × *E. urophylla*, which are susceptible to *C. pteridis*, were removed from 53 cm³ tubes at 50 days of age. The cultivation substrate was then removed under running water. The exposed roots were carefully washed and disinfested with 1% sodium hypochlorite for 1 min and transplanted to 6 L trays containing Clark's nutrient solution [18] modified with the respective treatments to acclimate the seedlings.

In the acclimation phase, the seedlings remained in trays with nutrient solution diluted to 25% ionic strength for 7 days. After new leaf pairs and/or secondary roots emerged, the solutions were replaced with 60% ionic strength solution. The seedlings remained under this condition for the same period.

After the adaptation phase, uniform seedlings within each treatment were transplanted into 3 L plastic pots containing Clark's nutrient solution with 100% ionic strength according to the respective treatments, and the seedlings remained under this condition for another 25 days. The experimental period from the acclimation phase to the end of the evaluations was 39 days.

The treatments consisted of five doses of K (1.2, 3.0, 6.0, 9.0 and 12.0 mmol L⁻¹), which was provided as KNO₃ and KCl₂, combined with five doses of Ca (0.8, 2.0, 4.0, 8.0 and 12.0 mmol L⁻¹), which was provided as Ca(NO₃)₂ and CaCl₂, in a 5 x 5 factorial scheme with 25 treatments in terms of nutrient solution. The experiment was carried out in a randomized block design with five replications, with each experimental unit composed of two eucalyptus seedlings per pot.

The micronutrient solutions were prepared with Fe-EDTA ($89.53 \mu\text{mol L}^{-1}$), manganese sulfate ($91.01 \mu\text{mol L}^{-1}$), zinc sulfate ($0.76 \mu\text{mol L}^{-1}$), copper sulfate ($0.3153 \mu\text{mol L}^{-1}$), boric acid ($46.25 \mu\text{mol L}^{-1}$) and ammonium molybdate ($0.10 \mu\text{mol L}^{-1}$). All solutions were prepared using pure analysis grade reagents. The concentrations of K and Ca were established based on the standard dose of Clark's solution [18] for these nutrients ($6 \text{ mmol L}^{-1} \text{ K} \times 4 \text{ mmol L}^{-1} \text{ Ca}$) (control doses), with two doses above and two doses below the standard dose.

The roots were kept under constant aeration in nutrient solution. The pH of the solutions was checked at three-day intervals with a digital pH meter (HANNA® Instruments) and corrected when necessary to 5.5 – 6.0 by adding $0.1 \text{ mol L}^{-1} \text{ KOH}$ or HCl. The volume of the pots was refreshed as needed with deionized water. The electrical conductivity (EC) was monitored weekly with a conductivity meter (HANNA® Instruments) in each treatment at all stages to determine whether solution replacement was required. The solution was not replaced because depletion did not reach 50% of the initial K^+ value.

The outside of the pots was painted with reflective silver paint to prevent light entrance and algal proliferation. The plant stems were attached to Styrofoam blocks in the upper face of the pots to prevent the entrance of light and support the seedlings.

2.2. *Inoculum preparation and inoculation*

Cultures of the *C. pteridis* isolate A2 were prepared in potato-dextrose-agar (PDA) medium. The fungus isolate was obtained from eucalyptus plantations in the state of Maranhão and kept in the fungal collection of the Laboratory of Pathology, Federal University of Lavras (Universidade Federal de Lavras – UFLA). For inoculum production, the mycelium was cultured for 7 days for subsequent induction of sporulation by scraping the aerial mycelium and submersing the cultures in water [19].

The inoculum suspension was prepared by adding 20 mL of distilled water + 0.05% Tween 20 to the culture surface and then removing the conidia by scraping with a brush. The suspension was filtered through a double layer of sterilized gauze, and the inoculum concentration was adjusted to a concentration of 10^4 conidia/mL⁻¹ with the aid of a Neubauer chamber. The suspension was sprayed on all leaves of the seedlings until runoff. The seedlings were covered with dark plastic bags to maintain constant leaf wetting in this environment, and deionized water was frequently sprayed to maintain the humidity levels. The seedlings remained under these conditions, which were ideal for germination and pathogen penetration, for 48 h.

2.3. Experimental evaluation

2.3.1. Disease and defoliation assessment

Severity of CLB were evaluated when the first symptoms were observed in the leaves at 24, 48, 72, 96 and 120 h after inoculation (hai).

Were photographed the second fully expanded leaf pair at a distance of 10 cm after each evaluation period. The images were analyzed using Quant® software [20] to obtain the percentage of injured area as a function of the total leaf area. The severity values obtained at 120 h were analyzed separately as the final severity (FS).

The area under the disease progress curve (AUDPC) was calculated according to Shaner and Finney [21]:

$$\text{AUDPC} = \sum_{i=1}^{n-1} \left(\frac{y_i + y_{i+1}}{2} \right) (t_{i+1} - t_i)$$

where Y_i is the proportion of the disease at the i -th observation; t_i is the time (in days) at the i -th observation; and n is the total number of observations.

Before inoculation and at the end of the evaluation period, the total number of leaves remaining was counted to determine the defoliation percentage according to the following equation:

$$D (\%) = 100 - \frac{100 \times Qf}{Qi}$$

where D represents defoliation; Qi represents the quantity of initial leaves; and Qf represents the final quantity of leaves.

2.3.2. Plant growth and chlorophyll content

Four morphological variables were evaluated: shoot height (H), which was measured from the collar to the apical bud; collar diameter (CD), which was measured at the base of the collar; dry shoot weight (DSW); and dry root weight (DRW). At the end of the experiment, the roots were separated from the shoot, and each part was washed in distilled water, packed in paper bags and then dried in an oven at 60°C to a constant weight.

The Dickson quality index (DQI) [21] was obtained by the following formula:

$$DQI = \frac{TDW}{H/CD}$$

where TDW (total dry weight) corresponds to the sum of DSW and DRW ; H corresponds to the height; and CD corresponds to the collar diameter.

The chlorophyll content of the leaves was determined using a SPAD-502® portable chlorophyll meter [22]. Four readings were performed on the second fully expanded leaf pair, with two readings performed on each leaf, one day prior to inoculation and five days after inoculation. The mean of the four readings was used for analysis. The

chlorophyll *a* and *b* contents (mg gm^{-1}) were determined according to a previous study [23] based on the following equations:

$$\text{Chlorophyll } a = \frac{(12.7 \times A_{663} - 2.69 \times A_{645})V}{1000 \text{ FMW}}$$

$$\text{Chlorophyll } b = \frac{(22.9 \times A_{645} - 4.68 \times A_{663})V}{1000 \text{ FMW}}$$

where *A* is the absorbance at the indicated wavelength; *V* is the final volume of the chlorophyll-acetone extract; and *FMW* is the fresh weight in grams of plant material used (mg (FM g)^{-1}).

The following equations were used to determine the chlorophyll *a* and *b* concentrations:

$$Ya = (0.008 \times X) - 0.0053$$

$$Yb = (0.0004 \times X) - 0.0032$$

where *X* corresponds to the reading of the chlorophyll meter; *Ya* corresponds to chlorophyll *a*; and *Yb* corresponds to chlorophyll *b*.

2.4. Determination of the leaf nutrient contents

Leaves were collected before the implementation of the treatments and after the end of the experiment to determine the nutritional status of the seedlings. The Ca and K contents were determined according to the method described by Malavolta et al. [24]. The reference values used to interpret the results of the leaf analysis were based on the work of Martinez et al. [25] for eucalyptus.

2.5. Statistical analysis

Data were subjected to the Shapiro-Wilk [26] and Bartlett tests to evaluate the normal distribution of residuals and the homogeneity of variances, respectively. The data did not need to be transformed because the values met the assumptions of the analysis of variance. The means of the studied variables were compared by the F test ($p < 0.05$), and significant values were subjected to a regression analysis and fitted to linear models most representative of the studied pathosystem. The significant interactions between the studied quantitative factors were plotted on response surface diagrams. Statistical analyses were carried out using the statistical software R, and graphs were produced using SigmaPlot v. 16.0 (SigmaPlot, SYSTAT Software, Inc.).

3. Results

3.1. Disease severity

The first symptoms were observed at 48 hai, and an interaction was observed between the K and Ca doses for the AUDPC ($P = 0.0000$), final severity ($P = 0.0000$) and defoliation ($P = 0.0000$). At all doses supplied, progression of the disease was observed over time, and mean severity values greater than 30% were observed in the last evaluation (Figure 1).

