NICOLLE ARAUJO CAMPOS

DIVERSIDADE GENÉTICA DE ISOLADOS DE *Ceratocystis fimbriata* EM PLANTIOS DE *Eucalyptus* spp. NO EXTREMO SUL DA BAHIA.

Monografia apresentada ao Departamento de Engenharia Florestal da Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do curso de Engenharia Florestal.

VIÇOSA
MINAS GERAIS, BRASIL
SETEMBRO DE 2013

NICOLLE ARAUJO CAMPOS

DIVERSIDADE GENÉTICA DE ISOLADOS DE *Ceratocystis fimbriata* EM PLANTIOS DE *Eucalyptus* spp. NO EXTREMO SUL DA BAHIA.

Monografia apresentada ao Departamento de Engenharia Florestal da Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do curso de Engenharia Florestal.

APROVADA em 2 setembro de 2013.

Prof. Acelino Couto Alfenas
(ORIENTADOR)

Lúcio Mauro da Silva Guimarães
(CO-ORIENTADOR)

Daniele Aparecida Alvarenga Arriel

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida e por iluminar meu caminho.

Aos meus pais, Gelson Luiz Campos e Ana Maria Araujo Figueira, pelo amor, apoio, incentivo e pelas orações.

A toda minha família, em especial ao meu primo Vinicius, ao meu tio Marcos e a minha avó Alice (*in memoriam*), pela constante ajuda e força.

Ao professor Acelino Couto Alfenas, pela orientação e oportunidade durante todos esses anos.

Ao Lúcio Guimarães, pela paciência, disponibilidade, orientação e auxílio no desenvolvimento deste trabalho.

Aos colegas e funcionários do Laboratório de Patologia Florestal, em especial Dani, Lucas, Rodrigo e Denise, pelos conselhos e auxílio durante o desenvolvimento deste trabalho.

À Veracel Celulose S.A, em especial a Daniela Neves, Karina Zamprogno e demais funcionários, pela grande experiência profissional e pessoal.

À Universidade Federal de Viçosa e aos professores do Departamento de Engenharia Florestal, pelos ensinamentos e pela formação profissional.

Aos meus amigos da turma de Engenharia Florestal 2008, pelas alegrias, pelo companheirismo e pela convivência.

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

BIOGRAFIA

Nicolle Araujo Campos, filha de Gelson Luiz Campos e Ana Maria Araujo Figueira, nasceu em 27 de março de 1990 em Porciúncula, Rio de Janeiro.

Em 2007, concluiu o ensino médio no colégio Logos em Porciúncula, Rio de Janeiro.

Em 2008, iniciou o curso de Engenharia Florestal, na Universidade Federal de Viçosa. No período de novembro de 2009 a setembro de 2013 foi bolsista de Iniciação Científica no Laboratório de Patologia Florestal do DFP/Bioagro sob a orientação do Prof. Acelino Couto Alfenas. De julho a dezembro de 2011 estagiou na Veracel, onde desenvolveu atividades no Viveiro e em projetos nas áreas de Fitossanidade e Melhoramento Genético.

Em setembro de 2013, conclui o curso de Engenharia Florestal, na Universidade Federal de Viçosa.

CONTEÚDO

LISTA DE FIGURAS.....VI
LISTA DE TABELAS.....VII
EXTRATO.....VIII
1. INTRODUÇÃO.....1
2. OBJETIVO.....3
3. REVISÃO DE LITERATURA.....4
3.1. Murcha-de-ceratocystis.....4
3.1.1. Distribuição geográfica do patógeno e gama de hospedeiro.....5
3.1.2. Disseminação do patógeno e transmissão da doença.....6
3.1.3. Sintomas da doença.....7
3.1.4. Controle da doença.....8
3.2. Marcadores moleculares.....9
3.2.1. Marcadores RAPD.....9
4. MATERIAL E MÉTODOS.....14
4.1. Isolamento do fungo.....14
4.2. Obtenção de culturas monoascospórica.....14
4.3. Extração e quantificação de DNA.....16
4.4. Análise da variabilidade genética.....17
4.4.1. Amplificação dos produtos por PCR e análise eletroforética.....17
4.4.2. Análise de dados.....18

4.4.3. Diversidade genética.....18
4.4.4. Similaridade genética.....19
5. RESULTADOS.....20
5.1. Isolamento do fungo.....20
5.2. Análise da variabilidade genética.....23
6. DISCUSSÃO.....27
7. CONCLUSÃO.....30
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....31

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Mapa dos municípios onde foram realizadas as coletas de amostras de madeira com sintomas de murcha-de-ceratocystis no extremo sul da Bahia..... 15

FIGURA 2: Método de isolamento de *Ceratocystis fimbriata*..... 16

FIGURA 3: Porcentagem de isolados de *Ceratocystis fimbriata* coletados por clone de eucalipto (*Eucalyptus grandis* x *E .urophylla*)..... 22

FIGURA 4: Porcentagem de isolados de *Ceratocystis fimbriata* pelos municípios onde foram feitas as coletas..... 22

FIGURA 5: Padrão de amplificação dos isolados de *Ceratocystis fimbriata* e dos comparadores com os *primers* OPF 12 e OPI 10..... 24

FIGURA 6: Dendrograma UPGMA representando a similaridade genética entre os isolados de *Ceratocystis fimbriata* e comparadores..... 26

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Isolados de *Ceratocystis fimbriata* obtidos e suas respectivas regiões de plantio, locais de coleta, clone e coordenadas geográficas..... 21

TABELA 2: Sequência e números de fragmentos gerados pelos *primers* RAPD utilizados para a caracterização da diversidade genética dos isolados de *Ceratocystis fimbriata*..... 23

TABELA 3: Estimativas da diversidade genética da população de *Ceratocystis fimbriata* por área total, local de coleta e comparadores..... 25

EXTRATO

CAMPOS, Nicolle Araujo. Monografia de graduação. Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2013. **Diversidade genética de isolados de *Ceratocystis fimbriata* em plantios de *Eucalyptus* spp. no extremo sul da Bahia.** Orientador: Acelino Couto Alfenas, Co-orientador: Lúcio Mauro da Silva Guimarães e Daniela Andrade Neves.

Dentre as doenças que ocorrem na eucaliptocultura destaca-se, quanto aos prejuízos causados, a murcha-de-ceratocystis, causada pelo fungo *Ceratocystis fimbriata*. A melhor forma de controle da doença é o plantio de materiais resistentes. A variabilidade genética para resistência dentro do gênero *Eucalyptus* é considerada boa, sendo eficaz a seleção de genótipos resistentes. Entretanto, recentes estudos têm revelado uma alta variabilidade patogênica entre isolados de *C. fimbriata*. Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar a diversidade genética entre isolados do patógeno em áreas de plantio de *Eucalyptus* spp. no extremo sul da Bahia. Foram coletadas amostras de madeira em seis municípios que abrangem diferentes plantios de seis clones híbridos de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*. Tecidos do lenho de árvores com sintomas de murcha foram enviados ao Laboratório de Patologia Florestal (UFV) para o isolamento, pelo método iscas de cenoura. Foram obtidos 36 isolados a partir da análise de 84 amostras. Cinco dos seis clones amostrados apresentaram a doença, sendo que apenas um dos clones foi responsável por 75% dos isolados obtidos. A partir dos isolados foram obtidas 24 culturas monoascospóricas e destas extraiu-se o DNA, que foi amplificado pela reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando *primers* RAPD. Para a caracterização da diversidade genética intrapopulacional foi utilizado o programa PopGene, versão 1.31, e

para as análises de similaridade genética o programa Genes. Foram analisados 57 locos RAPD sendo 28 polimórficos. A diversidade média de Nei (He) para a população foi de 0,15 e o índice de Shannon (I) igual a 0,23. Em relação à similaridade genética, a maior proximidade foi de 1,00 e a menor foi de 0,67. De acordo com os resultados obtidos verifica-se que houve baixa diversidade entre os isolados, indicando que podem pertencer a uma mesma população.

1. INTRODUÇÃO

Atualmente no Brasil mais de cinco milhões de hectares correspondem à área de plantios de *Eucalyptus* spp. (ABRAF, 2013) e o grande interesse pelo uso das espécies deste gênero nas plantações florestais ocorre pela boa adaptação das mesmas nas diferentes regiões do país, por apresentarem crescimento relativamente rápido e por serem de fácil manejo tecnológico e silvicultural (Ferreira et al., 2006). A maior parte da matéria-prima proveniente das plantações de eucalipto brasileiras, cerca de 35%, destina-se à produção de celulose (ABRAF, 2013). Recentemente, tem sido constatada em plantios nos diversos estados do país uma enfermidade causada pelo fungo *Ceratocystis fimbriata* Ellis & Halsted que, além de letal, inviabiliza o uso da madeira para a geração deste tipo de produto florestal.

A murcha-de-ceratocystis foi relatada pela primeira vez causando a morte de indivíduos em plantios clonais de eucalipto no sudeste da Bahia, em 1997 (Ferreira et al., 1999). O fungo é causador de cancro, escurecimento radial do lenho a partir da medula e murcha que pode culminar com a morte da planta (Alfenas et al. 2009). É provável que, para o eucalipto, a disseminação do patógeno seja através do vento, água, material vegetal propagativo infectado e atividades de manejo como produção e transporte de mudas (Zauza et al., 2003). Condições de umidade elevada e altas temperaturas favorecem o estabelecimento da doença (Alfenas et al., 2009).

A melhor alternativa de controle da doença é o uso de materiais resistentes (Alfenas et al., 2009). Contudo, preocupar-se somente em selecionar genótipos

resistentes não garante a completa eficiência do controle. Há que se atentar para o conhecimento da variabilidade genética do patógeno nas áreas de plantio, a fim de garantir o sucesso do programa de melhoramento visando resistência à murcha-de-ceratocystis. Para a análise de diversidade genética são utilizados diversos tipos de marcadores moleculares, dos quais se destacam os marcadores RAPD.

RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA* - DNA polimórfico amplificado ao acaso) (Williams et al., 1990) é uma técnica molecular rápida, barata e informativa, já que não é necessário conhecer previamente a sequência de DNA a ser amplificada e o par de iniciadores utilizado é construído com sequências arbitrárias (Xavier et al., 2005). Estes marcadores vêm sendo utilizados em diversos estudos de diversidade genética de fungos, como *Fusarium* sp., *Colletotrichum* spp. e *Ophiostoma* spp., e tem se mostrado eficientes na identificação da variabilidade existente nestes patógenos.

2. OBJETIVO

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a diversidade genética entre isolados de *C. fimbriata* em áreas de plantio de *Eucalyptus* spp. no extremo sul da Bahia, utilizando marcadores moleculares RAPD.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Murcha-de-ceratocystis

O fungo *Ceratocystis fimbriata* incita uma das principais enfermidades da eucaliptocultura brasileira na atualidade. Tal designação é em função das perdas econômicas induzidas, dos poucos conhecimentos adquiridos e das características do patossistema que dificultam o controle.

A murcha-de-ceratocystis é uma doença de natureza sistêmica, na qual o agente causal coloniza os tecidos vasculares das plantas infectadas. Com a desintegração das células, há o escurecimento radial do lenho que pode ser visualizado por meio de cortes perpendiculares ao tronco e ramos afetados. Além deste típico sintoma, observa-se redução no crescimento, surgimento de brotações epicórmicas no fuste, murcha, cancros e, até, morte das árvores doentes.

