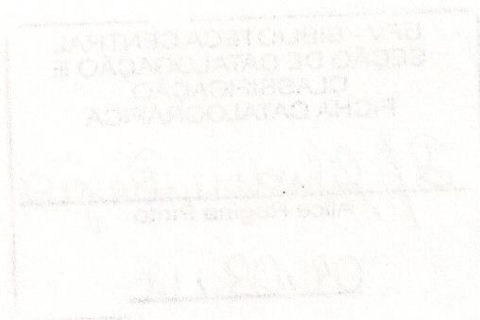


DENISE CRISTINA DE OLIVEIRA FRANCO VALDETARO

MORFOLOGIA, VARIABILIDADE GENÉTICA E PATOGENICIDADE DE
Ceratocystis fimbriata EM *Hevea brasiliensis*

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2012



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

T

V145m
2012

Valdetaro, Denise Cristina de Oliveira Franco, 1976-
Morfologia, variabilidade genética e patogenicidade de
Ceratocystis fimbriata em *Hevea brasiliensis* / Denise
Cristina de Oliveira Franco Valdetaro. – Viçosa, MG, 2012.
vii, 28f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Inclui apêndices.

Orientador: Acelino Couto Alfenas.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 22-25.

1. Seringueira. 2. *Ceratocystis fimbriata*. 3. Filogenia.
 4. Fungos - Morfologia. 5. Microsatélites (Genética).
- I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22. ed. 632.46

DENISE CRISTINA DE OLIVEIRA FRANCO VALDETARO

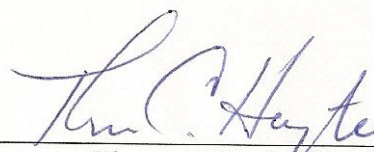
MORFOLOGIA, VARIABILIDADE GENÉTICA E PATOGENICIDADE DE
Ceratocystis fimbriata EM *Hevea brasiliensis*

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

APROVADA: 16 de julho de 2012.



Maria Alves Ferreira
(Coorientadora)



Thomas Charles Harrington



Olinto Liparini Pereira



Acelino Couto Alfenas
(Orientador)

"Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo, qualquer um pode começar agora e fazer um novo fim."

Chico Xavier

"O que faz a gente crescer é a emoção de estarmos vivos e ajudando alguém a ser alguém"

Chiquinho da floresta

Aos meus pais Ciloni e Maria

Ao meu marido Erlon

À minha filha Rafaela

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus pela criação da vida.

Ao Prof. Acelino pela orientação, pelos conselhos e pela paciência principalmente com as nossas inseguranças.

À Universidade Federal de Viçosa pela oportunidade de realizar o curso de graduação em Engenharia Florestal, especialização em Proteção de Plantas e mestrado em Fitopatologia.

Ao Departamento de Fitopatologia pela estrutura que possibilitou a realização do curso de mestrado.

Aos professores do Departamento de Fitopatologia, em especial ao Olinto Liparini e Luiz Antônio Maffia pelos ensinamentos.

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

À minha coorientadora, Prof^ª Maria Alves Ferreira, da Universidade Federal de Lavras, pela colaboração, paciência e pelos conselhos para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao professor Dalmo Lopes de Siqueira do Departamento de Fitotecnia/UFV e à Tecnoplanta pela doação das mudas de manga e acácia negra, respectivamente.

À Michelin pelo suporte na coleta de amostras em Ituberá (BA) e doação de mudas de seringueira.

A Clonar Resistência e Doenças Florestais pela manutenção das plantas e estrutura de inoculação.

Ao pesquisador da Embrapa Rivaldalve Gonçalves pelo apoio na coleta de amostra em Rio Branco/AC.

A todos os estudantes e funcionários do Laboratório de Patologia Florestal pela amizade, ótima convivência e pelo apoio para que a dissertação fosse concluída.

Ao Renildo pela amizade, pelo socorro quando precisei e pelas inúmeras conversas enquanto tomávamos nosso cafezinho.

À Márcia pela paciência, amizade e pelo amparo nas atividades do laboratório.

A pós-doutoranda Talyta pelos conselhos para desenvolvimento deste trabalho.

Ao pós-doutorando Lúcio Mauro pela paciência, pela disponibilidade e orientação em todas as etapas de desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos do mestrado, em especial, Maurício (Mauzinho), Alexandre (Alê), Adriana (Thuca), André (Thuco), Patrícia, Jonas (Jonas Brother), Daniel (Daniel Sam), Silvia (Silvinha), Lívio, André (virologia) e os doutorandos Danilo (Danilão), Leonardo (Leo), Stefânia e Braz pela convivência, ajuda e os momentos de risos e desespero.

Ao meu irmão André que amo muito e por ter me dado dois lindos sobrinhos João Gabriel (João Bebê) e Luiz Fernando (Luluzinho).

Aos meus pais Ciloni e Maria pelo amor incondicional, pela minha formação moral e intelectual. Amo vocês.

Aos meus sogros Rafael e Edna por me considerar muito mais que uma nora e estender as mãos nos momentos difíceis da minha vida.

Aos meus cunhados Rodrigo e Fernando Gustavo que são demais.

À minha cunhada Débora (Tia Pretosa) pela convivência, amizade e pelo carinho.

Ao grande amigo Fabiano Luiz a quem tenho muita gratidão pelo apoio oferecido desde que retornei a viçosa.

A todos os amigos que fiz ao longo da minha vida.

A Thaísa pela ajuda inicial.

Ao Rodrigo por me aturar, pela amizade e dedicação, sem sua ajuda não teria conseguido.

Ao Erlon pela paciência, amizade e cumplicidade. Enfrentar os obstáculos da vida ao seu lado se torna muito mais fácil.

À minha filha Rafaela por quem tenho um amor incondicional e por ser a motivação para tudo que faço.

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

BIOGRAFIA

DENISE CRISTINA DE OLIVEIRA FRANCO VALDETARO , filha de Ciloni Edson Franco e Maria das Gracas de Oliveira Franco, nasceu em 31 de marco de 1976, em Volta Redonda, Rio de Janeiro. Em março de 1995, ingressou no curso de Engenharia Florestal na Universidade Federal de Viçosa. Em março de 2006 ingressou no curso de especialização em Proteção de Plantas a distância na Universidade Federal de Viçosa Em agosto de 2010, iniciou o curso de mestrado em Fitopatologia na mesma instituição concluindo em julho de 2012, sob orientação do professor Acelino Couto Alfenas.

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
1. INTRODUÇÃO	1
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	3
2.1. Caracterização sintomatológica da doença, coleta de amostras e isolamento	3
2.2. Obtenção das culturas monoascospóricas	3
2.3. Extração e quantificação de DNA.....	4
2.4. Análise filogenética.....	5
2.4.1. Amplificação dos produtos por PCR e purificação de DNA	5
2.4.2. Sequenciamento de DNA e análises	5
2.5. Marcadores e análises de microssatélites	6
2.6. Caracterização morfológica	7
2.7. Patogenicidade em diferentes espécies hospedeiras	8
3. RESULTADOS.....	9
3.1. Caracterização sintomatológica da doença, coleta de amostras e isolamento	9
3.2. Análise filogenética.....	12
3.3. Análises de microssatélites	14
3.4. Caracterização morfológica	15
3.5. Patogenicidade em diferentes espécies hospedeiras	17
4. DISCUSSÃO.....	18
5. CONCLUSÃO	21
6. REFERÊNCIAS	22
7. APÊNDICES.....	26

RESUMO

VALDETARO, Denise Cristina de Oliveira Franco, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2012. **Morfologia, variabilidade genética e patogenicidade de *Ceratocystis fimbriata* em *Hevea brasiliensis***. Orientador: Acelino Couto Alfenas. Coorientadora: Maria Alves Ferreira.

Espécies do complexo *Ceratocystis fimbriata sensu lato (s.l.)* são importantes patógenos de um grande número de plantas arbóreas e herbáceas, dentre elas a seringueira (*Hevea* sp.), nativa da região amazônica e pertencente a família Euphorbiaceae. A seringueira é cultivada visando a produção do látex, a principal matéria prima para obtenção da borracha natural que é utilizada em diversos setores. *Ceratocystis fimbriata* infecta o painel da seringueira, causando uma doença conhecida como mofo cinzento que afeta negativamente a produção de látex. *Ceratocystis fimbriata s.l.* considerado, atualmente, como um “complexo de espécies” contendo várias espécies crípticas, muitas das quais ainda não descritas. Deste modo, objetivou-se com este trabalho, determinar a morfologia, o relacionamento filogenético e especificidade de hospedeiro do fungo causador do mofo cinzento em seringueira, de modo a confirmar se é uma nova espécie do complexo *fimbriata*. Para isso, foram utilizados 20 isolados de seringueira para análise de variabilidade genética. Dentre estes, quatro isolados foram selecionados para análises morfológicas e filogenéticas e destes, dois foram utilizados para testes de patogenicidade. De acordo com as sequências de ITS r-DNA analisadas, os isolados de *C. fimbriata* de seringueira pertencem ao clado da América Latina, com dois genótipos de ITS, de acordo com a origem geográfica, sendo eles originados do Estado do Acre e o outro do Estado da Bahia, também confirmados por análises de microssatélites. As inoculações mostraram que não há especialização, quanto ao hospedeiro, uma vez que foram patogênicos a diferentes espécies hospedeiras (manga, crotalária, acácia, eucalipto e kiwi). Portanto, de acordo com os resultados deste trabalho, os isolados de seringueira pertencem ao clado da América Latina e são confirmados como *C. fimbriata* e não uma espécie distinta.

