

Lucas Veiga Ayres Pimenta

**DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Ceratocystis fimbriata* EM *Eucalyptus* spp.
NO 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
Dezembro/2014

Lucas Veiga Ayres Pimenta

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

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

APROVADO em dezembro/2014

Prof. Acelino Couto Alfenas
(ORIENTADOR)

Lúcio Mauro da Silva Guimarães
(CO-ORIENTADOR)

Leonardo Sarno Soares Oliveira

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Robinson Ayres Pimenta e Maura Gerbi Veiga, pelo amor, incentivo, paciência, conhecimento e por terem me ensinado que “Não importa o quão estreito seja o portão e quão repleta de castigos seja a sentença, eu sou o dono do meu destino, eu sou o capitão da minha alma”.

Ao meu irmão, Daniel Veiga Ayres Pimenta, e minha cunhada, Nathalia Duarte Ayres, pela fé depositada em mim e por me ensinarem que não importa como, mas o importante é ser feliz.

A todo o restante de minha família, em especial a minha Tia Tânia Gerbi, por ser meu segundo porto seguro.

Ao professor Acelino Couto Alfenas pela orientação, oportunidades oferecidas e, acima de tudo, por acreditar em meu potencial.

Ao Lúcio Guimarães, pelo conhecimento passado e auxílios no desenvolvimento deste projeto

A Denise Valdetaro pelo companheirismo e conselhos ao longo da realização deste trabalho.

Ao meu amigo Leonardo Sarno pela grande ajuda na realização deste trabalho, pelos conhecimentos passados, mas, principalmente, pela grande amizade que criamos.

As amizades construídas no PATOMOL que sem dúvida fizeram de meus longos dias de trabalho mais alegres e prazerosos,

A todos meus grandes “amigos-irmãos”, especialmente aos integrantes da Família Adultério e aos meus amigos de Ipatinga-MG , que podem ter certeza que sem vocês eu não conseguiria realizar esse trabalho, porque a amizade é o ingrediente mais importante na receita da vida.

À Universidade Federal de Viçosa e aos Professores do Departamento de Engenharia Florestal, em especial aos Professores Helio Garcia Leite e Angélica de Cassia Carneiro, pelas experiências compartilhadas, ensinamentos e formação profissional.

BIOGRAFIA

Lucas Veiga Ayres Pimenta, filho de Robinson Ayres Pimenta e Maura Gerbi Veiga, nasceu em 6/2/1988 em Belo Horizonte, Minas Gerais.

Estudou na Escola Educação Criativa, Ipatinga-MG, de 1991 a 2005, onde concluiu o Ensino Fundamental e o Ensino Médio.

No início de 2007, ingressou no curso de Zootecnia na Universidade Federal de Lavras (UFLA), abandonando-o no final do primeiro semestre de 2007.

Em 2009, ingressou no Curso de Engenharia Florestal na Universidade Federal de Viçosa (UFV). É, atualmente, bolsista de Iniciação Científica, nesta universidade, na área de Patologia Florestal sob a orientação do Prof. Acelino Couto alfenas. Foi também estagiário na área de Meteorologia em Sistemas Florestais e em Manejo Florestal. Foi membro efetivo da Empresa Júnior do departamento de Engenharia Florestal da UFV.

Concluirá o curso de Engenharia Florestal, pela Universidade Federal de Viçosa, em janeiro de 2015.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	ii
BIOGRAFIA	iv
EXTRATO	vii
ABSTRACT	ix
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	1
1.1 História e importância do eucalipto no Brasil.....	1
1.2 Murcha-de-ceratocystis	2
1.2.1 Importância do <i>C. fimbriata</i> no setor florestal, principalmente na eucaliptocultura	2
1.2.3. Sintomatologia	4
1.2.4. Disseminação	6
1.2.5. Controle e prevenção da murcha-de-ceratocystis	7
1.3. Marcadores Moleculares	8
1.3.1. Técnicas moleculares utilizadas para o estudo de estrutura genética	8
1.3.2. Marcadores microssatélites	8
2. INTRODUÇÃO	10
3.OBJETIVO.....	12
4. MATERIAL E MÉTODOS	13
4.1. Isolamento do fungo.....	13

4.2. Obtenção das culturas monoascópicas	15
4.3. Extração e quantificação do DNA.....	15
4.4. Genotipagem (Marcadores microssatélites – SSRs)	16
4.5 Análises SSRs	17
5. RESULTADOS.....	19
5.1. Isolamento do <i>C. fimbriata</i>	19
5.2. Análise da diversidade genética	21
6. DISCUSSÃO	27
7. CONCLUSÕES	29
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	30

EXTRATO

Pimenta, Lucas Veiga Ayres. Monografia do curso de graduação em Engenharia Florestal. Universidade Federal de Viçosa, Setembro de 2014. **Diversidade genética de *Ceratocystis fimbriata* em *Eucalyptus* spp. no sul da Bahia.** Orientador: Acelino Couto Alfenas. Co-orientadores: Lúcio Mauro da Silva Guimarães e Leonardo Sarno Soares Oliveira.

A murcha-de-ceratocystis causada pelo fungo *Ceratocystis fimbriata* em eucalipto é, atualmente, uma das mais importantes doenças que ocorre na cultura do eucalipto. Seu controle é realizado mediante o plantio de plantas resistentes. Embora a seleção de genótipos resistentes seja eficiente para o controle da doença, recentes estudos tem revelado uma alta variabilidade genética e patogênica nas populações de isolados de *C. fimbriata*, o que pode comprometer a correta seleção de materiais resistentes. Assim, o presente estudo teve como objetivo determinar a diversidade genética de isolados de *C. fimbriata* obtidos de *Eucalyptus* spp. na região do sul da Bahia, Brasil, por meio de marcadores microssatélites. Dos 36 isolados obtidos, 31 foram distribuídos em quatro diferentes populações, que foram divididas de acordo com os municípios da obtenção dos isolados. Os cinco isolados pertencentes aos municípios que não conseguiram gerar uma população, foram utilizados somente nas análises de indivíduos. Dos 13 marcadores SSR utilizados sete marcadores foram polimórficos para os isolados estudados, obtendo 25 genótipos dentre os 36 isolados. Uma baixa movimentação dos

genótipos foi observada entre as populações estudadas. Altos valores de diversidade gênica de Nei (H) e diversidade genotípica (G) foram observados, principalmente, nas populações de Porto Seguro e Canavieiras. Esses altos valores de diversidade gênica e genotípica nas populações de *C. fimbriata* em *Eucalyptus* no sul da Bahia indica que o fungo é nativo desta região. A análise de variância molecular (AMOVA) mostrou que a principal fonte de variação ocorre dentro de populações, o que indica a existência de baixo fluxo gênico.

ABSTRACT

Pimenta, Lucas Veiga Ayres. Monograph of course Forest Engineering. Universidade Federal de Viçosa, September, 2014. **Genetic variability of *Ceratocystis fimbriata* on *Eucalyptus* spp. in southern Bahia.** Advisor: Acelino Couto Alfenas. Co-advisers: Lúcio Mauro da Silva Guimarães, Leonardo Sarno Soares Oliveira.

Currently, Ceratocystis wilt caused by *Ceratocystis fimbriata* is one of the most important diseases in *Eucalyptus*. The main strategy for controlling the disease is done by planting of resistant genotypes. Although the selection of resistant *Eucalyptus* is effective, recent studies have revealed a high pathogenic variability among isolates of *C. fimbriata*. Thus, the present study aimed to determine the genetic diversity of *C. fimbriata* isolates obtained from *Eucalyptus* in Southern Bahia, Brazil. Samples were collected in two different regions from four *Eucalyptus* clones. Samples were collected from plants exhibiting typical symptoms of the disease such as wilting and xylem discoloration and then sent to the Forest Pathology Lab at UFV for isolation of the fungus using carrot baits. A total of thirty six isolates were obtained and distributed into four different populations. The DNA was extracted from all isolates and subsequently submitted to PCR using 13 microsatellites markers. Seven microsatellite loci were polymorphic, and high values of Nei's gene diversity (H) and genotypic diversity (G) was observed in populations from Porto Seguro and Canavieiras. These high

values of gene and genotypic diversity of populations of *C. fimbriata* on *Eucalyptus* in southern Bahia indicate that the fungus is native to this region. The analysis of molecular variance (AMOVA) showed that the main source of variation occurs within populations, and indicate that low gene flow is occurring.

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 História e importância do eucalipto no Brasil

O *Eucalyptus* spp. é nativo da Austrália e ocupa cerca de 80% do território florestal australiano, onde são encontradas mais de 700 espécies do gênero (ASFM, 2007). No Brasil, o seu cultivo comercial iniciou em 1904, por Edmundo Navarro de Andrade, para atender a demanda de dormentes para as ferrovias da Companhia Paulista de Estradas de Ferro do Estado de São Paulo (BRACELPA, 2014).

Até 1965, haviam sido plantados, aproximadamente, 470.000 ha de eucalipto em todo Brasil, e, em torno de 80% do plantio, situava-se no estado de São Paulo. Entre 1966 e 1986, último ano vigente da lei dos incentivos fiscais, foram plantados 3,2 milhões de hectares de *Eucalyptus* spp. (Pereira et al., 2000). Contudo, mesmo depois da abolição dos incentivos fiscais, a implantação de eucalipto no Brasil continuou crescente, devido à boa adaptação do eucalipto a diversas regiões do território brasileiro; crescimento relativamente rápido e alta capacidade de rebrota permitindo sua exploração por talhadia em relação a outras essências florestais; por apresentar um fácil manejo tecnológico e silvicultural (Ferreira et al., 2006); e porque a tecnologia desenvolvida no cultivo do eucalipto está fortalecida e completamente absorvida pelas indústrias florestais (Pereira et al., 2000). Além disso, a madeira do eucalipto apresenta características físicas e mecânicas favoráveis ao desenvolvimento de diversos produtos, tais como: carvão, celulose e papel, produtos serrados, laminados, moirões, dormentes,

dentre outros(Valverde, 2009)o que fortalece a preferência pela utilização das espécies do gênero *Eucalyptus*.

A receita bruta do setor florestal brasileiro de 2013, girou em torno de 60 bilhões de reais, correspondente a 6% PIB do país e gerou cerca de 5 milhões de empregos diretos e indiretos, ou seja, aproximadamente 5% da população brasileira economicamente ativa (ABRAF, 2013). Há, atualmente, no Brasil 7,2 milhões de hectares de plantações florestais, sendo 5 milhões de hectares somente de eucalipto(ABRAF, 2013).