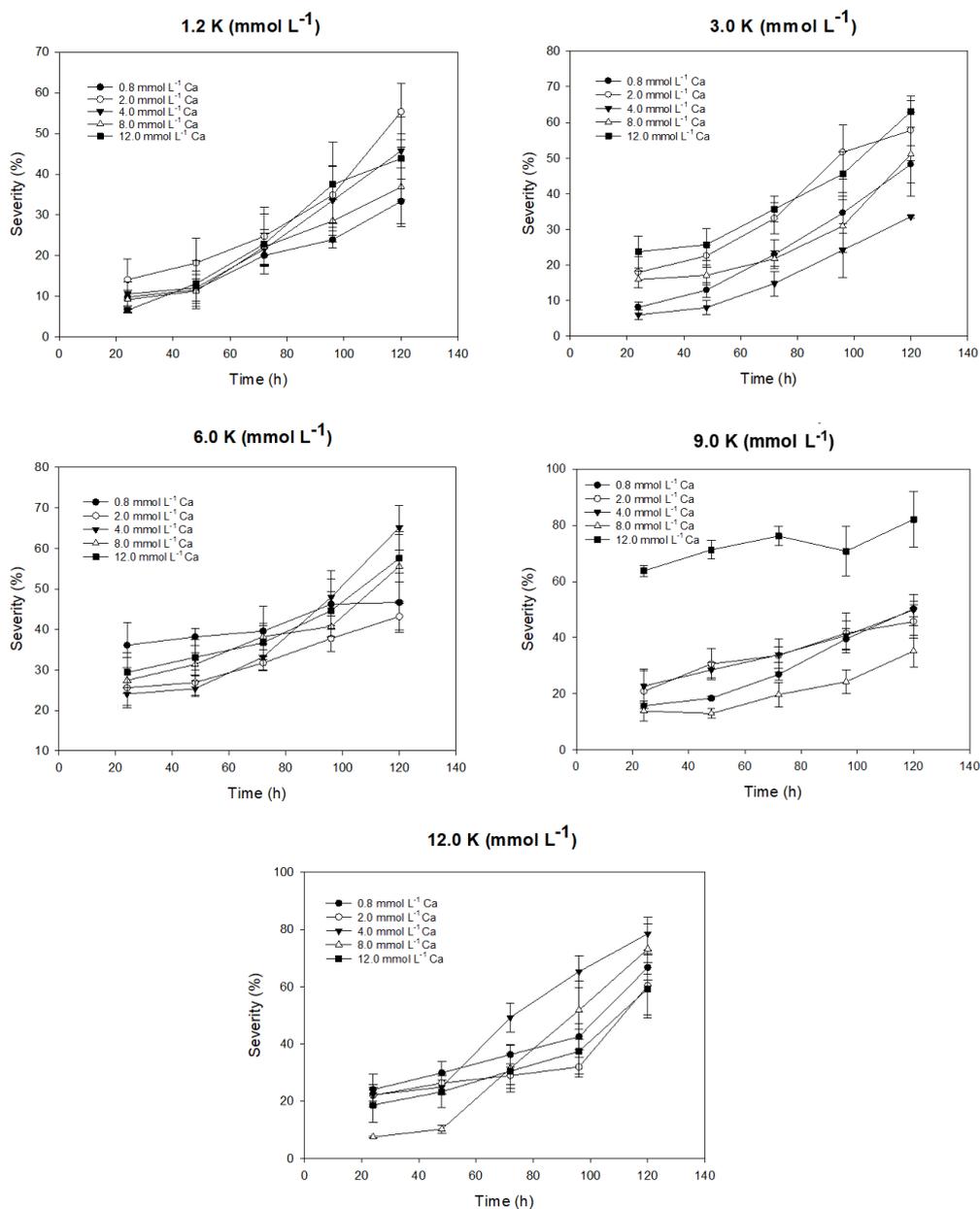


Figure 1. Severity (%) of *Calonectria* leaf blight in eucalyptus over time for combinations of different doses of Ca (mmol L⁻¹) with (A) 1.2 mmol L⁻¹, (B) 3.0 mmol L⁻¹, (C) 6.0 mmol L⁻¹, (D) 9.0 mmol L⁻¹ and (E) 12.0 mmol L⁻¹ K.

The supply of 12 mmol L⁻¹ K at all doses of Ca resulted in high final severity (FS) (59 to 78%) (Figure 1-A). However, the highest FS (mean of 82%) was observed at 9

and 12 mmol L⁻¹ K and Ca, respectively. A moderate severity response was observed at standard doses of the nutrient solution (6 mmol L⁻¹ K × 4 mmol L⁻¹ Ca) and at doses with low concentrations of K. The interaction between the doses of 9 and 8 mmol L⁻¹ K and Ca, respectively, yielded the lowest FS of 24.19%.

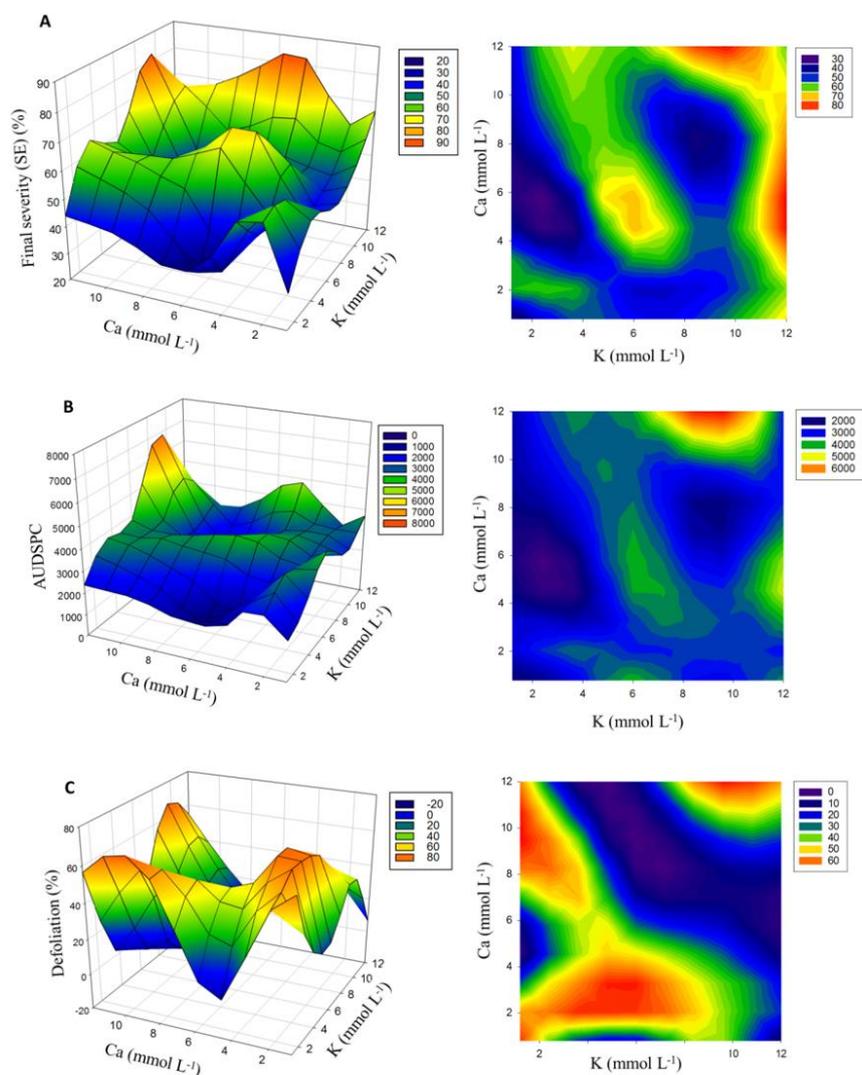


Figure 2. Influence of the supply of Ca and K (mmol L⁻¹) on the final severity (FS) (A), area under the disease progression curve (AUDPC) (B) and defoliation (C) of eucalyptus seedlings.

The combination of K at doses of 3 and 4 mmol L⁻¹ and Ca at doses of 9 and 8 mmol L⁻¹ resulted in the lowest AUDPC values of 1598.9 and 1955.8, respectively (Figure 2-B), whereas the supply of K and Ca at doses of 9 and 12 mmol L⁻¹, respectively, showed higher AUDPC values. The highest defoliation also occurred in the treatments with 9 mmol L⁻¹ K × 12 mmol L⁻¹ Ca and at 12 mmol L⁻¹ K × 12 mmol L⁻¹ Ca, reaching values of 64% and 54%, respectively (Figure 2-C). High defoliation percentages ranging from 39% to 63% were also observed under low doses of K with varying doses of Ca (except for values close to the standard dose). In addition, low doses of Ca combined with variable doses of K resulted in substantial defoliation (30% – 63%). The supply of Ca above the established standard dose (4 mmol L⁻¹) combined with the standard dose of K (6 mmol L⁻¹) resulted in low defoliation, and the interaction between 6 and 8 mmol L⁻¹ K and Ca, respectively, presented a low defoliation of 3.9% (Figure 2-C).

3.2. *Plant growth and chlorophyll content*

The interaction of the Ca and K doses affected the DRW ($P = 0.0000$) and DSW ($P = 0.0000$) as well as the DQI ($P = 0.0008$). In turn, the supply of Ca independent of the supply of K was significant for the H ($P = 0.0009$) and chlorophyll *a* and *b* ($P = 0.0000$; $P = 0.0000$) content before inoculation. No treatment effect was observed for the CD ($P = 0.062$).

The highest DRW was obtained with the doses of 6 mmol L⁻¹ K × 8 mmol L⁻¹ Ca, which resulted in a mean of 3.69 g plant⁻¹ (Figure 3-A). This treatment also led to a higher DSW, with a mean of 10.9 g plant⁻¹ (Figure 3-B). The other doses for both variables did not result in significant weight gain. The delivery of any dose of K combined with a high dose of Ca significantly increased the DQI (Figure 3-C).

However, the treatment with $8 \text{ mmol L}^{-1} \text{ K} \times 12 \text{ mmol L}^{-1} \text{ Ca}$ stood out from the others and presented a mean of $0.23 \text{ g plant}^{-1}$.

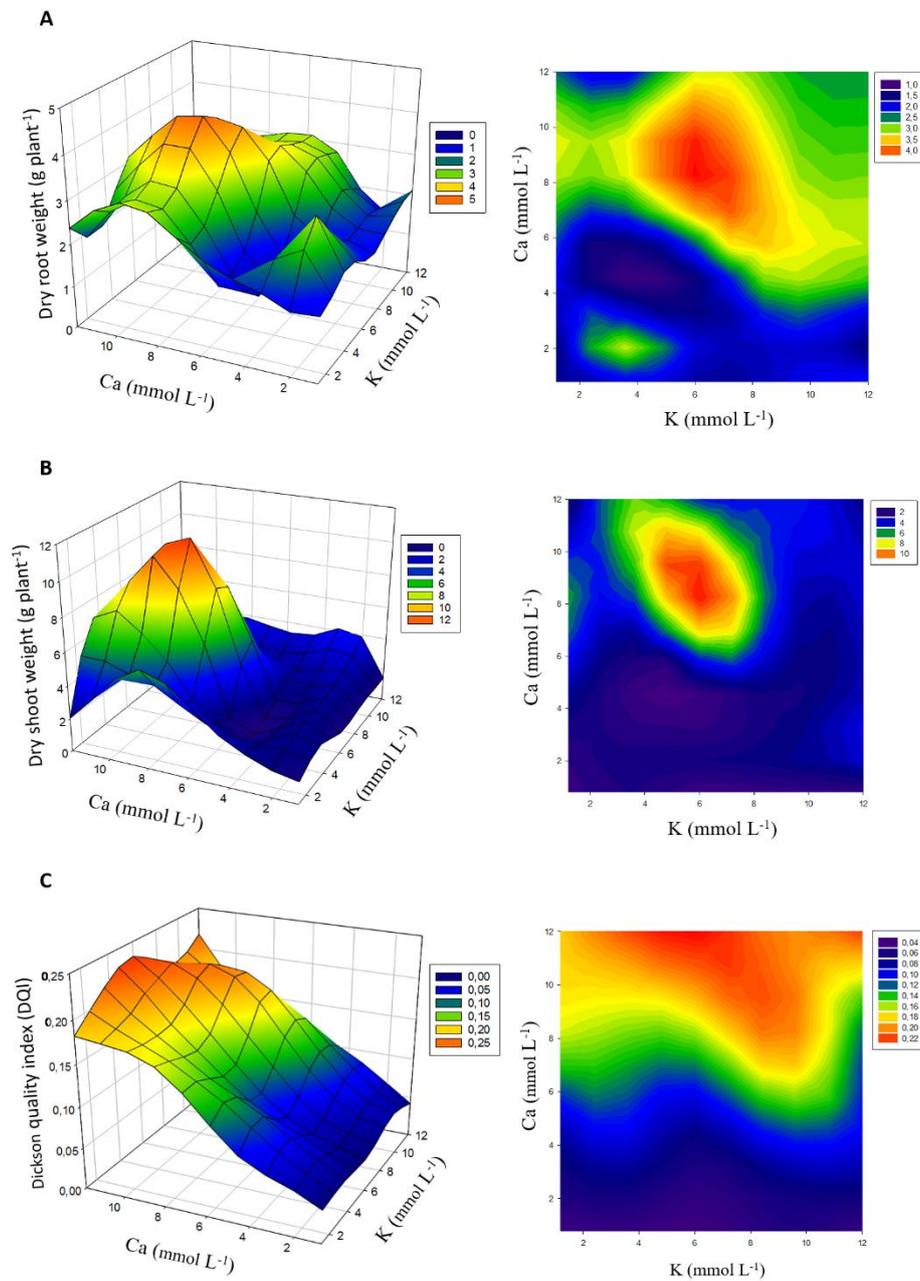


Figure 3. Influence of the supply of Ca and K (mmol L^{-1}) on the dry root weight (g plant^{-1}) (A), dry shoot weight (g plant^{-1}) (B) and Dickson quality index (DQI) (C) of eucalyptus.