ABSTRACT

VALDETARO, Denise Cristina de Oliveira Franco, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July , 2012. **Morphology, genetic variability and pathogenicity of *Ceratocystis fimbriata* in *Hevea brasiliensis***. Adviser: Acelino Couto Alfenas. Co-adviser: Maria Alves Ferreira.

Ceratocystis fimbriata sensu lato (s.l.) is a complex of many species that are important pathogens of a large number of woody and herbaceous plants. One of this hosts is rubber tree (*Hevea* sp.), that is native to the Amazon and belong to the family Euphorbiaceae. Rubber tree is grown in order to produce latex, the main raw material for obtaining natural rubber that is used in many different industries. *Ceratocystis fimbriata* infects the rubber tree panel, causing gray mold that affects latex production. *C. fimbriata* is considered now as a "species complex" containing cryptic species, and many of them remain undescribed. Thus, the aim of this work was to determine the morphology and phylogenetic relationships of the fungus that causes gray mold in rubber tree in order to confirm whether it is a new species of *fimbriata* complex. For this, it was used 20 isolates obtained from rubber tree for analysis of genetic variability. Of these, four isolates were selected for morphological and phylogenetic analysis and of those, two isolates were used for pathogenicity tests. According to the sequences of ITS r-DNA, the isolates of *C. fimbriata* of rubber tree belong to the Latin American clade, with two ITS genotypes, that is related to their geographical origin. One genotype was originated from the state of Acre and the other one from the state of Bahia, which was also confirmed by microsatellite markers. The inoculations showed no specialization to the host, since they were pathogenic to different host species (mango, crotalaria, acacia, eucalyptus and kiwi). Therefore, according to the results of this work, the isolates of rubber tree belong to the Latin American clade and confirmed as *C. fimbriata* and not a distinct species.

1. INTRODUÇÃO

A seringueira (*Hevea* sp.) é uma planta arbórea da família Euphorbiaceae e nativa da região amazônica (Lorenzi, 1992). Das onze espécies, relatadas no gênero *Hevea*, dez ocorrem no Brasil e todas produzem látex com destaque para a *Hevea brasiliensis*, devido a sua maior capacidade produtiva e variabilidade genética (Gasparotto et al., 1997; Costa et al., 2001; Alvarenga & Carmo, 2008). O látex é a principal matéria prima para obtenção da borracha natural que é utilizada em diversos setores, visto que as propriedades físicas da borracha sintética (obtida do petróleo) não são viáveis para a fabricação de luvas cirúrgicas, pneus de automóveis, de aviões, preservativos, dentre outros. Um dos principais entraves na produção do látex da seringueira no Brasil são as doenças que acometem a cultura. Dentre as doenças que afetam o painel da seringueira, destaca-se o mofo cinzento causado por *Ceratocystis fimbriata* Ell & Halst (Albuquerque et al., 1972).

Ceratocystis fimbriata é considerado um patógeno emergente ocupando posição de destaque por causar prejuízos em uma variada gama de hospedeiros, principalmente em plantas arbóreas, tais como *Gmelina arborea* (Muchovej et al., 1978; Ribeiro, 1982), *Mangifera indica* (Carvalho, 1938; Pyenson, 1938), *Eucalyptus* spp. (Ferreira et al., 2006; Alfenas et al., 2009), *Ficus carica* (Figueiredo & Pinheiro, 1969) e *Cassia fistula* (Ribeiro et al., 1984, 1987), com relato de ocorrência em diversos países. Em seringueira os sintomas iniciam-se, geralmente, no painel de sangria e caracterizam-se pela renovação desuniforme da casca, permanecendo partes do caule com o lenho exposto em alternância com o tecido renovado, formação de pústulas com exsudação de látex acima da região de corte e desenvolvimento de uma camada branca acinzentada sobre os tecidos mais jovens. A partir daí a infecção pode progredir até provocar a morte da árvore (Albuquerque et al., 1972). Segundo Furtado (2007), quando a doença não é tratada no início e quando as condições climáticas são favoráveis, pode ocasionar o apodrecimento de grandes porções da casca e do lenho e, com a posterior cicatrização da região afetada, o painel fica recoberto por calos que o deformará e limitará a exploração de látex.

O primeiro relato de *C. fimbriata* ocasionando doença na seringueira no Brasil ocorreu na década de 1970 (Albuquerque et al., 1972), em plantios na região amazônica. Posteriormente, outros relatos se sucederam na Bahia (Pereira & Santos, 1985b) e em São Paulo (Silveira et al., 1985). *Ceratocystis fimbriata* foi a primeira espécie

descrita do gênero como agente causal da podridão negra da batata doce (*Ipomea batatas*) em Nova Jersey, EUA (Halsted, 1890; Halsted & Fairchild, 1891). Atualmente, *C. fimbriata* tem sido considerado um complexo de espécies crípticas (Van Wyk et al., 2010). Assim, o patógeno causador da podridão negra em batata doce é tratado como *C. fimbriata sensu stricto* (s.s.) enquanto os isolados dos demais hospedeiros têm sido denominados *C. fimbriata sensu lato* (s.l.). Várias espécies, que anteriormente faziam parte do complexo *fimbriata*, têm sido descritas e, ou renomeadas como novas espécies a partir de comparações morfológicas e, principalmente de estudos moleculares, como, por exemplo, *C. colombiana* e *C. papillata* em *Coffea arabica*, na Colômbia (Van Wyk et al., 2010); *C. fimbriatomina* em *Eucalyptus* spp., na Venezuela (Van Wyk et al., 2009); *C. manginecans* em *Mangifera indica*, em Omã e Paquistão (Van Wyk et al., 2007); *C. mangicola* e *C. mangivora* em *M. indica*, no Brasil (Van Wyk et al., 2011) e *C. cacaofunesta* em *Theobroma cacao*, no Brasil e *C. platani* em *Platanus* sp., nos EUA (Engelbrecht & Harrington, 2005; Johnson et al., 2005).

De acordo com Harrington et al. (2011) há quatro clados dentro do complexo *fimbriata* compreendendo os da América latina, da Ásia, da África e da América do Norte, sendo este último o centro de diversidade genética do fungo. Corroborando com essa visão, Ferreira et al. (2010) realizaram análises de variabilidade genética, utilizando marcadores microssatélites, e testes de esterilidade com isolados de *C. fimbriata* de diferentes hospedeiros no Brasil, e sugeriram que os isolados brasileiros constituem uma única espécie dentro do clado da América Latina, independentemente do hospedeiro estudado (*Eucalyptus* spp., *Mangifera indica*, *Ficus carica*, *Gmelina arborea* e *Ipomea batatas*). Ademais, a hipótese da existência de espécies crípticas de *C. fimbriata* no Brasil não foi apoiada pelas análises filogenéticas ou por resultados de inoculações (Harrington et al., 2011). Assim, de acordo com os autores a hipótese mais aceita é que as populações naturais de *C. fimbriata* no Brasil variam grandemente em agressividade de acordo com o hospedeiro.

Entretanto, até o momento não foram realizados estudos envolvendo isolados de *C. fimbriata* s.l. patogênicos à seringueira para elucidar se estes isolados pertencem a uma espécie críptica dentro do complexo *fimbriata*. Além de compreender melhor a população deste importante patógeno no Brasil, a correta identificação do agente causal de determinada doença é essencial na busca de

métodos de controle mais eficiente e na seleção de plantas resistentes à mesma.

Sendo assim, com este trabalho, objetivou-se determinar as características morfológicas e o relacionamento filogenético de isolados *C. fimbriata s.l.* causador do mofo cinzento no Brasil, com isolados de outros hospedeiros brasileiros e outros pertencentes aos clados da América do Norte e Ásia. Além disso, verificou-se se os isolados de seringueira podem ser hospedeiros específicos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Caracterização sintomatológica da doença, coleta de amostras e isolamento

A caracterização sintomatológica da doença baseou-se em observações em painéis de seringueira infectados em fazendas localizadas nos estados do Acre e da Bahia. Amostras de madeira de painéis infectados e de solos próximos às árvores com sintomas foram coletadas e acondicionadas em sacos de papel (fragmentos de madeira), em sacos plásticos (solo) e processadas no Laboratório de Patologia Florestal, do DFP/BIOAGRO da Universidade Federal de Viçosa (UFV). O fungo foi isolado empregando-se o método de isca de cenoura (Alfenas & Mafia, 2007; Laia et al., 2000). Para isso, sanduíches de cenoura com pedaços de madeira infectados foram incubados em Gerbox a 28 °C por 10 dias. Para o isolamento das amostras de solo, aproximadamente 200 g de solo foram depositados em gerbox e 16 iscas de cenoura (2 cm x 1 cm) colocadas no solo e incubadas a 25°C por 10 dias (Laia et al., 2000).

2.2. Obtenção das culturas monoascospóricas

As culturas isoladas foram cultivadas por 21 dias em placas de Petri contendo meio EMLA (Extrato-Malte-Levedura-Ágar) acrescido de rifamicina na concentração de 100 µL mL⁻¹. 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 de cadeias de endoconídios) foi transferido para o centro de outra placa de Petri contendo o mesmo meio. Essas placas foram mantidas nas mesmas condições por 21

dias e, após esse período, as culturas do fungo foram armazenadas pelos métodos de Castellani (Castellani, 1939) a temperatura ambiente e em glicerol 15% a - 80°C.