1.2 Murcha-de-ceratocystis

Com a crescente expansão da cultura do eucalipto, doenças causadas por fungos e bactérias tem ocorrido com mais frequência, ocasionando perdas econômicas importantes. Dentre as principais doenças destaca-se quanto aos prejuízos que podem ocasionar a ferrugem, causada pelo fungo *Puccinia psidii*, a murcha-de-ceratocystis, causada por *Ceratocystis fimbriata*, a mancha-de-pteridis, causada por *Calonectria pteridis*; além de duas doenças de origem bacteriana, a murcha-de-ralstonia e a murcha e seca-de-ponteiros, causadas respectivamente por *Ralstonia solanacearum* e *Erwinia psidii* (Alfenas et al., 2009). Das doenças citadas acima, a murcha-de-ceratocystis tem sido considerada por muitos como a doença que pode se tornar limitante para a cultura.

1.2.1 Importância da murcha-de-ceratocytis

Ceratocystis fimbriata foi relatado causando doença em eucalipto no final da década de 1990 no estado da Bahia (Brasil) (Ferreira et al., 1999), embora o fungo já tenha sido identificado desde a década de 1960, causando doença em mangueira (*Mangifera indica*) (Batista, 1960). Após o relato da doença no Brasil, *C. fimbriata* foi identificado em *Eucalyptus* spp. na República do Congo (Roux et al., 2000), em Uganda (Roux et al., 2001), no Uruguai (Barnes et al., 2003b), na África do Sul (Roux et al., 2004). Em materiais suscetíveis, a doença pode reduzir 87% do crescimento volumétrico e 13,7% do rendimento em celulose, além de inviabilizar o uso da madeira para a serraria(Maffia et al 2013).

Ceratocystis fimbriata tem grande relevância na área da Patologia Florestal por ter uma ampla dispersão geográfica, variada gama de hospedeiros (Tabela 1) e causar perdas significativas aos hospedeiros (Alfenas et al., 2009).

Tabela 1 – Gama de hospedeiros e distribuição de *Ceratocystis fimbriata* s.l., em culturas agrônômicas e florestais no Brasil

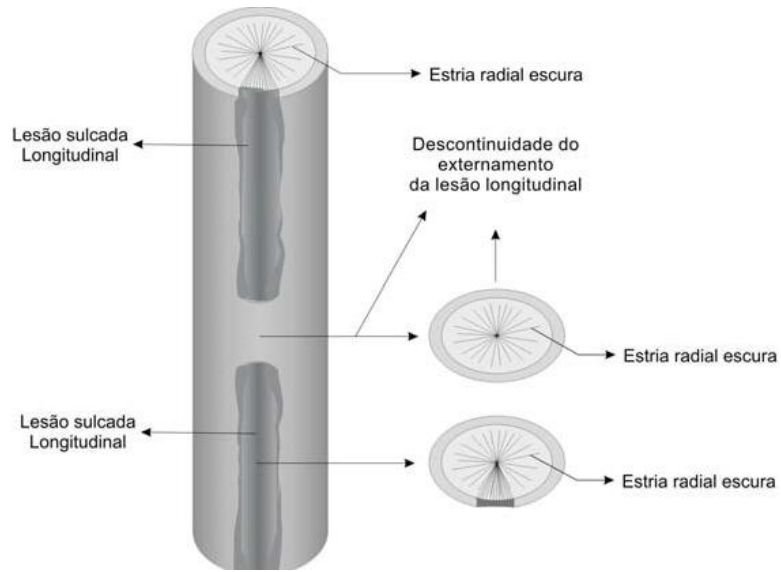
Plantas hospedeiras	Família	Estado	Referência
<i>Acaciadecurrens</i>	Leguminosae	SP	Ribeiro <i>et al.</i> , 1988
<i>Acaciamearsnii</i>	Leguminosae	RS	Santos e Ferreira, 2003.
<i>Annona squamosa</i>	Annonaceae	RJ	Silveira <i>et al.</i> , 2006.
<i>Cajanus indicus</i>	Leguminosae	SP	Viégas, 1944.
<i>Cassia renigera</i>	Leguminosae	SP	Ribeiro <i>et al.</i> , 84; 1987.
<i>Cassia fistula</i>	Leguminosae	SP	Galli, 1958.
<i>Colocasia esculenta</i>		SP	Harrington <i>et al.</i> , 2005.
<i>Crotalaria juncea</i>	Leguminosae	SP/MG/CE /PE/DF	Costa e Krug 1935, Chardon <i>et al.</i> , 1940; Viégas, 1944, Batista, 1947, 1960; Melo Filho <i>et al.</i> , 2002.
<i>Crotalaria expectabilis</i>	Leguminosae	SP	Viégas, 1944.
<i>Crotalaria retusa</i>	Leguminosae	SP	Galli, 1958.
<i>Daucus carota</i>		RJ	Carvalho e Carmo, 2003.
<i>Eucalyptus</i>	Mirtaceae	BA/MS/MG/ SP/MA/ES	Ferreira, <i>et al.</i> , 1999; Ferreira, 2005; Alfenas <i>et al.</i> , 2004.
<i>Ficus carica</i>	Moraceae	SP	Figueiredo e Pinheiro, 1969; Valarini e Tokeshi, 1980.
<i>Gmelina arbórea</i>	Verbenaceae	PA/SP	Muchovej <i>et al.</i> , 1978; Ribeiro, 1982.
<i>Hevea brasiliensis</i>	Euphorbiaceae	PA/SP	Albuquerque <i>et al.</i> 1972; Silveira <i>et al.</i> , 1986; 1994.
<i>Lactuca sativa</i>	Chicoriaceae	RR	Halfeld-Vieira e Nechet, 2006.
<i>Mangifera indica</i>	Anacardiaceae	SP/PE/BA/RJ/ MG/CE/PI	Arruda, 1940; Viégas, 1960; Batista, 1960; Lima <i>et al.</i> , 2000; Silveira <i>et al.</i> , 2006; Rossetto e Ribeiro, 2001.
<i>Nicotiana tabacum</i>	Solanaceae	SP	Viégas, 1944.
<i>Persea americana</i>	Lauraceae	PE	Mariano e Menezes, 1989.
<i>Ricinus communis</i>	Euphorbiaceae	SP	Viégas, 1944.
<i>Spathodea campanulata</i>	Bignoniaceae	PE	Mariano e Menezes, 1989.

Além da Bahia, onde foi relatado inicialmente, *C. fimbriata* já foi relatado em plantios de eucalipto nos estados de São Paulo, Minas Gerais, Maranhão, Pará, Mato

Grosso do Sul e Alagoas, afetando, aproximadamente, 15 diferentes clones comerciais (Alfenas et al., 2009; Oliveira, 2010). Acredita-se, porém, que atualmente, a doença afete um número maior de clones. Em torno de 75% dos clones, inoculados no Laboratório de Patologia Florestal da UFV e na Clonar Resistência a Doenças Florestais, são suscetíveis a esta enfermidade (Alfenas, A. C. informação pessoal 2014).

1.2.3. Sintomatologia

A murcha-de-ceratocystis é considerada uma doença vascular. O patógeno progride no interior do lenho do eucalipto, com infecções iniciadas a partir das raízes, atingindo depois o colo e tronco, via parênquima medular, de onde, em diversas alturas, surgem estrias escuras. Estas progridem, pelo parênquima radial, matando uma porção de câmbio vascular, de floema e de feloderme (Ferreira et al., 2006). Dessa progressão vascular do patógeno de forma ascendente e radial, resulta uma lesão longitudinal externa ao tronco, contínua ou descontínua, marrom-avermelhada, coriácea, que passa a sulcada e, posteriormente, a cancro longitudinal, com seus calos longilíneos nas duas laterais (Figura1) (Ferreira et al., 2006). As plantas infectadas geralmente murcham, porém suas folhas tendem a permanecer presas aos ramos, dando origem a brotações epicórmicas ao longo do fuste, devido às decorrentes alterações hormonais. Outros sintomas pela doença são “die-back”, cancro, morte de ponteiros, o que pode levar à morte da planta (Alfenas et al., 2009). Cortes perpendiculares ao eixo principal das árvores afetadas evidenciam a descoloração radial, o que é sintoma típico da doença (Figura 2)(Alfenas et al., 2009). As lesões longitudinais são contínuas ou descontínuas, negras a arroxeadas. A inativação de xilema em raízes, colo e em diferentes alturas do tronco ou galho dá-se pelo adensamento das estrias radiais escuras no lenho (Ferreira et al., 2006), o que leva à redução do diâmetro de elementos condutores. Essa redução pode ser influenciada por diferentes fatores, incluindo a própria presença de estruturas do patógeno, seus metabólitos, enzimas extracelulares ou, ainda, pela formação de substâncias como gomas e tiloses (Aguirreolea et al., 1995; Pascual et al., 2010).



Fonte: (Ferreira et al., 1997). **Figura1-** Desenho esquemático do externamento de lesões longitudinais causadas por *Ceratocystis fimbriata* em *Eucalyptus grandis* e respectivas secções transversais



Fonte: (Alfenas al., 2009).

Figura2 – Sintomas causados por *Ceratocystis fimbriata* em eucalipto: A - Escurecimento dos vasos do xilema. B - Planta murcha.

1.2.4. Disseminação

Sabe-se que a disseminação de *C. fimbriata* ocorre por meio de suas estruturas fúngicas, como micélio, conídios, aleuroconídios ou ascósporos. Os aleuroconídios constituem, provavelmente, a unidade de sobrevivência mais eficiente, devido a sua parede celular compacta, o que facilita, também, a sobrevivência no solo (Accordi, 1989). O patógeno produz um odor frutado e forte, o que é uma adaptação favorecedora da sua dispersão por insetos, que são atraídos para as plantas doentes e podem ficar cobertos por estruturas do fungo (Teviotdale & Harper, 1991). Coleobrocas da Família *Scolytidae*, pertencente aos gêneros *Xyleborus* e *Hypocryphalus*, foram identificadas, envolvidas na dispersão e disseminação do fungo em *Populus* (Hinds, 1972), *Prunus* (Moller et al., 1969) e em *M. indica* (Viégas, 1960; Ribeiro, 1980; Yamashiro & Myazaki, 1985). Sugere-se que os insetos coleobrocas adquirem o inóculo de *C. fimbriata* e contribuem para a dispersão em plantas suscetíveis. Além disso, os esporos de *C. fimbriata* também podem ser carregados sobre os corpos de besouros *Ambrosia* e podem sobreviver ao passarem pelo intestino do inseto (Iton, 1960; Crone, 1963). As coleobrocas ainda perfuram o lenho das árvores infectadas, produzindo galerias e expulsando serragem (Goitia & Rosales, 2001), e este material infectado contém estruturas infectivas que podem ser disseminadas pelo vento (Iton, 1960). A maioria das coleobrocas pertencem aos gêneros *Xyleborus* e *Hypocryphalus* (Goitia & Rosales, 2001; Wingfield & Robinson, 2004).

Foi constatada, também, a infecção por *C. fimbriata* em *Ipomoea*, através de ferimentos feitos por insetos e roedores. Em eucalipto, porém, de acordo com Ferreira et al. (2006), foram observadas perfurações, ocasionadas por insetos, somente em lesões mais velhas, sendo essa associação interpretada como não precursora da doença. Contudo, quando os insetos saem das galerias de lenho infectado, eles podem transmitir endoconídios e clamidósporos do patógeno para outras plantas lenhosas, que estiverem com o xilema alterado por fator abiótico ou biótico (Sinclair et al., 1987; Baker & Harrington, 2004).