Plantas infectadas por este patógeno já foram detectadas em diferentes países e diversos estados do Brasil, além de pertencerem as mais variadas espécies (Mafia et al., 2011)

3.1.1. Distribuição geográfica do patógeno e gama de hospedeiros

Em dezembro de 1997 foi constatada pela primeira vez a murcha-de-ceratocystis em plantios de eucalipto no Brasil (Ferreira et al., 1999). No primeiro ano de acompanhamento, a enfermidade limitava-se a plantações monoclonais de dois genótipos. Posteriormente, verificou a presença do patógeno em cultivos de outros três clones (Ferreira et al., 2006). De acordo com resultados de inoculações do patógeno sob condições controladas, sabe-se que vários outros materiais genéticos são suscetíveis (Zauza et al., 2004).

Somando-se as ocorrências registradas no Espírito Santo, em Mato Grosso do Sul, em Minas Gerais, em São Paulo, Maranhão, Pará e, recentemente, Alagoas a doença tem acometido aproximadamente 15 clones comerciais (Alfenas et al., 2009; Oliveira, 2010). Atualmente, entretanto, acredita-se que a doença afete um número muito maior de clones. Cerca de 60% dos clones inoculados no Laboratório de Patologia Florestal da UFV e na Clonar Resistência a Doenças Florestais são suscetíveis à murcha-de-ceratocystis (Alfenas, A.C. informação pessoal 2012). Além do Brasil, a enfermidade foi relatada em eucalipto no Uruguai (Barnes et al., 2003b), na República do Congo (Roux et al., 2000), em Uganda (Roux et al., 2001) e na África do Sul (Roux et al., 2004).

C. fimbriata já foi detectado em 31 espécies de 14 famílias diferentes (Baker *et al.*, 2003) dentre as quais destacam-se espécimes florestais e agronômicas importantes como mangueira (*Mangifera indica*), fícus (*Ficus caica*), seringueira (*Hevea brasilienses*), crotalária (*Crotalaria juncea*), inhame (*Colocasia esculenta*), batata-doce (*Ipomea batatas*), acácia (*Acacia mearnsii*), cafeeiro (*Coffea arabica*), gmelina (*Gmelina arbórea*), espatódea (*Spathodea campanulata*), kiwi (*Actinidia deliciosa*), andiroba (*Carapa guianensis*), entre outros, além do eucalipto.

Há grande variabilidade fisiológica na população do patógeno, de modo que determinada espécie vegetal pode ou não ser infectada por isolados do fungo oriundos de outros hospedeiros (Harrington et al., 2001; Baker et al., 2003). Para eucalipto, por exemplo, pode se observar especialização do patógeno em relação ao hospedeiro, já que os isolados oriundos desta espécie aparentemente foram patogênicos somente a ela

mesma (Baker et al., 2003; Zauza et al., 2004). Há também variabilidade do fungo em relação ao isolado do patógeno e do clone inoculado (Zauza et al., 2004; Oliveira, 2010).

Além de *C. fimbriata*, novas espécies deste gênero têm sido descritas causando doença em eucalipto pelo mundo. *C. atrox* (van Wyk et al., 2007) e *C. corymbiicola* (Kamgan Nkuekam et al., 2012) na Austrália, *C. pirilliformis* (Barnes et al., 2003a; Roux et al., 2004), também, na Austrália e África do Sul, *C. neglecta* (Rodas et al., 2007), *C. curvata* e *C. ecuadoriana* (van Wyk et al., 2011) na Colômbia, *C. fimbriatomima* (van Wyk et al., 2009) na Venezuela, *C. zombamontana* (Heath et al., 2009) no Malaui, *C. eucalypticola* (van Wyk et al., 2012) na África do Sul, *C. moniliformis* (Heath et al., 2009) na África do Sul e Tânzania, *C. salinaria* e *C. decipiens* (Kamgan Nkuekam et al., 2013) , também, na África do Sul.

3.1.2. Disseminação do patógeno e transmissão da doença

Para *C. fimbriata* sabe-se que sua disseminação ocorre por meio de suas estruturas fúngicas como fragmentos de micélio, conídios, aleuroconídios (clamidósporos) ou ascósporos. Os aleuroconídios constituem, provavelmente, a unidade de sobrevivência mais eficiente, em virtude da parede celular compacta, o que facilita também a sobrevivência no solo (Accordi, 1989) e no interior de insetos envolvidos na dispersão (Iton, 1960). Para *Platanus* sp. foi observada dispersão do patógeno a partir de inóculo no solo via contato radicular (Accordi, 1986, 1989) e ferimento na raiz (Vigouroux et al., 1999; Vigouroux & Olivier, 2004). A mesma forma de infecção foi verificada em eucalipto (Ferreira, 2004) e em manga (Rossetto & Ribeiro, 1990).

Plantas doentes produzem uma grande variedade de aromas, similares aos de frutas, que atraem insetos. Cupins e coleobrocas são alguns tipos de insetos que promovem a dispersão do fungo comportando-se como vetores. Em *Prunus* (Moller & DeVay, 1968) e em *Populus* (Hinds, 1972), existem evidências da transmissão do patógeno na medida em que insetos adquirem o fungo e visitam ferimentos frescos em árvores suscetíveis. Especialmente coleobrocas dos gêneros *Xyleborus* e *Hypocryphalus* são atraídas para árvores doentes onde realizam galerias e expulsam para fora a serragem (Goitia & Rosales, 2001). Este material contém estruturas infectivas que podem ser disseminadas pelo vento (Iton, 1960). Sabe-se também que *C. fimbriata* pode

ser carreado externamente nos insetos (Iton, 1966) ou sobreviver após a passagem pelo intestino dos mesmos (Iton, 1960; Iton, 1966; Crone, 1963). Para eucalipto, Ferreira et al. (2006) constataram perfurações de insetos somente em lesões mais velhas, sendo esta associação interpretada como secundária ou não precursora da doença. Todavia, esses insetos, ao saírem das galerias do lenho infectado, podem transmitir estruturas infectivas do patógeno para outras plantas lenhosas. (Sinclair et al., 1987; Wingfield et al., 1993; Baker & Harrington, 2004).

Outro mecanismo de disseminação da doença são os materiais propagativos e estes podem ser um método bem efetivo de dispersão. Como exemplos, estacas aparentemente sadias de *Populus* apresentaram infecções de *C. fimbriata* (Vujanovic et al., 1999) e estacas infectadas de *Syngonium* constituem, aparentemente, o meio de dispersão do fungo através de viveiros (Walker et al., 1988). Ferimentos de poda constituem portas de entrada para *C. fimbriata*, sendo que o fungo pode ser transmitido por facão ou por outras ferramentas (Walter, 1946; Walter et al., 1952; Teviotdale & Harper, 1991). Alfenas et al. (2006) comprovaram que é possível a transmissão do patógeno durante o corte com motosserra, evidenciando o risco de condução de brotações a partir de plantios sabidamente infectados pela doença.

3.1.3. Sintomas da doença

Nas primeiras investigações da enfermidade, em plantas de quatro a seis meses de idade, de plantações monoclonais de eucalipto de primeiro ciclo e de brotações no sudeste da Bahia, observou-se início de murchamento da copa ou de apenas um galho. Com o passar do tempo, essa murcha progredia, afetando toda a planta e levando-a a morte. Esses sintomas apresentavam-se em plantas isoladamente, ou agrupadas em algum(ns) setor(es) do talhão, sem a caracterização de uma reboleira típica (Ferreira et al., 2006).

Outro sintoma típico é visível nas secções transversais de órgãos lenhosos, na forma de estrias radiais escuras. Essas estrias no lenho são visíveis quando um ramo afetado é cortado transversalmente, pois o patógeno provoca a desintegração do sistema vascular da planta (Ferreira & Milani, 2002). Quando o adensamento das estrias radiais escuras toma toda a

circunferência interna do lenho das raízes ou da base do tronco, ocorre a inativação de xilema e a árvore morre. Se a inativação do xilema ocorrer em uma altura elevada do tronco principal, se tem a murcha e a subsequente morte do segmento terminal, havendo, por isso, alteração do balanço hormonal, resultando na emissão de brotações adventícias em setores medianos e basais do tronco (Ferreira, 1989; Ferreira & Milani, 2002).

Ferreira et al. (2006), em função do estudo sintomatológico detalhado, caracterizaram a murcha-de-ceratocystis como doença vascular em planta lenhosa. Tal caracterização é em razão do progresso do patógeno via parênquima medular na direção ascendente e via parênquima radial, a partir da medula, na direção radial, lesionando sequencialmente uma porção ou a totalidade do câmbio e da feloderme, que resulta em lesão longitudinal externa na forma de cancro.

3.1.4. Controle da doença

O plantio de materiais resistentes tem sido utilizado com sucesso para *Mangifera* (Ribeiro et al., 1984; Ribeiro et al., 1986; Ribeiro et al., 1995; Rossetto et al., 1997), *Theobroma* (Desrosiers, 1956; Delgado & Echandi, 1965; Gardella et al., 1982; Ocampo et al., 1982; Simmonds, 1994), *Ipomoea* (Martin, 1954), *Coffea* (Castilla, 1982), *Crotalaria* (Ribeiro et al., 1977) e eucalipto (Zauza et al., 2004, Alfenas et al., 2009, Fonseca et al., 2010). Espécies e variedades de citrus também variam muito em suscetibilidade a isolados do fungo na Colômbia (Paez-Redondo & Castano-Zapata, 2001).

Para eucalipto, também se recomenda que a colheita, bem como todos os tratos culturais, seja realizada primeiramente em áreas sem a doença e somente depois nas áreas sabidamente infectadas. Além disso, recomenda-se a desinfestação de ferramentas e equipamentos após a utilização em áreas com a doença. Em relação às mudas para plantio, é recomendado eliminar qualquer material propagativo infectado e comprovar a sanidade das cepas ou minicepas utilizadas para produção de propágulos vegetativos. Qualquer tipo de intervenção química não é recomendado em plantios de eucalipto, sendo o plantio de materiais resistentes o método mais eficiente de controle da doença. (Alfenas et al., 2009).

3.2. Marcadores Moleculares

A detecção da variabilidade genética em microrganismos pode ser feita através de técnicas clássicas ou moleculares. Como as técnicas clássicas, que se baseiam na análise fenotípica, limitam os estudos populacionais, a análise a partir de marcadores moleculares tornou-se amplamente utilizada para diferenciação dos indivíduos estudados (Stringari, 2009).

As técnicas moleculares que identificam o polimorfismo, ou seja, a variação de uma mesma sequência gênica em indivíduos diferentes são divididas de acordo com duas metodologias básicas: os marcadores que hibridizam e os que amplificam o DNA (Coutinho et al., 2006). Entre os identificados por hibridização estão os marcadores RFLP (*Restriction Fragment of Length Polymorphism*) e Minissatélites ou *locos* VNTR (*Variable Number of Tandem Repeats*). Já aqueles que amplificam o DNA, incluem os marcadores do tipo: RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*); SCAR (*Sequence Characterized Amplified Regions*); STS (*Sequence Tagged Sites*); Microssatélite ou SSR (*Simple Sequence Repeats*) e AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) (MILACH, 1998). Dentre estas, as mais utilizadas em estudos com fungos são RFLP, RAPD, AFLP, SSR, entre outras (Stringari, 2009).

