

LEONARDO SARNO SOARES OLIVEIRA

**AGRESSIVIDADE DE ISOLADOS DE *Ceratocystis fimbriata* EM
CLONES DE *Eucalyptus* spp.**

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
2010**

LEONARDO SARNO SOARES OLIVEIRA

**AGRESSIVIDADE DE ISOLADOS DE *Ceratocystis fimbriata* EM
CLONES DE *Eucalyptus* spp.**

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 EM: 22 de julho de 2010

Luiz Antonio Maffia
(Coorientador)

Prof. Eduardo Seiti Gomide Mizubuti
(Coorientador)

Dr. Reginaldo Gonçalves Mafía

Dr. Lúcio Mauro da Silva Guimarães

Prof. Acelino Couto Alfenas
(Orientador)

Ao mestre, exemplo de dedicação e profissionalismo na Patologia Florestal

Professor Acelino Couto Alfenas

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Deus por estar aqui.

À minha família, Antonio, Helena, Tereza e Zaia (*in memorian*), pelo amor e apoio durante todas as etapas da minha vida, inclusive neste trabalho.

À Universidade Federal de Viçosa pelo apoio na execução do trabalho e minha formação.

Ao Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa pelo curso a mim oferecido e suporte para que este trabalho acontecesse.

Aos Professores da UFV pelos ensinamentos ao longo de toda minha vida universitária na graduação e na pós-graduação.

Aos Funcionários de UFV e do Departamento de Fitopatologia pela ajuda na execução das atividades.

Ao professor Acelino Couto Alfenas pelos ensinamentos e amizade desde o início da minha formação profissional, fornecendo sempre suporte e conhecimento.

À Márcia Brandão pela amizade, auxílio e paciência durante todo o tempo que trabalhei no laboratório de Patologia Florestal.

Aos amigos de Laboratório pela amizade e ajuda sempre que necessária.

Aos meus amigos da Engenharia Florestal que acompanharam a minha formação durante vários anos na UFV.

Ao Márcio, Fred, Serjão, Vitor, e demais floresteiros pela amizade e histórias construídas em Viçosa.

Às amigas Bruna, Camila, Nanda, Ana Cláudia, Aninha e demais floresteiras pela amizade construída em Viçosa.

À Lívia pelo companheirismo durante muitos anos.

Aos amigos da Ventania e de república pelo convívio.

Aos amigos do departamento de Fitopatologia pela amizade, convívio e troca de experiências profissionais.

À todos que direta e indiretamente contribuíram para realização desta obra.

BIOGRAFIA

Leonardo Sarno Soares Oliveira, filho de Antonio de Oliveira Soares e Maria do Rosário Sarno de Oliveira, nasceu no dia 13/05/1986 na cidade de Alpinópolis, Minas Gerais.

Ingressou na Universidade Federal de Viçosa no curso de Engenharia Florestal no ano de 2004. Foi bolsista de iniciação científica de 2005 a 2008 no Laboratório de Patologia Florestal com a orientação de Acelino Couto Alfenas. Fez intercâmbio na Austrália por cinco meses no ano de 2008.

Colou grau no ano de 2009 e em seguida ingressou no mestrado no Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia pela mesma Universidade na área de Patologia Florestal sob orientação de Acelino Couto Alfenas.

SUMÁRIO

RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
1. INTRODUÇÃO	1
2. MATERIAL E MÉTODOS	3
2.1. ISOLADOS	3
2.2. MATERIAL VEGETAL	4
2.3. INOCULAÇÃO	5
2.4. AVALIAÇÃO	6
2.5. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISES	6
3. RESULTADOS	7
4. DISCUSSÃO	11
5. CONCLUSÃO	14
6. REFERÊNCIA BIBLIOGRAFICA	15

RESUMO

OLIVEIRA, Leonardo Sarno Soares, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2010. **Agressividade de isolados de *Ceratocystis fimbriata* em clones de *Eucalyptus* spp.** Orientador: Acelino Couto Alfenas. Coorientadores: Luiz Antonio Maffia e Eduardo Seiti Gomide Mizubuti.

Espécies do complexo *Ceratocystis fimbriata sensu lato* (s.l.) são importantes patógenos de um grande número de plantas arbóreas e herbáceas, com destaque para a cultura do eucalipto. A doença causada por *C. fimbriata*, denominada murcha-de-ceratocystis, é considerada emergente e de difícil controle por se tratar de um patógeno vascular e com ampla gama de hospedeiros. A principal forma de controle da doença é feita pelo plantio de material resistente, mas a possível variabilidade na população do patógeno pode comprometer a seleção de genótipos resistentes. Neste trabalho, avaliou-se a variabilidade patogênica de isolados de *C. fimbriata* obtidos de plantas de *Eucalyptus* spp. no Brasil. Foram inoculados dez isolados do fungo em dez clones comerciais de *Eucalyptus* spp. O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial composto de dois fatores (clone X isolado), com quatro repetições. Aos 60 dias após a inoculação, avaliou-se o comprimento de lesão no lenho em relação a altura da planta (% de tecido doente). Os isolados apresentaram variabilidade patogênica, diferenciando em vários níveis de agressividade. Os isolados ANG1 e PT15 foram os menos agressivos, causando infecções em apenas um clone. Os isolados RM35 e PT12 foram os mais agressivos, sendo que o primeiro foi capaz de infectar oito dos dez clones inoculados. Os demais isolados tiveram valores intermediários e variaram a agressividade de acordo com o clone avaliado. Os clones 386 e A06 foram os mais resistentes, enquanto 1172 e 1288 os mais suscetíveis. Esses clones altamente resistentes e altamente suscetíveis podem ser utilizados como comparadores nos experimentos de inoculação controlada e no campo. O resultado do presente trabalho permite concluir que existe variabilidade patogênica na população de *C. fimbriata* de *Eucalyptus* spp. e que os isolados mais agressivos são recomendados para as inoculações artificiais visando a seleção de genótipos resistentes à doença.