Um dos métodos mais efetivos de disseminação da doença é por meio de material propagativo infectado. Sabe-se que o fungo tem sido disseminado para novos

países e regiões por estacas de *Populus* sp., *Theobroma* sp., *Eucalyptus* spp. e *Syngonium* sp., e, por raízes de *Ipomoea* sp (Baker et al., 2003). Existem evidências de que a introdução, na Europa, de *C. fimbriata* f. *platani*, que em *Platanus*, tenha ocorrido devido à entrada de embalagens contaminadas com o inóculo do fungo, enviadas da América do Norte para a Europa, na época da Segunda Guerra Mundial (Panconesi, 1981, 1999). Isto ocasionou danos significativos aos indivíduos de *Platanus* no sul da Europa, sendo listada como praga quarentenária A2 (OEPP/EPPO, 1986). No campo, ferimentos de poda constituem portas de entrada para *C. fimbriata*, já 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, demonstrando, assim, o risco de condução de brotações, a partir de plantios sabidamente infectados pela doença.

1.2.5. Controle e prevenção da murcha-de-ceratocystis

Em *Platanus* sp. (Walter, 1946; Walter et al., 1952) e em *Prunus* sp. (Teviotdale e Harper, 1991), a desinfestação, com solução de hipoclorito de sódio a 2% em água, das ferramentas de poda, auxilia no controle da doença. No caso do eucalipto, em função da sua grande escala, essas medidas podem e devem ser adaptadas. Sendo assim, recomenda-se 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. Recomenda-se, em relação às mudas para plantio, eliminar qualquer material propagativo infectado e comprovar a sanidade das cepas ou minicepas utilizadas para a produção de propágulos vegetativos.

O controle químico, também, tem sido utilizado em alguns casos específicos, como em seringueira (Chee, 1970; Albuquerque, 1972; Silveira et al., 1985). Todavia, para o eucalipto, não se recomenda controle químico devido à natureza vascular das lesões.

A existência da variabilidade genética inter e intraespecífica para a resistência à murcha-de-ceratocystis em eucalipto faz com que a seleção de genótipos resistentes seja a melhor estratégia de controle da doença (Zauza et al., 2004; Fonseca et al., 2010).

Além do eucalipto, a utilização de genótipos resistentes no plantio tem sido um método de controle eficiente para mangueira (*M. indica*)(Ribeiro et al., 1984; Ribeiro et al., 1986; Ribeiro et al., 1995; Rossetto et al., 1997);*Ipomoea* (Martin, 1954) e *Crotalaria* (Ribeiro et al., 1977).Sabe-se, no entanto, que com o tempo a resistência pode ser suplantada, semelhante ao ocorrido no Equador, em 1957, onde mais de 40.000 cacauzeiros morreram em uma única plantação.

1.3. Marcadores Moleculares

1.3.1. Técnicas moleculares utilizadas para o estudo de estrutura genética

Os marcadores moleculares são qualquer fenótipo molecular, proveniente de um gene expresso (isoenzima) ou de um segmento específico de DNA, que correspondem a regiões expressas ou não do genoma (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Os marcadores têm sido utilizados, em análises genéticas, para várias finalidades, como: identificação de clones, linhagens, híbridos, cultivares; em teste de paternidade; em estimativa de diversidade, taxa de cruzamento, parentesco e na construção de mapas genéticos (Buso et al., 2003).

Os marcadores moleculares mais comumente utilizados para estudos de estrutura genética de populações são o RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), o RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), o AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphisms), SSR (Simple Sequence Repeats) (Baker et al., 2003; De Beer et al., 2006). Atualmente, os microssatélites, desenvolvidos por Steimel et al. (2004), são os marcadores mais usados nos estudos de diversidade genética de *C. fimbriata*.

1.3.2. Marcadores microssatélites

Microsatélites ou sequências simples repetidas (simple sequence repeats; SSRs) são marcadores moleculares codominantes, relativamente abundantes em fitopatógenos eucariotos e estão distribuídos por todo genoma (Weising et al., 1995), apresentam variações de comprimento entre os alelos (Hancock, 1999; Schlötterer & Wiehe, 1999). As regiões microsatélites consistem de unidades mono, di, tri, tetra ou pentanucleotídica repetidas ao acaso, dispersas por todo o genoma (Hamada et al., 1982). Os microsatélites são classificados de acordo com a composição das sequências repetidas: (a) repetições perfeitas, quando não apresentam interrupção, por exemplo: CACACACACACA; (b) repetições imperfeitas, quando são interrompidas por bases que não correspondem ao padrão, por exemplo: CACACACATCACACA; (c) repetições compostas, quando duas ou mais classes de repetições de microsatélites estão dispostas de forma adjacente, por exemplo: CACACACACAGTGTGTGTGTGT (Borém & Caixeta, 2006).

São necessários, no mínimo, oito nucleotídeos repetidos em tandem (Chamber & Macavoy, 2000), para se iniciar um processo de origem de uma região de microsatélite. Estudos têm apontado, como o principal mecanismo de formação e amplificação de SSR, o *slippage* ou deslizamento da polimerase. Acredita-se que, durante a replicação de uma região repetitiva, as fitas de DNA separam-se e se unem, novamente, de forma incorreta. Isto geraria cópias de trechos de DNA com diferentes tamanhos ou números de repetições no próximo ciclo de replicação, por meio da inserção ou deleção de uma unidade de repetição (Schlotterer & Tautz, 1992; Fields & Wills, 1996). O grande valor desta classe de marcadores moleculares reside em sua natureza multialélica e em sua transmissão co-dominante; por ser de fácil detecção por PCR; ser de relativa abundância; ter extensiva cobertura do genoma; por necessitar de quantidade mínima de DNA para análise genética (Johansson et al., 1992); ter alta reprodutibilidade e polimorfismo; e, ser uma técnica simples de ser realizada e de baixo custo (Borém & Caixeta, 2006).

Os microsatélites permitem analisar, com eficiência, a estrutura genética das populações por apresentarem um conteúdo informativo por locus gênico maior do que outros marcadores moleculares. Permitem observar diferenças genéticas em populações separadas por poucos quilômetros (Costa-Ribeiro et al., 2006), ou ainda, analisar a mesma população, em momentos temporais distintos (Lehmann et al., 2003). Segundo

Hanski & Gilpin (1997), a detecção da variabilidade genética, em nível intra-específico ao longo de gradientes geográficos e, ou temporais, é capaz de fornecer dados suficientes para estimar se uma população está em extinção, expansão ou em equilíbrio.

2. INTRODUÇÃO

O eucalipto (*Eucalyptus*spp.) é a principal espécie florestal cultivado no Brasil. Ocupa, atualmente, mais de 5 milhões de hectares (ABRAF, 2013). Possui grande importância comercial e estratégica, por tratar-se de matéria-prima destinável a diversos segmentos econômicos importantes, como: celulose e papel, siderurgia de carvão vegetal, painéis de madeira, produtos sólidos de madeira, entre outros (ABRAF, 2013). A larga utilização das espécies do gênero *Eucalyptus* nas plantações florestais do país decorre de sua boa adaptação nas diferentes regiões do seu território; do seu crescimento relativamente rápido, comparado a de outras essências florestais (Ferreira et al., 2006); de seu fácil manejo tecnológico e silvicultural (Alfenas et al., 2004).

A grande expansão da cultura do eucalipto nas últimas décadas no Brasil levou ao surgimento de doenças que se encontravam endêmicas em determinadas regiões ou foram introduzidas. Dentre as doenças da eucaliptocultura a murcha-de-ceratocystis é considerada como uma das mais importantes, devido à ampla dispersão geográfica do patógeno, à variada gama de hospedeiros e por causar perdas significativas na cultura (Alfenas et al., 2009).

A murcha-de-ceratocystis em eucalipto foi constatada, pela primeira vez no Brasil, em 1997, no sul da Bahia (Ferreira et al., 1999). Hoje, porém, há relatos da ocorrência desta doença nos estados de Minas Gerais, São Paulo, Maranhão, Mato Grosso do Sul, Alagoas e Espírito Santo (Acelino et al., 2009). Entre os sintomas causados por esta doença, pode-se citar o cancro, escurecimento radial do lenho, a partir da medula, o “die-back” e a murcha, o que pode ocasionar a morte da planta (Acelino et al., 2009). É provável que a disseminação do *C.fimbriata*, ocorra através do vento, da água, de materiais vegetais propagativos infectados e, também, em razão das 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 utilização de materiais resistentes (Alfenas et al., 2009) é, atualmente, o único método de controle da doença em eucalipto. Entretanto, a seleção de genótipos resistentes não garante a completa eficiência do controle se não levar em consideração a variabilidade genética do patógeno nas áreas de plantio. O não conhecimento da variabilidade genética do patógeno na área estudada, pode favorecer a ocorrência da

suplantação da resistência por parte do patógeno, tornando um clone resistente em susceptível.

3.OBJETIVO

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a diversidade genética entre isolados de *Ceratocystis fimbriata*, em plantios de *Eucalyptus* spp., localizados no sul da Bahia, utilizando marcadores moleculares microssatélites.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Isolamento do fungo

Foram coletadas amostras de caule de plantas com sintomas da doença, em plantios de seis clones de eucalipto no sul da Bahia (Figura 3). As amostras de madeira foram acondicionadas em saco de papel, identificadas e enviadas para serem processadas no Laboratório de Patologia Florestal, do DFP/BIOAGRO da Universidade Federal de Viçosa (UFV). O fungo foi isolado, utilizando-se o método de isca com cenoura (Alfenas & Mafia, 2007; Laia et al., 2000). Para isso, dois discos de cenoura foram desinfestados superficialmente com detergente e hipoclorito, e entre eles foram adicionados pedaços de madeiras supostamente infectadas. Em seguida, os discos foram incubados em caixas tipo Gerbox® a temperatura ambiente por 10 dias (Figura 4). Após o desenvolvimento do fungo na cenoura, ele foi transferido para placas de Petri (90 x 15mm), contendo o meio de cultura EMLA (2% extrato de malte, 0.2% extrato de levedura, e 2% Agar) (Figura 4).