An increase was observed in the chlorophyll *a* and *b* contents (Figure 4) and H (Figure 5) with the supply of Ca up to a dose 8 mmol L⁻¹, after which the values for these variables decreased.

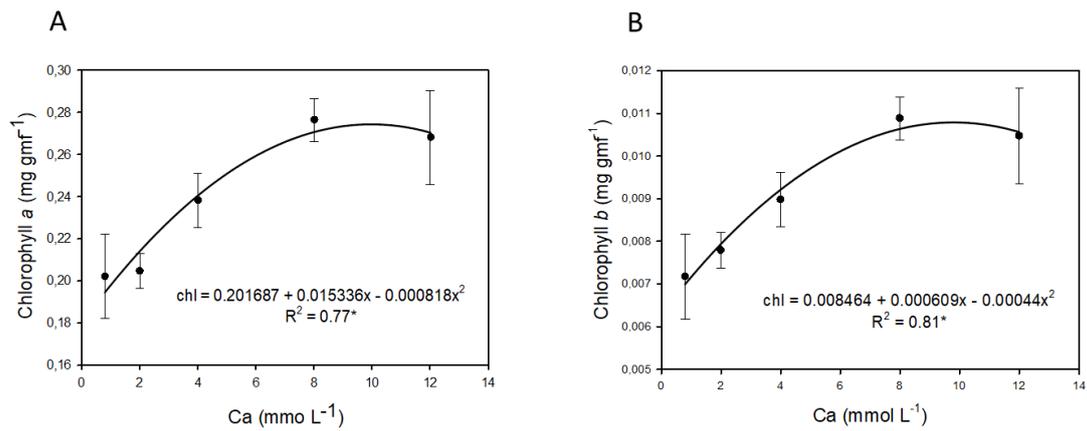


Figure 4. Contents of chlorophyll *a* (A) and *b* (B) and height (C) of eucalyptus seedlings according to the calcium supply (mmol L⁻¹). * Significant at $P \leq 0.05$.

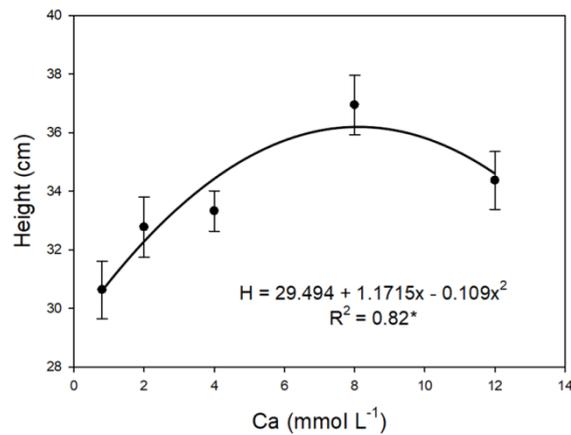


Figure 5. Effect of the calcium supply (mmol L⁻¹) on the height of eucalyptus seedlings. * Significant at $P \leq 0.05$.

3.3. Determination of leaf nutrient contents

The interaction between Ca and K had an effect on the contents of these same nutrients in the leaves ($P = 0.0302$ and $P = 0.0042$, respectively). The leaf content of K increased in all treatments relative to the initial content of 8.6 g kg^{-1} . All treatments had leaf contents of K above the range considered adequate for this nutrient ($10 - 12 \text{ g kg}^{-1}$) according to Martinez et al. [25]. However, the highest K contents in the leaves were observed in the treatments with 12 mmol L^{-1} K combined with doses of 0.8 to 8 mmol L^{-1} Ca (Figure 6-A).

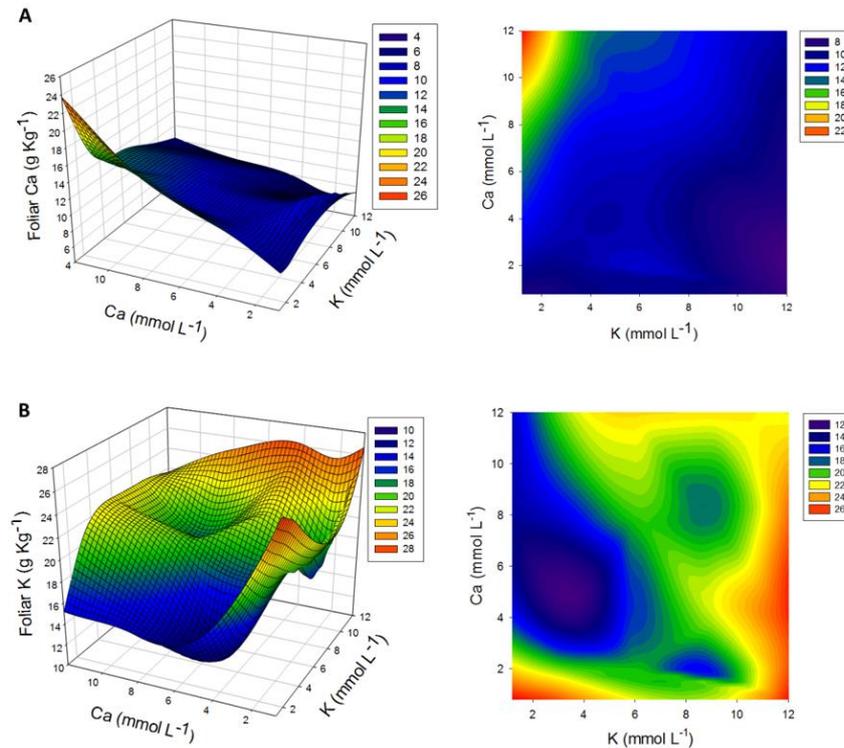


Figure 6. Leaf contents of calcium (A) and potassium (B) (g kg^{-1}) as a function of the supply of different doses of Ca and K (mmol L^{-1}) in nutrient solution.

The leaf content of Ca decreased in almost all the treatments relative to the initial content of this nutrient in the leaves, 19.1 g kg^{-1} , except in the 1.2 and 12 mmol L^{-1} K and Ca treatment, with a value of 23.7 g kg^{-1} (Figure 6-B). The leaf Ca contents were only below the adequate range according to Martinez et al. [25] (i.e., $8 - 12 \text{ g kg}^{-1}$) in the treatment with 12 mmol L^{-1} K combined with doses of Ca below 8 mmol L^{-1} .

4. Discussion

In this study, eucalyptus defoliation caused by *C. peridis* varied according to the Ca and K doses. The excessive supply of both nutrients led to high disease severity combined with a high percentage of defoliation. In eucalyptus, disease-induced defoliation is the main damage resulting from the reduction in photosynthetically active

area, which can cause reduced plant diameter and H, as observed by Pulrolnik [27] in *E. grandis* trees.

In addition, the deficiency of either Ca or K resulted in high defoliation in eucalyptus seedlings, even in treatments with low disease severity where defoliation was not associated with the disease. When the K dose was below 6 mmol L⁻¹ (standard) and the Ca dose was variable, a high percentage of defoliation was observed. Hillocks and Chinodya [28] investigated the relationship between K deficiency and leaf spot caused by *Alternaria macrospora*, which leads to defoliation in cotton, and showed that K-deficient plants showed early defoliation, even in the absence of the leaf pathogen. Prior to these results, premature defoliation was attributed only to leaf spot caused by *Alternaria*. Thus, the results of the present study are consistent with this previous study regarding the effect of K deficiency on defoliation. Early defoliation as a consequence of K deficiency is characterized by chlorophyll degradation and negative chlorophyll fluorescence, as observed by Hu [29], who found that K deficiency causes premature senescence of cotton leaves, decreases the leaf area and increases the rate of yellow leaves.

As observed for K, in the treatments with doses of Ca below 4 mmol L⁻¹ (standard dose) combined with varying doses of K, significant defoliation occurred that was not associated with CLB. This behavior can be explained by the influence of Ca on the K contents in the leaves. According to Tsialtas [30], high concentrations of Ca²⁺ in cotton leaves inhibit K⁺ from exiting cells under stress conditions. This conclusion was also reached in other studies [31,32], in which an increase in apoplastic Ca concentration reduced the stress caused by K⁺ efflux from the mesophyll of leaves, thus ensuring a higher K retention under deficiency conditions of this nutrient. The results of the present study suggest that Ca deficiency directly influences the occurrence of defoliation due to

the imbalance in the Ca/K ratio. High Ca concentrations allow for greater K retention and indirectly contribute to the maintenance of cellular turgor [30].

The eucalyptus seedlings supplied with 12 mmol L⁻¹ K, regardless of the Ca dose supplied, presented high disease severity without defoliation except when combined with 12 mmol L⁻¹ Ca. Several factors may have contributed to the high disease severity in these treatments, including stomatal movement. K exerts an important influence on stomatal opening and closing and induces rapid stomatal closure when provided at a sufficient dose; thus, pathogen infection via the stomata is directly affected by the supply of K [33]. In this study, excessive K supply may have reduced the stomatal closure responses and increased the stomatal opening movements, thereby leading to infection by *C. pteridis*, which penetrates exclusively via the stomata [34]. This stomatal response at high concentrations of K was detailed by Smith and Stewart [35], who subjected *Striga hermonthica* plants to high concentrations of K (>200 millimolar) and observed atypical behavior in the maintenance of stomatal opening and closing movements.

Although high concentrations of K favored *C. pteridis* infection, they also contributed to the nonoccurrence of defoliation despite the seedlings showing a high necrotic leaf percentage resulting from the disease. This finding is again due to the notable influence of K on defoliation.

Compared with the FS value, the AUDPC was not representative in explaining the behavior of CLB disease in eucalyptus, and only a high percentage of disease in the interaction between the doses of 9 and 12 mmol L⁻¹ K and Ca, respectively, was observed via the AUDPC, whereas other interactions, including this one, were observed based on the FS value. The accumulation of disease over time did not indicate the actual behavior of CLB disease as observed at the final evaluation time.

The Ca and K doses that yielded low disease severity and defoliation percentages also contributed positively to the evaluated morphological characteristics, thus leading to high crop yield. Therefore, if all analyzed variables are overlapped, the regions in the graphs that favor all the desirable characteristics belong to the interactions between doses of K near the standard dose (6 mmol L^{-1}) and doses of Ca above 4 mmol L^{-1} .