ABSTRACT

OLIVEIRA, Leonardo Sarno Soares, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2010. **Aggressiveness of isolates of *Ceratocystis fimbriata* in clones of *Eucalyptus* spp.** Orientador: Acelino Couto Alfenas. Coorientadores: Luiz Antonio Maffia e Eduardo Seiti Gomide Mizubuti.

Species of the complex *Ceratocystis fimbriata* sensu lato (sl) are important pathogens of a large number of woody plants and herbs, especially the cultivation of eucalyptus. The disease caused by *C. fimbriata*, called *Ceratocystis* wilt, is considered an emerging disease and difficult to control because it is a vascular pathogen with wide host range. The main way for disease control is done by planting resistant material, but the possible variability in the pathogen population may affect the selection of resistant genotypes. In this study, we evaluated the aggressivity of isolates of *C. fimbriata* obtained from *Eucalyptus* spp. in Brazil. Ten isolates were inoculated in ten commercial clones of *Eucalyptus* spp. The experiment was conducted in a randomized design in factorial composed of two factors (clone X isolate) with four replications. At 60 days after inoculation, we evaluated the length of lesion in the wood in relation to height (% of diseased tissue). The isolates presented pathogenic variability, differing at various levels of aggressiveness. The ANG1 and PT15 isolates were less aggressive, causing infections in just one clone. The isolates RM35 and PT12 were the most aggressive, while the first was able to infect eight of the ten clones inoculated. The remaining isolates had intermediate values and aggression varied according to clone evaluated. Clones 386 and A06 were the most resistant, while 1172 and 1288 the most susceptible. These clones highly resistant and highly susceptible can be used as comparators in controlled experiments and field inoculation. The result of this work shows that there is variability in the population of *C. fimbriata* in *Eucalyptus* spp. and that the most aggressive isolates are recommended for artificial inoculations to select disease resistant genotypes.

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, *Ceratocystis fimbriata* Ellis & Halsted é um dos mais importantes fitopatógenos do eucalipto. Além do eucalipto, *C. fimbriata* tem sido relatado em diversas espécies agronômicas e florestais como *Acacia mearnsii* (Santos & Ferreira, 2003), *Cassia fistula* (Galli, 1958), *Cassia renigera* (Ribeiro et al., 1987), *Colocasia esculenta* (Harrington et al., 2005), *Ficus carica* (Valarini & Tokeshi, 1980) *Gmelina arborea* (Muchovej et al., 1978), *Mangifera indica* (Batista, 1960) entre outras.

A penetração de *C. fimbriata* ocorre normalmente a partir de ferimentos frescos no sistema radicular ou no tronco. Esses ferimentos podem ser causados por ferramentas e equipamentos utilizados no manejo da cultura (Ferreira et al., 2006; Ferreira et al., 2009), bem como por ferimentos causados por estresses ambientais (Ferreira, 2006). Os sintomas da murcha-de-ceratocystis caracterizam-se por murcha em folhas laterais que evolui para uma murcha generalizada com escurecimento do lenho tanto no sentido radial quanto longitudinal, matando uma porção de câmbio vascular, floema e feloderme (Ferreira et al., 2006). Resultados de inoculações artificiais mostraram que clones de eucalipto variam quanto a resistência à doença (Zauza et al., 2004).

O primeiro relato de *C. fimbriata* causando murcha em plantas de eucalipto, foi no sudeste da Bahia em 1997 (Ferreira et al., 1999). Atualmente, o patógeno é comumente observado em Minas Gerais assim como nos estados de São Paulo, Mato Grosso do Sul, Maranhão, Pará e mais recentemente em Alagoas (AC Alfenas, informação pessoal, 2010). A murcha-de-ceratocystis em eucalipto já foi observada também no Uruguai (Barnes et al. 2003) e em países da África (Roux et al., 2004; Roux et al., 2001; Roux et al., 2000).