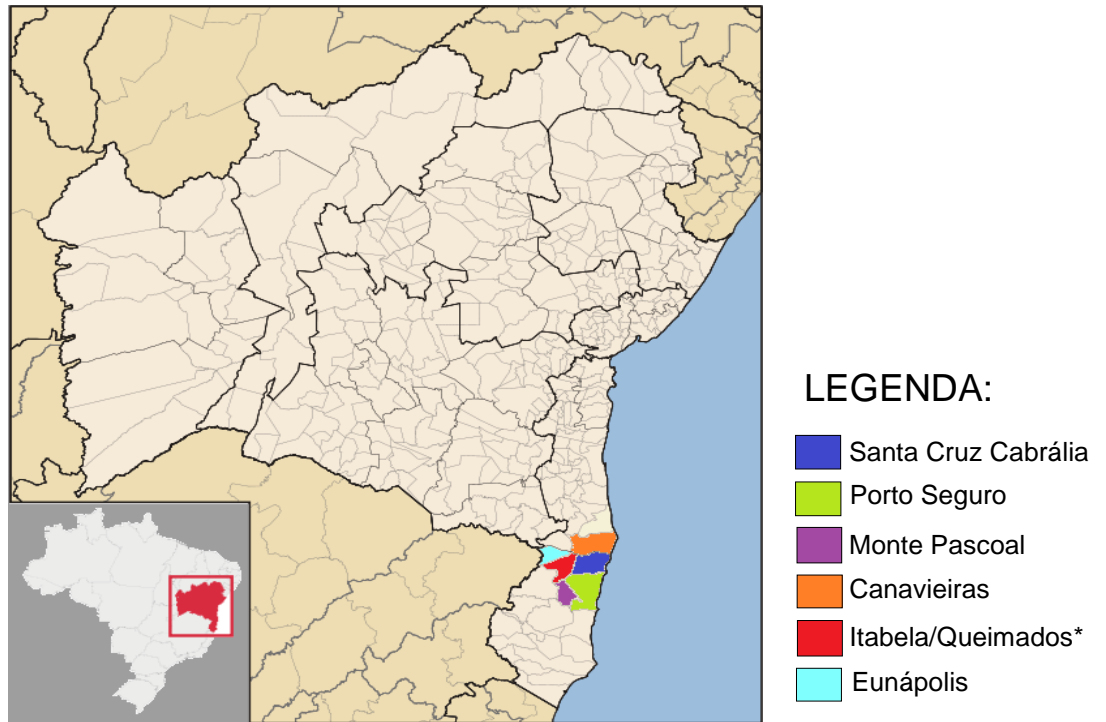


Figura3 -Em destaque no mapa os municípios onde foram coletadas as amostras de madeira com sintomas de murcha-de-ceratocystis, no sul da Bahia. Fonte: Mapa adaptado de Abreu (2006).

*Por serem municípios próximos foram representados juntos no mapa.

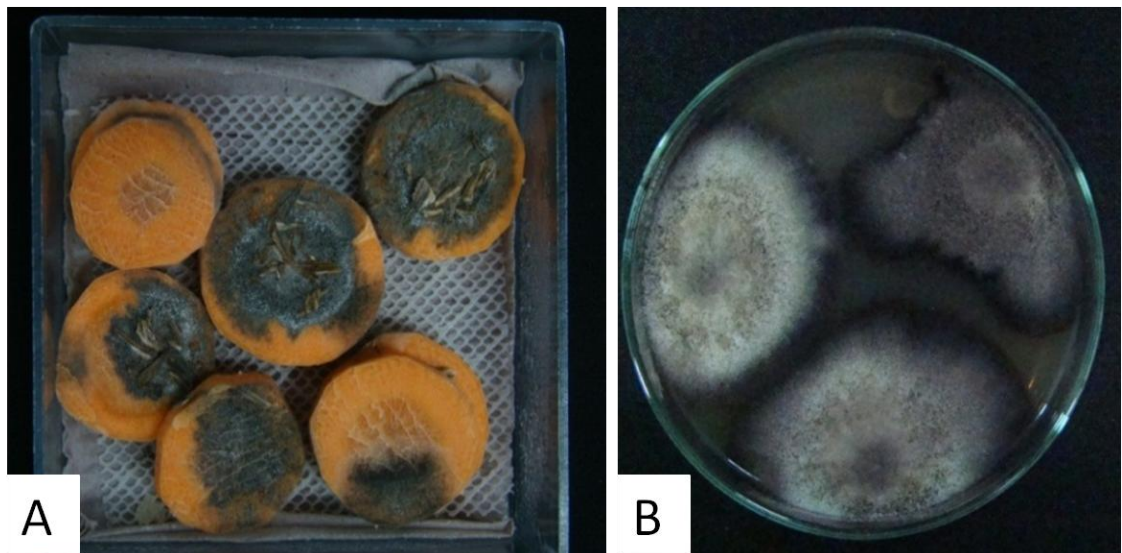


Figura4- Método de isolamento de *Ceratocystis fimbriata*. A – Sanduíches de cenoura utilizados como isca com crescimento do fungo. B – Colônias de *C. fimbriata* em meio EMLA(Extrato-Malte-Levedura-Ágar).

4.2. Obtenção das culturas monoascospóricas

As culturas isoladas foram cultivadas por 21 dias em placas de Petri, contendo o meio de cultura EMLA no qual foi acrescido a Rifamicina, na concentração de 100 µL/mL. Depois deste período, transferiu-se a massa de acósporos de um único peritécio de cada cultura isolada para uma nova placa, contendo o mesmo meio. Posteriormente, as placas foram mantidas a 28°C, com fotoperíodo de 12 horas, em BOD, por 24 horas. Após esse período, um único ascósporo ou conídio (formação em cadeia de endocónidios) foi transferido para o centro de outra placa de Petri, contendo o meio EMLA. Estas placas foram mantidas nas mesmas condições por 21 dias e, em seguida, as culturas foram armazenadas em glicerol 15% a -80°C.

4.3. Extração e quantificação do DNA

Para extrair o DNA, o fungo foi cultivado em placas de Petri, contendo meio de cultura EMLA, 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 Purification Kit*® (Promega Inc.), com as seguintes modificações: inicialmente, transferiu-se o micélio do meio de cultura para um microtubode 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. Depois, foi incubado a -20°C por 5 min. No período seguinte, foram acrescentados 400 µL de solução de lise de núcleo, e novamente o micélio foi macerado no aparelho *TissueLyser III* (Quiagen ®), a 30HZ, por 2 min., seguindo de nova incubação a 65°C, por 15min, sendo invertido a cada 5 min. Após a incubação as amostras foram centrifugadas por 5 min., a 13000 rpm. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubode 1,5 mL onde adicionou-se 300 µL de solução de precipitação de proteína. Os microtubos foram agitados, invertendo-os com cuidado, e centrifugados a 13000 rpm, por 10 min. Em seguida, transferiu-se 500 µL da fase aquosa (sobrenadante) para um novo microtubode 1,5 mL e a eles adicionou-se 500 µL de Fenol:Cloróformio:Álcool

Isoamílico (25:24:1), agitando-se cuidadosamente. As amostras foram centrifugadas a 13000 rpm, por 5 min, e a fase sobrenadante (aquosa) transferida para um novo microtubode 1,5 mL, contendo 600 µL de isopropanol gelado. Posteriormente, as amostras foram incubadas por 12 horas a -20°C, e, logo depois, procedeu-se uma centrifugação por 7 min., a 13000 rpm, e o sobrenadante foi descartado. Em seguida, adicionou-se 600 µL de etanol gelado 70%, agitou-se cuidadosamente os microtubose centrifugaram-se as amostras por 13000 rpm por 5 min. Esta etapa de lavagem foi repetida três vezes para remover o excesso de sais do DNA. O *pellet* resultante foi seco em temperatura ambiente, por 30 min. O DNA foi ressuscitado, acrescentando-lhe 50 µL de solução de reidratação de DNA, acrescida de 1 µL de solução de RNase e incubado a 37°C *overnight* e, posteriormente, foi incubado a 65°C, por 10 min. O DNA obtido de cada isolado foi quantificado no *Nanodrop*® 2000c (Thermo Fisher Scientific Inc.) e a concentração ajustadas para 50 ng.µL⁻¹.

4.4. Genotipagem (Marcadores microssatélites – SSRs)

Foi realizada a PCR com treze pares de primers microssatélites para se proceder a comparação de diversidade genética entre os isolados de *C. fimbriata* (Tabela 2). Um primer marcado com pigmento fluorescente e outro não marcado, flanqueando cada região de três ou quatro pares de bases repetidas, foram usados nas reações de amplificação de PCR (Steimel et al., 2004).

As reações de amplificação dos locos de SSRs foram operadas utilizando-se 25µL de reação, que continha 1,5µL de cada primer, em uma concentração de 10 mM, 10,75µL de água MiliQ, 2µL de DNTP's, 2µL do DNA fúngico na concentração de 50ng/µL, 5µL de Buffer, 2µL de MgCl, 0,25µL de Taq polymerase, sendo os três últimos reagentes pertencentes do Kit da *Promega*®. Os ciclos da PCR foram realizados no Termociclador Veriti® 96 well *Thermal cicler* (Applied Biosystems Inc., EUA). Tal processo é constituído de três etapas. A primeira etapa que é responsável pela desnaturação do DNA foi constituída de um aquecimento de 95°C por 2 min. A etapa seguinte, responsável pela amplificação do DNA possui 35 ciclos, com os seguintes passos: 94°C por 1 min, 60°C por 1 min. e de 72°C também por 1 min. A terceira e última etapa é constituída de uma extensão final realizada a 72°C, por 30min. As PCR's

foram realizadas com apenas um primer marcado com fluorescência (6-FAM, VIC, NED ou PET) por reação. Posteriormente, as amostras foram injetadas por eletroforese capilar no analisador ABI 3500 (Applied Biosystems Inc., EUA), para análises. Os tamanhos dos picos foram determinados com o auxílio do software GeneMapper (Applied Biosystems Inc., EUA).

4.5 Análises SSRs

Os locos se diferenciam pelos tamanhos dos fragmentos. A diversidade gênica de Nei (que serve para avaliar a divergência entre as populações por meio da frequência de alelos) foi calculada pelo software PopGen 1.32 (Yeh & Boyle, 1997). Devido ao diferente tamanho entre as populações obtidas, além do cálculo simples de diversidade genotípica, calculou-se a diversidade genotípica com rarefação por meio do índice *G* de Stoddart e Taylor's (Stoddart & Taylor, 1988) utilizando-se um pacote específico no programa estatístico *R*. As relações entre os genótipos obtidos e também entre as populações dos isolados, foram examinadas usando matrizes de distância genética baseadas na frequência alélica e os dendrogramas gerados por UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) através do software PAUP* (Swofford, 1998). Partição da variância total utilizando Análise de Variância Molecular em distância euclidiana, foi realizada com o auxílio do software Arlequin 1.0 (Excoffier et al., 2005), de modo a determinar a variação dentro e entre as populações.