2.3. Extração e quantificação de DNA

O micélio foi crescido em placas de Petri contendo meio EMLA forradas com papel celofane, incubados a 28 °C por um período que variou de 14 a 21 dias, dependendo do isolado. Após a incubação, 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 para um tubo de 2 mL contendo 200 µL de solução de lise de núcleos. Em seguida, o micélio foi macerado no “Tissuelyser III” (Quiagen®) a 30HZ por 2 min. Posteriormente, incubou-se - 20 °C por 5 min. Após esse período, acrescentaram-se 400 µL de solução de lise de núcleos, 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 tubos 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 novo tubo 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 tubos 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 tubo de 1,5 mL e adicionaram-se a esse 500 µL de Fenol:Clorofórmio:Álcool Isoamílico (25:24:1) agitando-os cuidadosamente. As amostras foram centrifugadas a 13000rpm por 5 min e a fase superior (aquosa) transferida para um novo 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 tubos e centrifugou-se as amostras a 13000 rpm por 5 min. Essa etapa de lavagem foi repetida três vezes para remover o etanol. O pellet resultante foi seco a temperatura. O DNA foi ressuscitado 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 e a concentração ajustada para 10 ng µL⁻¹ utilizando-se o Nanodrop® 2000c (Thermo Fisher Scientific Inc.).

2.4. Análise filogenética

2.4.1. Amplificação dos produtos por PCR e purificação do DNA

Os oligonucleotídeos usados para a amplificação foram ITS1 (5' – CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3') (Baker et al., 2003) e ITS4 – (5' – TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White et al., 1990). As PCRs foram amplificadas usando um termociclador PCT-100 (MJ Research Inc.) e com cada reação com volume final 20 µL de contendo 1- 2 µL de DNA genômico (50-100 ng µL⁻¹), 2 µL 10X tampão de PCR (Promega Inc.), 200 µL de cada dNTPs, 4 mM MgCl₂, 5 pmol de cada primer, 0,5 unidade de Taq polimerase (Promega Inc.). As Condições de amplificação foram temperatura inicial de aquecimento de 85°C por 2 min e desnaturação inicial de 95°C por 95 s, seguido de 35 ciclos de 58°C por 60 s, 72°C por 72 s e 94°C por 30 s seguido de 58°C po 1 min com uma extensão final 72°C por 30 min. Os produtos resultantes foram separados em gel de agarose 1 % a 150 V durante 40 min, contrastados em brometo de etídio 1%.

Para determinar o tamanho dos fragmentos amplificados, foi utilizado o padrão de peso molecular de 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). Os géis foram fotografados sob luz ultravioleta pelo sistema de fotodocumentação modelo Eagle Eye II (Stratagene Cloning Systems Inc., EUA). Em seguida, os produtos de PCR foram purificados usando o Kit GFXTM PCR DNA (GE Healthcare).

2.4.2. Sequenciamento de DNA e análises

O sequenciamento dos fragmentos de DNA foi realizado usando sequenciador AB 3730xl (Applied Biosystems Inc.). As sequências foram analisadas e editadas usando o software Sequence Navigator (Applied Biosystems Inc.) e posteriormente alinhadas usando o Clustal W v.1.5 (Thompson et al., 1992) seguido de ajustes manuais no software MEGA 5.00 (Tamura et al., 2011), quando necessário.

Para as análises filogenéticas, além dos isolados obtidos neste trabalho, foram escolhidas no GenBank sequências de DNA dos genes pertencentes ao complexo *C. fimbriata* dentro do clado da América Latina, América do Norte e Ásia. Foram utilizadas sequências de 30 de isolados selecionados no GenBank para o gene estudado, além de uma sequência de *Ceratocystis albofundus* utilizado como outgroup (Apêndices).

Os métodos da Máxima Parsimônia (MP) e Inferência Bayesiana (IB) foram utilizados para construir as árvores filogenéticas. A análise de Máxima Parsimônia foi realizada no programa PAUP* 4.0b10 (Swofford, 2003) pelo método de busca heurística usando o algoritmo TBR (*Tree Bisection Reconnection*) para troca de ramos. As sequências foram adicionadas pelo método de *stepwise* de forma aleatória com 1000 repetições. A estabilidade dos ramos foi verificada com um *bootstrap* com 1000 repetições. A inferência Bayesiana foi realizada utilizando o programa MrBayes 3.1.2 (Bayesian Inference of Phylogeny) (Ronquist & Huelsenbeck, 2003). O modelo de substituição foi escolhido com base no critério de informação de Akaike (AIC) do MrModelTest 3.2 (Nylander, 2004). A probabilidade *posteriori* (PP) na distribuição de árvores foi criada usando algoritmo MCMC (*Metropolis-coupled Markov Chain Mont Carlo*) de duas cadeias iniciadas a partir de uma árvore ao acaso, com 25 milhões de gerações executadas, sendo descartadas as 25% das primeiras árvores. A convergência do MCMC e o tamanho efetivo da amostra foram checados usando o programa Tracer 1.4 (Rambaut & Drummond, 2007). As árvores filogenéticas foram visualizadas e editadas no programa FigTree 1.3.1. (<http://tree.bio.ac.uk/software>).

2.5. Marcadores e análises de microssatélites

Foram analisados 14 loci de microssatélites (SSRs) (CfAAG8, CfAAG9, CfCAA9, CfCAA10, CfCAA15, CfCAA38, CfCAA80, CfCAT1, CfCAT1200, CfCAG5, CfCAG15, CfCAG900, CfGACA60 e CfGACA650) desenvolvidos a partir de DNA de um isolado de *C. cacaofunesta* (Steimel et al., 2004) (Apêndices). Para isso, utilizaram-se 20 isolados de seringueira de dois estados brasileiros (10 do Acre e 10 da Bahia). Para comparação de genótipos, utilizou-se o banco de dados de Ferreira et al., 2010 (Tabela 1).

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. As amplificações de todos os locos por SSRs foram realizadas em 20 µL de reação contendo dNTP a 200mM, tampão TBE 10x, MgCl₂ a 4 mM, 5 pmol de cada primer, 0,5 unidade de enzima Taq DNA polimerase e 2µl de DNA fúngico na concentração variando de 50 a 300 ng/µL. Os ciclos de PCR foram realizados em Termociclador GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems Inc., EUA) e incluíram aquecimento inicial de 85°C por 2 min, uma etapa inicial de

desnaturação a 95 °C por 95 segundos, seguida de 35 ciclos com os seguintes passos: 94°C por 30 segundos, 58°C por 1 min para o anelamento do primer e 72°C por 30 segundos para extensão das novas cadeias de DNA e, para finalizar, um último passo de 72 °C por 30 min. As PCRs foram conduzidas em sistemas simples, com apenas um primer marcado com fluorescência (6-FAM ou HEX ou NED) por reação. Posteriormente, para as análises, as amostras foram eletroinjetadas no analisador AB 3730 (Applied Biosystems Inc., EUA). Os tamanhos dos picos foram determinados com o auxílio do software Peak Scanner (Applied Biosystems Inc., EUA).

Para as análises, cada banda foi considerada um alelo, com diferença de 2-3 pb. As relações entre os genótipos foram examinadas usando matrizes de distância genética e dendrograma gerado por UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) pelo PAUP* (Swofford, 2003).

Tabela 1. Populações utilizadas para comparação de genótipos de seringueira de Ferreira et al.

Espécies	População	Hospedeiro	Localização
<i>C. fimbriata</i>	EucBA1	<i>Eucalyptus</i> spp.	Eunápolis, BA
	EucMG1	<i>Eucalyptus</i> spp.	Curvelo, MG
	EucMG2a	<i>Eucalyptus</i> spp.	Paracatu, MG
	EucMG2a	<i>Eucalyptus</i> spp.	Paracatu, MG
	ManRJ1	<i>Mangifera indica</i>	Campus, RJ
	ManSP	<i>M. indica</i>	São Paulo
	ManRJ2	<i>M. indica</i>	São Fidélis, RJ
	FicSP	<i>Ficus carica</i>	Valinhos, SP
	ColSP	<i>Colocasia esculenta</i>	Piedade, SP
	GmelPA	<i>Gmelina arborea</i>	Jari, PA
	IpoWW	<i>Ipomoea batatas</i>	Worldwide
<i>C. cacaofunesta</i>		<i>Theobroma cacao</i>	Rondônia
	CacBR	<i>T. cacao</i>	Bahia
		<i>T. cacao</i>	Colômbia
		<i>T. cacao</i>	Costa Rica
	CacEC	<i>T. cacao</i>	Equador
<i>C. platani</i>		<i>P. occidentalis</i>	USA
	PlaUS	<i>P. occidentalis</i>	Europa
		<i>P. occidentalis</i>	Califórnia

2.6. Caracterização morfológica

Dois isolados da Bahia (denominados A05 e A50) e dois do Acre (denominados RB08 e RB17) foram selecionados para os estudos morfológicos. As

culturas foram crescidas em placas de Petri contendo meio de cultura EMLA incubadas a 28 °C com fotoperíodo de 12 horas. As medições foram realizadas após 21 dias. Lâminas com estruturas fúngicas (esporos e micélio) em ácido láctico foram observadas em microscópio composto Olympus BX53 (Olympus Japan Co. Inc.). As imagens foram capturadas com a câmera digital Olympus Q-Color 5 (Olympus Japan Co. Inc.) conectada ao microscópio e mensuradas por meios do software Imagen-Pro Plus versão 7.0 (Media Cybernetics, Inc, USA). Dimensões de ascósporos, endoconídios, aleuroconídios e conidióforos foram feitas com lente objetiva de 40X e do peritécio com lente objetiva de 10X, com uma ampliação de 2X usando o micrometro ocular. Foram feitas medições de 20 estruturas representativas de cada isolado de maneira o comprimento máximo e mínimo de cada estrutura.