O conceito atualmente empregado é que *C. fimbriata* envolve um complexo de espécies crípticas, sendo o patógeno causador da podridão negra em batata doce tratado como *C. fimbriata sensu stricto* (s.s.) enquanto os isolados dos demais hospedeiros tratados como *C. fimbriata sensu lato* (s.l.) (Van Wyk et al., 2010). Diante desse conceito, tem sido sugerido que existem

muitas espécies crípticas dentro do complexo *C. fimbriata*. Vários estudos englobando especialização por hospedeiro, morfologia, intersterilidade entre grupos de isolados (Witthuhn et al., 1999; Harrington, 2000; Santini & Capretti, 2000; Barnes et al., 2001; Johnson et al., 2002; Baker et al., 2003; Marin et al., 2003; Thorpe et al., 2005) culminaram na descrição de novas espécies pertencente a este complexo, tendo como exemplos *C. cacaofunesta* em cacau e *C. platani* em *Platanus* spp (Engelbrecht & Harrington, 2005).

Estudo com isolados de *C. fimbriata* obtidos de *Eucalyptus* spp demonstraram haver variabilidade patogênica dos isolados em relação à espécie hospedeira (Baker et al., 2003). Nesse trabalho, os autores identificaram que isolados de eucalipto foram capazes de infectar plantas de mangueira, crotalária e café enquanto outros não foram patogênicos a mangueira, cacau, gmelina, batata doce, *Platanus* sp. e inhame.

A variabilidade genética é determinante para o potencial de adaptação de um organismo às diversas condições de ambiente. Já a variabilidade patogênica dos isolados tem implicações diretas no manejo da doença (Mc Donald & Linde, 2002). Para se obter sucesso nos programas de melhoramento com foco em resistência a doenças, os estudos de variabilidade do patógeno são de grande importância. Nesse caso, primeiramente deve-se identificar a variabilidade existente na população do patógeno antes da seleção de fontes de resistência no hospedeiro (Bruton, 1998).

No Brasil, Ferreira et al. (2010) ao estudarem 13 populações de *C. fimbriata* de diferentes hospedeiros verificaram que isolados do patógeno de eucalipto, mangueira, gmelina, inhame e figo representam uma única espécie biológica capaz de se intercruzarem. Observaram, ainda, a existência de ampla variabilidade genética do fungo infectando eucalipto de diferentes regiões brasileiras. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a variabilidade patogênica de isolados de *C. fimbriata*, obtidos de diferentes clones de eucalipto com o propósito de comprovar a existência de diferentes níveis de agressividade entre os isolados.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Isolados

A partir de estudos de análise com marcadores microssatélites feitos com diferentes isolados de *Ceratocystis fimbriata* coletados no Brasil (Ferreira et al., 2010), foram selecionados os mais divergentes para o presente estudo. Foram utilizados dez isolados de *C. fimbriata* obtidos de clones comerciais de eucalipto, sendo seis de Minas Gerais, dois de São Paulo e dois da Bahia (Tabela 1, Figura 1).

Tabela 1. Origem dos isolados de *Ceratocystis fimbriata* utilizados nos estudos de agressividade.

Código	Haplótipo*	Município, Estado	Coordenadas Geográficas	Hospedeiro (Clone)
CAV28	ABBGDA	Caravelas, BA	17°39'S 39°38'W	6011
ITA 20	BBAJCA	Eunápolis, BA	16°18'S 39°22'W	1028
ANG1	BBBJDA	Angatuba, SP	23°17'S 48°27'W	1172
ANG7	BBBGDA	Angatuba, SP	23°17'S 48°27'W	1172
PT15	GBCJAG	Curvelo, MG	18°50'S 44°33'W	1288
PT12	ABBJEE	Curvelo, MG	18°50'S 44°33'W	1288
JP4	ACAKAE	João Pinheiro, MG	17°56'S 47°07'W	VM3
JP8	ABCKEA	João Pinheiro, MG	17°56'S 47°07'W	VM3
RM11	ACCJDA	Buritizeiro, MG	17°28'S 45°17'W	1288
RM35	IBBJEA	Buritizeiro, MG	17°29'S 45°13'W	1288

*Cada haplótipo está representado por seis locos (CfCAA9, CfCAA10, CfCAA15, CfCAA38, CfCAA80 e CfCAG15) de microssatélites específicos para *Ceratocystis fimbriata*. Cada letra representa um único alelo em cada locos (Ferreira, 2010).