Tabela 2– Locos, primers, e número de acesso no GenBank de marcadores microssatélite desenvolvidos para isolados de *Ceratocystis fimbriata*

Locos	Primers	Sequências dos primers	Número de Acesso (Genbank)
CfAAG8	AAG8-1F	5'-TAG-ACA-GGG-GGT-GCG-TCA-AA	AY494859
	AAG8-1R	5'-TGT-CTG-CCC-TCC-ACA-TTT-GGT-CTC-TTC	
CfAAG9	AAG9-1F	5'-CCT-GAA-CTG-ACA-GAG-ACA-CTT	AY494860
	AAG9-1R	5'-GCA-CCA-GCT-GTT-CCT-AAT-CGT	
CfCAA9	CCAA9-F	5'-GGC-TGG-TTC-ATC-ATG-ATG-TT	AY494861
	CCAA9-R	5'-CTA-TGG-CAC-CTA-AGC-AAT-CT	
CfCAA10	CCAA10-F	5'-TGA-CAC-GCG-CTT-CAC-TAA-CAG	AY494862
	CCAA10-R	5'-TGC-ACC-ATA-CCC-AGG-GGA-CA	
CfCAA15	CCAA15-F	5'-GCT-ACA-GCA-GCC-GCA-GTG	AY494863
	CCAA15-R	5'-GAT-TGG-CGT-TAG-TGT-TAG-GT	
CfCAA38	CAA38-1F	5'-AAT-TCG-GGA-GCT-GCT-GTG-AG	AY494864
	CAA38-1R	5'-GAG-CCC-CAG-CCT-CAA-ACT-CA	
CfCAA80	CCAA80-F	5'-ACC-CGT-CTC-GTA-TTG-GCT-AT	AY494865
	CCAA80-R	5'-AAT-CGT-TCG-CAT-TCA-GGT-GG	
CfCAT1	DBVCAT1-1F	5'-CCC-AAT-TTC-CCA-TTC-TGA-TTC	AY494866
	WCAT1-1R	5'-AGT-ACA-GGA-TCA-ACT-ATG-GCA-TTT-CAA	
CfCAT1200	CAT12X-1F	5'-ACA-AAA-GAC-GGC-ACG-CAT-ACA	AY494869
	CAT12X-1R	5'-TGG-GGA-GAA-GTC-TGA-GTA-GAG-GGA-CAA	
CfCAG5	CAGDL2-5-1F	5'-AAG-CCC-GGT-TAC-AGA-AGC-AAG	AY494870
	CAGDL2-5-1R	5'-GTG-CTT-GAG-TTT-GTC-CAG-GGT-TCG-GTA	
CfCAG15	CCAG15-F	5'-GGG-CTA-GTA-GCA-GAG-TTG-G	AY494871
	CCAG15-R	5'-GCC-AAT-GTC-TTC-ACA-CCA-C	
CfCAG900	CAG900-1F	5'-CTT-TGC-TAG-TCC-CCA-GTT-CCA	AY494873
	CAG900-2R	5'-GCG-GAC-ATG-GGA-TTG-TAA-GAG-CCT-GAG	
CfGACA650	GACA6K-1F	5'-AAA-CAT-CTC-GGC-AGA-ACA-GC	AY494875
	GACA6X-2R	5'-TGC-CGC-TTT-TGC-TTT-GTA-GTG-TTC-TTG	

Steimel et al., 2004.

5. RESULTADOS

5.1. Isolamento do *C. fimbriata*

Foram coletadas 84 amostras de tecido de lenho infectado, em diferentes plantios de seis clones híbridos de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*. Do total de amostras coletadas, foram obtidos 36 isolados (Tabela 3). Em apenas um clone amostrado, não foi possível o isolamento do fungo, sendo que 75% dos isolados eram provenientes somente de um único clone (Clone 1). Dentre os seis municípios que abrangem os plantios de eucalipto, Porto Seguro e Canavieiras foram responsáveis pela obtenção de mais de 60% dos isolados, sendo 13 isolados de Porto Seguro e 9 de Canavieiras. Os demais municípios apresentaram o seguinte número de isolados: cinco de Santa Cruz de Cabrália, quatro de Queimados, três de Eunápolis e dois de Monte Pascoal. No caso de Itabela não houve isolamento do fungo nas amostras coletadas.

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

5.2. Análise da diversidade genética

Dos 13 marcadores microssatélites analisados, sete foram polimórficos para os trinta e seis isolados utilizados. Apenas a população de Porto Seguro (EucaPTS) (Tabela 4) apresentou polimorfismo no locus CAG15. Foram encontrados 25 genótipos entre os 36 isolados de *C. fimbriata* avaliados, o que demonstra uma alta diversidade genotípica (Figura 5). Os cinco isolados pertencentes aos municípios que não conseguiram gerar uma população, foram utilizados somente nas análises de indivíduos. Tanto a diversidade genotípica (G) quanto a diversidade gênica de Nei (H) foram calculadas para as populações (Tabela 5). A diversidade genotípica foi calculada com rarefação, devido ao fato de as populações não possuírem o mesmo número de indivíduos. Todas as populações tiveram diversidade genotípica acima de 3,00, demonstrando que as populações possuem uma alta diversidade genotípica. Também foram encontrados níveis altos de diversidade gênica de Nei para as populações, que variaram entre 0,1108 e 0,2374. A análise de variância molecular (AMOVA) foi calculada entre as populações e dentro das populações. Da AMOVA, obteve-se uma porcentagem de variação entre as populações de 11,50% e uma porcentagem de variação dentro das populações de 88,50% (Tabela 6), demonstrando que a diversidade genética foi maior intra do que inter populações. Este padrão observado pela AMOVA é típico de populações nativas que se encontram próximas geograficamente e geneticamente.

Tabela 4 - Alelos de microssatélite de populações de *Ceratocystis fimbriata* obtidos de *Eucalyptus spp*, baseados no tamanho aproximado das bandas, determinado pelo software PeakScanner, com o número de isolados testados e nome do município de cada população mostrado em parênteses.

Loci	EucMPC (2) (Monte Pascoal)	EucENA (3) (Eunápolis)	EucQMD (4) (Queimados)	EucSCC (5) (Santa Cruz de Cabralia)	EucCNV (9) (Canavieiras)	EucPTS (13) (Porto Seguro)
AAG8	180	180	180	180	180	180
AAG9	397	397	397	397	397	397
CAA9	174	171, 174	174	174	174, 177	174, 208
CAA10	131	131, 134	131	131	131, 134	131, 134
CAA15	321	321	321, 324	321, 324	321, 324	321, 324
CAA38	238	217, 238	217, 238, 255	174, 238, 255	195, 229, 238, 247, 255	174, 195, 238, 247, 255
CAA80	311	311, 317	311, 317	311, 317	308, 311, 317	311, 317
CAG5	317	317	317	317	317	317
CAG15	259	259	259	259	259	259, 283, 286
CAG900	194	194	194	194	194	194
CAT1	261	261	261	261	261	261
CAT1200	377	377	377	377	377	377
GACA6K	215	215, 221	215	215	215, 221	215, 221

Tabela 5 - Diversidade genética de populações de *Ceratocystis fimbriata* de *Eucalyptus* spp. no sul da Bahia, baseada em 13 marcadores microssatélite.

População	Município	Nº Isolados	Nº haplótipos	Diversidade genotípica (G) ^a	Diversidade gênica de Nei (H)
EucQMD	Queimados	4	3	3.00	0.1250
EucSCC	St Cruz Cabrália	5	4	3.40	0.1108
EucCNV	Canavieiras	9	8	3.83	0.2374
EucPTS	Porto Seguro	13	11	3.78	0.1839

^aDiversidade genotípica de Stoddart and Taylor's com rarefação. Valores de G , com rarefação para populações individuais variando de 1.00 (um único genótipo na população) até um valormáximo de 4.00 (cada isolado da população representa um genótipo diferente).

Foram construídos dois dendrogramas UPGMA, sendo um dendrograma relacionando os genótipos (Figura 5) e o outro fazendo uma relação entre as populações (Figura 6). O dendrograma UPGMA de genótipos, mostrou que eles se repetiram muito pouco entre os isolados, tendo apenas dois genótipos que se repetiram mais vezes, no caso, o genótipo que pertence aos isolados VER 10, VER 17, VER 34 e VER 36, e o genótipo que é representado pelos isolados VER 8, VER 9, VER 28 e VER 32. No dendrograma UPGMA de populações, foram comparadas as populações obtidas neste trabalho com algumas das populações estudadas por Ferreira et al., 2010, o que permitiu constatar uma clara diferenciação entre as populações do estado da Bahia e as populações do estado de Minas Gerais. Das populações pertencentes à Bahia, a mais próxima das populações de isolados de Minas Gerais é a população EucBa1, estudada por Ferreira et al., 2010, localizada no município de Eunápolis.

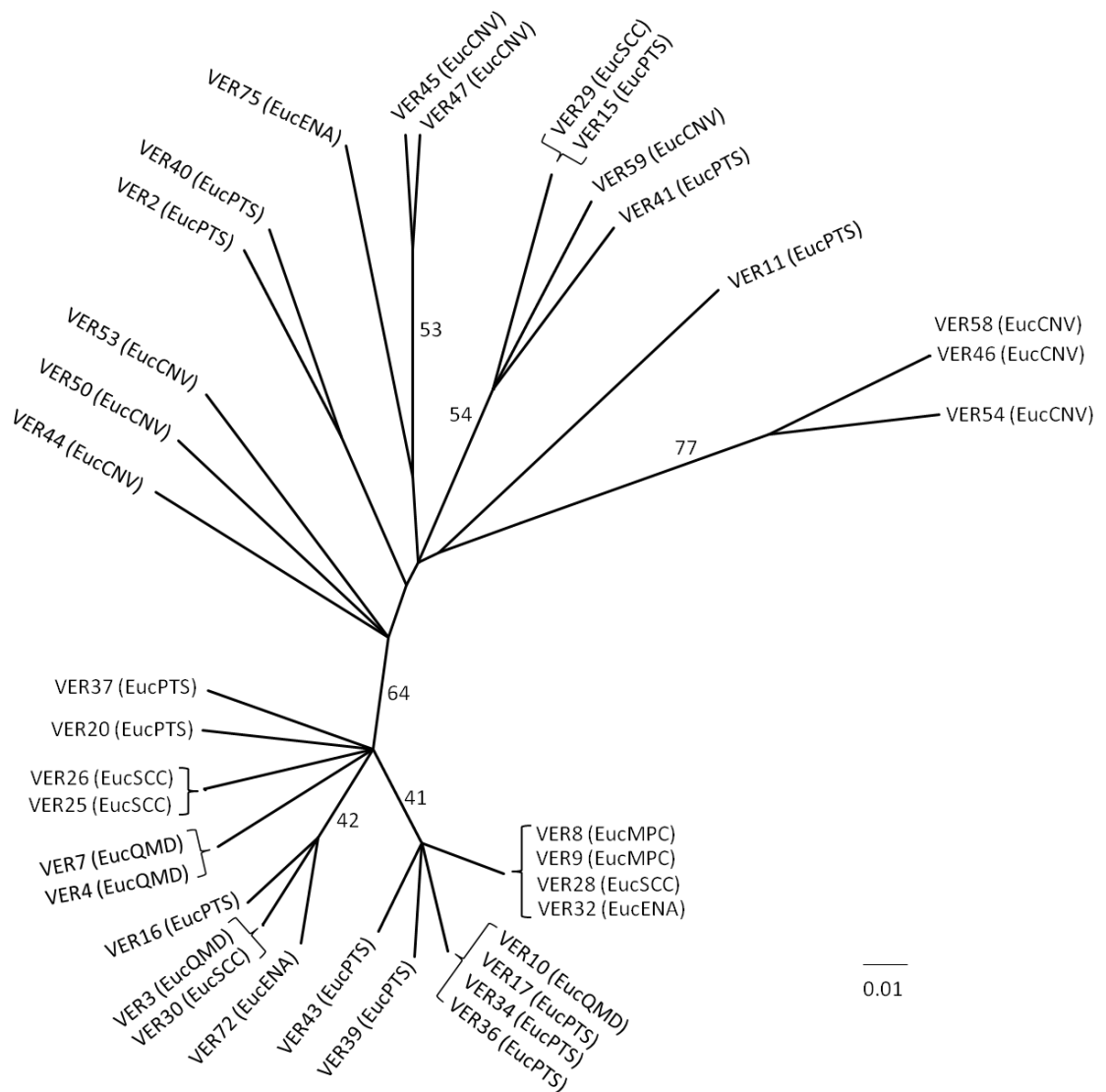


Figura 5—Dendrograma de UPGMA de genótipos de *Ceratocystis fimbriata* obtidos de *Eucalyptus* spp., baseado em 13 marcadores microssatélites. Valores de bootstrap estão representados ao longo das ramificações. População de cada isolado está representada em parênteses. Escala e representação da distância genética.