2.7. Patogenicidade em diferentes espécies hospedeiras

Os isolados RB17 e A50 foram selecionados para o teste de especialização por hospedeiro. Para isso, 16 mudas para cada hospedeiro, sendo eles seringueira (*Hevea brasiliensis*, clone suscetível FX3864, porta enxerto/enxerto com brotação de seis meses de idade), mangueira (*Mangifera indica* var. 'Espada', 11 meses de idade), acácia negra (*Acacia mearnsii*, 17 meses de idade), crotalária (*Crotalaria juncea*, 44 dias de idade), kiwi (*Actinidia deliciosa* var. Monty, Hayward e Elmwood, estacas com três meses de idade) e eucalipto (híbrido *Eucalyptus urophylla* x *E. grandis*, clone suscetível 1088, estacas com três meses de idade) foram transplantadas ou semeadas para vasos de 2 L de capacidade, contendo substrato MecPlant[®] complementado com 6 Kg m⁻³ de superfosfato simples e 1,5 Kg m⁻³ de Osmocote[®] (19-6-10) e inoculadas 30 a 90 dias após o transplântio ou semeadura, dependendo da espécie. As plantas foram mantidas em casa de vegetação climatizada (temperatura 28°C). Uma suspensão com os esporos (conídios e ascósporos) dos isolados com 21 dias de idade, coletados de placas de petri com EMLA, foi preparada e calibrada para 2,5 x 10⁶ esporos mL⁻¹ (Laia et al., 2000) utilizando microscópio de luz e hemacitômetro. Para inoculação, uma incisão superficial foi realizada no caule da planta onde foram depositados 0,5 mL da suspensão e o ferimento coberto com filme de PVC. O experimento foi realizado em primeiro de março de 2012 com delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial composto de dois fatores (hospedeiro e isolado), com oito repetições para cada isolado, sendo cada planta representou uma unidade amostral. O experimento foi avaliado 37 dias após a inoculação, medindo-se o comprimento da lesão no lenho e a altura da planta

(Oliveira, 2010). Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as pressuposições de análises verificadas pelos gráficos de resíduos. Para a comparação de médias foi usado o teste Tukey ($p < 0,05$) por meio do software *STATISTICA 7.0®* (StaSoft, Inc, Tulsa, OK, USA).

3. RESULTADOS

3.1. Caracterização sintomatológica da doença, coleta de amostras e isolamento

Em geral, os sintomas da doença caracterizam-se pelo crescimento micelial do fungo superficialmente no painel de sangria, sem formação de peritécio (Figura 1). Se não houver controle o fungo poderá inutilizar o painel de sangria.

Foram coletadas 101 amostras de madeira de painéis e 21 amostras de solo (três amostras/fazenda) próximas às árvores com sintomas. Do total de amostras coletadas, isolaram-se o fungo de 51 amostras do Estado da Bahia e 18 amostras do Estado do Acre (Tabela 2). Das amostras coletadas de solo nenhum isolado foi obtido.

Tabela 2. Locais de coleta, isolados obtidos e coordenadas.

Fazenda	Município/Estado	Proprietário	Nº de isolados obtidos	Isolados estudados/Códigos	Coordenadas (UTM)
Parcela 112	Ituberá/BA	Michelin S.A	10	A01 e A05	S48°31'09'' W84°77'29.0''
PMB	Ituberá/BA	Michelin S.A	12	A16 e A21	S48°13'09'' W84°71'07.8''
Maçaranduba	Ituberá/BA	Carlos Mattos	6	A35 e A40	S47°96'80'' W84°73'78.7''
Mudururu	Ituberá/BA	Joseilton Nascimento	13	A50 e A58	S47°82'62'' W84°64'18.3''
Jatobá	Ituberá/BA	Irenildo Dantas	10	A64 e A74	S48°05'84'' W84°68'93.7''
Gema	Capixaba/AC	Amadio Cogo	15	RB02, RB05, RB08, RB09, RB11, RB13 e RB16	S64°29'12'' W88°43'51.4''
Bonal	Senador Guiomar/AC	INCRA	3	RB17, RB19 e RB21	S69°98'43'' W88°96'53.4''

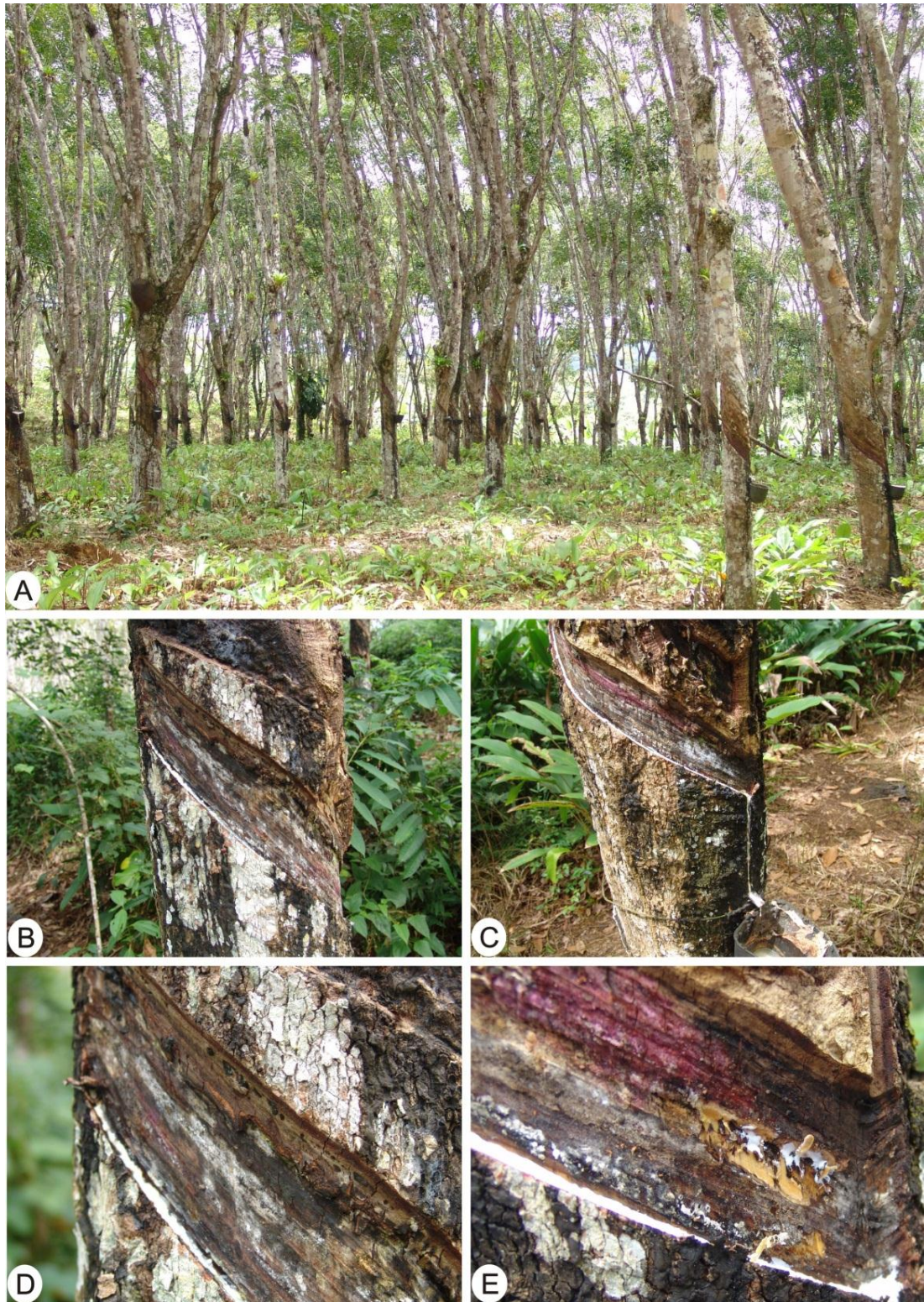


Figura 1. Sintomas do mofo cinzento em seringueira causada por *Ceratocystis fimbriata* **A**, Plantio de seringueira; **B-D**, Crescimento micelial no painel; **E**, Crescimento superficial do fungo no painel;

3.2. Análise filogenética

Foram obtidas sequências parciais de 689 pares de base (pb) para a região gênica ITS para os isolados estudados. O número de sítios informativos para a parcimônia foi de 135. O número de sítios conservados foi de 492 e o número de sítios variáveis foi de 171. O melhor modelo evolucionário selecionado pelo Mrmodeltest 2.3. para a Análise Bayesiana pelo AIC foi HKY+I+G e os parâmetros I+G com os valores 0,4778 e 0,8476, respectivamente.

A árvore filogenética para a região gênica estudada, tanto pelo método de Máxima Parcimônia quanto pela Inferência Bayesiana, mostraram a mesma topologia, com os isolados de seringueira agrupando-se com isolados brasileiros de *C. fimbriata* de mangueira, de eucalipto, de gmelina, de fícus e com isolados de *C. cacaofunesta*, *C. neglecta* de eucalipto, da Colômbia, e *C. fimbriata s.s* de batata doce, pertencentes ao clado da América latina (Figura 2). Espécies do clado da América Latina foram sustentadas por um ramo com alto valor de *bootstrap* (97) e valor moderado de PP (0,68). Foram encontrados dois genótipos de ITS entre os isolados de seringueira, com moderado suporte de *bootstrap* (72) e alto valor de PP (0,98) para o genótipo do Acre e nenhum suporte do ramo de *bootstrap* para o genótipo da Bahia, porém com moderado suporte de ramo de PP (0,72). Dentro do clado, os genótipos se agruparam distantes um do outro, sendo o genótipo da Bahia mais próximo aos isolados de Eucalipto da Bahia, enquanto que o genótipo do Acre mais próximo do isolado de mangueira de São Paulo.