3.2.1. Marcadores RAPD

Inicialmente nos estudos de variação genética os principais tipos de marcadores utilizados eram as isoenzimas (Alfenas et al, 2006). Com o surgimento da técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction* – Reação em Cadeia da Polimerase) a avalição da diversidade passou a ser diretamente ao nível do DNA. Entretanto, para a sua aplicação era necessário o conhecimento prévio da sequência-alvo. Esse fator, somado com os gastos para a realização das análises, tornou os custos da técnica de PCR elevados limitando seu emprego como ferramenta de rotina (Lacerda et al., 2002).

Contudo, derivações do protocolo de PCR permitiram o surgimento de novos marcadores moleculares. No início dos anos 90, três grupos de pesquisadores descreveram simultânea e independentemente uma nova técnica. Esta se baseava na

utilização de iniciadores (*primers*) de sequência menor e arbitrária na condução da reação de amplificação. Williams et al. (1990) descreveram a técnica mais popular de todas denominada RAPD. Por sua vez, Welsh & McClelland (1990) propuseram o nome de AP-PCR (*Arbitrarily Primed-Polymerase Chain Reaction*), uma vez que a amplificação do material genético não ocorre ao acaso, mas em lugares específicos do genoma, mesmo sendo arbitrária a sequência do iniciador. Semelhantemente a essas tecnologias, em 1991, Caetano-Anólles et al. publicaram a técnica chamada DAF (*DNA Amplification Fingerprinting*) para detectar diferenças genéticas entre organismos (Lacerda et al., 2002; Castiglioni et al., 2003).

A técnica de RAPD consiste na amplificação de DNA genômico, baseado no princípio da PCR, utilizando um único oligonucleotídeo de sequência arbitrária como *primer*. Este é formado por diferentes combinações das quatro bases nitrogenadas, devendo o conteúdo de guanina (G) e citosina (C) ser em torno de 50 a 70%, e possuir tamanho igual a 10 bases (Lacerda et al., 2002). Para que um fragmento de DNA seja amplificado, o *primer* deve ser complementar a um sítio em uma das fitas e a um mesmo sítio, em orientação invertida, na outra fita de DNA. Além disso, essas regiões do genoma precisam estar separadas por no máximo 4000 pares de base (Stringari, 2009; Lacerda et al., 2002).

Por serem pequenos e terem suas sequências determinadas aleatoriamente, os *primers* podem encontrar várias regiões complementares em diversos pontos do genoma para se ligarem. Por isso, resulta um grande número de fragmentos (bandas) com diferentes tamanhos. A detecção dos produtos de amplificação pode ser feita em gel de agarose, com concentração variando entre 0,8 e 2%, corado com brometo de etídio e visualizado sob luz ultravioleta. Alternativamente, podem ser separados em gel de poliacrilamida (Lacerda et al., 2002; Caixeta et al., 2009).

O polimorfismo revelado pelo RAPD é em função de alterações de uma única base (mutação de ponto) no sítio de ligação do *primer*, inviabilizando o seu pareamento e impedindo a amplificação do fragmento de DNA. Outras fontes de polimorfismo podem ser decorrentes de deleções em sítio e deleções ou inserções entre dois sítios de pareamento adjacentes, gerando ausência de amplificação ou amplificação de fragmento com tamanho diferente correspondendo a uma nova banda no gel (Lacerda et al., 2002; Caixeta et al., 2009). A detecção de polimorfismo por estes marcadores é feita através

da análise de ausência ou presença de determinado fragmento, o que caracteriza natureza binária (Ferreira & Grattapaglia, 1995).

Marcadores RAPD são dominantes, impossibilitando a distinção entre indivíduos homozigotos dominantes e heterozigotos de uma população através do padrão de amplificação. Isto porque ambos serão representados pela presença de determinada banda no gel. Portanto, a ausência da banda é correlacionada ao genótipo homozigoto recessivo. Por estarem distribuídos ao acaso no genoma, os marcadores RAPD podem representar desde DNA de cópia única até altamente repetitivo (Lacerda et al., 2002; Caixeta et al., 2009).

RAPD é uma técnica que permite a caracterização e avaliação, bem sucedidas, da similaridade genética entre indivíduos de forma inter e intra-específica, uma vez que é capaz de detectar diferenças de até um único nucleotídeo entre o *primer* e o DNA alvo (Stringari, 2009). Outra importante vantagem é a simplicidade, sendo um procedimento de fácil execução que não requer profundo conhecimento de biologia molecular e nem equipamentos sofisticados. Portanto, dispensa o uso de mão-de-obra altamente especializada, tornando o custo relativamente reduzido comparado com as demais técnicas moleculares (Stringari, 2009; Caixeta et al., 2009). Além disso, permite a rápida obtenção de dados e resultados podendo ser imediatamente aplicada a qualquer tipo de organismo (Caixeta et al., 2009).

Os marcadores RAPD não exigem o sequenciamento de nucleotídeos, a construção de *primers* específicos e, consequentemente, a não criação prévia de bibliotecas de sondas específicas para o organismo de interesse. E a não utilização de sonda elimina o emprego de isótopos radioativos e marcações não radioativas (Stringari, 2009; Caixeta et al., 2009).

Diferentemente de outros marcadores, como os RFLP, cujas sondas são pré-selecionadas para hibridizar com regiões de DNA de cópia única, o RAPD permite a amostragem de regiões de DNA repetitivo. Isto porque os *primers* utilizados na identificação das variações da sequência de bases são arbitrários (Caixeta et al., 2009).

A técnica oferece ainda a possibilidade de automatização do processo de aquisição de dados, uma vez que o polimorfismo RAPD apresenta natureza binária adequando-se a sistemas computacionais (Stringari, 2009). Por fim, tem se constatado em diversos trabalhos o sucesso do uso de marcadores RAPD para caracterizar a diversidade

genética em população de fungos fitopatogênicos (MA et al., 2001; WEEDS et al., 2003; BELABID et al., 2004; DAVIS et al., 2005).

Análises por marcadores RAPD permitiram a Brancão et al. (2008) caracterizarem molecularmente uma coleção de isolados de *Fusarium graminearum* obtidos de diferentes localidades tritícolas do estado do Rio Grande do Sul. Neste estudo foram utilizados 12 *primers* para a caracterização de 20 isolados. Os autores encontraram por volta de 59% de polimorfismo e a técnica permitiu a separação dos isolados em dois grupos distintos.

Silva-Mann et al. (2002) avaliaram a diversidade genética de 10 isolados do complexo *Colletotrichum*, sendo três da espécie da *C. gossypii* e sete da espécie *C. gossypii* var. *cephalosporioides* causadores, respectivamente, de antracnose e ramulose em algodoeiro. Os autores utilizaram 10 *primers* que geraram 41 bandas polimórficas, encontrando um valor de divergência genética de 48,3% entre os dois grupos. Os resultados da análise com os marcadores RAPD foram confirmados com o teste de patogenicidade, também conduzido no estudo, evidenciando a potencialidade da técnica para diferenciar tais fungos.

Yu et al. (2011) utilizaram a técnica RAPD para caracterizar a variabilidade genética da população chinesa de *C. fimbriata*. As 69 amostras foram comparadas com isolados de *C. fimbriata* de diferentes regiões da Índia, Brasil, Estados Unidos, Nova Zelândia e Papua Nova Guiné. Os autores encontraram alto grau de homogeneidade (índice de similaridade: 1,00) na população de *C. fimbriata* de romã na China, sendo estes agrupados com os isolados chineses de inhame. Os isolados do outros países apresentaram certa diversidade, sendo os isolados de romã da Índia diferentes dos da China e os isolados de inhame do Brasil filogeneticamente mais próximos aos de romã e inhame chineses.

Marin et al. (2003) analisando a variabilidade genética de isolados de *C. fimbriata* oriundos de plantações de café na Colômbia, verificaram alto nível de diversidade na população. Foram observados 67 locos polimórficos, um índice de divergência de 50,6% e os isolados separados em dois grandes grupos.

A técnica RAPD também foi utilizada por Santini & Capretti (2000) na avaliação da população de *C. fimbriata* f.sp. *platani* na Itália. Os 48 isolados de *C. fimbriata* f.sp. *platani* foram comparados com genótipos de *C. fimbriata* de diferentes hospedeiros e

países. Por meio do uso de quatro *primers*, os autores encontraram alto nível de homogeneidade na população italiana e certa variabilidade nos isolados de outros hospedeiros.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Isolamento do fungo

Amostras de caule infectado foram coletadas em plantios clonais de eucalipto no extremo sul da Bahia (FIGURA 1). Os fragmentos de madeira foram acondicionados em saco de papel identificado e enviados ao Laboratório de Patologia Florestal, do DFP/Bioagro da Universidade Federal de Viçosa (UFV), onde foram processados. O fungo foi isolado empregando-se o método de isca de cenoura (Alfenas & Mafia, 2007; Laia et al., 2000). Para isso, sanduíches de discos de cenoura desinfetados superficialmente com pedaços de madeira infectados foram incubados em gerbox a temperatura ambiente por 10 dias (FIGURA 2A).

4.2. Obtenção de culturas monoascospóricas

As culturas isoladas (FIGURA 2B) foram cultivadas por 21 dias em placas de Petri contendo meio MEYA (Extrato-Malte-Levedura-Ágar) acrescido de rifamicina na concentração de 100 $\mu L.mL^{-1}$. Para o preparo do meio, em um litro de água destilada, foram adicionados 20 gramas de extrato de malte em pó refinado (HIMEDIA Laboratories PVT. LTD.), 2,43 gramas de extrato de levedura em pó (Vetec Química Fina Ltda) e 15 gramas de ágar em pó bacteriológico puro (Vetec Química Fina Ltda).

Após esse período, transferiu-se a massa de ascósporos de um único peritécio de cada cultura para uma nova placa contendo o mesmo meio. Em seguida, as placas foram mantidas a 28°C com fotoperíodo de 12 horas. Após esse período, um único ascósporo germinado ou conídio (formação em cadeia de endoconídios) foi transferidopara o centro de outra placa de Petri contendo meio MEYA. Essas placas foram mantidas nas mesmas condições por 21 dias e, em seguida, as culturas do fungo foram armazenadas em glicerol 15% a -80°C.