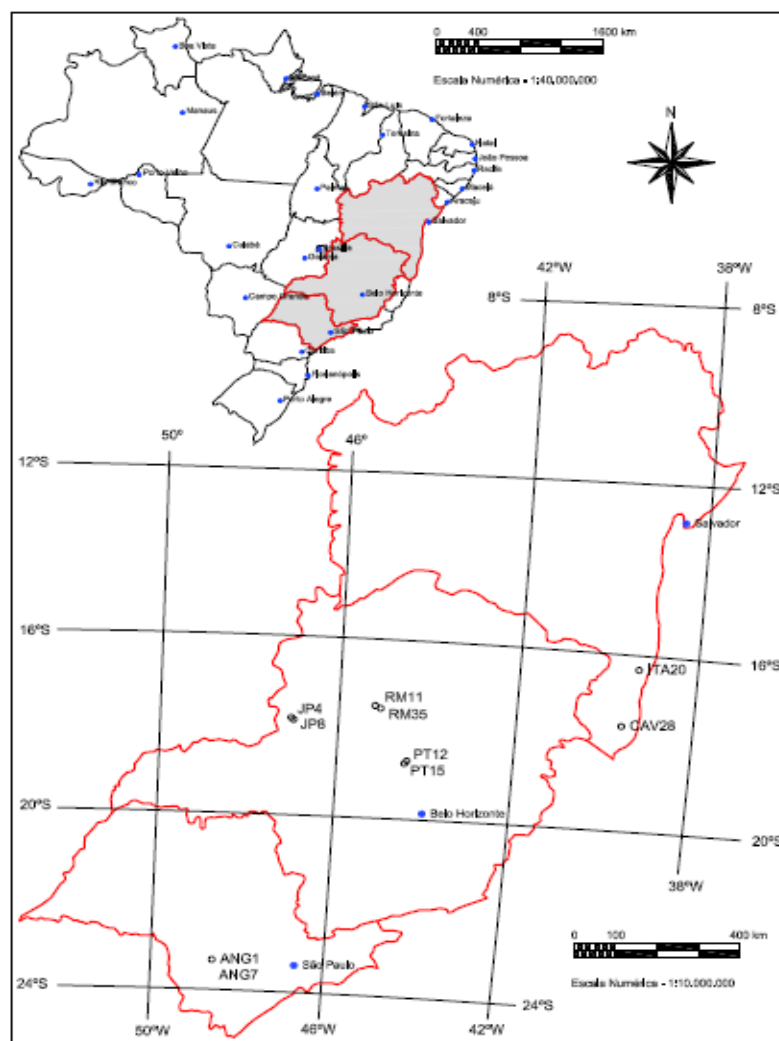


Figura 1. Locais de coleta dos dez isolados *Ceratocystis fimbriata* obtidos de clones de *Eucalyptus* spp. no Brasil.

2.2. Material Vegetal

Foram utilizados dez clones híbridos de *Eucalyptus* spp. (Tabela 2). Mudas clonais produzidas em tubetes e com aproximadamente 70 dias de idade, foram transplantadas para vasos de 3 L de capacidade, contendo substrato MecPlant® complementado com 6 Kg.m⁻³ de fosfato supersimples e 3 Kg.m⁻³ de Osmocote® (19-6-10) e inoculadas 30 dias após o transplântio.

Tabela 2. Clones de *Eucalyptus* spp. inoculados com os isolados de *Ceratocystis fimbriata*.

Clone	Espécie
386	<i>E. urophylla</i> x <i>E. grandis</i>
A06	*Híbrido de <i>E. grandis</i>
9882	<i>E. urophylla</i> x <i>E. grandis</i>
2277	*Híbrido de <i>E. grandis</i>
1028	*Híbrido de <i>E. grandis</i>
1288	<i>E. urophylla</i> x <i>E. grandis</i>
VM3	<i>E. urophylla</i> x <i>E. camaldulensis</i>
8B	<i>E. urophylla</i> x <i>E. grandis</i>
1172	<i>E. urophylla</i> x <i>E. grandis</i>
57	*Híbrido de <i>E. grandis</i>

*Híbridos com polinização não controlada de apenas mãe conhecida.

2.3. Inoculação

Os isolados selecionados foram transferidos para placas de Petri (9 cm) contendo 20 mL de meio de cultura EMA (Extrato de Malte e Ágar) e mantidos em incubadora com fotoperíodo de 12 h a 28 °C durante dez dias. Após esse período, foram adicionados 10 mL de água destilada esterilizada às placas e, após raspagem da superfície da colônia com alça de Drigalski, a suspensão de esporos (conídios, ascósporos e clamidósporos) foi filtrada em camada dupla de gaze. A concentração da suspensão de inóculo foi determinada sob microscópio de luz com o auxílio de um hemacitômetro. A suspensão foi calibrada para $2,5 \times 10^6$ esporos mL⁻¹ (Laia et al., 2000).

A inoculação das plantas foi feita por meio de uma incisão transversal superficial no caule, de aproximadamente 2 cm de comprimento, situado 5 cm acima do coleto. A abertura do corte foi feita com auxílio de um estilete e em seguida foram depositados 500 µL da suspensão de esporos com o auxílio de uma pipeta automática. O ferimento foi coberto com filme de PVC para evitar o secamento e a entrada de outros microrganismos. Para as plantas controle foi empregada água destilada esterilizada no lugar da suspensão de inóculo. Após a inoculação, as plantas foram mantidas em casa de vegetação por 60 dias,

quando se procedeu a avaliação. As temperaturas mínimas e máximas foram medidas de modo a obter a temperatura média durante todo o experimento.

Este experimento foi repetido (dados não mostrados), porém em épocas diferentes do ano. O primeiro experimento foi realizado no período de 17 de dezembro de 2009 a 17 de fevereiro de 2010, sendo que a temperatura média máxima foi de 37,8° C e a média mínima de 19,1° C. O segundo experimento foi realizado no período de 06 de maio de 2010 a 06 de julho de 2010, sendo a temperatura média máxima de 31,1° C e média mínima de 13,7° C.

2.4. Avaliação

Avaliou-se a altura das plantas e o comprimento das lesões (sintoma típico de escurecimento do lenho causados pelo patógeno no caule da planta). Com esses dados, calculou-se a severidade (percentual de tecido doente), dividindo o comprimento da lesão pela altura da planta e multiplicando por 100.