The increased DRW was primarily caused by Ca at high doses, and treatments with higher mean DRW values were observed when the Ca doses were greater than 4 mmol L^{-1} , regardless of the amount of K supplied. The importance of Ca in root development was also demonstrated by Rodrigues [36], where the application of limestone to eucalyptus plants promoted an increase in the density of fine roots up to 40 cm in the soil. Furthermore, according to Ivashuta et al. [37], the protein required for cell root cell expansion, which determines the plant's development, is dependent on Ca and called Ca-dependent protein kinase 1 (CDPK1). Therefore, Ca plays a key role in root development.

The treatment with $6 \text{ mmol L}^{-1} \text{ K} \times 8 \text{ mmol L}^{-1} \text{ Ca}$ presented good root development and resulted in great shoot development in the eucalyptus seedlings; moreover, at similar doses of Ca and K, greater increases in the DSW were observed compared with the other treatment doses. Both nutrients participate in physiological processes related to plant growth and influence cambium activity and xylem development, which are important in wood formation [38]. K participates in the regulation of the osmotic potential and cell expansion, and Ca is involved in a number of processes, such as cell division, cell wall chemistry and cell differentiation; therefore, both nutrients promote increases of cambium width [45]. Moreover, according to Laclau et al. [39], fertilization with K significantly increased the leaf biomass of *E. grandis* in addition to increasing the leaf life span.

The significant increase in dry organ weight (i.e., DRW and DSW) at K and Ca doses of 6 and 8 mmol L⁻¹, respectively, indicated that the amount of Ca supplied to eucalyptus plants based on the standard solution was insufficient to achieve the desired morphological characteristics. The DQI results validate this conclusion because the treatments with the highest indices included Ca above the standard dose (4 mmol L⁻¹), and the findings were independent of the doses of K. In addition, the highest mean chlorophyll *a* and *b* contents and H values were observed in the seedlings supplied with 8 mmol L⁻¹ Ca.

According to the results of the leaf analysis, in the treatments with high K supply, the leaf content of Ca decreased compared with that of the other treatments, indicating the competition for the same absorption site in the plant [40]. In general, the leaf content of one of the nutrients was higher when the supply of the other was reduced. Only in the treatments with low doses of K was the leaf content of Ca above the range considered adequate by Martinez et al. [25]. Thus, the excess supply of K reduces Ca uptake and leads to the accumulation of K in the leaves. In addition, the high K content in the leaves of the treatments supplied with 12 mmol L⁻¹ K confirms that imbalances in this nutrient cause issues in stomatal movement, leading to high disease severity.

5. Conclusions

In practice, mineral fertilization regimes in the production of eucalyptus seedlings that increase the supply of Ca while maintaining the dose of K close to the standard dose used in this study can ensure higher crop growth and reduce losses related to defoliation due to increases in disease and defoliation susceptibility attributed to unbalanced fertilization.

6 Referências

1. Ibá – Indústria Brasileira de Árvores.
2. http://iba.org/images/shared/Biblioteca/IBA_RelatorioAnual2017.pdf. Accessed 03 October 2017
3. Hinchee, M.; Rottmann, W.; Mullinax, L.; Zhang, C.; Chang, S.; Cunningham, M.; Pearson, L.; Nehra, N. Short-rotation woody crops for bioenergy and biofuels applications. *In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant* **2009**, 45, 619-629.
4. Shepherd, M.; Bartle, J.; Lee, D.J.; Brawner, J.; Bush, D.; Turnbull, P. *Eucalypts* as a biofuel feedstock. *Biogeosciences* **2011**, 2, 639–57.
5. Alfenas, A.C.; Zauza, E.A.V.; Mafia, R.G.; Assis, T.F. Clonagem e doenças do eucalipto, 2nd. ed. Editora UFV, Viçosa, MG, Brasil. **2009**, 500p.
6. Rodas, C.A.; Lombard, L.; Gryzenhout, M.; Slippers, B.; Wingfield, M.J.. *Cylindrocladium* blight of *Eucalyptus grandis* in Colombia. *Australasian Plant Pathology* **2005**, 34, 143–149.
7. Alfenas, A.C.; Ferreira, F.A. A mancha de folha do eucalipto no Brasil causada por três espécies de *Cylindrocladium* – Uma revisão da descrição da doença. *Revista Árvore* **1979**, 3, 47-56.
8. Ferreira, F.A.; Alfenas, A.C.; Moreira, A.M.; Demuner, N.L. Mancha-de-pteridis doença foliar de eucalipto em áreas tropicais brasileiras. *Fitopatologia Brasileira* **1995**, 20, 107–110.
9. Alfenas, A.C.; Zauza, E.A.V.; Mafia, R.G.; Assis, T.F. Clonagem e doenças do eucalipto. Viçosa-Imprensa Universitária, Viçosa-Imprensa Universitária, UFV, **2004**, 442p.
10. Ferreira, E.M.; Alfenas, A.C.; Mafia, L.A.; Mafia, R.G. Eficiência de fungicidas sistêmicos para o controle de *Cylindrocladium candelabrum* em eucalipto. *Fitopatologia Brasileira* **2006**, 31, 468-475.

11. Datnoff, L.E.; Rodrigues, F.A.; Seebold, K.W. Silicon and Plant Nutrition. In: Datnoff LE, Elmer WH, Huber DM (Eds.) Mineral Nutrition and Plant Disease. Saint Paul MN. APS Press.pp. 233-Saint Paul MN. *APS Press* **2007**, 233-246.
12. Wang, M.;Zheng, Q.;Shen, Q.;Guo,S.*The critical role of potassium in plant stress response. InternationalJournalofMolecularSciences***2013**, 14, 7370-7390.
13. Jakobsen, T.J. Interaction between Plant Nutrients: 1. Theory and Analytical Procedures. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B - Soil & Plant Science* **1992**, 42, 208-212.
14. Jakobsen, T.J. Interaction between Plant Nutrients: III. Antagonism between Potassium, Magnesium and Calcium, *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B - Soil & Plant Science* **1993**, 43, 1-5.
15. Zhang, L.; Du, L.; Poovaiah, B.W. Calcium signaling and biotic defense responses in plants. *Plant Signaling & Behavior* **2014**, 9:e973818.
16. Armengaud, P.;Breitling, R.;Amtmann, A. The potassium-dependent transcriptome of *Arabidopsis* reveals a prominent role of jasmonic acid in nutrient signaling. *Plant Physiology* **2004**,136, 2556–2576.
17. Ma, W.; Qi, Z.; Smigel, A.; Walker, R.K.; Verma, R.; Berkowitz, G.A. Ca²⁺, cAMP, and transduction of non-self perception during plant immune responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2009**, 106, 20995-21000.
18. Rahman, M.; Punja, Z.K. Calcium and Plant Disease. In: Datnoff, L.E.; Elmer, W.H.; Huber, D.M. Mineral Nutrition and Plant Disease. *American Phytopathological Society press* **2007**, 1, 79-93.
19. Clark, R.B. Characterization of phosphates in intact maize roots. *Journal Agriculture Food Chemistry* **1975**, 23, 458-460.

20. Alfenas, R.F. Produção de inóculo de *Cylindrocladium pteridis* em condições controladas. 36 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, **2009**.
21. Vale, F.X.R.; Fernandes, F.E.I.F.; Liberato, J.R. QUANT – A software for plant disease severity assessment. In: Anais International Congress of Plant Pathology, 8. Christchurch, New Zealand, **2003**.
22. Dickson, A.; Leaf, A.L.; Hosner, J.F. Quality appraisal of white spruce and white pine seedling stock in nurseries. *Forest Chronicle* **1960**, 36, 10-13.
23. Shaner, G.; Finney, R.E. The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildew resistance in Knox wheat. *Phytopathology* **1977**, 67, 1051-1056.
24. Matsumoto, S.N.; Carvalho, F.M.; Viana, A.E.S.; Malta, M.R.; Castro, L.G. Initial growth of coffee plants (*Coffea Arabica* L.) submitted to different phosphate doses in nutritive solution. *Coffee Science* **2008**, 31, 58-67.
25. Malavolta, E.; Vitti, G. C.; Oliveira, S. A. Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações. 2. ed. Piracicaba: *POTAFOS* **1997**, 319 p.
26. Martinez, H.E.P.; Carvalho, J.G.; Souza, R.B. Diagnose foliar. In: Ribeiro AC, Guimarães PTG, Alvarez V VH. Recomendações para uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais. 5ª aproximação. *CFSEMG* **1999**, 143-168.
27. Shapiro, S.S.; Wilk, M.B. An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika* **1965**, 52, 591–611.
28. Pulrolnik, K.; Reis, G.G.; Reis, M.G.F.; Monte, M.A.; Fontan, I.C.I. Crescimento de plantas de clone de *Eucalyptus grandis* [hillebrandii] submetidas a diferentes tratamentos de desrama artificial, na região de cerrado. *Revista Árvore* **2005**, 29, 495-505.

29. Hillocks, R.J.; Chindoya, R. The relationship between *Alternaria* leaf spot and potassium deficiency causing premature defoliation of cotton. *Plant Pathology* **1989**, 38, 502-508.
30. Hu, W.; Lv, X.; Yang, J.; Chen, B.; Zhao, W.; Meng, Y.; Oosterhuis, D.M. Effects of potassium deficiency on antioxidant metabolism related to leaf senescence in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Field Crops Research* **2016**, 191, 139-149.
31. Tsialtas, J.T.; Shabala, S.; Matsi, T. A prominent role for leaf calcium as a yield and quality determinant in upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.) varieties grown under irrigated Mediterranean conditions. *Journal of Agronomy and Crop Science* **2016**, 202, 161-173.
32. Shabala, S.; Pottosin, I. Regulation of potassium transport in plants under hostile conditions: implications for abiotic and biotic stress tolerance. *Physiologia plantarum* **2014**, 151, 257– 279.
33. Reddy, K.R.; Hodges, H.F.; Varco, J. Potassium nutrition of cotton. Mississippi *Agricultural & Forestry Experiment Station* **2000**, 1094, 1–10.
34. Pervez, H.; Ashraf, M.; Makhdom, M.I.; Mahmood, T. Potassium nutrition of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) in relation to cotton leaf curl virus disease in aridisols. *Pakistan Journal of Botany* **2007**, 39, 529-539.
35. Graça, R.N.; Alfenas, A.C.; Maffia, L.A.; Titon, M.; Alfenas, R.F.; Lau, D.; Rocabado, J.M.A. Factors influencing infection of eucalypts by *Cylindrocladium pteridis*. *Plant Pathology* **2009**, 58, 971-981.
36. Smith, S.; Stewart, G.R. Effects of potassium levels on the stomatal behavior of the hemi-parasite *Striga hermonthica*. *Plant Physiology* **1990**, 94, 1472–1476.