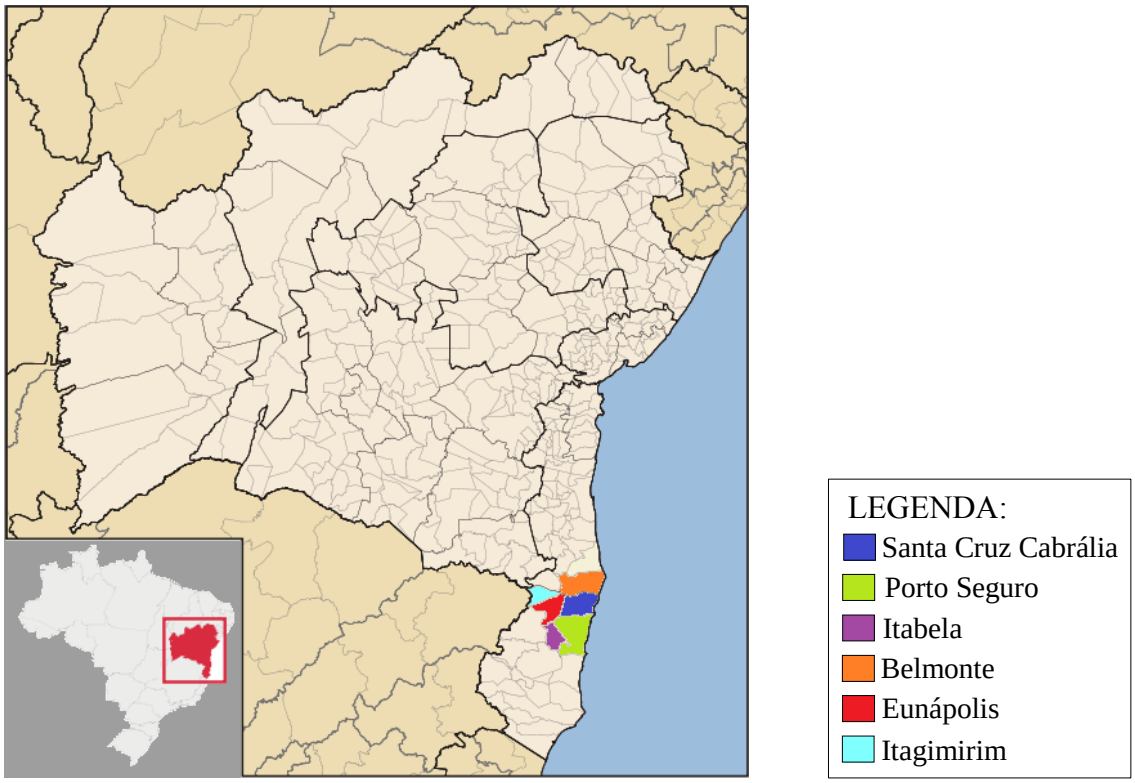

FIGURA 1 – Mapa dos municípios onde foram realizadas as coletas de amostras de madeira com sintomas de murcha-de-ceratocystis no extremo sul da Bahia. Fonte: Adaptado Abreu (2006).

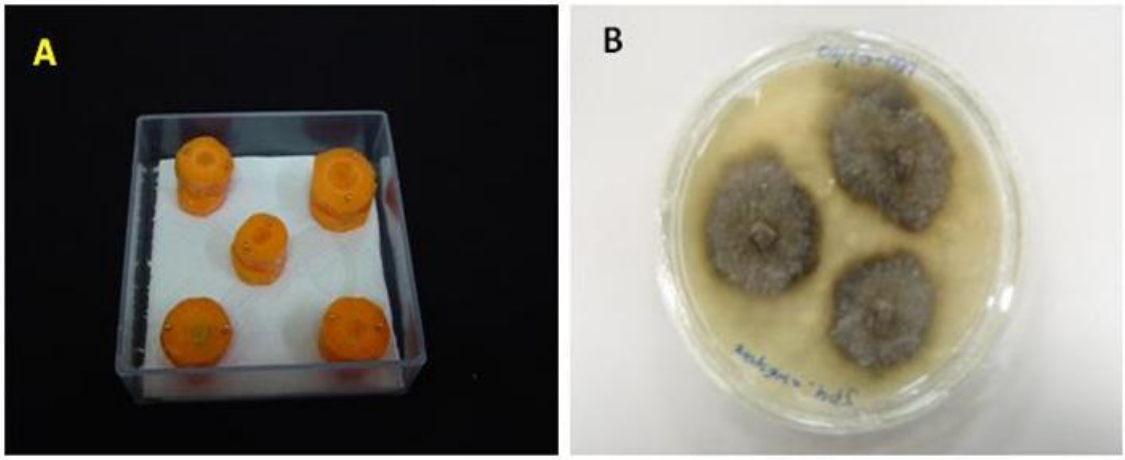

FIGURA 2 - Método de isolamento de *Ceratocystis fimbriata*. A – Sanduíche de cenoura utilizada como isca. B – Colônia de *C. fimbriata* em meio de Extrato de Malte e Ágar.

4.3. Extração e quantificação de DNA

O fungo foi cultivado em placas de Petri contendo meio de cultura MEYA forradas com papel celofane, incubadas a 28°C por um período que variou de 14 a 21 dias, dependendo do isolado. Após esse período, extraiu-se o DNA utilizando o kit de extração *Wizard Genomic* DNA *Purifiction Kit*® (Promega Inc.) com as seguintes modificações: inicialmente transferiu-se o micélio do meio de cultura para um microtubo de 2 mL contendo 200 µL de solução de lise de núcleo. Em seguida, o micélio foi macerado no *Tissuelyser* III (Quiagen ®) a 30HZ por 2 min. Posteriormente, incubou-se a -20° C por 5 min. Após esse período, acrescentaram-se 400 µL de solução de lise de núcleo, e macerou-se novamente no *Tissuelyser* III a 30HZ por 2 min, seguindo-se de uma nova incubação a 65°C por 15 min. Os microtubos foram invertidos a cada 5 min. Em seguida, centrifugaram-se as amostras por 5 min a 13000 rpm. O sobrenadante foi então transferido para um microtubo de 1,5 mL e as amostras incubadas por 5 min à temperatura ambiente. Após a incubação adicionaram-se 300 µL de solução de precipitação de proteína. Os microtubos foram agitados, invertendo-os cuidadosamente, e centrifugados a 13000 rpm por 10 min. Em seguida, transferiram-se

500 µL da fase aquosa (sobrenadante) para um novo microtubo de 1,5 mL e adicionaram-se a esse 500 µL de Fenol:Clorofórmio:Álcool Isoamílico (25:24:1) agitando-se cuidadosamente. As amostras foram centrifugadas a 13000 rpm por 5 min e a fase superior (aquosa) transferida para um novo microtubo de 1,5 mL contendo 600 µL de isopropanol gelado. Após incubar as amostras por 12 horas a -20°C, procedeu-se uma centrifugação por 7 min a 13000 rpm e o sobrenadante foi descartado. Em seguida, adicionaram-se 600 µL de etanol gelado 70%, agitou-se cuidadosamente os microtubos e centrifugou-se as amostras a 13000 rpm por 5 min. Essa etapa de lavagem foi repetida três vezes para remover o excesso de sais do DNA. O *pellet* resultante foi seco em estufa a 37°C por 30 min. O DNA foi ressuspendido em 50 µL de solução de reidratação de DNA acrescido de 1 µL de solução de RNase e incubado a 37°C *overnight* e, posteriormente a 65°C por 10 min. O DNA obtido de cada isolado foi quantificado no Nanodrop® 2000c (Thermo Fisher Scientific Inc.) e a concentração ajustada para 10 $ng.\mu L^{-1}$.

4.4. Análise da diversidade genética

4.4.1. Amplificação dos produtos por PCR e análise eletroforética

Para amplificação dos fragmentos de DNA foram utilizados 10 *primers* RAPD OPA-03, OPA-13, OPC-17, OPC-19, OPD-16, OPF-12, OPF-20, OPH-02, OPI-10 e OPL-03 (Operon Technologies Inc., Alameda, CA, EUA). Empregou-se 24 isolados de eucalipto e quatro comparadores de diferentes hospedeiros, que foram: um isolado de kiwi (*Actinidia deliciosa)* oriundo de Farroupilha-RS, um de seringueira *(Hevea brasiliensis)* de Ituberá-BA, um de mangueira *(Mangifera indica)* de Frutal-MG e um de eucalipto *(Eucalyptus* spp.) de Teixeira de Freitas –BA.

As PCRs foram amplificadas usando um termociclador Veriti 96 Well *Thermall Cycler* (Applied Biosystems™) e cada reação teve um volume final de 15 µL contendo 2 µL de DNA genômico, 5 µL de *Dream* Taq PCR *Master Mix* 2X (Thermo Scientific), 5 µL de *Water nuclease-free* (Thermo Scientific) e 3 µL de *primer*. As condições de amplificação foram um ciclo para desnaturação de 94°C por 5 min e 40 ciclos para amplificação de 94°C por 60s, 35°C por 60s e 72°C por 2 min, seguido de uma etapa de

extensão final de 72° por 5 min. Os produtos resultantes foram separados por eletroforese em géis de agarose 1,4% a 90V durante 95 min.

Para determinar o tamanho dos fragmentos amplificados, foi utilizado o padrão de peso molecular de 1 Kb Plus DNA Ladder. Os géis foram corados em uma solução com brometo de etídio e fotografados sob luz ultravioleta pelo sistema de fotodocumentação modelo Molecular *Imaging* (Loccus Biotecnologia).

O experimento foi executado com duas repetições de amplificação para cada *primer*.

4.4.2. Análise dos dados

A partir das fotografias dos géis foi realizada a genotipagem, construindo-se uma matriz binária com a presença (1) ou ausência (0) dos fragmentos.

4.4.3. Diversidade genética

A caracterização da diversidade genética intrapopulacional foi realizada por meio do programa PopGene, versão 1.31 (YEH et al., 1997), uma vez que os locos de RAPD segregam como marcadores dominantes, assumindo-se que as populações estão em Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW). Os parâmetros estimados foram:

a) porcentagem de locos polimórficos (*P*): obtida pela média aritmética do número de locos polimórficos pelo número total de locos. Os locos foram considerados polimórficos quando a frequência do alelo mais comum não excedesse a 0,95, conforme sugerido por Nei (1978).

b) Índice de diversidade genética de Shannon *(I)*

$$I = - pi \, . \, log_2 \, pi$$

Onde *pi* é a frequência da presença ou ausência de uma dada banda.

c) Diversidade Genética de Nei

$$H_{e(s/c)} = (1 - \sum p_i^2)$$

Onde *pi* é a frequência da presença ou ausência de uma dada banda

d) Número de alelos observados (*Na*)

e) Número de alelos efetivos (*Ne*)

4.4.4. Similaridade genética

A estimativa da similaridade genética (sg_{ij}), entre cada par de genótipos, foi efetuada pelo coeficiente de Jaccard, por meio da seguinte expressão:

$$sg_{ij} = \frac{a}{a+b+c}$$

Sendo,

a, presença do alelo nos genótipos *i* e *j*

b, presença do alelo apenas no genótipo *i*

c, presença do alelo apenas no genótipo *j*

Posteriormente, foi realizada a representação simplificada das distâncias por meio de um dendograma obtido pelo método hierárquico aglomerativo da média aritmética entre pares não ponderados (UPGMA). As análises de similaridade genética foram realizadas por meio do programa Genes 5.1.

5. RESULTADOS

5.1. Isolamento do fungo

Foram coletadas 83 amostras de tecido de lenho infectado em diferentes plantios de seis clones híbridos de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*. O número de amostras para cada clone foi de 60 para o clone 1, 11 para o clone 2, 2 para o clone 3, 6 para o clone 4, 3 para o clone 5 e 1 para o clone 6. Do total de amostras coletadas, foram obtidos 36 isolados perfazendo uma eficiência de isolamento de aproximadamente 43,4% (TABELA 1).