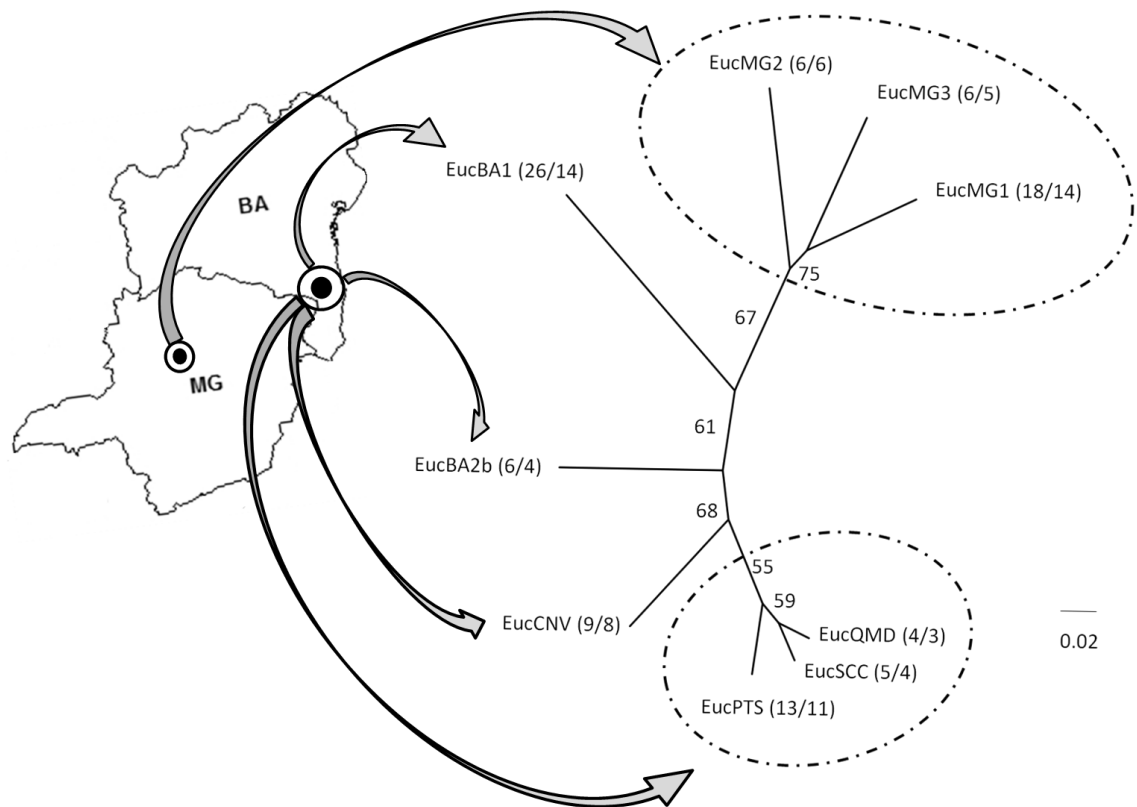


Figura 6—Populações de *Ceratocystis fimbriata* obtidas de *Eucalyptus* spp., baseado na frequência alélica de 13 marcadores microssatélite. Setas conectam referência geográfica das populações. Valores de bootstrap maiores que 50% estão representados ao longo das ramificações. Número de isolados / número de genótipos estão representados em parênteses. Escala e a representação da distância genética.

Tabela 6 - Análise de variância molecular (AMOVA) de populações de *Ceratocystis fimbriata*, obtidos de *Eucalyptus* spp. no sul da Bahia, Brasil, baseada em 13 marcadores microssatélites.

Fonte de Variação	G. L	Soma de Quadrados	Componentes de Variação	Porcentagem de Variação (%)	<i>P</i> valor ^a
Entre populações	3	7.873	0.1761	11.49	0.001
Dentro das populações	27	36.61	1.3559	88.51	0.001
Total	30	44.484	1.5320		

^a*P* valor representa a hipótese de nulidade de que não existe variação significativa ao nível baseado em 1023 permutações.

6. DISCUSSÃO

Os isolados de *C. fimbriata* estudados possuem diversidade genotípica característica de alta diversidade genética, típico do observado para populações naturais (Engelbrecht et al 2004, 2007; Ferreira et al., 2010, 2011; Ocasio-Morales et al., 2007) Entre as populações estudadas, a população de Canavieiras (EucCNV) e Porto Seguro (EucPTS) foram as que apresentaram maior diversidade gênica de Nei (H) e maior diversidade genotípica(G), mostrando que essas populações representam, possivelmente, indivíduos nativos do sul da Bahia.

Apenas dois genótipos se repetiram mais de duas vezes, nos permitindo dizer que esses genótipos estão sendo disseminados para essas regiões, provavelmente através de materiais propagativos, compartilhados entre as áreas, como observados em outros trabalhos (Ferreira et al., 2010, 2011; Rosseto & Ribeiro, 1990). Outro trato cultural que pode ajudar na disseminação do patógeno é a realização da poda ou desrama, sem a devida higienização das ferramentas utilizadas nas atividades (Harrington et al., 2011).

A maioria dos isolados obtidos (72%)é oriunda de um único clone (Clone 1), sugerindo que este clone é o mais suscetível aos isolados locais em relação aos demais clones ou que é o clone mais plantado na região. De acordo com os resultados encontrados deve-se suspender o plantio Clone 1 na região avaliada, dada a incidência do patógeno observada nesse clone, sendo recomendável, assim, a sua substituição por outros clones considerados resistentes. É importante, também, confirmar se existe uma

grande diferenças de níveis de agressividade entre os isolados. O estudo de variabilidade patogênica, por sua vez, permite conhecer, entre os isolados, aquele com maior espectro de ação e agressividade aos clones de eucalipto plantados. Com isso, garante-se mais eficácia na seleção de materiais resistentes durante o programa de melhoramento (Oliveira, 2010).

O que se pode deduzir através do dendrograma UPGMA, que relacionou as populações estudadas neste trabalho com populações estudadas por Ferreira et al. (2010) é que ocorreu um agrupamento geográfico, ou seja, as populações do fungo na Bahia EucBA1, EucBA2b, EucaCNV, EucQMD, EucPTS, EucSCC, se diferenciaram das populações em Minas Gerais, EucMG1, EucMG2 e EucMG3. A principal fonte de variação ocorreu dentro das populações e não entre as populações. Isto determina uma maior variabilidade genética entre os isolados da mesma população do que uma variabilidade entre populações diferentes, demonstrando que existe baixo fluxo gênico (Ferreira et al., 2010; Oliveira, 2014). Esses resultados confirmam que o patógeno é nativo da região estudada e está ocorrendo baixa disseminação do fungo entre as regiões.

A ausência de disseminação de genótipos observada no presente trabalho, deve-se provavelmente ao método atual de produção de mudas onde se coletam brotações saudáveis em mini-jardins clonais. O processo de macroestaquia, adotado antigamente pelas empresas florestais, consiste da busca de brotos a partir de matrizes no campo, podendo ser esta a principal fonte de inóculo (Ferreira et al., 2011, 2013).

Ceratocystis fimbriata, além de causar grandes perdas e ser de difícil controle, apresenta, especialmente na região estudada, grande diversidade genética, o que dificulta a eficiência dos programas de melhoramento genético que focam na resistência ao patógeno. A determinação da variabilidade genética e de agressividade do patógeno é fundamental para a escolha de isolados do fungo altamente agressivos a serem empregados na seleção de materiais genéticos resistentes à doença.

7. CONCLUSÕES

- A frequência de plantas infectadas variou com o clone, sendo o clone 1 o com maior incidência da doença.
- A técnica de marcadores microssatélites foi eficiente para a caracterização da diversidade genética dos isolados em estudo.
- O patógeno é, provavelmente, nativo da região do sul da Bahia, devido à alta diversidade genética encontrada nas populações estudadas.
- As populações do patógeno se agrupam de acordo com a região geográfica.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASFM, Australian Sustainable Forest Management. Austrália 2007.

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

ACCORDI, S. M. Spread of *Ceratocystis fimbriata* f. *platani* through root anastomoses. *Informatore Fitopatologico*, 36: 53-58. 1986.

ACCORDI, S. M. The survival of *Ceratocystis fimbriata* f.sp. *platani* in the soil. *Informatore Fitopatologico*, 39(5): 57-62. 1986.

ALBUQUERQUE, F.C., DUARTE, M.L.R., SILVA, H.M. Ocorrência do mofo cinzento (*Ceratocystis fimbriata*) da seringueira. In: Seminário Nacional da Seringueira. Cuiabá, MS. p.125-128. 1972.