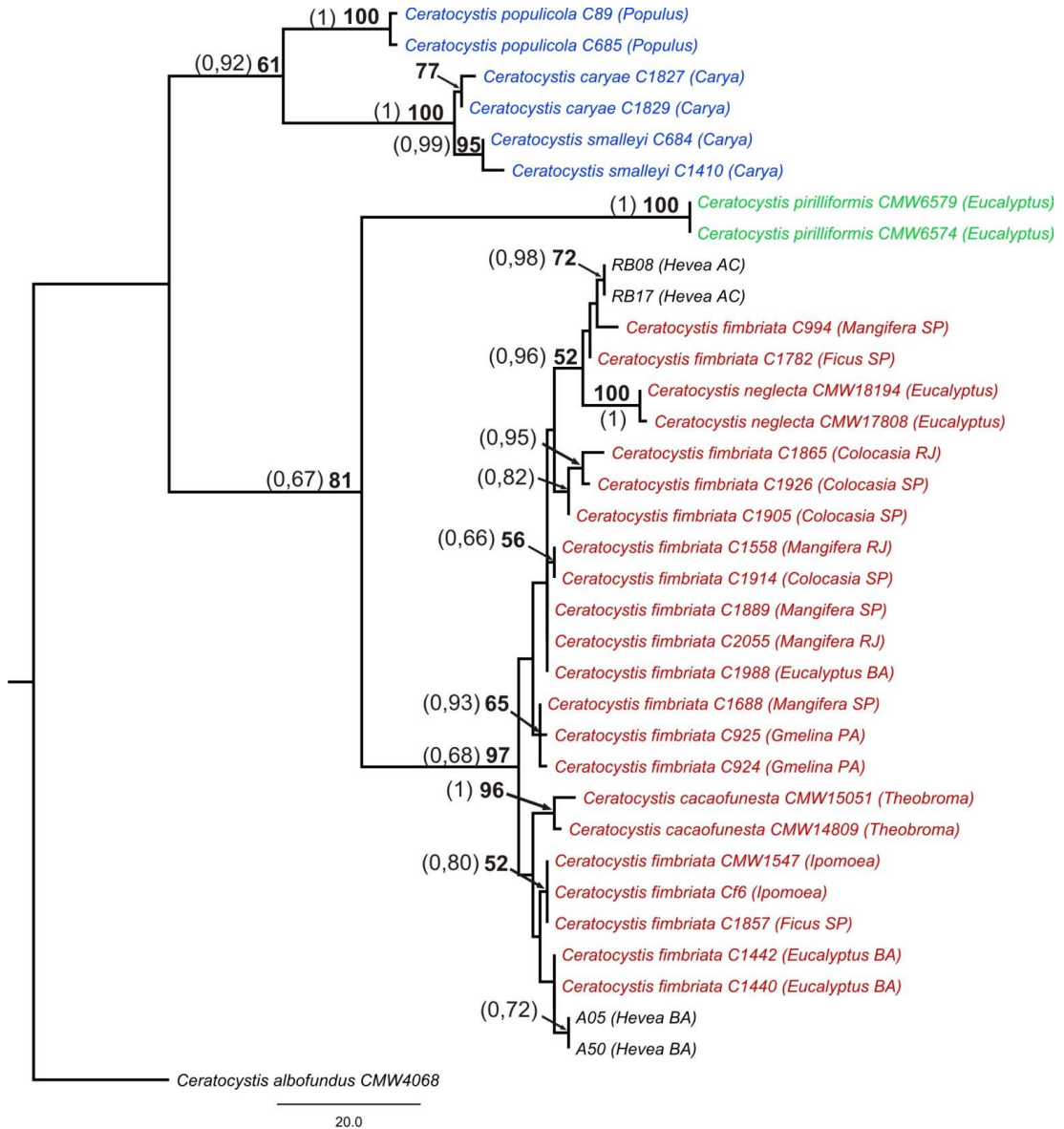


Figura 2. Uma das 100 árvores mais parcimoniosas baseado nas sequências ITS-rDNA de isolados de *Ceratocystis* sp. Os valores de *bootstrap* estão indicados em negrito, enquanto que os valores de PP estão entre parênteses. *Ceratocystis albofundus* foi usado como *outgroup*. A identificação do isolado e do hospedeiro/local (entre parênteses) estão indicados à frente do nome da espécie. As barras indicam a fração de substituição por sítio. Em vermelho estão destacados os isolados pertencentes ao clado da América Latina, incluindo os isolados de seringueira (em preto), em verde os isolados pertencentes ao clado da Ásia e em azul os isolados pertencentes ao clado da América do Norte.

3.3. Análises de microssatélites

O dendrograma gerado por UPGMA mostrou que não há variabilidade genética nas populações dentro de cada Estado, porém as populações do Acre e da Bahia foram divergentes entre si, separando em dois genótipos de microssatélites (Figura 3).

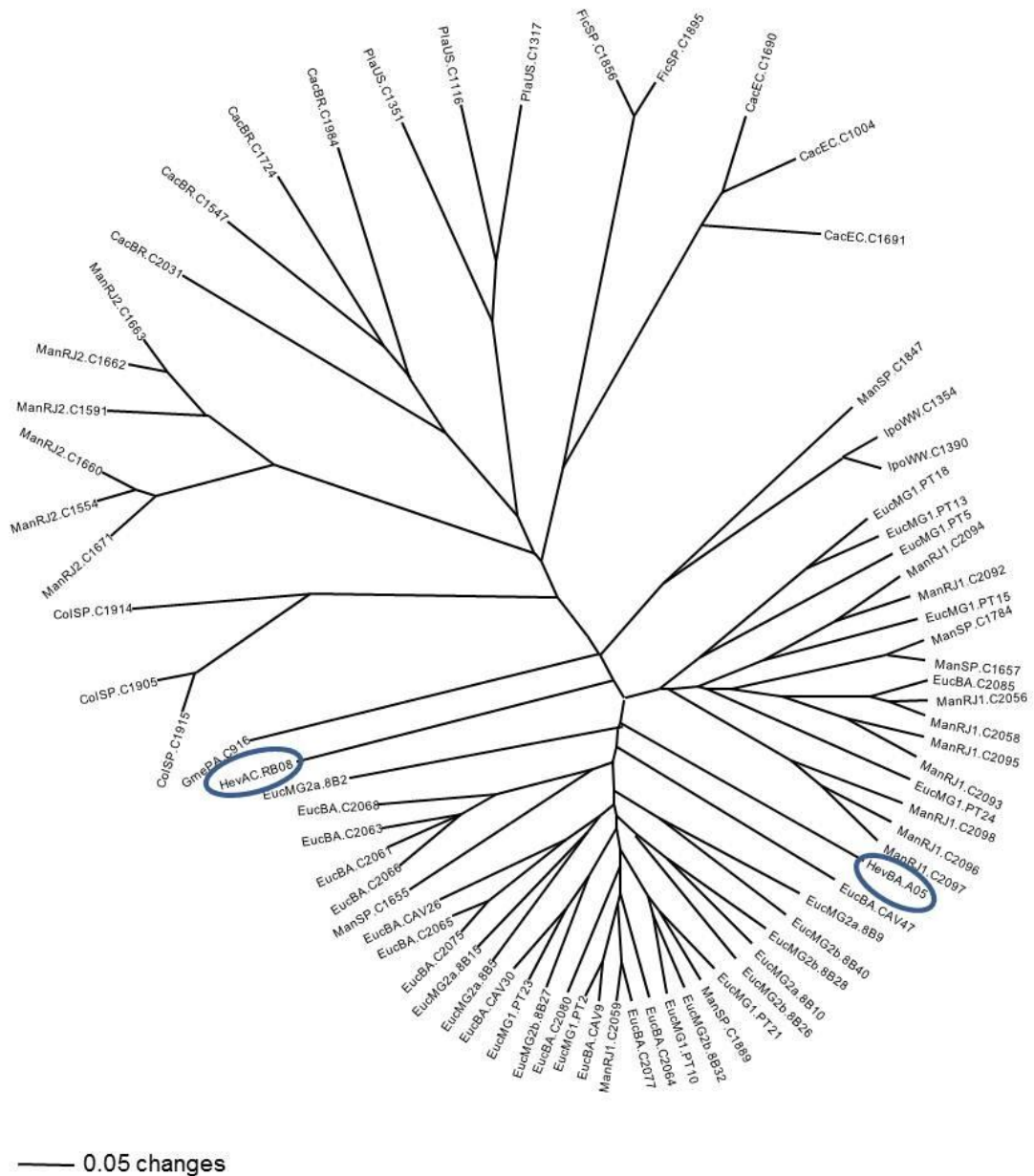


Figura 3. Dendrograma de genótipos de *Ceratocystis fimbriata*, *C. cacaofunesta* e *C. plantani* gerado pelo UPGMA (“Unweighted pair group method”, média aritmética) baseado na matriz de distância genética. Genótipos de dos isolados de *Hevea* do Acre e Bahia estão marcados com um círculo azul.