Em apenas um clone amostrado não foi possível o isolamento do fungo, sendo 75% dos isolados provenientes somente do clone 1 (FIGURA 3). Dentre os seis municípios que abrangem os plantios de eucalipto, Porto Seguro e Santa Cruz Cabrália foram responsáveis pela obtenção de mais de 60% dos isolados, tendo 12 cada um. Os demais municípios apresentaram o seguinte número de isolados: três de Eunápolis, oito de Belmonte e um de Itagimirim (FIGURA 4). Para Itabela não houve isolamento do fungo nas amostras coletadas.

TABELA 1 – Isolados de *Ceratocystis fimbriata* obtidos e suas respectivas regiões de plantio, locais de coleta, clone e coordenadas geográficas.

Código	Região	Município	Clone	Coordenadas	
VER02*	Sul	Porto Seguro	1	S 16º 40' 09,7"	W 039º 24' 17,4"
VER03*	Sul	Porto Seguro	2	S 16º 35' 04,8"	W 039º 25' 12,4"
VER04*	Sul	Porto Seguro	1	S 16º 35' 07,8"	W 039º 24' 49,0"
VER07*	Sul	Porto Seguro	1	S 16º 35' 29,7"	W 039º 25' 44,8"
VER08*	Sul	Porto Seguro	1	S 16º 40' 30,7"	W 039º 24' 47,2"
VER09*	Sul	Porto Seguro	1	S 16º 40' 27,8"	W 039º 24' 57,1"
VER10*	Sul	Porto Seguro	1	S 16º 35' 31,2"	W 039º 25' 46,3"
VER11*	Sul	Porto Seguro	1	S 16º 40' 17,0"	W 039º 24' 15,6"
VER15*	Sul	Porto Seguro	1	S 16º 41' 06,4"	W 039º 14' 30,2"
VER16*	Sul	Porto Seguro	1	S 16º 41' 03,8"	W 039º 14' 32,3"
VER17*	Sul	Porto Seguro	1	S 16º 41' 16,9"	W 039º 13' 46,5"
VER20*	Sul	Porto Seguro	1	S 16º 41' 17,7"	W 039º 13' 43,2"
VER25*	Central B	Sta. Cruz Cabrália	5	S 16º 15' 55,2"	W 039º 19' 46,1"
VER28*	Central B	Sta. Cruz Cabrália	1	S 16º 15' 59,9"	W 039º 19' 39,3"
VER29*	Central B	Sta. Cruz Cabrália	1	S 16º 16' 40,1"	W 039º 20' 50,4"
VER30*	Central B	Sta. Cruz Cabrália	1	S 16º 16' 55,2"	W 039º 20' 57,8"
VER32	Central A	Eunápolis	1	S 16º 09' 57,9"	W 039º 30' 11,7"
VER34*	Central B	Sta. Cruz Cabrália	2	S 16º 19' 05,7"	W 039º 17' 40,6"
VER36*	Central B	Sta. Cruz Cabrália	4	S 16º 18' 52,1"	W 039º 17' 27,5"
VER37*	Central B	Sta. Cruz Cabrália	1	S 16º 21' 21,5"	W 039º 20' 33,8"
VER39*	Central B	Sta. Cruz Cabrália	1	S 16º 19' 22,2"	W 039º 16' 56,3"
VER40*	Central B	Sta. Cruz Cabrália	2	S 16º 19' 03,1"	W 039º 17' 47,9"
VER41*	Central B	Sta. Cruz Cabrália	1	S 16º 18' 59,4"	W 039º 17' 51,8"
VER43*	Central B	Sta. Cruz Cabrália	1	S 16º 19' 05,5"	W 039º 18' 33,9"
VER44*	Central B	Sta. Cruz Cabrália	1	S 16º 19' 00,6"	W 039º 18' 43,7"
VER45	Norte	Belmonte	1	S 15º 51' 19,1"	W 039º 12' 46,5"
VER46	Norte	Belmonte	1	S 15º 51' 22,4"	W 039º 12' 45,9"
VER47	Norte	Belmonte	1	S 15º 51' 02,1"	W 039º 12' 51,4"
VER50	Norte	Belmonte	1	S 15º 52' 28,2"	W 039º 16' 30,0"
VER53	Norte	Belmonte	2	S 15º 50' 18,5"	W 039º 13' 26,5"
VER54	Norte	Belmonte	2	S 15º 49' 53,3"	W 039º 13' 23,7"
VER58	Norte	Belmonte	1	S 15º 49' 56,1"	W 039º 13' 24,4"
VER59	Norte	Belmonte	1	S 15º 50' 34,4"	W 039º 13' 27,3"
VER72	Central A	Eunápolis	3	-	-
VER75	Central A	Eunápolis	3	-	-
VER83	Oeste	Itagimirim	1	-	-

*Isolados utilizados nas análises de diversidade genética.

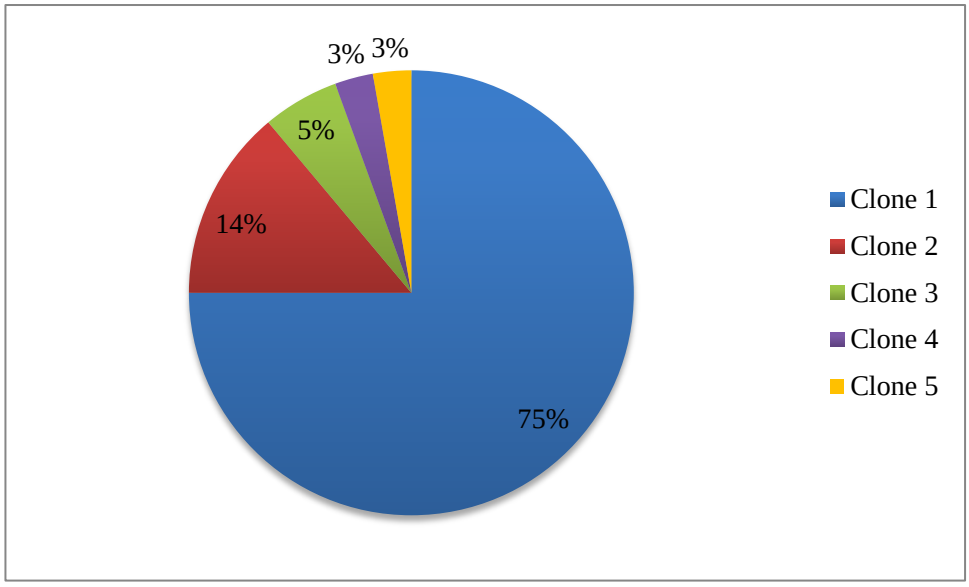

FIGURA 3 – Porcentagem de isolados de *Ceratocystis fimbriata* coletados por clone de eucalipto (*Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*).

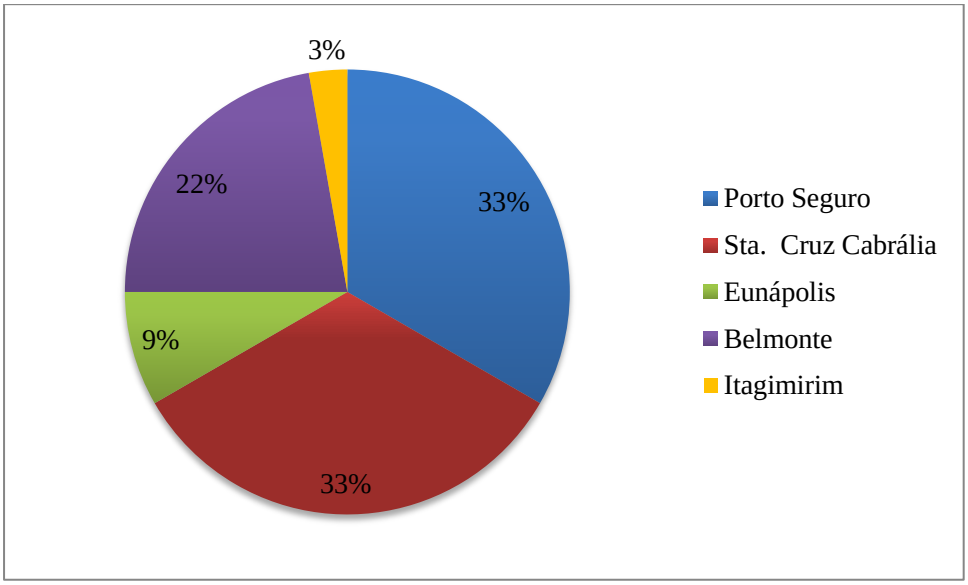

FIGURA 4 – Porcentagem de isolados de *Ceratocystis fimbriata* pelos municípios onde foram feitas as coletas.

5.2. Análise da diversidade genética

Dos 10 *primers* selecionados para a caracterização da diversidade genética dos isolados, apenas um não foi utilizado para o estudo de diversidade (TABELA 2). A FIGURA 5 mostra o padrão de amplificação obtido para os *primers* OPI 10 e OPF 12.

Os nove *primers* utilizados geraram um total de 57 locos, dos quais 28 foram polimórficos. Analisando os 24 isolados separadamente por município, não se observou diferença significativa entre a porcentagem de polimorfismo dos mesmos. Porto Seguro apresentou 40,35% e Santa Cruz Cabrália 43,86%. Já os comparadores mostraram 63,16% de polimorfismo em relação aos isolados estudados. Não se utilizou todos os isolados para a análise, visto que a coleta de certas amostras ocorreu após o início desta.

A diversidade genética de Nei (*He*) para a população foi de 0,15 e o índice de Shannon (*I*) igual a 0,23, sendo semelhante aos valores encontrados quando se avaliou a população de cada município. Os comparadores mostraram maior diversidade, apresentando estes parâmetros com valores iguais a 0,25 e 0,37, respectivamente. O número de alelos observados foi de 1,49 e o número de alelos efetivos igual a 1,25 (TABELA 3).

TABELA 2 – Sequência e número de fragmentos gerados pelos *primers* RAPD utilizados para a caracterização da diversidade genética dos isolados de *Ceratocystis fimbriata*.