2.5. Delineamento experimental e análises

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial composto de dois fatores (clone X isolado), com quatro repetições, sendo que cada planta representou uma unidade amostral. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as pressuposições da análise verificadas pelos gráficos de resíduos. Para comparação das médias foi utilizado o teste de agrupamento Scott & Knott ($p < 0,05$). Para realização das análises, foram utilizados os programas *Statistica 7.0* e *SAEG 9.0*.

3. RESULTADOS

Os isolados de *Ceratocystis fimbriata* apresentaram diferentes níveis de agressividade e variaram de acordo com o clone de eucalipto inoculado (Tabela 3, Figura 2). A interação clone x isolado foi significativa, confirmando que a resistência no presente patossistema é isolado específica.

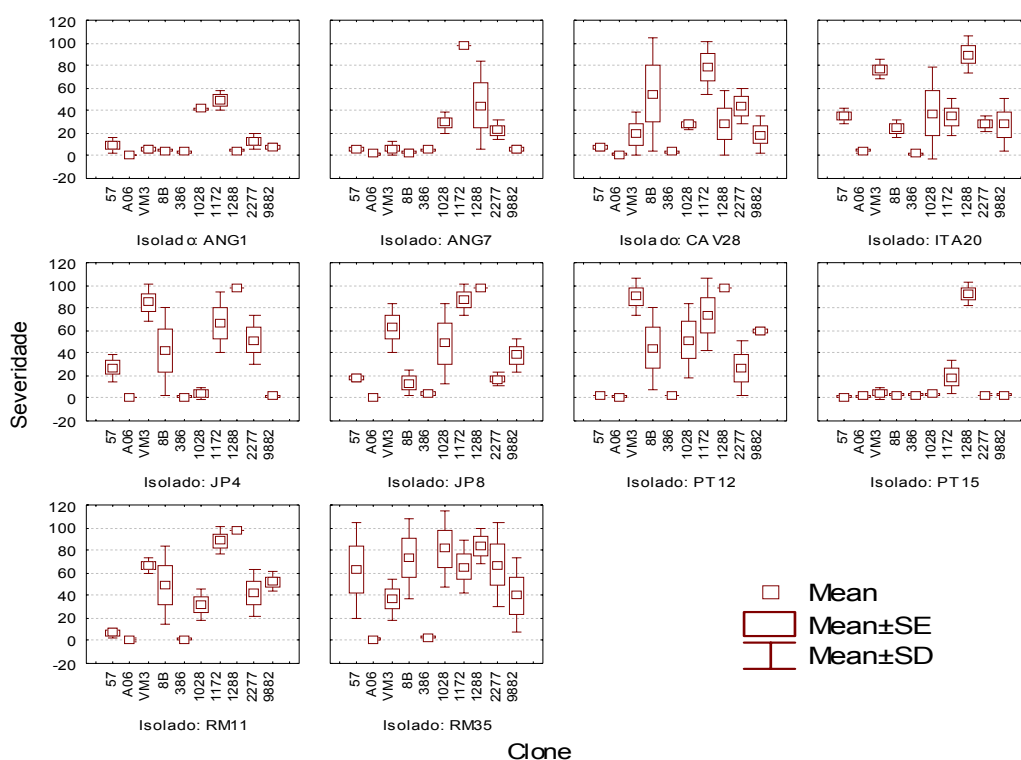


Figura 2. Média de severidade dos isolados de *Ceratocystis fimbriata* inoculados em dez clones de *Eucalyptus* spp.

As plantas utilizadas como testemunhas inoculadas com água destilada não exibiram nenhum sintoma de escurecimento do lenho ou de murcha. 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 (Figura 3).