3.4. Caracterização morfológica

Os isolados estudados foram morfológicamente indistinguíveis entre eles e do isolado *C. fimbriata* s.s. por possuírem anamorfo, acomodado no gênero *Thielaviopsis*, com tipo de fiálide lageniforme produzindo conídios hialinos cilíndricos (Figuras 4 e 5). Além de não produzirem conidióforo secundário com conídios barriliformes (Engelbrecht & Harrington, 2005).

Os resultados das avaliações mostraram que os *peritécios* são superficiais ou embebidos no substrato, coloração variando de marrom escuro a preta, globosa com 120 - 252 μm de comprimento e 115 - 241 μm de largura. *Pescoço* com a mesma coloração da base e com 172 - 668 μm de comprimento e 23 - 59 μm largura da base e 14 - 24 μm no ápice. A *hifa ostiolar* é divergente, hialina, sem septo com parede lisa e com 53 - 98. Os *ascósporos* são hialinos, forma de chapéu com 5 - 7 μm de comprimento e 3 - 4 μm de largura, acumulando-se numa matriz de cor creme, no ápice do peritécio. Os *endoconidióforos* possuem 1 - 11 septos e 51 - 240 μm de comprimento e 2 - 5 largura da base. As *fiálides* são lageniformes com 36 - 69 μm de comprimento, 3 - 8 largura no meio e 2 - 5 largura no ápice com coloração marron pálida. Os *endoconídios* são unicelulares, hialinos, lisos, cilíndricos com 10 - 22 X 3 - 5 μm originados em cadeias de tamanho variado. Os isolados estudados não possuem endoconídios doliformes. *Aleuroconidióforo* com 0 - 6 septos e dimensões de 7 - 89 μm comprimento, 2 - 5 μm largura da base. Os *aleuroconídios* são marrons, globosos a piriliforme com 13 - 18 X 8 - 14 μm , ocorrendo sozinhos ou em cadeias curtas.

Habitat: Hevea brasiliensis.

Distribuição conhecida: Estados do Acre e Bahia, Brasil.

Material utilizado para descrição morfológica: Municípios Senador Guiomar e Capixaba, Acre e Ituberá, Bahia, Brasil, amostra de madeira de painel de sangria de *Hevea brasiliensis* infectadas, 2011, D.C.O.F. Valdetaro & A.F. Alfenas, quatro isolados.

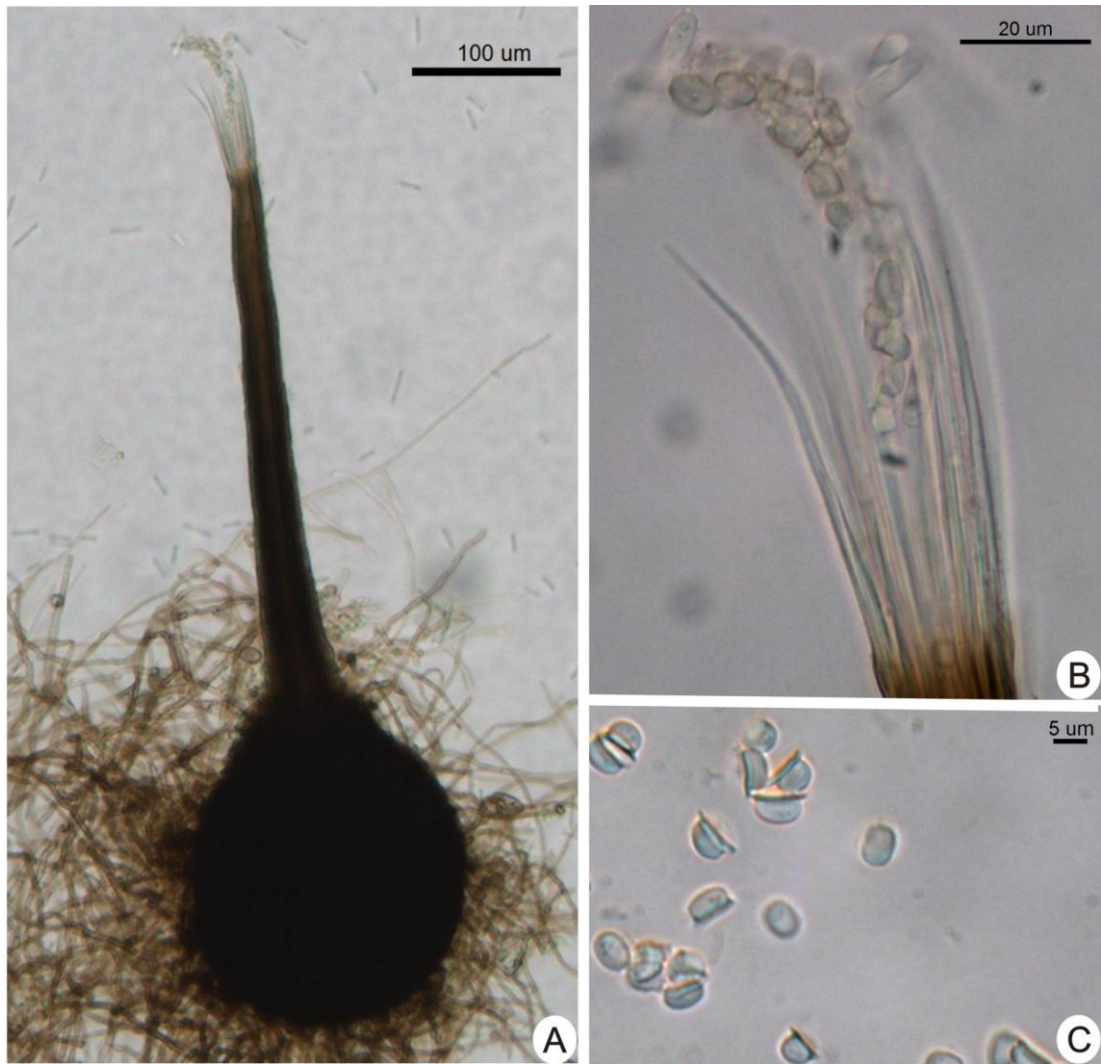


Figura 4. Características morfológicas de *Ceratocystis fimbriata* de *Hevea brasiliensis*. **A**, peritécio de base globosa e ostíolo rostrado; **B**, hifa ostiolar; **C**, ascósporos em forma de chapéu.



Figura 5. Características morfológicas de *Ceratocystis fimbriata* de *Hevea brasiliensis*: **A**, endoconióforo primário com fiálide produzindo conídio; **B**, endoconídio primário cilíndrico; **C**, aleuroconidióforo e aleuroconídio.

3.5. Patogenicidade em diferentes espécies hospedeiras

Os dois isolados de seringueira avaliados foram patogênicos a todos os hospedeiros testados (mangueira, eucalipto, acácia, kiwi e crotalária). Houve interação significativa ($P < 0,05$) entre hospedeiro e isolado (Apêndices), demonstrando que a resistência no presente patossistema é isolado-específica. Para as plantas utilizadas como testemunhas, em que se utilizou água destilada no lugar do fungo, não foram observados sintomas de escurecimento do lenho ou de murcha, mas apenas uma pequena lesão (± 2 cm) em resposta ao ferimento. Já as plantas inoculadas exibiram sintomas típicos causados por *C. fimbriata*, como lesão escurecida no sentido longitudinal do caule e, em alguns casos, murcha apical

progredindo para murcha generalizada. Ao final do experimento, foi realizado reisolamento de cada isolado e as colônias apresentavam o mesmo padrão anterior à inoculação.

O isolado RB17 foi mais agressivo em seringueira com valor médio de severidade de 43%, porém para os outros hospedeiros não houve diferença significativamente entre os isolados (Tabela 3). Dentre eles, o RB17 apresentou maior espectro de ação, com valores de severidade significativos ($P < 0,005$) em todos os hospedeiros inoculados, sendo a maior severidade para crotalária, de 97% e a menor para mangueira, de 4%. Para o A50, não houve diferença significativa entre seringueira, acácia e mangueira quanto a severidade (Tabela 3).

Tabela 3. Teste de Tukey ($p \leq 0,05$) para as médias de severidade (%) de cada combinação isolados de seringueira x hospedeiros. Hospedeiros estão representados verticalmente na primeira coluna e isolados horizontalmente na primeira linha.

Hospedeiro/Isolado	RB17	A50
Crotalária	97,49 A a	100 A a
Seringueira	43,74 B a	5,87 D b
Kiwi	21,51 C a	21,26 B a
Eucalipto	14,61 D a	10,34 C a
Acácia	9,11 E a	5,33 D a
Manga	4,85 F a	4,00 D a

*médias seguidas pela mesma letra maiúscula na vertical não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

*médias seguidas pela mesma letra minúscula na horizontal não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

4. DISCUSSÃO

Devido à visão contemporânea do complexo *fimbriata* estar relacionada à existência de várias espécies crípticas, realizou-se, neste trabalho, análises filogenéticas, de variabilidade genética por microssatélites e de especialização de hospedeiros em isolados de seringueira. Não houve marcador morfológico entre os isolados de seringueira e *C. fimbriata* s.s. A falta de marcadores morfológicos consistentes impedem o reconhecimento de uma nova espécie dentro do complexo *fimbriata* (Webster & Butler, 1967a), porém análises da região ITS r-DNA ou outras análises genéticas tem mostrado que existem vários subgrupos ou clados dentro do complexo *fimbriata* (Harrington, 2000). Desse modo, para determinação de novas espécies estão sendo usadas, além dos estudos morfológicos, técnicas moleculares

que podem facilitar a diferenciação entre linhagens ou espécies crípticas (Jonhson et al., 2005; Ferreira et al., 2010; Harrington et al., 2011).