37. Rodrigues, F.A.V. Crescimento de eucalipto em idade jovem e movimentação de cálcio e magnésio no solo em resposta à aplicação de calcário e gesso agrícola. Tese, Universidade Federal de Viçosa **2013**.
38. Ivashuta, S.; Liu, J.; Lohar, D.P.; Haridas, S.; Bucciarelli, B.; VandenBosch, K.A.; Vance, C.P.; Harrison, M.J.; Gantt, J.S. RNA interference identifies a calcium-dependent protein kinase involved in *Medicago truncatula* root development. *Plant Cell* **2005**, 17, 2911–2921.
39. Fromm, J. Wood formation of trees in relation to potassium and calcium nutrition. *Tree Physiology* **2010**, 30, 1140-1147.
40. Laclau, J.P.; Almeida, J.C.R.; Gonçalves, J.L.M.; Saint-Andre, L.; Ventura, M.; Ranger, J.; Moreira, R.M.; Nouvellon, Y. Influence of nitrogen and potassium fertilization on leaf life span and allocation of above-ground growth in Eucalyptus plantations. *Tree Physiology* **2009**, 29, 111-124.
41. Fageria, V.D. Nutrient interactions in crop plants. *Journal of Plant Nutrition* **2001**, 24, 1269-1290.

CAPÍTULO 3: DISTRIBUIÇÃO DE CÁLCIO E POTÁSSIO EM EUCALIPTO
NO PROCESSO PATOGÊNICO DE *Calonectria pteridis*

Distribuição de cálcio e potássio em eucalipto no processo patogênico de

Calonectria pteridis

Preparado em concordância com as normas do periódico “**Journal of Plant Pathology**”

Thaissa P. F. Soares¹, Edson Ampélio Pozza¹, Adélia Aziz Alexandre Pozza², Maria Alves Ferreira¹

¹Universidade Federal de Lavras/UFLA - Departamento de Fitopatologia/DFP - C. P. 3037 - 37200-000 - Lavras – MG. ² Departamento de Ciência do Solo/DCS

Corresponding author: mariaferreira@dfp.ufla.br

Resumo: A mancha foliar por *Calonectria pteridis* em eucalipto é um sério problema da cultura, tanto em viveiro quanto no campo. Em condições ideais ao patógeno, a doença pode causar grave desfolha em plantas adultas. Uma opção de controle eficaz e benéfica à cultura e ao meio ambiente é o uso eficiente dos nutrientes na adubação. Neste estudo investigou-se a influência da adubação com cálcio e potássio no teor e distribuição destes nutrientes na área foliar sintomática, zona de transição e assintomática ao longo do tempo. Mudanças de eucalipto foram cultivadas em solução nutritiva sob diferentes tratamentos de Ca e K (6K × 4Ca mmol L⁻¹, 6K × 8Ca mmol L⁻¹ e 9K × 12Ca mmol L⁻¹) e inoculadas com *C. pteridis*. Foram destacadas folhas às 24, 48 e 72 horas após a inoculação (h.a.i.) e avaliadas em Microanálise de raio-X (MAX). O maior teor de cálcio foi verificado na zona sintomática, com níveis crescentes ao longo do tempo,

atingindo as maiores médias às 72 h.a.i. no tratamento $6K \times 8Ca$ mmol L⁻¹. Nos demais tratamentos, o teor de cálcio atingiu maiores médias às 48 h.a.i., decrescendo em seguida. O mesmo comportamento no tratamento $6K \times 8Ca$ mmol L⁻¹ foi observado para potássio no tecido assintomático. A adubação com cálcio e potássio tiveram consequências diretas na demanda e disponibilidade dos nutrientes em tempos diferentes na infecção. Isto demonstra que as respostas de defesa da planta e sua continuidade ao longo do tempo no processo infeccioso são intrínsecas à adubação equilibrada com cálcio e potássio, pois estes nutrientes participam diretamente na resistência da planta ao patógeno.

Palavras-chaves: Mancha foliar, adubação mineral, resistência, MAX

1 Introdução

Espécies do gênero *Calonectria* estão associadas a diversas doenças em espécies florestais de importância econômica ao redor do mundo (Lombard et al., 2008; Lombard et al., 2009; JieQiong Li et al., 2017; Alfenas et al., 2013). As doenças causadas pelo patógeno incluem manchas foliares, *damping-off*, podridão de estacas, miniestacas e raízes (Alfenas e Ferreira, 1979; Alfenas et al., 2009) sendo beneficiadas por temperaturas elevadas e alta umidade. Sérios prejuízos causados pelo fungo são observados em plantações de espécies florestais nos países tropicais com condições climáticas ideais para a sua infecção.

O método de controle mais efetivo e largamente utilizado é a seleção e multiplicação de genótipos resistentes em eucalipto (Alfenas et al., 2009). Entretanto, a alta variabilidade genética observada nas diversas espécies de *Calonectria* (Freitas et al., 2019) aliada aos diferentes climas regionais tem dificultado o processo de seleção de genótipos de eucalipto resistentes ao patógeno. Assim, integrar o controle genético com

outros métodos de controle eficientes pode diminuir a incidência de *Calonectria* em regiões com alta ocorrência do patógeno.

O manejo adequado da adubação é um eficiente método de controle para muitas doenças (Gaspar et al., 2015, Geary et al., 2015, Pérez et al., 2017). Isso é devido ao importante papel dos nutrientes como mensageiros secundários e na formação de barreiras físicas, químicas e síntese de compostos de defesa quando a planta sofre estresse biótico ou abiótico. Em especial, o cálcio é reconhecido pelo importante papel como mensageiro secundário na sinalização de respostas a estresses bióticos e abióticos (Renty et al. 2016), além de atuar na estrutura e permeabilidade de membranas celulares, divisão e alongação celular e absorção de nutrientes através das membranas celulares (El-Beltagi and Mohamed, 2013).

Além do cálcio, estudos têm demonstrado a importância do potássio na resistência a doenças (Sarwar, 2012; Soares et al., 2018). Este nutriente exerce importante papel em várias funções bioquímicas e fisiológicas vitais, tais como a ativação de enzimas, síntese de proteínas, fotossíntese, movimento estomatal e osmoregulação (Marschner 2012). Em vista disso, a deficiência de potássio interfere diretamente na suscetibilidade da planta aos patógenos, pois acarreta paredes celulares finas, caules enfraquecidos e menores, raízes mais curtas, acúmulo de açúcar e nitrogênio nas folhas (Graham, 1983).

Muito se sabe sobre a ação individual de cada nutriente no metabolismo vegetal. Entretanto, pouco conhecimento é acessado sobre os efeitos das diferentes interações entre eles na resistência a doenças nos diferentes patossistemas. Este conhecimento é fundamental para o uso de doses corretas e equilibradas dos nutrientes na adubação, pois a absorção e ação de alguns nutrientes dependem diretamente do fornecimento balanceado de outros (Gaspar et al., 2015; Soares et al., 2018).

Além disso, os efeitos da adubação balanceada e/ou desbalanceada na dinâmica celular, como transporte e localização ao longo do tempo dos nutrientes nos tecidos foliares, são conhecimentos valiosos. Tais informações poderiam elucidar os mecanismos de defesa da planta sob ataque de fitopatógeno a partir da distribuição e utilização dos recursos minerais que a planta dispõe. Um método eficiente para o estudo da distribuição dos nutrientes nos tecidos foliares é a utilização da microanálise de Raios-X (MAX). Esta técnica quantifica raios-X emitidos pela amostra ao ser bombardeada por um feixe de elétrons em microscópio eletrônico (Dedavid et al., 2007). O uso emprego da técnica possibilita a visualização e distribuição dos elementos minerais em plantas (Freitas 2014, Silva et al., 2015).

Neste sentido, este estudo visa elucidar a influência da adubação de cálcio e potássio na distribuição destes nutrientes no tecido foliar em eucalipto, em tempos distintos durante a infecção por *Calonectria pteridis*.

2 Material e métodos

2.1 Preparo das mudas e implantação

Mudas de um clone híbrido de *Eucalyptus grandis* × *E. urophylla* suscetível à *C. pteridis* foram cultivadas em solução nutritiva de Clark (Clark, 1975). O experimento foi conduzido em casa-de-vegetação, com temperatura e umidade relativa do ar de 25 +/- 2°C e 80%, respectivamente. As mudas inicialmente foram retiradas dos tubetes e as raízes foram lavadas em água corrente para remoção do substrato de cultivo. As raízes expostas foram, cuidadosamente, lavadas e desinfestadas com hipoclorito de sódio 1% por 1 min e transplantadas para bandejas de 6L com solução nutritiva de Clark, modificada com os respectivos tratamentos, para aclimatação das mudas.

As mudas permaneceram em bandejas com solução nutritiva por sete dias com 25% da força iônica. Após emitir novos pares de folhas e/ou raízes secundárias, as soluções foram substituídas para 60% da força iônica, permanecendo nessa condição por igual período. Ao fim do período de aclimação, as mudas uniformes foram transplantadas para vasos plásticos com capacidade de 3 litros, contendo solução nutritiva de Clark com 100% da força iônica, de acordo com os respectivos tratamentos. O período experimental ao término das avaliações foi de 39 dias.

Os tratamentos foram escolhidos com base nos resultados obtidos por Soares et al., (2018) e consistiram de três combinações de doses de Ca e K: 6K×4Ca, 6K×8Ca e 9K×12Ca (mmol L^{-1}) fornecidos como KNO_3 , KCl_2 , $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ e CaCl_2 . As soluções de micronutrientes foram preparadas com Fe-EDTA ($89,53 \mu\text{mol L}^{-1}$), sulfato de manganês ($91,01 \mu\text{mol L}^{-1}$), sulfato de zinco ($0,76 \mu\text{mol L}^{-1}$), sulfato de cobre ($0,3153 \mu\text{mol L}^{-1}$), ácido bórico ($46,25 \mu\text{mol L}^{-1}$) e molibdato de amônio ($0,10 \mu\text{mol L}^{-1}$). O preparo de todas as soluções foi executado utilizando reagentes puros para análise. As concentrações de K e Ca foram estabelecidas a partir da dose padrão da solução de Clark para esses nutrientes (6 mmol L^{-1} de K \times 4 mmol L^{-1} de Ca) com uma dose apenas com a concentração de cálcio maior e outra com ambas concentrações de cálcio e potássio elevadas.

As raízes foram mantidas sob aeração constante em solução nutritiva. O pH das soluções foi verificado em intervalos de três dias, com pHmetro digital (HANNA® instruments) e corrigido quando necessário para 5,5 – 6,0, adicionando NaOH ou HCl, $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. O volume dos vasos foi completado quando necessário com água deionizada. A condutividade elétrica (CE) foi monitorada semanalmente por condutivímetro (HANNA instruments®) em cada tratamento, em todas as etapas, para

conferir a necessidade de eventual troca das soluções, o que não se verificou devido à depleção não ter atingido 50% do valor inicial de K^+ .

A face externa dos vasos foi pintada com tinta prateada reflexiva para evitar a entrada de luz e a proliferação de algas. O caule das plantas foi fixado em placas de isopor na face superior dos vasos, para também evitar a entrada de luz e servir de suporte para as mudas.