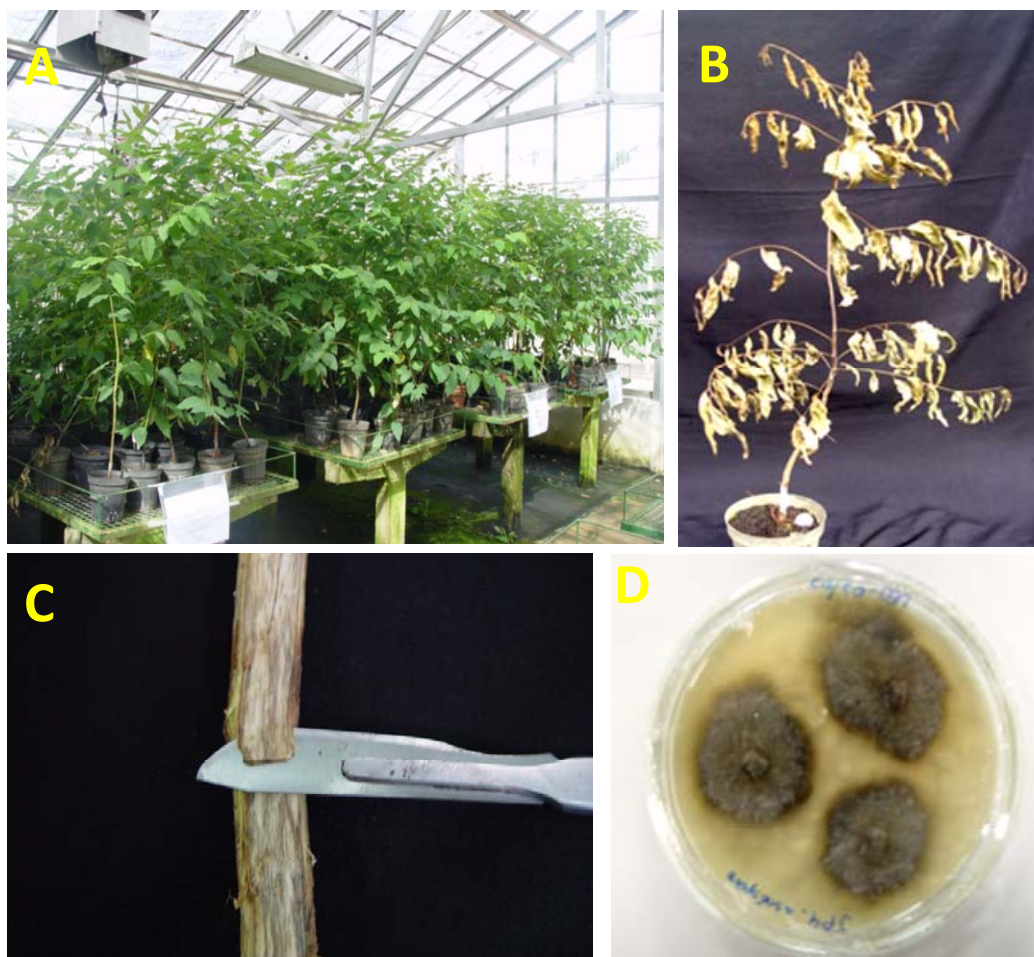


Figura 3. Inoculação de *Ceratocystis fimbriata* em plantas de *Eucalyptus* spp. A- Plantas de eucalipto recém inoculadas mantidas em casa de vegetação. B- Sintomas típicos de murcha causada por *C. fimbriata* em plantas de eucalipto 60 dias após a inoculação. C- sintomas de escurecimento do lenho causados por *C. fimbriata*. D – Colônia do fungo *C. fimbriata* em meio de cultivo MEA.

Os isolados ANG1 e PT15 foram os menos agressivos. Contudo o último foi altamente agressivo no clone 1288, com valor médio de severidade de 92,4%. Nos demais clones, PT15 apresentou baixa agressividade. O isolado ANG1 seguiu a mesma tendência do isolado PT15, sendo que os valores máximos de severidade foram de 41% para o clone 1028 e 49% para o clone 1172, sendo que para os demais clones os valores de severidades foram muito baixos.

Os isolados RM35, PT12 e RM11 foram os mais agressivos com altos valores de severidade para a maioria dos clones. Esses isolados foram capazes

de causar maiores lesões em uma maior número de clones. O isolado RM35 foi capaz de causar altos valores de severidade em oito dos dez clones inoculados.

Os isolados JP8, JP4 e ITA20 tiveram valores médios de severidade intermediários e também variaram de acordo com o clone inoculado. Contudo, foram altamente agressivos no clone 1288, com 98% de severidade para o JP8 e JP4 e de 89,7% para o ITA20. O JP8 e o JP4 também apresentaram alta agressividade aos clones 1172 e VM3. O ITA20 apresentou 76,5% de severidade no clone VM3.

Os isolados CAV28 e ANG7 tiveram valores intermediários de severidade em todos os clones. Entretanto, esses isolados causaram 78,3% e 98% de severidade, respectivamente, no clone 1172.

Pelo teste de agrupamento de médias realizado com os dez isolados, notou-se que os isolados se agrupam diferentemente de acordo com o clone (Tabela 3). Para o clone 1028, observaram-se quatro grupos, com severidade variando de 3,6 a 81,3%. Para os clones 386 e A06, não houve diferença entre a severidade média dos isolados, sendo que os valores médios de severidade não ultrapassaram 5,8%. Ao fixar os clones 9882, 2277 e 8B, observou-se separação de dois grupos entre os isolados, variando de 27,8 a 73% para o grupo com severidade média alta. Observou-se a presença de três grupos quando se fixaram os clones VM3, 1288, 57 e 1172.

Tabela 3. Médias de severidade (%) para cada combinação isolado de *Ceratocystis fimbriata* x clone de *Eucalyptus* spp.. Clones estão representados verticalmente na primeira coluna e isolados horizontalmente na primeira linha.