Neste trabalho, de acordo com as sequências de ITS r-DNA analisadas, os isolados de *C. fimbriata* de seringueira pertencem ao clado da América Latina. Ainda de acordo com essas análises verificou-se a existência de dois genótipos de ITS, um do Acre e outro da Bahia. Esses resultados corroboram com o observado anteriormente por Harrington (2000), que permitiram agrupar os isolados brasileiros de *C. fimbriata* no clado da América Latina. Entretanto, a região ITS r-DNA é suficiente apenas para determinar a que clado pertencem os isolados de *C. fimbriata*, aparentemente devido aos seus *indels* hipervariáveis, especialmente na região ITS1 (Harrington et al., 2011). Outros genes como Fator de alongação (*EF1*) e Beta-tubulina (*βt*) vem sendo utilizados para separação de espécies dentro do complexo *C. fimbriata* (Rodas et al., 2008; Van Wyk et al., 2009; Van Wyk, et al., 2010; Van Wyk et al., 2010), mas estes genes não possuem resolução suficiente para separar espécies do complexo *fimbriata* dentro do clado da América Latina, principalmente para populações brasileiras de *C. fimbriata*.

Os dois genótipos de ITS encontrados nos isolados de seringueira estudados, também foram confirmados por análises de microssatélites. Segundo Ferreira et al. (2010) populações separadas geograficamente no Brasil tendem a ser diferentes geneticamente, supostamente, devido a dispersão limitada a longa distância por disseminadores secundários como insetos, pela ocorrência de autofecundação ou seleção de agressividade a uma cultura específica. Neste trabalho, devido a baixa variabilidade genética, sugere-se que os genótipos encontrados foram, possivelmente, introduzidos nos respectivos plantios, e disseminados dentro do plantio pela utilização de ferramentas para a sangria. De acordo com Ferreira (1989) e Gasparotto et al. (1997) este é o principal modo de disseminação da doença em um seringal, que também é responsável pela distribuição do inóculo no painel ao longo da linha de corte. Espécies de *Ceratocystis* podem ser introduzidas facilmente em novas áreas via ferramentas e material propagativo contaminados (Harrington, 2000; Baker et al., 2003; Engelbrecht & Harrington, 2005; Ferreira et al., 2011). Populações de *Ceratocystis* spp. introduzidas por ferramentas contaminadas ou material propagativo mostraram pouco ou nenhuma variação genética (Harrington, 2000; Baker et al., 2003; Thorpe et al., 2005; Ferreira et al., 2010; Ferreira et al., 2011). Em contra partida, a alta incidência da doença e diversidade genética encontrada em populações

de *Ceratocystis* em plantações de *Eucalyptus* no estado de Minas Gerais, em locais anteriormente de cerrado, sugerem que as árvores de *Eucalyptus* foram infectadas por inóculos existente no solo e que *C. fimbriata* pode ser nativo deste tipo de floresta (Ferreira et al., 2010; Ferreira et al., 2011).

Estudos de intersterilidade e de inoculação, importantes para determinar espécies biológicas e especialização por hospedeiro, respectivamente, também são utilizados para dar maior suporte na descrição de novas espécies (Johnson et al., 2005, Engelbrech & Harrington, 2005, Ferreira et al. 2010). Em adição a morfologia, linhagens hospedeiros-especializados podem ser utilizadas como um caráter diagnóstico de espécies (Engelbrech & Harrington, 2005). Ainda, segundo os mesmos autores, a especialização de hospedeiro pode ser um fator importante na condução de especiação dentro do gênero *Ceratocystis*. Para *C. fimbriata* Baker et al. (2003) demonstraram que a não especialização e sim a existência de uma ampla variação de agressividade entre os isolados brasileiros de *C. fimbriata* em vários hospedeiros e especialmente para *C. juncea*.

Neste trabalho, a especialização por hospedeiro não foi evidente para os isolados estudados uma vez os isolados de seringueira utilizados foram patogênicos às diferentes espécies inoculadas (*M. indica*, *C. juncea*, *A. mersnii*, *Eucalyptus* - híbrido *Eucalyptus urophylla* x *E. grandis*, *A. deliciosa* e *H. brasiliensis*). Com diferença na agressividade dos isolados frente aos diferentes hospedeiros inoculados. Conforme demonstrado por Harrington et al. (2011) isolados brasileiros variam amplamente em agressividade para diferentes hospedeiros, mas não mostram forte especialização com o hospedeiro. Os resultados obtidos por Oliveira (2010) também mostram que há diferentes níveis de agressividade entre isolados de *C. fimbriata* oriundos de clones de *Eucalyptus* sp. no Brasil.

Portanto, baseado em evidências morfológicas, filogenéticas e hospedeiro especializado os isolados de seringueira pertencem ao clado da América Latina e são confirmados como *C. fimbriata* e não uma espécie distinta. Esse resultado enfatiza a importância de se conhecer a gama de hospedeiros desse patógeno, de modo a facilitar o manejo da doença e o desenvolvimento medidas quarentenárias para minimizar o risco de introdução de formas especializadas do patógeno em plantios livres da doença.

5. CONCLUSÃO

Os resultados deste trabalho permitiram demonstrar que:

- i. Os isolados de seringueira do Acre e da Bahia foram morfológicamente indistinguíveis entre si e do *C. fimbriata* s.s.;
- ii. Confirmou-se que o mofo cinzento em seringueira é causado por *C. fimbriata* pertencente ao clado da América Latina;
- iii. Não houve variabilidade genética dentro das populações em cada estado, mas sim entre as populações;
- iv. Não houve especialização por hospedeiros para os isolados estudados.

6. REFERÊNCIAS

- Albuquerque FC, Duarte MLR, Silva HM (1972) Ocorrência do mofo cinzento (*Ceratocystis fimbriata*) da seringueira. In: Seminário Nacional da Seringueira. Cuiabá, MS. 125-128.
- Alfenas AC, Zauza EAV, Mafia RG, Assis TF (2009) Clonagem e doenças do eucalipto - 2ª Edição. Editora UFV. 500p.
- Alfenas AC, Mafia RG (2007) Métodos em Fitopatologia. Editora UFV. Universidade Federal de Viçosa. 382p.
- Alvarenga AP, Carmo CAFS (2008) Seringueira. EPAMIG, Viçosa MG. 894p.:il.
- Baker CJ, Harrington TC, Krauss U, Alfenas AC (2003) Genetic variability and host specialization in the Latin American clade of *Ceratocystis fimbriata*. *Phytopathology* 93:1274–1284.
- Carvalho MB (1938) Sobre dois insetos nocivos à mangueira. *Boletim da Secretaria da Agricultura. Indústria e Comércio do Estado de Pernambuco* 3(2):130-132.
- Castellani A (1939) The viability of some pathogenic fungi in sterile distilled water. *Journal of Tropical Medicine Hygiene* 42: 225-226.
- Costa RB, Gonçalves PS, Rimoli AO, Arruda EJ (2001) Melhoramento e conservação genética aplicados ao desenvolvimento local – o caso da seringueira (*Hevea* sp.). *Revista Internacional de Desenvolvimento Local* 2 (1):51-58.
- Engelbrecht CJ, Harrington TC (2005) Intersterility, morphology and taxonomy of *Ceratocystis fimbriata* on sweet potato, cacao and sycamore. *Micologia* 97:57-69.
- Ferreira FA, Maffia LA, Barreto RW, Demuner NL, Pigatto S (2006) Sintomatologia da murcha de *Ceratocystis fimbriata* em eucalipto. *Revista Árvore* 2(30):155-162.
- Ferreira FA (1989) Patologia floresta: principais doenças florestais no Brasil. Viçosa MG. SIF. 570p
- Ferreira EM, Harrington TC, Thorpe DJ, Alfenas AC (2010) Genetic diversity and interfertility among highly differentiated populations of *Ceratocystis fimbriata* in Brazil. *Plant Pathology* 59: 721-735.

- Ferreira MA, Harrington TC, Alfenas AC, Mizubuti ESG (2011) Movement of genotypes of *Ceratocystis fimbriata* within and among *Eucalyptus* plantations in Brazil. *Phytopathology* 101:1005-1012.
- Figueiredo P, Pinheiro ED (1969) Uma nova doença da figueira (*Ficus carica* L.) na região de Valinhos, SP. *O Biológico* 35:227-203.
- Furtado EL (2007) Doenças da seringueira e seu manejo no Brasil. *Informe agropecuário BH* 237(28):78-87.
- Gasparotto L, Santos AF, Pereira JCR, Ferreira FA (1997) Doenças da seringueira no Brasil. Brasília: Embrapa-SPI; Manaus: Embrapa-CPAA, 168p.
- Halsted BD, Fairchild DG (1891) Sweet-potato black rot. *Journal of Mycology* 7: 1-11.
- Halsted BD (1890) Some fungous diseases of the sweet potato. The black rot. *New Jersey Agriculture Experiment Station Bulletin* 76:7-14.
- Harrington TC (2000) Host specialization and speciation in the American wilt pathogen *Ceratocystis fimbriata*. *Fitopatologia Brasileira* 25S:262-263.
- Harrington TC, Thorpe DJ, Alfenas AC (2011) Genetic variation and variation in aggressiveness to native and exotic hosts among Brazilian populations of *Ceratocystis fimbriata*. *Phytopathology* 101:555-566.
- Huelsenbeck JP, Ronquist F (2001) MRBAYES: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics* 17:754-755.
- Johnson JA, Harrington TC, Engelbrecht CJB (2005) Phylogeny and taxonomy of the North American clade of the *Ceratocystis fimbriata* complex. *Micologia* 97:1067-1092.
- Laia ML, Alfenas AC, Harrington TC (2000) Isolation, detection in soil, and inoculation of *Ceratocystis fimbriata*, causal agent of wilting, die-back and canker in *Eucalyptus* (Abstract). *Fitopatologia Brasileira* 25:384.
- Lorenzi H (1992) Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa: Plantarum. 352p.
- Muchovej JJ, Albuquerque FC, Ribeiro GT (1978) *Gmelina arborea* – a new host of *Ceratocystis fimbriata*. *Plant Disease Reporter* 62:717-719.
- Nylander JAA (2004) MrModeltest Version 2. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University.
- Oliveira, LSS (2010) Agressividade de isolados de *Ceratocystis fimbriata* em clones de *Eucalyptus* sp. Dissertação. Universidade Federal de Viçosa MG.