2.2 Preparo do inóculo e inoculação

Culturas do isolado A2 de *C. pteridis* foram preparadas em meio BDA (Batata-Dextrose-Ágar). O isolado do fungo foi obtido de plantios de eucalipto do estado do Maranhão e mantido conservado na micoteca do laboratório de Patologia Florestal, UFPA. O preparo da suspensão de inóculo foi realizado adicionando 20 mL de água destilada + Tween 20 a 0,05% na superfície da cultura e posterior remoção dos conídios mediante a raspagem com pincel. A suspensão obtida foi filtrada em camada dupla de gaze esterilizada e a concentração de inóculo foi ajustada para a concentração de 10^4 conídios/mL⁻¹ com auxílio da câmara de Neubauer. A suspensão foi pulverizada por aspersão com borrifador em todas as folhas das mudas até o ponto de escorrimento. As mudas foram cobertas com sacos plásticos escuros, para manter o molhamento foliar constante nesse ambiente, com aspersão frequente de água deionizada para manutenção da umidade.

2.3 Coleta do material biológico e delineamento experimental

As mudas submetidas aos três tratamentos de $Ca \times K$ foram inoculadas com *C. pteridis* aos 36 dias da implantação do experimento. A coleta do material biológico foi realizada em três tempos distintos: 24, 48 e 72h após a inoculação, em esquema fatorial 3×3 , perfazendo nove tratamentos em solução nutritiva. Todas as folhas amostradas

foram destacadas do terço médio da planta. O delineamento foi em blocos casualizados (DBC), com três repetições, sendo cada unidade experimental composta por duas mudas de eucalipto por vaso.

Folhas sintomáticas coletadas de cada tratamento foram fragmentadas em pequenos pedaços de forma a conter, respectivamente, áreas com tecido sintomático (TS), zona de transição (ZT) e tecido assintomático (TA).

2.4 Preparo e análise das amostras vegetais para microanálise de raio-X

Com o auxílio de fita adesiva dupla face, cada fragmento de folha foi aderido a suportes de alumínio *stubs*, onde cada um correspondia a um dos tratamentos e continha três amostras de tecido foliar. Os *stubs* foram cobertos por camada de carbono pelo aparelho “sputtering” (MED 010) (Balzers, Liechtenstein, Germany). As amostras foram analisadas em MEV (Leo Evo 40 XVP) (Leo Electron Microscopy, Cambridge, UK) acoplado ao sistema de detecção MAX: EDS-X Flash Detector 5010 (Bruker, Berlin, Germany). Nos tecidos foliares foi quantificada a distribuição de cálcio e potássio nos perfis delimitados como TS, ZT e TA.

Para condições de padronização, todas as imagens geradas tiveram aumento de 160 vezes, 20Kv, distância de 9,5 mm. Os dados utilizados nas análises estatísticas foram obtidos pela quantificação de cálcio e potássio presente nas imagens, pela delimitação de área de 278 x 567 pontos para cada perfil. Os valores correspondem à quantidade total de pontos de cada nutriente presente em cada área amostrada. Os nutrientes também foram quantificados ao longo de uma linha de 100 pontos traçados ao longo dos perfis. As imagens foram editadas no programa Inkscape. Link 0.92. As análises estatísticas foram realizadas usando o programa estatístico R (Ihaka and

Gentleman 1996) e os gráficos foram confeccionados no software Sigmaplot v. 16.0 (Sigma Plot; Systat Software Inc).

3 Resultados

Houve diferença significativa no teor foliar de cálcio na interação Tratamento×Tempo ($p = 0,0003$) e nos perfis da amostra ($p = 0,0006$). Quanto ao teor de potássio nas folhas, houve diferença estatística na interação Tratamento×Tempo×Perfil ($p=0,0002$).

O teor de cálcio aumentou 48 horas após a inoculação (h.a.i.) em todos os tratamentos, e decresceu 72 h.a.i. nos tratamentos $6K \times 4Ca \text{ mmol L}^{-1}$ e $12K \times 9Ca \text{ mmol L}^{-1}$ (Fig. 1). No tratamento $6K \times 8Ca \text{ mmol L}^{-1}$, o teor de cálcio nas folhas se manteve crescente 72 h.a.i.. Não houve diferença significativa no teor de cálcio 48 h.a.i. entre os tratamentos $12K \times 9Ca \text{ mmol L}^{-1}$ e $6K \times 8Ca \text{ mmol L}^{-1}$. Ainda em relação ao teor de cálcio, o tecido sintomático apresentou maiores médias quando comparado ao tecido assintomático e a zona de transição, enquanto o teor de potássio foi maior no tecido assintomático que nos demais perfis (Fig. 2).

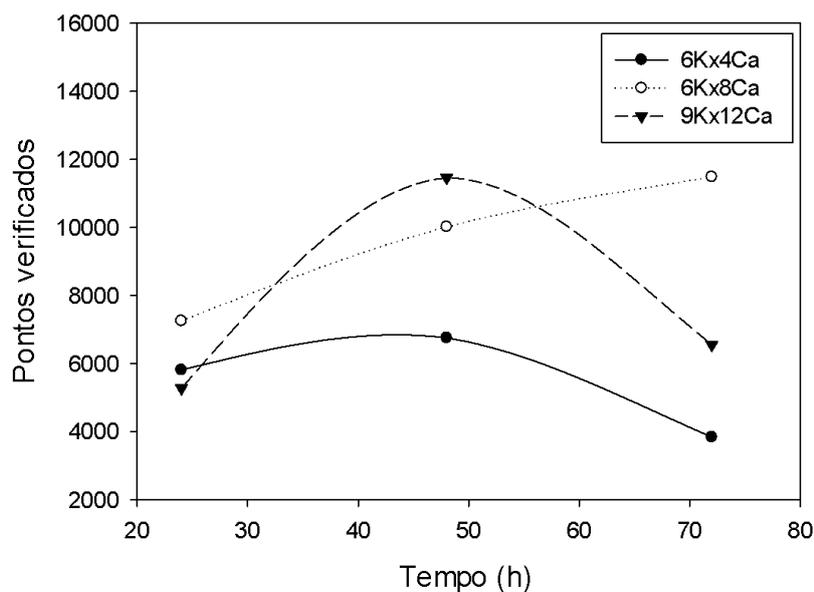


Figura 1. Quantidade de pontos verificados nas folhas correspondentes ao teor de cálcio em mudas de eucalipto submetidas a diferentes doses de Ca e K e avaliadas 24, 48 e 72 horas após a inoculação.

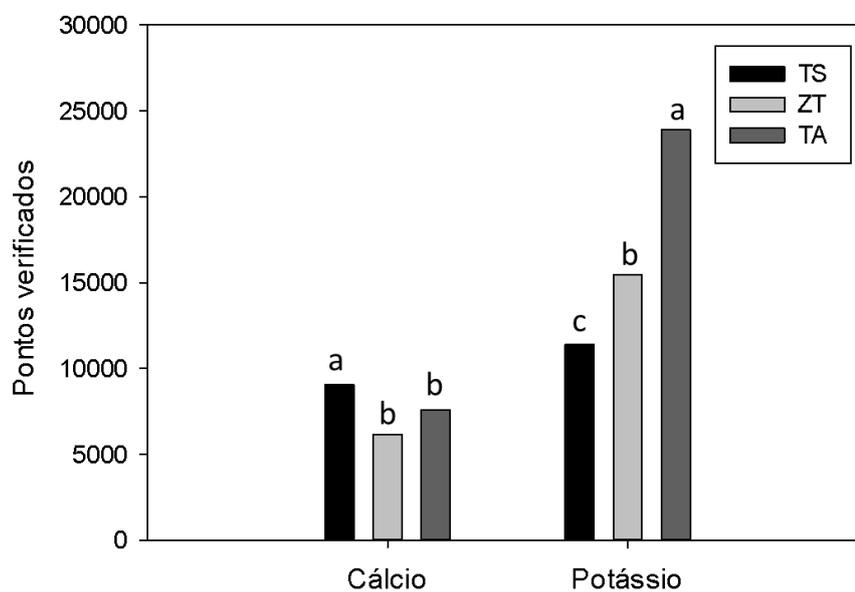


Figura 2. Média de pontos verificados de cálcio e potássio nos diferentes perfis da amostra. TS: Tecido sintomático, ZT: Zona de transição, TA: Tecido assintomático.

Letras minúsculas nas barras para cada nutriente representam diferença significativa ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

No tecido assintomático, o teor de potássio no tratamento $6K \times 4Ca$ mmol L⁻¹ decresceu ao longo do tempo, enquanto no tratamento $6K \times 8Ca$ mmol L⁻¹, o teor deste nutriente atingiu a maior média 72 h.a.i. (22983,22 pontos) (Fig. 3). Não houve diferença significativa no teor de potássio 72 h.a.i. nos tratamentos $6K \times 8Ca$ mmol L⁻¹ e $9K \times 12Ca$ mmol L⁻¹. O teor de potássio na zona de transição não diferiu significativamente entre os tratamentos em cada tempo avaliado.