Primer	**Sequência (3'-5')**	**Número de fragmentos**
OPA 03	AGTCAGCCAC	7
OPA13	CAGCACCCAC	6
OPC 19	GTTGCCAGCC	5
OPD 16	AGGGCGTAAG	6
OPF 12	ACGGTACCAG	9
OPF 20	GGTCTAGAGG	2
OPH 02	TCGGACGTGA	10
OPI 10	ACAACGCGAG	7
OPL 03	CCAGCAGCTT	5
Total		57

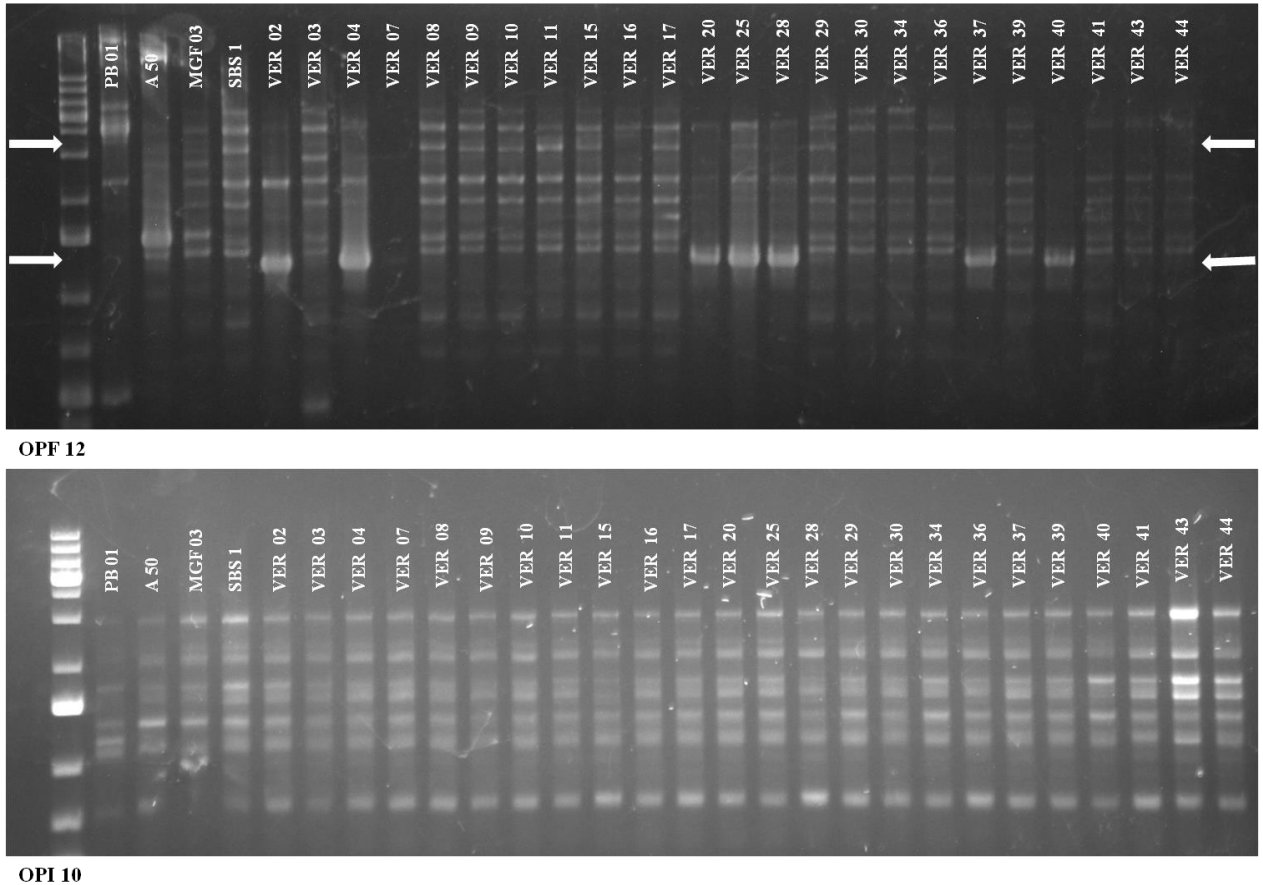

FIGURA 5 – Padrão de amplificação dos isolados de *Ceratocystis fimbriata* e dos comparadores com os *primers* OPF 12 e OPI 10. PB01 = *Actinidia deliciosa*; A50 = *Hevea brasiliensis*; MGF03 = *Mangifera indica*; SBS1 = *Eucalyptus* spp.; VER 02 a 20= isolados de Porto Seguro; VER 25 a 44= isolados de Santa Cruz Cabrália. Seta indica polimorfismo na população.

TABELA 3 – Estimativas de diversidade genética da população de *Ceratocystis fimbriata*, por área total, local de coleta e comparadores. *He:* diversidade genética de Nei; *I:* Índice de Shannon; *Na:* número de alelos observados; *Ne:* número de alelos efetivos; *Np*: número de locos polimórficos; *P:* porcentagem de locos polimórficos.

	População			
Parâmetros	**Total**	**Porto Seguro**	**Santa Cruz Cabrália**	**Comparadores**
He	0,15	0,11	0,15	0,25
I	0,23	0,18	0,23	0,37
Na	1,49	1,40	1,44	1,63
Ne	1,25	1,17	1,25	1,43
Np	28	23	25	36
P	49,13%	40,35%	43,86%	63,16%

A similaridade genética variou de 0,67 a 1,00. O máximo grau de similaridade foi observado entre dois pares de isolados, VER 4 – VER 7 e VER 9 - VER 10. Os isolados agruparam-se em três grupos. O primeiro formado pela maioria dos isolados, o segundo composto de três isolados (VER 28, VER 37 e VER 20), sendo dois de Santa Cruz Cabrália (VER 28 e VER 37) e um de Porto Seguro (VER 20) e o último constituído apenas do isolado VER 40. Não houve agrupamento dos comparadores entre si e nem com os demais isolados, exceto o para SBS1 (FIGURA 6).

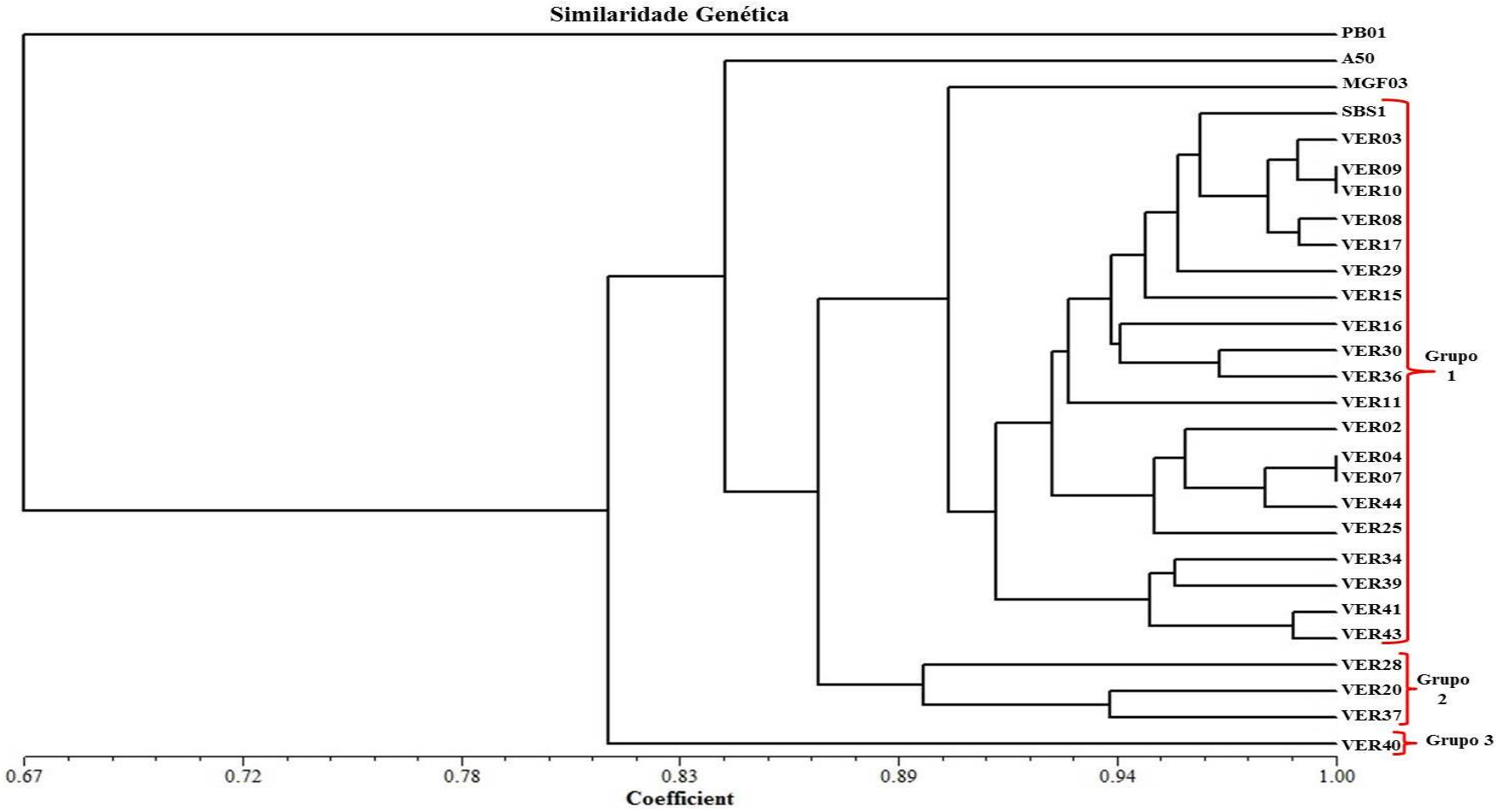

FIGURA 6 – Dendrograma UPGMA representando a similaridade genética entre os isolados de *Ceratocystis fimbriata* e comparadores. PB01 = *Actinidia deliciosa*; A50 = *Hevea brasiliensis*; MGF03 = *Mangifera indica*; SBS1 = *Eucalyptus* spp.; VER 02 a 20 = isolados de Porto Seguro; VER 25 a 44 = isolados de Santa Cruz Cabrália.

6. DISCUSSÃO

O isolamento de *C. fimbriata* a partir das amostras coletadas foi relativamente de baixa eficiência, não em função do método utilizado, mas provavelmente pelas amostras em si. A coleta foi realizada por pessoas não especializadas, que por não ter profundo conhecimento a respeito da doença, podem ter facilmente confundido árvores com sintoma de murcha causada não pelo patógeno e sim por fatores abióticos, tornando impossível o isolamento.

Os isolados do fungo, obtidos de eucalipto da região estudada, apresentaram baixa diversidade genética, sugerindo tratar-se apenas de uma população. Com este resultado, pode-se inferir que o patógeno não é nativo da região. Ferreira (2009) avaliando a estrutura genética da população de *C. fimbriata* no país, verificou nível de diversidade maior. Para isolados de eucalipto na Bahia, os valores de diversidade de Nei foram entre 0,21 e 0,23. Vale salientar que foram usados marcadores microssatélites, que diferentemente de RAPD, são codominantes e, portanto, permitem a diferenciação entre indivíduos homozigotos e heterozigotos. No entanto, Yu et al. (2011) e Santini & Capretti (2000) analisando através da técnica RAPD a diversidade, respectivamente, de isolados de romã e inhame na China e de platanus na Itália, encontraram alto nível de similaridade nas populações assemelhando-se ao resultado deste trabalho.

Como previsto, a população dos comparadores mostrou alto nível de diversidade, uma vez que os isolados são oriundos de diversos hospedeiros e distintos locais de coleta no país.

Até o momento, os isolados coletados são oriundos em sua maioria de um único clone (Clone 1). O plantio de extensas áreas com um clone suscetível, como o clone 1, pode ter sido um facilitador para o estabelecimento de uma população do patógeno na área. É recomendável a substituição do clone 1 por outros resistentes aos isolados coletados. Para isso, é fundamental confirmar se há variabilidade patogênica entre os isolados, mesmo com baixa diversidade genética entre eles. A partir do estudo de variabilidade patogênica torna-se possível conhecer dentre os isolados, aquele com maior espectro de virulência e altamente agressivo aos clones de eucalipto plantados. Com isso, garante-se eficácia na seleção de materiais resistentes durante o programa de melhoramento (Oliveira, 2010).