	RM35	PT12	RM11	JP8	JP4	ITA20	CAV28	ANG7	ANG1	PT15
386	2,7 A	2,2 A	1,4 A	3,8 A	2,0 A	2,0 A	3,8 A	5,8 A	3,9 A	3,3 A
A06	1,6 A	1,6 A	0,9 A	1,1 A	0,8 A	4,4 A	1,6 A	1,9 A	0,8 A	1,9 A
9882	40,4 A	59,3 A	52,4 A	38,2 A	1,7 B	27,8 A	18,7 B	6,0 B	8,4 B	2,9 B
VM3	36,6 B	89,9 A	66,2 A	63,0 A	84,7 A	76,5 A	19,6 C	6,7 C	6,0 C	4,8 C
2277	67,2 A	26,8 B	42,4 A	17,2 B	51,8 A	27,9 B	43,8 A	22,5 B	12,3 B	3,1 B
8B	73,0 A	44,1 A	49,6 A	13,8 B	41,6 A	24,5 B	54,5 A	3,3 B	4,5 B	3,4 B
1288	83,6 A	98,0 A	98,0 A	98,0 A	98,0 A	89,7 A	28,5 B	44,6 B	5,1 C	92,4 A
57	62,5 A	2,0 C	6,8 C	18,3 C	27,2 B	35,7 B	7,3 C	6,0 C	9,1 C	1,6 C
1028	81,3 A	51,1 B	32,5 C	48,5 B	4,21 D	37,7 B	27,8 C	29,7 C	41,5 B	3,6 D
1172	65,4 B	73,8 B	88,6 A	87,3 A	66,8 B	34,7 C	78,3 B	98,0 A	49,2 C	18,6 C

*As médias seguidas pela mesma letra na horizontal não diferem entre si pelo teste de agrupamento Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

A resistência genética variou de acordo com o clone analisado. Os clones 386 e A06 foram altamente resistentes, considerando todos os isolados analisados. Os clones 1288 e 1172 foram os clones com maiores valores de severidade e os mais afetados pelos isolados, sendo considerado altamente suscetíveis (Figura 4).

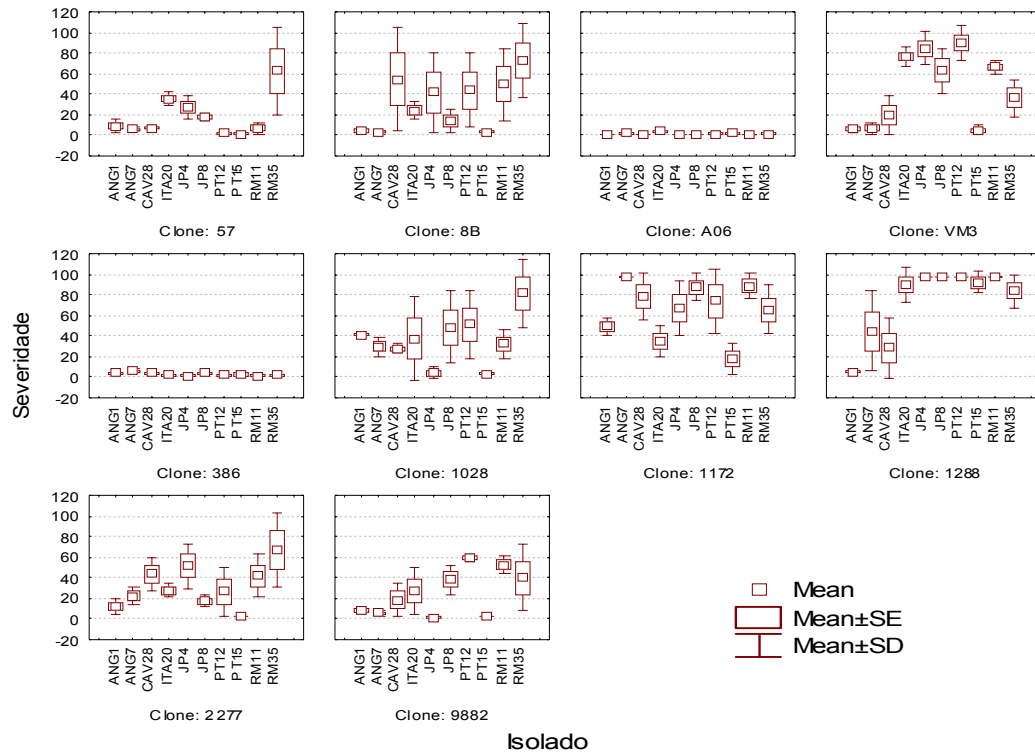


Figura 4. Média de severidade de dez isolados de *Ceratocystis fimbriata* inoculados em dez clones de *Eucalyptus* spp.

4. DISCUSSÃO

Com base nos diferentes valores de severidade observados, constatou-se que existe variabilidade patogênica dos isolados de *Ceratocystis fimbriata* obtidos de clones de *Eucalyptus* spp. no Brasil e que podem ser identificados diferentes níveis de agressividade. A diferença na agressividade dos isolados pode ser atribuída à variabilidade genética em *C. fimbriata* (Baker et al., 2003; Harrington, 2000, Ferreira et al., 2010). Todos os isolados causaram sintomas em pelo menos um dos clones inoculados. Porém alguns isolados tiveram maior espectro de ação que outros, com maior severidade na maioria dos clones. Ao analisar o isolado RM35, constatou-se que ele é capaz de causar altos valores de severidade em oito dos dez clones inoculados, enquanto que o isolado de PT15 só foi capaz de causar altos valores de severidade em apenas um clone. É importante ressaltar que os dois isolados foram coletados de plantas doentes de um mesmo clone híbrido de eucalipto. Desse modo, verificou-se que a severidade de *C. fimbriata* pode variar de acordo o isolado (haplótipo) em uma mesma área ou/e em um mesmo clone. Esses dois isolados são de regiões próximas no estado de Minas Gerais, o que mostra não existir correlação entre severidade e distância geográfica. Contudo, os cinco isolados mais agressivos são todos de Minas Gerais, seguidos dos dois isolados da Bahia, que por sua vez são seguidos dos dois isolados de São Paulo. Nos estudos de análise de DNA com marcadores microssatélite realizados por Ferreira et al (2010), um maior número de genótipos de *C. fimbriata* foi encontrada em Minas Gerais, o que explica o fato de se ter isolados muito agressivos e isolados pouco agressivos provenientes de áreas muito próximas, e coletados do mesmo clone, como é o caso dos isolados PT12 (muito agressivo) e PT15 (pouco agressivo).