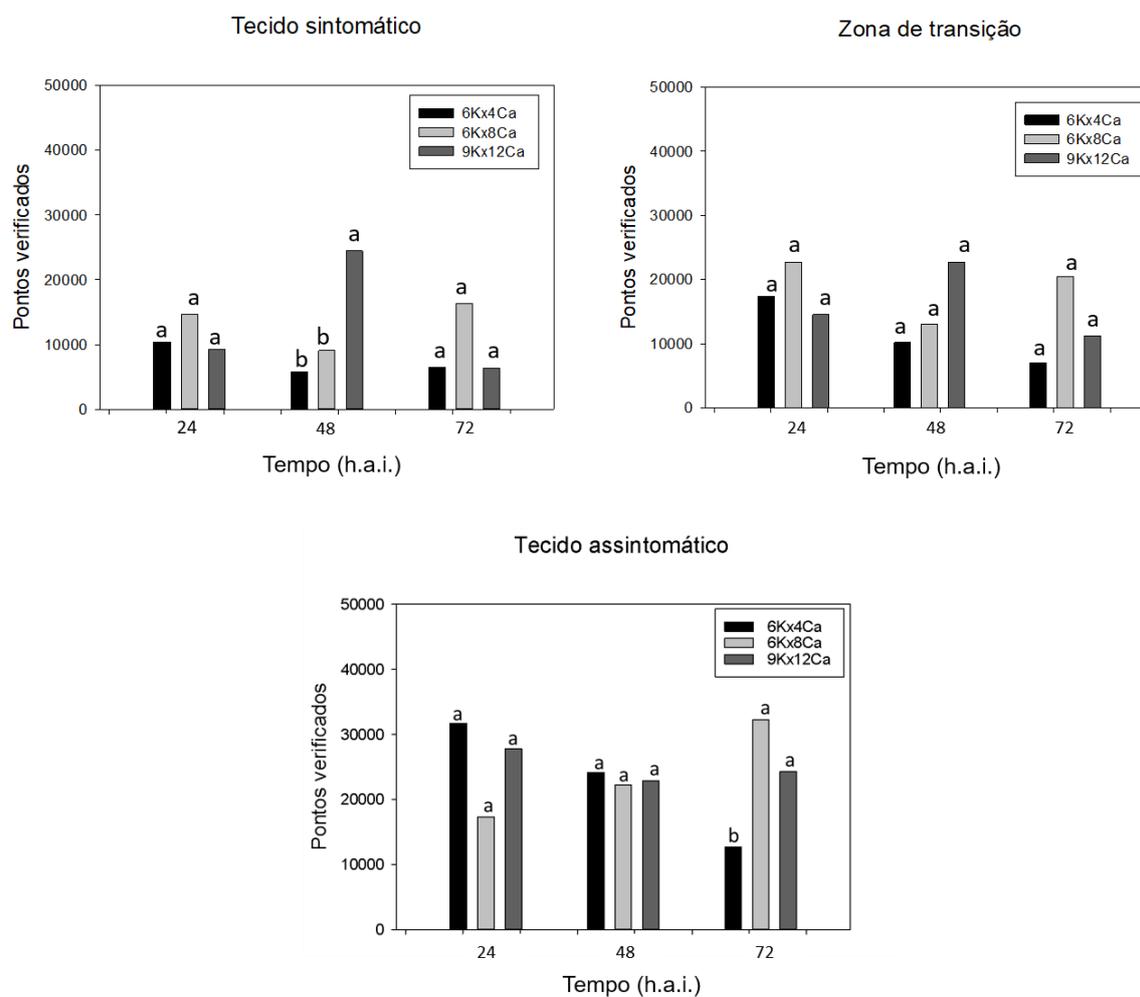


Figura 3. Média dos pontos verificados nas folhas correspondentes ao potássio nos diferentes perfis da amostra, quando submetidos a diferentes doses de Ca×K, nos tempos 24, 48 e 72 horas após a inoculação com *Calonectria pteridis*. Letras minúsculas nas barras representam diferença significativa ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Em todos os perfis avaliados, 72 horas após a inoculação, observou-se maior teor de potássio no tratamento $6K \times 8Ca \text{ mmol L}^{-1}$ (Fig. 3). Em ambos os perfis, tecido sintomático e na zona de transição, o teor de potássio nesse tratamento decresceu às 48 h.a.i. e às 72 h.a.i. apresentou-se crescente. Em contraste, nesses mesmos perfis, o teor de potássio atingiu as maiores médias às 48 h.a.i. no tratamento $9K \times 12Ca \text{ mmol L}^{-1}$, e posteriormente decresceu drasticamente.

O mapeamento de cálcio e potássio por MAX nos perfis dos diferentes tratamentos permitiu verificar a sucessiva perda de cálcio ao longo do tempo no tratamento $9K \times 12Ca \text{ mmol L}^{-1}$ no tecido sintomático (Fig. 4). O inverso foi observado no tratamento $6K \times 8Ca \text{ mmol L}^{-1}$, em que o teor deste nutriente cresceu ao longo do tempo no tecido sintomático, demonstrando maior requerimento deste nutriente 72 h.a.i.. Ademais, o teor de potássio (coloração verde) neste mesmo tratamento 72 h.a.i. foi maior do que naquele. No tratamento $6K \times 4Ca \text{ mmol L}^{-1}$, observou-se maior intensidade de Ca e K, no tecido sintomático e assintomático, respectivamente, 24 h.ai, enquanto às 72 h.a.i. ambos os nutrientes se equiparam ao longo dos perfis.

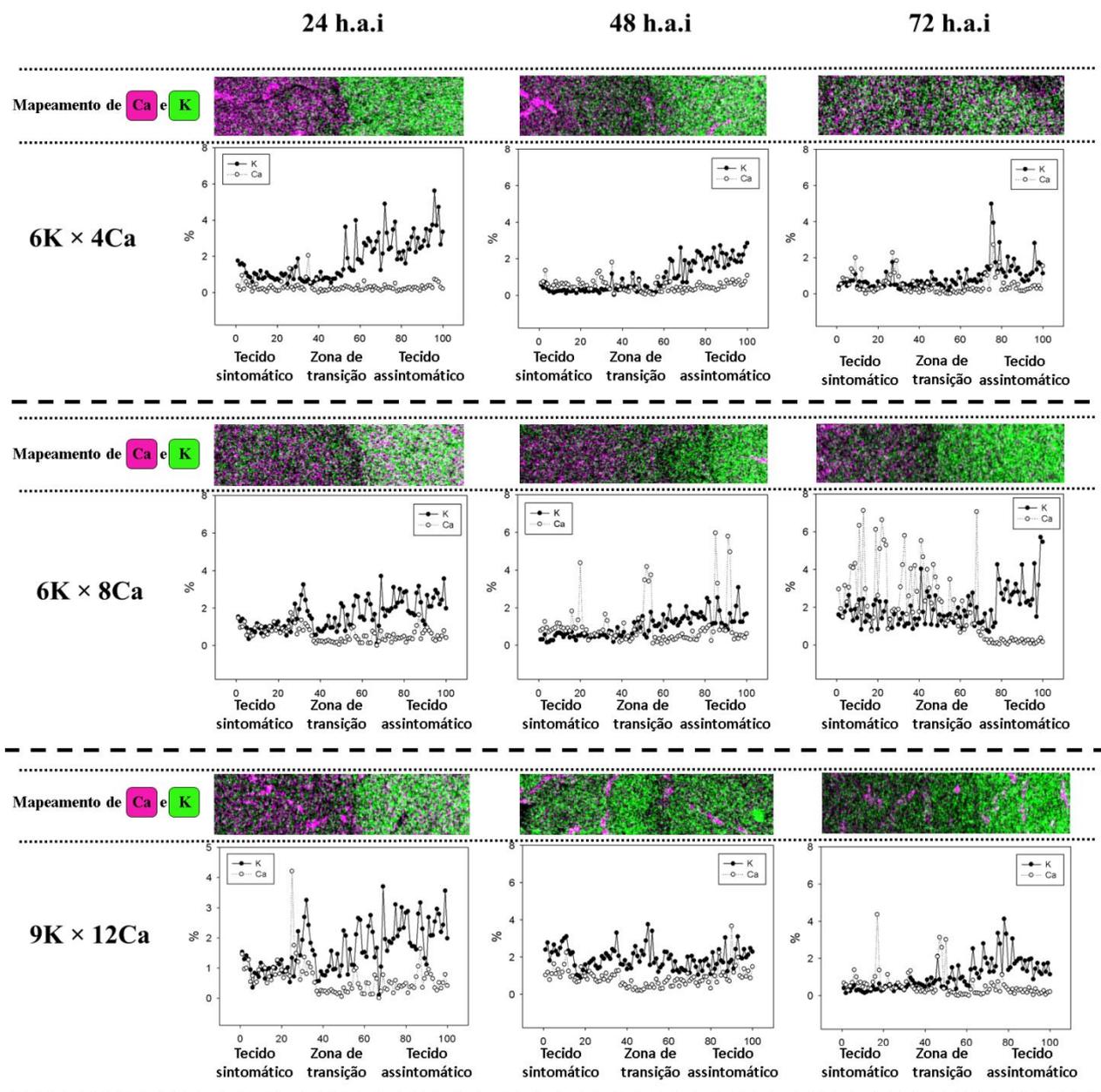


Figura 4. Quantificação dos nutrientes minerais cálcio (Ca) e potássio (K) em 100 pontos ao longo dos perfis: tecido sintomático, zona de transição e tecido assintomático nas folhas de eucalipto submetido a diferentes tratamentos de Ca × K, avaliadas em diferentes tempos após a inoculação com *Calonectria pteridis*. Mapeamento de Ca e K por Microanálise de Raio-X (MAX) ao longo dos perfis correspondentes aos gráficos de distribuição.

Nos gráficos de distribuição dos nutrientes, observaram-se no tratamento 6K × 8Ca mmol L⁻¹, quando avaliado 72 h.a.i., maior teor de cálcio e potássio nos perfis sintomático e assintomático, respectivamente, quando comparado aos outros tratamentos neste mesmo tempo (Fig. 4).

4 Discussão

A quantidade de cálcio e potássio requerida entre os perfis da folha infectada por *C. pteridis* variou conforme o tempo e nos diferentes suprimentos de Ca e K. O teor de cálcio foi fortemente influenciado pelos diferentes tratamentos de Ca×K ao longo do tempo.

O maior teor de cálcio 48 horas após a inoculação, observado em todos os tratamentos, demonstra a importância da demanda deste íon como uma das principais respostas primárias a estresses na planta. Diniz et al. (2019), analisando a expressão de genes relacionados à resistência de plantas de café, verificaram que a percepção do patógeno nos estágios iniciais da infecção é seguida por cascatas de sinalização de cálcio, confirmadas pela máxima expressão de genes relacionados à defesa às 48 h.a.i. de *Colletotrichum kahawae*. Esta alta sinalização de cálcio ocorre, principalmente, durante a penetração do fungo e seu crescimento às 48 h.a.i.. Outros resultados obtidos por Heller & Witt-Geiges (2013) demonstraram que a penetração das hifas de *Sclerotinia sclerotiorum* na parede celular epidérmica de *Helianthus annuus* ocorre entre às 12-24 h.a.i., enquanto a presença de cristais de oxalato de cálcio foi percebida somente 48 h.a.i. e mais tardiamente às 72 h.a.i..

O aumento da concentração intracelular de Ca⁺² decorre de estímulos percebidos pela planta, simultaneamente ou após um tempo de latência, em um, ou vários compartimentos intracelulares da célula (Ranty et al., 2016). Isso resulta na ativação de

proteínas relacionadas à patogênese (PRs) ou à morte celular programada. O aumento de cálcio na célula é percebido por proteínas sensoras de cálcio que atuam na resposta a estresses bióticos e abióticos na planta. Estima-se haver mais de 250 proteínas sensoras de cálcio, sendo as principais a Calmodulina (CaM), proteínas quinases dependentes de cálcio (CPKs) e a proteína quinase dependente de cálcio/calmodulina (CCaMK) (Wang et al. 2015). Ademais, o aumento de cálcio é pré-requisito essencial para induzir a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e óxido nítrico (ON), culminando na morte programada da célula como forma de defesa ao patógeno (Salguero-Linares & Coll, 2019).

Os resultados também demonstraram redução no teor de cálcio nas folhas ao longo do tempo quando as mudas de eucalipto são submetidas às doses de $6K \times 4Ca$ $mmol L^{-1}$ e $9K \times 12Ca$ $mmol L^{-1}$, enquanto na combinação $6K \times 8Ca$ $mmol L^{-1}$, a demanda por cálcio, principalmente no tecido sintomático, continua crescente às 72 h.a.i.. Zhu et al. (2019) observaram em estudo realizado em *Arabidopsis*, que a infecção por *Colletotrichum higginsianum* às 72 h.a.i. corresponde ao estágio de hifas necrotróficas, estágio crucial para definir a resistência à doença. A partir deste tempo a severidade da doença difere entre cultivares resistentes e suscetíveis (Sun et al., 2019). De acordo com nossos resultados, apenas a combinação das doses $6K \times 8Ca$ $mmol L^{-1}$ permitiu a contínua demanda por cálcio às 72 h.a.i., verificada por seu alto teor no tecido sintomático.