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

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

- AGUIRREOLEA, J.; IRIGOYEN, J.; SÁNCHEZ-DÍAZ, M.; SALAVERRI J.
Physiological alterations in pepper during wilt induced by *Phytophthora capsici*
and soil water deficit. *Plant Pathology*, v. 44, p. 587-596, 1995.
- ARRUDA, S.C. Murcha (*Ceratostomella*) da mangueira, rubelose da jabuticabeira e o
carvão da tamareira. *O Biológico*. 6(10):310-311. 1940.
- ASHA RAM, R.R.V., FREITAS, D.B. Controle de cancro ou murcha de *Ceratocystis*
do cacauero na Bahia. *Fitopatologia Brasileira*. 27:S154. 2002.
- ATALLAH, Z. K., LARGET, B., CHEN, X., AND JOHNSON, D. A. High genetic
diversity, phenotypic uniformity, and evidence of outcrossing in *Sclerotinia*
sclerotiorum in the Columbia Basin of Washington State. *Phytopathology*
Lancaster, 94:737-742. 2004.
- BAKER, C.J., HARRINGTON, T.C., KRAUSS, U., ALFENAS, A.C. Genetic
variability and host specialization in the Latin American clade of *Ceratocystis*
fimbriata. *Phytopathology*. 93:1274–1284. 2003.
- BARNES, I., GAUR, A., BURGESS, T., ROUX, J., WINGFIELD, B.D., WINGFIELD,
M.J. Microsatellite markers reflect intra-specific relationships between isolates of
the vascular wilt pathogen *Ceratocystis fimbriata*. *Molecular Plant Pathology*.
2:319-325. 2001.
- BARNES, I.; ROUX, J.; WINGFIELD, M.J.; OLD, K.M.; DUDZINSKI, M.
Ceratocystis pirilliformis, a new species from *Eucalyptus nitens* in Australia.
Mycologia, 95:865–871. 2003a.
- BARNES, I. et al. *Ceratocystis fimbriata* infecting *Eucalyptus grandis* in Uruguai.
Australian Plant Pathology, 32:361-366. 2003b.
- BATISTA, A.C. *Ceratocystis fimbriata* Ell. & Halst. sobre *Mangifera indica* L.
Publicação 244, Instituto de Micologia da Universidade do Recife. pp. 1-46. 1960

- BATISTA, A.C. *Ceratostomella fimbriata* (E.&H.) Elliot sobre *Crotalaria juncea* L. em Pernambuco. Boletim da Secretaria de Agricultura Industria e Comércio do Estado de Pernambuco. Pernambuco. 14(3):243-245. 1947.
- BATISTA, A.C. *Ceratocystis fimbriata* Ell. & Halst. sobre *Mangifera indica* L. Publicação 244, Instituto de Micologia da Universidade do Recife. pp. 1-46. 1960.
- BORÉM, A., CAIXETA, T. C. Marcadores Moleculares. 1º Edição. Viçosa/MG: Editora UFV. 374. 2006.
- BRACELPA, Associação Brasileira de Papel e Celulose, 2014. Disponível em: www.bracelpa.org.br.
- BUSO, G. S. C.; CIAMPI, A. Y.; MORETZHON, M. C.; AMARAL, Z. P. S.; BRONDANI, R.V. Marcadores microssatélites em espécies vegetais – Desenvolvimento e caracterização de marcadores microssatélites em espécies vegetais tropicais. Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento, Brasília, DF, 6(30): 46-50. 2003.
- CAUSIN, R., GALBERO, G., LODI, M., MONTECCHIO, L., ACCORDI, S.M. Prove di lotta contro *Ceratocystis fimbriata* f. sp. *platani* mediante iniezione di fitofarmaci al tronco. Informatore Fitopatologico 45:28-31. 1995.
- CARVALHO, A.O., CARMO, M.G.F. Podridão pós-colheita de cenoura causada por *Ceratocystis fimbriata*. Fitopatologia Brasileira 28:108. 2003.
- CHAMBERS, J. K., MACAVOY, E. S. Microsatellite: Consensus and controversy. Comparative Biochemistry and Physiology, London, 126:455-476. 2000.
- CHARDON, C.E., MILLER, J.H., MÜLLER, A.S. Ascomycetes from the State of Minas Gerais (Brazil). Mycologia, 32:172-204. 1940.
- CHEE, K.H. Evaluation of fungicides for control of moldy rot (*Ceratocystis fimbriata*) of *Hevea brasiliensis*. Plant Disease Reporter, 54:897-899. 1970.

- COSTA, A.S., KRUG, H.P. Eine durch *Ceratostomella* hervorgerufene Welkekrankheit der *Crotalaria juncea* in Brasilien. *Phytopathologische Zeitschrift*. Berlin. 8:507-513. 1935.
- COSTA-RIBEIRO M. C. V., LOURENÇO-DE-OLIVEIRA R. & FAILLOUX A. B. Higher genetic variation estimated by microsatellites compared to isoenzyme markers in *Aedes aegypti* from Rio de Janeiro. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 101:917-921. 2006.
- CRONE, J.L. Symptoms, spread, and control of canker stain of plane trees. *Dissertation Abstracts*, 23:1857-1858. 1963.
- DE BEER, Z.W., BEGEROW, D., BAUER, R., PEGG, G.S., CROUS, P.W., WINGFIELD, M.J. Phylogeny of *Quambalariaceae* fam. nov., including important *Eucalyptus* pathogens from South Africa and Australia. *Studies in Mycology*. 55:289-298. 2006.
- ENGELBRECHT, C. J. B., AND HARRINGTON, T.C. Intersterility, morphology, and taxonomy of *Ceratocystis fimbriata* on sweet potato, cacao, and sycamore. *Mycologia*. 97:57–69. 2005.
- ENGELBRECHT, C. J. B, HARRINGTON, T.C., ALFENAS, A.C., AND SUAREZ, C. Genetic variation of populations of the cacao wilt pathogen, *Ceratocystis cacaofunesta*. *Plant Pathol*. 56:923-933. 2007.
- FERREIRA, F.A.; MILANI, D. Diagnose visual e controle das doenças abióticas e bióticas do eucalipto no Brasil. UFV. 98p. 2002.
- FERREIRA, F. A. et al. Murcha de *Ceratocystis* em eucalipto no Brasil. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília. 24:284. 1999.
- FERREIRA, F.A., MAFFIA, L.A., BARRETO, R.W., DEMUNER, N.L. & PIGATTO, S. Sintomatologia da murcha de *Ceratocystis fimbriata* em eucalipto. *Revista Árvore*, 3(2):155-162. Viçosa-MG. 2006.

- FERREIRA, M. A. Estrutura genética de populações de *Ceratocystis fimbriata* e padrão espaço-temporal da murcha-de-ceratocystis. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG. 107 f. 2009.
- FERREIRA, M. E., GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análises genéticas. Brasília, DF: EMBRAPA, CENARGEN, 220p. 1998.
- FERREIRA, M.A., HARRINGTON, T.C., THORPE, D.J., ALFENAS, A.C. Genetic diversity and interfertility among highly differentiated populations of *Ceratocystis fimbriata* in Brazil. *Plant Pathology*. 59:721-735. 2010.
- FERREIRA, M. A., HARRINGTON, T. C., ALFENAS, A. C., AND MITZUBUTI, E. S. G. Movement of genotypes of *Ceratocystis fimbriata* within and among *Eucalyptus* plantations in Brazil. *Phytopathology*. 101:1005–1012. 2011.
- FERREIRA, M. A., HARRINGTON, T. C., GONGORA-CANUL, C. C., MAFIA, R. G., ZAUZA, E. A. V., AND ALFENAS, A. C. Spatial-temporal patterns of *Ceratocystis* wilt in *Eucalyptus* plantations in Brazil. *Forest Pathol*. 43:153–164. 2013.
- FIELD, D., WILLS, C. LONG, polymorphic microsatellites in simple organisms. *Proceedings of Biological Sciences, London*, 263(1367):209-215. 1996.
- FIGUEIREDO, P., PINHEIRO, E.D. Uma nova doença da figueira (*Ficus carica* L.) na região de Valinhos, SP. *O Biológico*. 35:227-203. 1969.
- GALLI, F. Nota sobre a ocorrência de *Ceratostomella fimbriata* (E. e H.) Elliot em *Crotalaria retusa* L. e *Cassia fistula* L. *Revista de Agricultura*. Piracicaba, 33:225-227. 1958.
- GOITIA, W., ROSALES, C.J. Relacion entre la incidencia de escolitidos y la necrosis del cacao en Aragua, Venezuela. *Manejo Integrado de Plagas*, 62: 65-71. 2001.

- HALFELD-VIEIRA, B.A., NECHET, K.L. Black rot in lettuce: a new disease caused by *Ceratocystis fimbriata* in hydroponics culture in Brazil. *New Disease Reporter*. 55: 300. 2005. 2006.
- HAMADA, H., PETRINO, M.G., KAKUNAGA, T. A. Novel repeat element with Z-DNA-forming potential is widely found in evolutionary diverse eucariotic genomes. *Proceedings National Academy Science of the USA, Washington, DC*, 79:465-469. 1982.
- HANCOCK, J. M. Microsatellites and other simple sequences: genomic context and mutational mechanisms. *Microsatellites: Evolution and Applications*. Eds. Goldstein D. B. & Schlotterer C. Oxford University Press. New York, EUA, p.1-9. 1999.
- HANSKI, I. & GILPIN, M. E. *Metapopulation biology: ecology, genetics and evolution*. Ed. Academic Press. San Diego, EUA, 1997.
- HARRINGTON, T.C., THORPE, D.J., MARINHO, V.L., FURTADO, E.L. First Reporter of Black Rot of *Colocasia esculenta* caused by *Ceratocystis fimbriata* in Brazil. *Fitopatologia Brasileira*. 30:88-89. 2005.
- HARRINGTON, T. C., THORPE, D. J., AND ALFENAS, A. C. Genetic variation and variation in aggressiveness to native and exotic hosts among Brazilian populations of *Ceratocystis fimbriata*. *Phytopathology*. 101:555-566. 2011.
- HARRINGTON, T. C.; STEIMEL, J.; WORKNEH, F.; YANG, X. B. Characterization and Distribution of Two Races of *Phialophora gregata* in the North-Central United States. *Phytopathology, Lancaster*, 93:901-912. 2003.
- HINDS, T.E. Insect transmission of *Ceratocystis* species associated with aspen cankers. *Phytopathology*, 62(2):221-225. 1972.
- HIROTA, K., KATO, K., MIYAGAWA, T. Chemical control of *Ceratocystis* canker in fig. *Research Bulletin of the Aichi-ken Agricultural Research Center*. 16:211-218. 1984.

- 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, p.47-58. 1960.
- JOHANSSON, M; ELLEGREN, H; ANDERSSON, L. Cloning and characterization of highly polymorphic porcine microsatellites. *Journal of heredity*, Washington, DC, 83:196-198. 1992.
- KNAPOVA, G., GISI, U. Phenotypic and genotypic structure of *Phytophthora infestans* populations on potato and tomato in France and Switzerland. *Plant Pathology*, London, 51:641-653. 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*, 25:384-385. 2000.
- LEHMANN, T., HAWLEY, W. A., KAMAU, L., FONTENILLE, D., SIMARD, F. & COLLINS, F. H. Genetic differentiation of *Anopheles gambiae* populations from East and West Africa: comparison of microsatellite and allozyme loci. *Heredity*. 77:192-208. 2003.
- LITT, M., LUTY, J.A. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *American Journal of Human Genetics*, Baltimore, 44:398-401. 1989.
- LIMA, J.A.S., TAVARES, S.C.C.H., SANTANA, M.R.S.P., SÁ, M.G., CARVALHO, A.B.B. Ocorrência generalizada de *Ceratocystis fimbriata* (seca da mangueira) em cultivares de mangueiras nativas da microrregião do Senhor do Bonfim da Bahia. *Fitopatologia Brasileira*. 25:435. 2000.