- Pereira JCR, Santos AF dos (1985b) Controle químico do mofo cinzento no painel de sangria da seringueira. Manuas, AM. Comunicado técnico. n.46, 4p.: Embrapa.
- Pyenson L (1938) Problems of applied entomology in Pernambuco. II. A survey of some of the pests of the crops of Pernambuco. *Revista de Entomologia*. Rio de Janeiro 9:16-31.
- Rambaut A, Drummond AJ (2007) Tracer v1.4., <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>.
- Ribeiro GT (1982) 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.
- Ribeiro IJA, Ito MF, Rossetto CJ (1984) *Cassia renigera* Wall., um novo hospedeiro de *Ceratocystis fimbriata* Ell. & Halst. *Fitopatologia Brasileira* 9:322.
- Ribeiro IJA, Ito MF, Rossetto CJ (1987) *Cassia renigera* Wall.: novo hospedeiro de *Ceratocystis fimbriata* Ell. & Halst. *Bragantia* 46:417-423.
- Rodas CA, Roux J, Van Wyk M, Wingfield BD, Wingfield MJ (2008) *Ceratocystis neglecta* sp. nov., infecting *Eucalyptus* trees in Colombia. *Fungal Diversity* 28: 73-84.
- Ronquist F, Huelsenbeck JP (2003) MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19:1572-1574.
- Silveira AP, Cardoso RMG, Neto FB, Oliveira DA (1985) Ocorrência e controle químico do mofo cinzento (*Ceratocystis fimbriata* Ell. E Hast.) da seringueira. *Fitopatologia Brasileira* 2(10):281.
- Swofford DL (2003) *PAUP**. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Steimel J, Engelbrecht CJB, Harrington TC (2004) Development and characterization of microsatellite markers for fungus *Ceratocystis fimbriata*. *Molecular Ecology Notes* 4:215-218.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011) MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* 28:2731-2739.
- Thompson JD, Higgins D, Gibson TJ (1992) CLUSTAL versionW: a novel multiple sequence alignment program. *Nucleic Acids Research* 22: 4673-4680.

- Thorpe DJ, Harrington TC, Uchida JY (2005) Pathogenicity, internal transcribed spacer-rDNA variation, and human dispersal of *Ceratocystis fimbriata* on the family Araceae. *Phytopathology* 95:316–23.
- Van Wyk M, Al Adawi AO, Khan IA, Deadman ML, Al Jahwari AA, Wingfield BD, Ploetz R. e Wingfield MJ (2007) *Ceratocystis manginecans* sp. nov., causal agent of a destructive mango wilt disease in Oman and Pakistan. *Fungal Diversity* 27: 213-230.
- Van Wyk M, Wingfield BD, Mohali S, Wingfield MJ (2009) *Ceratocystis fimbriatomima*, a new species in the *C. fimbriata sensu lato* complex isolated from *Eucalyptus* trees in Venezuela. *Fungal Diversity* 34: 175-185.
- Van Wyk M, Wingfield BD, Marin M, Wingfield MJ (2010) New *Ceratocystis* species infecting coffee, cacao, citrus and native trees in Colombia. *Fungal Diversity* 40:103–117.
- Van Wyk M, Wingfield BD, Wingfield MJ (2010) Four new *Ceratocystis* spp. associated with wounds on *Eucalyptus*, *Schizolobium* and *Terminalia* trees in Ecuador. *Fungal Diversity* 46 (1): 111-163.
- Van Wyk M, Wingfield BD, Al Adawi AO, Rossetto CJ, Ito MF, Wingfield MJ (2011) Two new *Ceratocystis* species associated with mango disease in Brazil. *Mycotaxon* 24(117):381-404
- Webster RK, Butler EE (1967a) A morphological and biological concept of the species *Ceratocystis fimbriata*. *Canadian Journal of Botany* 45:1457-1468.
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR Protocols: A sequencing guide to methods and applications*. (eds. M.A. Innis, D.H Gelfand, J.J. Sninsky and T.J.White) Academic Press, San Diego 315-322.

7. APÊNDICES

Apêndice 1. Sequências da região ITS obtidas no Genbank, pertencentes ao Clado da América Latina

Espécies	Número do isolado	Acesso	Hospedeiro	Local
<i>C. fimbriata</i>	C994	AY157964	<i>Mangifera</i>	SP/Brasil
<i>C. fimbriata</i>	C1558	AY157965	<i>Mangifera</i>	RJ/Brasil
<i>C. fimbriata</i>	C1889	HQ157547	<i>Mangifera</i>	SP/Brasil
<i>C. fimbriata</i>	C1688	AY526291	<i>Mangifera</i>	SP/Brasil
<i>C. fimbriata</i>	C2055	HQ157548	<i>Mangifera</i>	RJ/Brasil
<i>C. cacaofunesta</i>	CMW15051	DQ520636	cacau	Brasil
<i>C. cacaofunesta</i>	CMW14809	DQ520637	Cacau	Brasil
<i>C. fimbriata</i>	Cf6	EF042607	<i>Ipomoea batatas</i>	USA
<i>C. fimbriata</i>	CMW1547	AF264904	<i>Ipomoea batatas</i>	Papua Nova Guiné
<i>C. fimbriata</i>	C1865	AY526286	<i>Colocasia</i>	RJ/Brasil
<i>C. fimbriata</i>	C1905	AY526288	<i>Colocasia</i>	SP/Brasil
<i>C. fimbriata</i>	C1926	HQ157541	<i>Colocasia</i>	SP/Brasil
<i>C. fimbriata</i>	C1914	HQ157540	<i>Colocasia</i>	SP/Brasil
<i>C. fimbriata</i>	C1782	AY526292	<i>Ficus carica</i>	SP/Brasil
<i>C. fimbriata</i>	C1857	HQ157542	<i>Ficus carica</i>	SP/Brasil
<i>C. fimbriata</i>	C925	AY157967	<i>Gmelina arborea</i>	PA/Brasil
<i>C. fimbriata</i>	C924	HQ157539	<i>Gmelina arborea</i>	PA/Brasil
<i>C. fimbriata</i>	C1440	HQ157544	<i>Eucalyptus</i> spp.	BA/Brasil
<i>C. fimbriata</i>	C1442	HQ157545	<i>Eucalyptus</i> spp.	BA/Brasil
<i>C. fimbriata</i>	C1988	HQ157543	<i>Eucalyptus</i> spp.	BA/Brasil
<i>C. neglecta</i>	CMW18194	EF127991	<i>Eucalyptus grandis</i>	Colombia
<i>C. neglecta</i>	CMW17808	EF127990	<i>Eucalyptus grandis</i>	Colombia
<i>C. albofundus</i>	CMW4068	DQ520638	<i>Acacia mearnsii</i>	África do Sul

Apêndice 2. Sequências da região ITS obtidas no Genbank.pertencentes ao Clados da América do Norte e Ásia

Espécies	Isolado	Acesso	Hospedeiro	Local
<i>C. populicola</i>	C89	AY907027	Populus tremuloides	USA
<i>C. populicola</i>	C685	AY907028	Populus tremuloide	Canadá
<i>C. caryae</i>	C1827	AY907034	Carya ovata	USA
<i>C. caryae</i>	C1829	AY907035	Carya cordiformis	USA
<i>C. smalleyi</i>	C684	AY907030	Carya cordiformis	USA
<i>C. smalleyi</i>	C1410	AY907031	Carya cordiformis	USA
<i>C. pirilliformis</i>	CMW 6579	AF427105	Eucalyptus nitens	Austrália
<i>C. pirilliformis</i>	CMW6574	AF427106	Eucalyptus nitens	Austrália

Apêndice 3. Locos, primers, e número de acesso no GenBank de marcadores microsatélite 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	
CfGACA60	GACA60-1F	5'-GGC-GAC-GGC-AAA-TAG-CAA-AAT	AY494874
	GACA60-1R	5'-GAT-GTG-TGG-TGC-IGT-GGT-ATG-CTG-CTG	
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.

Apêndice 4. Análise de variância da severidade

Fonte	GL	SQ	QM	F	P
Hospedeiro	5	100590,9	20118,2	2247,78	0,000
Isolado	1	1319,5	1319,5	147,42	0,000
Hospedeiro * Isolado	5	4573,4	914,7	102,20	0,000
Erro	84	751,8	9,0		
Total	95	107235,6			