Este comportamento está intimamente ligado ao fornecimento equilibrado de cálcio e potássio neste tratamento, garantindo a persistência das respostas de defesa da planta contra o patógeno. Nos demais tratamentos, a queda da disponibilidade de cálcio nas folhas 72 h.a.i. pode ser consequência do fornecimento desequilibrado de Ca e K,

pois ambos os nutrientes competem pelo mesmo sítio de absorção na planta (Fageria, 2001).

Ao fornecer cálcio como pré-tratamento em mudas de soja, Arfaoui et al. (2017) detectaram máxima indução na produção de H_2O_2 e O_2^- (ERO) às 72 h.a.i. de *Sclerotinia sclerotiorum* nas folhas. Estas respostas culminam na morte celular programada, mecanismo eficaz utilizado principalmente contra os patógenos necrotróficos e hemibiotróficos. Acredita-se que a contínua demanda por cálcio no tecido sintomático observada no tratamento $6\text{K} \times 8\text{Ca} \text{ mmol L}^{-1}$ às 72 h.a.i., tenha como objetivo a produção de ERO envolvidos na incessante resposta de defesa de eucalipto contra *C. pteridis*.

O alto teor de potássio observado no tecido assintomático ao redor das lesões está de acordo com os resultados obtidos por Belan et al. (2015) ao avaliarem a distribuição mineral nas folhas infectadas por diversos patógenos no café. A percepção dos sinais dos patógenos pelas células gera mudanças diretas na membrana plasmática, como formação de barreiras e reconhecimento no processo de infecção em resposta a elicitores fúngicos (Davis et al., 2018). Esta interação elicitor/receptor estimula o fluxo de íons através da membrana, alterando o potencial transmembrana pela entrada de Ca^{+2} e saída de K^+ . Esta alta concentração externa de K^+ despolariza a membrana, e resulta em uma cascata de sinais de defesa da planta contra invasores (Oliveira et al., 2016).

Davis et al. (2018) também concluíram que a concentração de potássio varia de acordo com a forma de parasitismo dos patógenos. Os sintomas causados por *Blumeria graminis*, fungo biotrófico, foram retardados em plantas privadas de K. Em contraste, os sintomas de *Rhynchosporium commune*, patógeno necrotrófico, apareceram mais precocemente quando as plantas foram privadas de K. Isto indica que a planta demanda concentrações distintas de K em razão do tipo de infecção. Em resposta a fungos

necrotróficos, tais como *C. pteridis*, alta concentração de potássio é requerida ao redor das lesões, afetando diretamente a resistência da planta a estes patógenos. Entretanto, os mecanismos à jusante a este comportamento ainda não estão bem esclarecidos. Ademais, fungos necrotróficos também estimulam o aumento da transpiração e do acúmulo de K em torno dos estômatos (Ayres e Owen, 1971).

O aumento progressivo do teor de potássio no tratamento $6K \times 8Ca \text{ mmol L}^{-1}$ ao longo do tempo foi o mesmo comportamento observado para o teor de cálcio. Neste tratamento, ambos nutrientes foram requeridos em máximas concentrações às 72 h.a.i.. Isto indica que, a nutrição com Ca e K quando bem equilibrada, resulta em respostas precoces e contínuas respostas tardias de eucalipto sob infecção de *C. pteridis*.

Como estes nutrientes estão envolvidos na sinalização e nas respostas de defesa da planta, as concentrações requeridas destes no local de infecção deve ser diretamente proporcional às respostas de defesa desencadeadas sob infecção de fungos necrotróficos (Davis et al., 2018). Esta conclusão é bem observada em estudo realizado por Chen et al. (2015), em que um clone resistente de eucalipto à *C. pseudoreteaudii* exibiam altos padrões de expressão de genes diretamente envolvidos nas respostas de defesa da planta às 60 h.a.i. quando comparado com um clone suscetível ao patógeno.

Estes padrões observados em eucalipto no presente estudo, são intrínsecos à resistência da planta sob infecção de *C. pteridis*. Segundo Soares et al. (2018), mudas de eucalipto em solução nutritiva submetidas ao tratamento $6K \times 8Ca \text{ mmol L}^{-1}$ apresentaram ótimos resultados quanto aos caracteres morfológicos dessa planta, além de menor severidade e desfolha quando inoculadas com *C. pteridis*.

Quanto aos demais tratamentos, a acentuada queda do teor de cálcio às 72 h.a.i. e os baixos valores de potássio neste mesmo tempo, quando comparados ao tratamento $6K \times 8Ca \text{ mmol L}^{-1}$ indicam possível desequilíbrio no fornecimento destes elementos

minerais como principal causa. Estudos relacionados à dinâmica de distribuição destes nutrientes em diferentes tecidos e órgãos da planta são necessários para a completa elucidação dos processos envolvidos a montante e a jusante das respostas de defesa.

6 Conclusões

A dinâmica da interação entre os nutrientes Ca e K e sua rápida disponibilidade no local de infecção depende da adubação equilibrada, indicando consequências diretas na distribuição e concentração dos nutrientes no local de infecção. Cálcio e potássio são requeridos em locais e em quantidades diferentes ao longo do tempo sob a infecção por *C. pteridis*. O fornecimento adequado de ambos os nutrientes a eucalipto determinará a persistência na sinalização das respostas de defesa do eucalipto, resultando na sua resistência ao patógeno.

7 Referências

Alfenas AC, Zauza EAV, Mafia RG (2009) Clonagem e doenças do eucalipto, 2nd. ed. Editora UFV, Viçosa, MG, Brasil, 500p.

Alfenas AC, Ferreira FA (1979). A mancha de folha do eucalipto no Brasil causada por três espécies de *Cylindrocladium* – Uma revisão da descrição da doença. Revista Árvore 3:47-56

Alfenas RF, Pereira OL, Jorge VL (2003) A new species of *Calonectria* causing leaf blight and cutting rot of three forest tree species in Brazil. Tropical Plant Pathology 38:513-521

Ayres PG, Owen H (1971) Resistance of barley varieties to establishment of subcuticular mycelia by *Rhynchosporium secalis*. Trans. Br. Mycol. Soc 57:233-240

Belan LL, Pozza EA, Freitas MLO, Pozza AAA, Abreu MS, Alves E (2015) Nutrients distribution in diseased coffee leaf tissue. Australas. Plant Pathol. 44:105-111

Bhadhuri D, Rakshit R, Chakraborty K (2014) Primary and secondary nutrients- a boon to defense system against plant diseases. IJBSM 5:461-466

Dedavid BA, Gomes CI, Machado G (2007) Microscopia eletrônica de varredura: aplicações e preparação de amostras. Porto Alegre, RS: Edipucrs

El-Beltagi HS, Mohamed HI (2013) Alleviation of cadmium toxicity in *Pisum sativum* L. seedlings by calcium chloride Not Bot Horti Agrobot 41:157-168

Fageria VD (2001) Nutrient interactions in crop plants. J Plant Nutr 24: 1269-1290

Freitas RG, Alfenas RF, Guimarães LMS, Badel JL, Alfenas AC (2019) Genetic diversity and aggressiveness of *Calonectria pteridis* in *Eucalyptus* spp. Plant Pathol.

Gaspar GG, Takahashi HW, Canteri MG, Almeida JCV, Fioretto RA, Andrade BLG, Fantin LH (2015) Balance among calcium, magnesium and potassium levels affecting Asian Soybean Rust severity. ASB 1:39-44

Geary B, Clark J, Hopkins BG, Jolley VD (2015) Deficient, Adequate and Excess Nitrogen Levels Established in Hydroponics for Biotic and Abiotic Stress-Interaction Studies in Potato. *J Plant Nutr* 38:41-50

Graham DR (1983) Effects of nutrients stress on susceptibility of plants to disease with particular reference to the trace elements. *Adv. Bot. Res.* 10:221-276

Heller A, Witt-Geiges T (2013) Oxalic acid has an additional, detoxifying function in *Sclerotinia sclerotiorum* pathogenesis. *Plos one* 8:72292

Ihaka R, Gentleman R (1996). R: a language for data analysis and graphics. *J. Comput. Graph. Statist.* 5: 299-314

Li J-Q, Wingfield MJ, Liu Q, Barnes I, Roux J, Chen SF (2017) *Calonectria* species isolated from *Eucalyptus* plantations and nurseries in South China. In: *IMA Fungus* 8: 259-294

Lombard L, Bogale M, Montenegro F, Wingfield BD, Wingfield MJ (2008) A new bark canker disease of the tropical hardwood tree *Cedrelinga cateniformis* in Ecuador. *Fungal Divers* 31:73-81

Lombard L, Rodas CA, Crous PW, Wingfield BD, Wingfield MJ (2009) *Cylindrocladium* species associated with dying *Pinus* cuttings. *Persoonia* 23:41-47

Marschner P (2012) Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants, 3rd ed.; Academic Press: London, UK 178-189pp

Pérez CDP, Pozza EA, Pozza AAA, Freitas AS, Silva MG (2017) Nitrogênio e potássio na intensidade da mancha aureolada do cafeeiro em solução nutritiva. *Coffee Science* 12:60-68

Ranty B, Aldon D, Cotelle V, Galaud JP, Thuleau P, Mazars C (2016) Calcium Sensors as Key Hubs in Plant Responses to Biotic and Abiotic Stresses. *Front. Plant Sci.* 7:327

Salguero-Linares J, Coll NS (2019) Plant proteases in the control of the hypersensitive response *J Exp Bot* 12:2087-2095

Sarwar M (2012) Effects of potassium fertilization on population build up of rice stem borers (*Lepidopteron pests*) and rice (*Oryza sativa* L.) yield. *J. Cereals Oil seeds* 3:6-9

Silva WLC, Antunes MF, Fortunato AA, Rodrigues FA (2015) Histochemical aspects of wheat resistance to leaf blast mediated by silicon. *Sci. agric.* 72:322-327

Soares TPF, Pozza EA, Pozza AAA, Mafia RG, Ferreira MA (2018) Calcium and Potassium Imbalance Favours Leaf Blight and Defoliation Caused by *Calonectria pteridis* in Eucalyptus Plants. *Forests* 9:782

Sun J, Cao, I, Li H, Wang G, Wang S, Li F, Zou X, Wang J (2019) Early responses given distinct tactics to infection of *Peronophythora litchii* in susceptible and resistant litchi cultivar. *Sci. Rep.* 9:2810

Wang JP, Munyampundu JP, Xu YP, Cai XZ (2015) Phylogeny of plant calcium and calmodulin-dependent protein kinases (CCaMKs) and functional analyses of tomato CCaMK in disease resistance. *Front. Plant Sci.* 6:1075