- MAFIA, R.G.; FERREIRA, M.A.; ZAUZA, E.A.V.; SILVA, J.F.; COLODETTE, J.L.; ALFENAS, A.C. Impact of *Ceratocystis* wilt on eucalyptus tree growth and cellulose pulp yield. *Forest Pathology*, 43:379-385. 2013.
- MARIANO, R.L.R., MENEZES, M. Ocorrência da seca do abacateiro (*Persea americana* Mill.) e da bisnagueira (*Spathodea campanulata* Beauv.) causada por *Ceratocystis fimbriata* E. & H. *Fitopatologia Brasileira*. 14:160. 1989
- MARIN, M., CASTRO, B., GAITAN, A., PREISIG, O., WINGFIELD, B.D., WINGFIELD, M.J. Relationships of *Ceratocystis fimbriata* isolates from Colombian Coffee-Growing Regions Based on Molecular Data and Pathogenicity. *Journal Phytopathology*. 151:395–405. 2003.
- MELO FILHO, P.A., LIMA, M.L.P., UESUGUI, C.H., UENO, B. Murcha causada por *Ceratocystis fimbriata* em crotalária no Distrito Federal, Brasil. *Summa Phytopathologica*. 28:211-212. 2002.
- MCDONALD, B.A., LINDE, C. Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. *Annu Rev Phytopathol* 40:349-379. 2002.
- MOLLER, W. J.; DEVAY, J. E. Insect transmission of *Ceratocystis fimbriata* in deciduous fruit orchards. *Phytopathology*, 58:1499-1508. 1968.
- MUCHOVEJ, J.J., ALBUQUERQUE, F.C., RIBEIRO, G.T. *Gmelina arborea* – a new host of *Ceratocystis fimbriata*. *Plant Disease Reporter*. 62:717-719. 1978.
- OCASIO-MORALES, R. G., TSOPELAS, P., AND HARRINGTON, T. C. Origin of *Ceratocystis platani* on native *Platanus orientalis* in Greece and its impact on natural forests. *Plant Disease*. 91:901-904. 2007.
- OEPP/EPPO Data sheets on quarantine organisms. No. 136, *Ceratocystis fimbriata* f. sp. *platani*. *Bulletin OEPP/ EPPO Bulletin* 16:21-24. 1986.
- OLIVEIRA, L. S. S. Agressividade de isolados de *Ceratocystis fimbriata* em clone de *Eucalyptus* spp. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG. 18 f. 2010.

- PANCONESI, A. *Ceratocystis fimbriata* of plane trees in Italy: biological aspects and possibility of control. Proceedings of the Fifth Congress of the Mediterranean Phytopathological Union, Patras, Greece. p.184-185. 21-27 September, 1980.
- PANCONESI, A. Canker stain of plane trees: a serious danger to urban plantings in Europe. *Journal of Plant Pathology*, 81:3-15. 1999.
- PASCUAL, I.; AZCONA, I.; MORALES, F.; AGUIRREOLEA; SÁNCHEZ-DÍAZ, M. Photosynthetic response of pepper plants to wilt induced by *Verticillium dahliae* and soil water deficit. *Journal of Plant Physiology*, v. 167, p. 701-708, 2010.
- PEREIRA, J.C.D.; STURION, J.A.; HIGA, A.R.; HIGA, R.C.V.; SHIMIZU, J.Y. Características da madeira de algumas espécies de eucalipto plantadas no Brasil. Embrapa Documentos, Colombo: Embrapa Florestas, 38:1-113. 2000.
- RABOIN, L.M.; SELVI, A., OLIVEIRA, K.M., PAULET, F., CALATAYUD, C., ZAPATER, M.F., BROTTIER, P., LUZARAN, R., GARSMEUR, O. CARLIER, J. & D'HONT, A. Evidence for the dispersal of a unique lineage from Asia to America and Africa in the sugarcane fungal pathogen *Ustilago scitaminea*, *Fungal Genetics and Biology*, Orlando, 44:64–76. 2007.
- RIBEIRO, I.J.A. Seca de mangueira. Agentes causais e estudo da moléstia. In: Anais do I Simpósio Brasileiro Sobre a Cultura de Mangueira. Sociedade Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal, 24-28, p.123-130. 1980.
- RIBEIRO, G.T. Avaliação preliminar da resistência de árvores de *Gmelina arborea* Lineaus, mediante inoculações do fungo *Ceratocystis fimbriata* Ell. & Halst., causador do cancro em gmelina. *Fitopatologia Brasileira*. 7:517. 1982.
- RIBEIRO, I.J.A., ITO, M.F., ROSSETTO, C.J. Cassia renigera Wall.: novo hospedeiro de *Ceratocystis fimbriata* Ell. & Halst. *Bragantia*. 46:417-423. 1987.
- RIBEIRO, I.J.A., FUMIKOTO, I., PARADELA, O., CASTRO, J.L. Gomose da acácia-negra causada por *Ceratocystis fimbriata* Ell. & Halst. *Bragantia*, 47:71-74. 1988.

- ROSSETTO, C. J., AND RIBEIRO, I. J. A. Mango wilt. XII. Recommendations for control. *Revista de Agricultura*. 65:173–80. 1990.
- ROSSETTO CJ, RIBEIRO IJA Seca da mangueira. XIX. Tipos e Controle. In: São José. Abel Rebouças. Manga: Tecnologia de Produção no mundo. Vitória da Conquista. BA. Universidade Federal do Sudoeste da Bahia. 378-392. 2001.
- ROUX, J. et al. A serious new wilt disease of *Eucalyptus* caused by *Ceratocystis fimbriata* in Central África. *Forest Pathology*, 30:175-184. 2000.
- ROUX, J. et al. Diseases in plantation *Eucalyptus* in Uganda. *South African Journal of Science*, 97:16-18. 2001.
- ROUX, J.; VAN WYK, M.; HATTING, H.; WINGFIELD, M.J. *Ceratocystis* species infecting stem wounds on *Eucalyptus grandis* in South Africa. *Plant Pathology*, 53:414–421. 2004.
- SANTINI, A., CAPRETTI, P. Analysis of the Italian population of *Ceratocystis fimbriata* f. sp. *platani* using RAPD and minisatellite markers. *Plant Pathology*. 49:461-467. 2000.
- SANTOS, A.F., FERREIRA, F.A. Murcha-de-Ceratocystis em Acácia-negra no Brasil. *Fitopatologia Brasileira*. 28:325. 2003.
- SCHLÖTTERER, C. AND WIEHE, T. Microsatellites, a neutral marker to infer selective sweeps. *Microsatellites: Evolution and Applications*. Eds. Goldstein D. B. & Schlötterer C. Oxford University Press, New York, USA. p.238-248. 1999.
- SCHLÖTTERER, C. AND TAUTZ, D. Slippage synthesis of simple sequence DNA. *Nucleic Acids Res*. 20:211-215. 1992.
- SCHLÖTTERER, C., RITTER, R., HARR, B., BREM, G. High mutation rate of a long microsatellite allele in *Drosophila melanogaster* provides evidence for allele-specific mutations rates. *Molecular Biology and Evolution*, Chicago, 15(10): 1269-1274. 1998.

- SILVA, J. R.; FIGUEIRA, A.; PEREIRA, G. A. G.; ALBURQUERQUE, P. Desenvolvimento de novos microssatélites de *Moniliophthora perniciosa*, agente causal da doença 'broom' de *Theobroma cacao*. *Molecular Ecology Resources*, New York, 8:783-785. 2008.
- SILVEIRA, A.P., CORDOSO, R.M.G., NETO, F.B., OLIVEIRA, D.A. Ocorrência e controle químico do mofo cinzento (*Ceratocystis fimbriata*) da seringueira. *Fitopatologia Brasileira*. 10:281. 1985.
- SILVEIRA, S.F., HARRINGTON, T.C., MUSSI-DIAS, V., ENGELBRECHT, C.J.B., ALFENAS, A.C., SILVA, C.R. *Annonasquamosa*, a new host of *Ceratocystis fimbriata*. *Fitopatologia Brasileira* 31: 394-397. 2006.
- SINCLAIR, W. A.; LYON, H. H.; JOHNSON, W. T. Diseases of trees and shrubs. Ithaca, New York, USA. Cornell University Press, 74p. 1987.
- STEIMEL J., ENGELBRECHT C.J.B. & HARRINGTON T.C. Development and characterization of microsatellite markers for fungus *Ceratocystis fimbriata*. *Molecular Ecology Notes*. 4:215-218. 2004.
- SWOFFORD, D.L. Paup*. phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts. 1998.
- TEVIOTDALE, B.L. & HARPER, D.H. Infection of pruning and small bark wounds in almond by *Ceratocystis fimbriata*. *Plant Disease*, 75:1026-1030. 1991.
- YEH, F.C. AND BOYLE, T.J. Population genetic analysis of co-dominant and dominant markers and quantitative traits. *Belgian Journal of Botany* 19:157, 1997
- VALARINI, P.J., TOKESHI, H. *Ceratocystis fimbriata*, causal agent of fig dieback, and its control. *Summa Phytopathologica*. 6(3/4):102-106. 1980.
- VALVERDE, S. R. As plantações de eucalipto no Brasil. p.1-7. 2009. Disponível em: http://www.ciflorestas.com.br/arquivos/doc_as_brasil_31441.pdf
- VIÉGAS, A.P. Alguns fungos do Brasil II. *Bragantia*. Campinas. 4:6-392. 1944.

- VIÉGAS, A.P. Seca da Mangueira. *Bragantia*, 19:163-182. 1960.
- 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 plane trees. *Phytopathology*, 42:236-9. 1952.
- WEIR, B.S. & COCKERMAN, C.C. Estimating F-Statistics for the analysis of populationstructure. *Evolution* 38:1358–1370. 1984.
- WEISING, K., NYBOM, H., WOLFF, K., MEYER, W. DNA fingerprinting in plants and fungi. Boca Raton: CRC Press, p.322. 1995.
- WITTHUHN, R.C., WINGFIELD, B.D., WINGFIELD, M.J., HARRINGTON, T.C. PCR-based identification and phylogeny of species of *Ceratocystis sensu stricto*. *Mycological Resource*. 103:743-749. 1999.
- ZAUZA, E.A.V., ALFENAS, A.C. & THORPE, D. Incidência de *Ceratocystis fimbriata* em plantios comerciais de *Eucalyptus* spp. na Veracel Celulose. Parecer Técnico-Científico, 25p., Viçosa-MG. 2003.
- 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*, 88:758-760. 2004.
- YAMASHIRO, T. AND MYAZAKI, I. Principal pests and diseases of mango – *Mangifera indica* L. - in the State of Sao Paulo and updated control methods. *Biológico* 51:41-50. 1985.