A formação de um grupo composto pela maioria dos isolados demonstra que o local de coleta e seus fatores não influenciaram na diversidade genética do patógeno. A separação do isolado VER 40 ocorreu provavelmente em função de problemas no processo de amplificação do DNA para a maior parte dos *primers* empregados. Já o agrupamento dos isolados VER 20, VER 28 e VER 37 demonstra que estes diferem da população. Contudo, outros *primers* e outros tipos de marcadores, como microssatélites, devem ser testados para confirmação do polimorfismo.

Com o agrupamento dos isolados apresentando nível de similaridade entre 0,91 e 1,00, associado à baixa diversidade da população, acredita-se que o fungo foi e, ou, está sendo introduzido nessas áreas de plantio, provavelmente a partir de mudas infectadas assintomáticas. No passado, em função da propagação clonal do eucalipto ter ocorrido via macroestaquia, constatou-se o risco de introdução do patógeno em áreas ainda sem a doença através de mudas infectadas assintomáticas. Em avaliações de bancos clonais no sudeste da Bahia, Ferreira (2004) encontrou a murcha-de-ceratocystis em brotações de tocos destinadas a confecção de estacas. A enfermidade também foi observada em estacas na fase de enraizamento, no interior de casa de vegetação, e em mudas enraizadas na fase de aclimatação, no viveiro a céu aberto.

Ressalta-se a similaridade do comparador SBS1 com os demais isolados. Tal associação pode ser em função deste ser oriundo de amostras de eucalipto também coletadas no extremo sul da Bahia, podendo indicar também a provável fonte de inóculo do patógeno nas áreas em estudo. Observa-se que o comparador MGF03 apresentou nível de similaridade maior com a população do que o A50, mesmo este sendo

geograficamente mais próximo. Isto permite inferir que está havendo disseminação do fungo pelo país. Já o comparador PB01 foi o mais divergente provavelmente por originar-se de outro hospedeiro e de uma região com características bem diferentes do local de origem da população de *C. fimbriata* de eucalipto em estudo.

7. CONCLUSÕES

- A frequência de plantas infectadas no campo variou com o clone, sendo o clone 1 o mais suscetível representando 75% dos isolados.

- A técnica de marcadores moleculares RAPD foi eficiente para a caracterização da diversidade genética da população em estudo.

- Os isolados estudados não diferiram quanto ao local de coleta.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAF, Associação Brasileira de Produtores de Florestas Plantadas. **Anuário Estatístico da ABRAF de 2013**, ano base 2012. Brasília, 2012.

ABREU, R.L. Imagem: Bahia MesoMicroMunicip. Disponível em: <http://pt.wikipedia.org/wiki/Ficheiro:Bahia_MesoMicroMunicip.svg>. Acesso em: julho de 2013.

ACCORDI, S. M. Spread of *Ceratocystis fimbriata* f. *platani* through root anastomoses. **Informatore Fitopatologico**, v.36, p.53-8. 1986.

ACCORDI, S. M. The survival of *Ceratocystis fimbriata* f.sp. *platani* in the soil. **Informatore Fitopatologico**, v.39, n.5, p.57-62. 1989.

ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. **Métodos em Fitopatologia**. Viçosa: Editora UFV. 2007. 382p.

ALFENAS, A.C. **Eletroforese e marcadores bioquímicos em plantas e microrganismos.** 2. ed. Viçosa: Editora UFV. 2006. 627p.

ALFENAS, A.C., ZAUZA, E.A.V., MAFFIA, R.G & ASSIS, T.F. **Clonagem e Doenças do Eucalipto.** 2. ed. Viçosa: Editora UFV. 2009. 500p.

BAKER, C. J.; HARRINGTON, T.C. ***Ceratocystis fimbriata*.** Kew, Surrey: CABI Publishing. 2004. p.14.

BAKER, C.J.; HARRINGTON, T.C.; KRAUSS, U.; ALFENAS, A.C. Genetic variability and host specialization in the Latin American clad of *Ceratocystis fimbriata*. **Phytopathology**, v.93, p.1274-1284. 2003.

BARNES, I. et al. *Ceratocystis fimbriata* infecting *Eucalyptus grandis* in Uruguai. **Australian Plant Pathology**, v. 32, p.361-366, 2003b.

BARNES, I.; ROUX, J.; WINGFIELD, M.J.; OLD, K.M.; DUDZINSKI, M. *Ceratocystis pirilliformis*, a new species from *Eucalyptus nitens* in Australia. **Mycologia**, v.95, p.865–871. 2003a.

BELABID, L.; BAUM, M.; FORTAS, Z.; BOUZNAD, Z.; EUJAYL, I. Pathogenic and genetic characterization of Algerian isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lentis* by RAPD and AFLP analysis. **African Journal of Biotechnology**, v.3, n.1, p.25-31. 2004.

BRANCÃO, M. F.; BIANCHI, V. J.; FARIAS, C. R. J. de; SANTO, J. dos; ROSSETTO, E. A. Caracterização genética de *Fusarium graminearum* Schwabe através de técnicas moleculares. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.19, n.3-4, p.67-76. 2008.

CAETANO-ANOLLÉS, G.; BASSAM, B. J.; GRESSHOFF, P. M. High resolution DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers. **Biotechnology**, v.9, n.6, p.553-557. 1991.

CAIXETA, E. T.; OLIVEIRA, A. C. B.; BRITO,G. G.; SAKIYAMA, N. S. Tipos de marcadores moleculares. In: BORÉM, A.; CAIXETA, E. T. (Ed.). **Marcadores Moleculares.** Viçosa: Folha de Viçosa, cap.1, p.27-30, 2009.

CASTIGLIONI, L.; BICUDO, H. E. M. de C. A Técnica de RAPD (*Random Amplified Polymorphic* DNA) e suas aplicações para estudos em genética molecular. **Revista UNORP**, v.3, n.2, p.63-77. 2003.

CASTILLA, Z.J. Production de una selección resístanse a llaga macana *Ceratocystis fimbriata* (Ell. and Halst.) Hunt con relacion a las variedades Tipica y Bordon. **Cenicafe**, v.33, p. 53-66. 1982.

COUTINHO, H. D. M.; NETO, V. M.; VERDE, L. C. L. Técnicas com marcadores moleculares usados nas ciências da saúde. **Revista Brasileira de Ciência da Saúde**, v.10, n.2, p.177-188. 2006.

CRONE, J.L. Symptoms, spread, and control of canker stain of plane trees. **Dissertation Abstracts**, v.23, p.1857-1858. 1963.

DAVIS, J. E.; KUBISIAK, T. L.; MILGROOM, M. G. Polymorphic sequence-characterized codominant loci in the chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica*. **Molecular Ecology Notes**, v.5, n.2, p.195–197. 2005.

DELGADO, J.C.; ECHANDI, E. Evaluación de la resistencia de especies y clones de cacao al mal del machete provocado por *Ceratocystis fimbriata*. **Turrialba**, v.15, p.286-289. 1965.

DESROSIERS, R.; DIAZ, J. The world distribution of diseases of cacao. In: Reunião do Comitê Técnico Interamericano de Cacau. Bahia, 20-27 de Maio, 1956, p.331-341. 1956.

FERREIRA, F. A. et al. Murcha de Ceratocystis em eucalipto no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 24, p. 284, Brasília,1999. Suplemento.

FERREIRA, F. A. **Patologia florestal principais doenças florestais no Brasil**. Viçosa, MG: SIF, UFV, 1989. 570p.

FERREIRA, F.A. **Etiologia da murcha de *Ceratocystis fimbriata* em eucalipto no Brasil.** 2004. 68f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2004.

FERREIRA, F.A., MAFFIA, L.A., BARRETO, R.W., DEMUNER, N.L. & PIGATTO, S. Sintomatologia da murcha de *Ceratocystis fimbriata* em eucalipto. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v.3, n.2, p.155-162, 2006.

FERREIRA, F.A.; MILANI, D. **Diagnose visual e controle das doenças abióticas e bióticas do eucalipto no Brasil.** UFV. 2002. 98p.

FERREIRA, M. A. **Estrutura genética de populações de *Ceratocystis fimbriata* e padrão espaço-temporal da murcha-de-ceratocystis.** 2009. 107f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2009.

FERREIRA, M. E. & GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética.** 2. ed. Brasília: EMBRAPA/CENARGEN. 1995. 220p.

FONSECA, S.M. et al. **Manual Prático de Melhoramento Genético do Eucalipto.** 1. ed. Viçosa: Editora UFV. 2010. 200p.

GARDELLA, D.S.; ENRIQUEZ, G.A.; SAUNDERS, J.L. Inheritance of clonal resistance to *Ceratocystis fimbriata* in cacao hybrids. In: Proceedings of the 8th International Cocoa Research Conference, Cartagena, Colombia, 18-23 Oct. 1981. Colombia: Cocoa Producers' Alliance, 695-702. 1982.

GOITIA, W.; ROSALES, C.J. Relacion entre la incidencia de escolitidos y la necrosis del cacao en Aragua, Venezuela. **Manejo Integrado de Plagas**, v.62, p.65-71. 2001.

HARRINGTON, T.C.; BAKER, C.J.; ALFENAS, A.C. Host specialization of *Ceratocystis fimbriata* in Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, v.26, p.383. 2001.

HEATH, R.N.; WINGFIELD, M.J.; WINGFIELD, B.D.; MEKE, G.; MBAGA, A.; ROUX, J. *Ceratocystis* species on *Acacia mearnsii* and *Eucalyptus* spp. in eastern and southern Africa including six new species. **Fungal Diversity**, v.34, p.41-67. 2009.

HINDS, T.E. Insect transmission of *Ceratocystis* species associated with aspen cankers. **Phytopathology**, v.62, n.2, p.221-225. 1972.

ITON, E.F. Ceratocystis wilt. In: Annual Report on Cacao Research, 1965. St. Augustine, Trinidad: Imperial College of Tropical Agriculture, University of the West Indies, p.44-56. 1966.

ITON, E.F. Studies on a wilt disease of cacao at River Estate. II. Some aspects of wind transmission. In: Annual Report on Cacao Research, 1959-1960. St Augustine, Trinidad: Imperial College of Tropical Agriculture, University of the West Indies, 47-58. 1960

KAMGAN NKUEKAM, G.; WINGFIELD, M.J.; MOHAMMED, C.; CARNEGIE, A.J.; PEGG, G.S.; ROUX, J. *Ceratocystis* species, including two new species associated with nitidulid beetles on *Eucalyptus* in Australia. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.101, p.217–241. 2012.

KAMGAN NKUEKAM, G; WINGFIELD, M.J.; ROUX, J. *Ceratocystis* species, including two new taxa, from *Eucalyptus* trees in South Africa. **Australasian Plant Pathology**, v.42, p.283–311. 2013.

LACERDA, D. R.; ACEDO, M. D. P.; FILHO, J. P. de L.; LOVATO, M. B. A técnica de RAPD: uma ferramenta molecular em estudos de conservação de plantas. **Lundiana**, v.3, n.2, p.87-92. Instituto de Ciência Biológicas, UFMG. 2002.

LAIA, M. L.; ALFENAS, A. C.; HARRINGTON, T. C. Isolation, detection in soil and inoculation of *Ceratocystis fimbriata*, causal agent of wilting, dieback and canker in eucalyptus. **Fitopatologia Brasileira**, v.25, p.384-385, 2000.

MA, Z.; BOEHM, E. W. A.; LUO, W.; MICHAILIDES, T. J. Population structure of *Botryosphaeria dothidea* from Pistachio and other hosts in California. **Phytopathology**, v.91, n.7, p.665-672. St. Paul. 2001.

MAFIA, R. G.; ALFENAS, A. C.; FERREIRA, E. M.; BINOTI, D. H. B. Método de seleção e identificação de fontes de resistência à murcha do eucalipto causada por *Ceratocystis fimbriata.* **Revista Árvore**, Viçosa-MG, v.35, n.4, p.817-824, 2011.

MARIN, M.; CASTRO,B.; GAITAN, A.; PREISIG, O.; WINGFIELD, B. D.; WINGFIELD, M. J. Relationships of *Ceratocystis fimbriata* isolates from Colombia coffee-growing regions based on molecular data and pathogenicity. **Journal of Phytopathology**, v.151, p.395-405. Berlin. 2003.

MARTIN, W. J. Varietal reaction to *Ceratostomella fimbriata* in sweet potato. **Phytopathology**, v.44, p.383-387.1954.

MILACH, S.C.K. Marcadores moleculares em plantas. Porto Alegre: UFRGS, 1998.
MOLLER, W. J.; DeVAY, J. E. Insect transmission of *Ceratocystis fimbriata* in deciduous fruit orchards. **Phytopathology**, v.58, p.1499-1508. 1968.

NEI, M. Estimation of average heterozigosity and genetic distance from small number ofindividuals. **Genetics**, v.89, p.583-590. 1978.

OCAMPO, R. F.; MAFLA, B. G.; VICTORA, K. J. I. Mejoramiento genético para resistência a *Ceratocystis fimbriata* en cacao (*Theobroma cacao* L.) In: Proceedings of the 8th International Cocoa Research Conference, Cartagena, Colombia, 18-23 Oct. 1981. Colombia: Cocoa Producers' Alliance, p.725-730. 1982.

OLIVEIRA, L. S. S. **Agressividade de isolados de *Ceratocystis fimbriata* em clone de *Eucalyptus* spp.** 2010. 18f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2010.

PAEZ-REDONDO, A. R.; CASTANO-ZAPATA, J. Respuesta de patrones y copas de citricos a *Ceratocystis fimbriata* Ell. Y Halst., agente causal del secamento o muerte subita. **Fitopatologia Colombiana**, v.25, p.71-78. 2001.

RIBEIRO, I. J. A.; LOURENÇÃO, A. L.; FILHO, O. P.; SOARES, N. B. Seca da mangueira. VII Resistência de cultivares de mangueira ao fungo *Ceratocystis fimbriata* Ell. & Halst. **Bragantia**, v.43, p.237-243. 1984.

RIBEIRO, I. J. A.; MIRANDA, M. A. C. de; BULISANI, E. A.; ALMEIDA, L. d'A. de; LOVADINI, L. A. C.(Costa Lovadini, L.A.); SUGIMORI, M. H.; PARADELA FILHO, O. Breeding Crotalaria. I Self compatibility and resistance to wilt caused by *Ceratocystis fimbriata*. **Bragantia**, v.36, p.291-295. 1977.

RIBEIRO, I. J. A.; ROSSETTO, C. J.; DONADIO, L. C.; SABINO, J. C.; MARTINS, A. L. M.; GALLO, P. B. Mango wilt. XIV Selection of mango (*Mangifera indica* L.) rootstocks resistant to the mango wilt fungus *Ceratocystis fimbriata* Ell. & Halst. **Acta Horticulturae**, v.370, p.159-161. 1995.

RIBEIRO, I. J. A.; ROSSETTO, C. J.; SABINO, J. C.; GALLO, P. B. Seca da mangueira: VIII Resistência de porta-enxertos de mangueira ao fungo *Ceratocystis fimbriata* Ell. & Halst. **Bragantia**, v.45, p.317-322. 1986.

RODAS, C.; ROUX, J.; VAN WYK, M., WINGFIELD, B.D., WINGFIELD, M.J. *Ceratocystis neglecta* sp. nov., infecting *Eucalyptus* trees in Colombia. **Fungal Diversity**, v.28, p.73–84. 2007.

ROSSETTO, C. J.; RIBEIRO, I. J. A. Seca da mangueira. XII Recomendações de controle. **Revista de Agricultura de Piracicaba**, v.65, n.2, p.173-80. 1990.

ROSSETTO, C. J.; RIBEIRO, I. J. A.; GALLO, P. B.; SOARES, N. B.; SABINO, J. C.; MARTINS, A. L. M.; BORTOLETTO, N.; PAULO, E. M. Mango breeding for resistance to diseases and pests. **Acta Horticulturae**, v.455, p.299-304. 1997

ROUX, J. et al. A serious new wilt disease of eucalyptus caused by *Ceratocystis fimbriata* in Central África. **Forest Pathology**, v. 30, p.175-184. 2000.

ROUX, J. et al. Diseases in plantation *Eucalyptus* in Uganda. **South African Journal of Science**, v. 97, p. 16-18. 2001.

ROUX, J.; VAN WYK, M.; HATTING, H.; WINGFIELD, M.J. *Ceratocystis* species infecting stem wounds on *Eucalyptus grandis* in South Africa. **Plant Pathology**, v.53, p.414–421. 2004.

SANTINI, A. & CAPRETTI, P. Analysis of Italian population of *Ceratocystis fimbriata* f.sp. *Platani* using RAPD and minisatellite maker. **Plant Pathology**, v.49, p.461-467. 2000.

SILVA-MANN, R., SALGADO, K.C.C., VIEIRA, M.G.G.C. & MACHADO, J.C. Variabilidade genética de isolados do complexo C*olletotrichum* associados a sementes de algodoeiro, por meio de técnicas moleculares e inoculação em plantas**. Fitopatologia Brasileira**, v.27, n.1, p.027-032. 2002.

SIMMONDS, N. W. Horizontal resistance to cocoa diseases. **Cocoa Growers' Bulletin**, n.47, p.42-52. 1994.

SINCLAIR, W. A.; LYON, H. H.; JOHNSON, W. T. **Diseases of trees and shrubs.** Ithaca: Cornell University Press. 1987. 74 p.

STRINGARI, D. **Sistemática e diversidade genética de isolados de *Guignardia* spp. e *Phyllosticta* sp. nos estados do Paraná e São Paulo.** 2009. 209f. Tese (Doutorado em Genética) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, 2009.

TEVIOTDALE, B.L. & HARPER, D.H. Infection of pruning and small bark wounds in almond by *Ceratocystis fimbriata*. **Plant Disease**, v.75, p.1026-1030. 1991.

VAN WYK, M.; PEGG, G.; LAWSON, S.; WINGFIELD, M.J. *Ceratocystis atrox* sp. nov. associated with *Phoracanthta acanthocera* infestations on *Eucalyptus* in Australia. **Australian Journal of Plant Pathology**, v.36, p.407–414. 2007.

VAN WYK, M.; WINGFIELD, B.D.; MOHALI, S.; WINGFIELD, M.J. *Ceratocystis fimbriatomima*, a new species in the *C. fimbriata sensu lato* complex isolated from *Eucalyptus* trees in Venezuela. **Fungal Diversity**, v.34, p.175-185. 2009.

VAN WYK, M.; WINGFIELD, B.D.; ROUX, J.; KAMGAN NKUEKAM, G.; WINGFIELD, M.J. *Ceratocystis eucalypticola* sp. nov. from *Eucalyptus* in South Africa and comparison to global isolates from this tree. **IMA Fungus**, v.3, p.45–58. 2012.

VAN WYK, M.; WINGFIELD, B.D.; WINGFIELD, M.J. Four new *Ceratocystis* spp. associated with wounds on *Eucalyptus*, *Schizolobium* and *Terminalia* trees in Ecuador. **Fungal Divers**, v.46, p.111–131. 2011.

VIGOUROUX, A.; CHALVON, V.; BOUDON, J. P.; LEMAIRE, J. M.; OLIVIER, R.; DOURADE, M. H. Canker stain of plane tree, last advances in genetic improvement for resistance. **Acta Horticulture**, v. 496, p. 99-101. 1999.

VIGOUROUX, A.; OLIVIER, R. First hybrid plane trees to show resistance against canker stain (*Ceratocystis fimbriata* f. sp. *platani*). **Forest Pathology**, v. 34, issue 5, p. 307-319. 2004.

VUJANOVIC, V.; St ARNOUD, M.; CHALEBOIS, D.; FORTIN, E. First report of *Ceratocystis fimbriata* infecting balsam poplar. **Plant Disease**, v. 82, p.879. 1999.

WALKER, J.; TESORIERO, L.; PASCOE, I.; FORSBERG, L. I. Basal rot of *Syngonium* cultivars and the first record of *Ceratocystis fimbriata* from Australia. **Australasian Plant Pathology**, v.17, n.1, p.22-23. 1988.

WALTER, J. M. **Canker stain of plane trees**. USDA Circular, nº 742. 1946.

WALTER, J. M.; REX, E. G., SCHREIBE, R. The rate of progress and destructiveness of canker stain of planetrees. **Phytopathology**, v. 42, p. 236-9. 1952.

WEEDS, P. L.; CHAKRABORTY, S.; FERNANDES, C. D.; CHARCHAR, M. J. D'A.; RAMESH, C. R.; KEXIAN, Y.; KELEMU, S. Genetic Diversity in *Colletotrichum gloeosporioides* from *Stylosanthes* spp. at Centers of Origin and Utilization. **Phytopathology**, v.93, n.2, p.176-185. 2003.

WELSH, J. & MCCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Research**, v.18, p.7213-7218. 1990.

WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.A. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, v.18, p.6531-6535, 1990.

WINGFIELD, M. J. ***Ceratocystis* and *Ophiostoma*, taxonomy, ecology and pathogenicity.** St. Paul: APS Press. 1993. 293 p.

XAVIER, G. R.; MARTINS, L. M. V.; RUMJANEK, N. G.; FILHO, F. R. F. Variabilidade genética em acessos de cupi analisada por meio de marcadores RAPD. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v.40, n.4, p.353-359. 2005.

YEH, F.C.; YANG, R.C.; BOYLE, T.B.J.; YE, Z.H.; MAO, J.X. **POPGENE, the User-riendly Shareware for Population Genetic Analysis.** Molecular Biology and Biotechnology Centre. University of Alberta, Edmonton, Alberta, Canada. 1997.

YU, L.; ZOU, L.; CHEN, X. L.; GAO, L. L.; HUANG, Q.; CHEN, H. R. Genetic diversity analysis of *Ceratocystis fimbriata* strains isolated from China. **Acta Phytopathologica Sinica**, v.41, n.4, p.345-351. 2011.

ZAUZA, E.A.V., ALFENAS, A.C. & THORPE, D. **Incidência de *Ceratocystis fimbriata* em plantios comerciais de *Eucalyptus* spp. na Veracel Celulose.** Parecer Técnico-Científco. 2003. 25p.

ZAUZA, E.A.V., ALFENAS, A.C., HARRINGTON, T.C., MIZUBUTI, E.S. & SILVA, J.F. Resistance of *Eucalyptus* clones to *Ceratocystis fimbriata*. **Plant Disease**, v.88, p.758-760. 2004.