O teste de agrupamento realizado confirmou que existe diferença entre os dez isolados e que a interação isolado x clone foi significativa, confirmando que a resistência varia de acordo com o clone analisado. Para alguns clones, a variabilidade entre os isolados se torna mais evidente, como é o caso do clone 1028. Para esse clone, foi possível distinguir quatro grupos de agressividade entre os isolados, podendo se observar uma variação notável de isolados muito

agressivos a isolados pouco agressivos. Outros clones também propiciaram uma boa separação em grupos e podem também ser utilizados para identificar variabilidade patogênica dos isolados. Clones que não exibem diferença entre os isolados não são recomendados para identificar diferenças de severidade, como é o caso de clones altamente resistentes que possuem valores de severidade muito baixos, não sendo possível separar os isolados com relação à agressividade.

Para os clones que tiveram resistência a um ou poucos isolados, concluiu-se que a resistência é isolado específica, sendo que o isolado que é muito agressivo para um clone se torna pouco agressivo para outro clone, como é o caso do isolado JP4 nos clones VM3 e 1028, onde a agressividade foi de 84,7% e 4,2% respectivamente, mostrando uma grande variação em termos de agressividade dentro de um mesmo isolado.

Este padrão de resistência específica ao isolado, também pode ser claramente observado no clone com maior valor de severidade, que é o caso do clone 1288 com o isolado ANG1(Figura 2). Apesar desse clone ter sido altamente suscetível aos isolados, se analisarmos apenas o isolados ANG1 notamos que o clone 1288 foi altamente resistente, o que confirma a hipótese da resistência ser isolado específica. No clone 1172, também altamente suscetível, notamos um certo grau de resistência ao isolado PT15, porém não tão claro como para o clone 1288.

Como discutido por McDonald e Linde (2002), a variabilidade patogênica encontrada nos isolados de um patógeno representa grande problema para traçar medidas eficazes no manejo da doença, sendo que a maior agressividade implica em maior consumo de fungicidas ou mesmo fazendo com que seja necessário revisar as estratégias de um programa de melhoramento com foco em resistência a doenças. A resistência genética é a principal forma de controle a *C. fimbriata* (Zauza et al, 2004, Alfenas et al., 2009). Desse modo, a seleção de genótipos resistentes ao patógeno fica comprometida quando se emprega um isolado pouco agressivo, fazendo com que a seleção dos genótipos resistentes seja equivocada. O conhecimento da variabilidade patogênica dos isolados empregados nos programas de melhoramento do eucalipto pode minimizar os problemas de seleção de clones resistentes no sentido de obtenção de isolados com maior espectro de ação e altamente agressivos nas diversas espécies e clones de *Eucalyptus* spp.

Como observado por Zauza et al (2004), os clones de *Eucalyptus* spp tem diferentes níveis de resistência à *C. fimbriata*. No presente trabalho, a

resistência dos clones variou de acordo com o isolado empregado. Contudo, ao analisar a severidade média causada pelos dez isolados em cada clone, é possível identificar dois clones altamente resistentes (Figura 4), sendo eles os clones A06 e 386, uma vez que apresentam resistência não só a um isolado específico, mas sim a todos isolados testados. Por outro lado, dois clones se destacaram negativamente por apresentarem altos valores de severidade, sendo classificados como altamente suscetíveis, sendo eles os clones 1288 e 1172. Os demais clones tiveram valores intermediários de resistência e variaram a suscetibilidade de acordo com o isolado testado, comprovando que existe resistência específica ao isolado.

Baker et al. (2003) inocularam mudas de um clone híbrido de eucalipto com três isolados desse mesmo clone. Somente dois desses isolados causaram doença, sendo que o terceiro isolado não causou doença, mostrando-se igual ao controle. Zauza et al., (2004) também determinaram a reação de 18 clones comerciais brasileiros a inoculação de dois isolados do patógeno. Os autores verificaram interação significativa entre os isolados e os clones utilizados. Eles observaram que a maioria dos clones reagiram similarmente aos dois isolados testados. Seis clones, incluindo um com histórico de alta susceptibilidade em condições de campo, foram altamente suscetíveis para um ou/e os dois isolados do patógeno. Oito clones tiveram susceptibilidade intermediária e quatro clones não diferenciaram do controle, ou seja, foram altamente resistentes.

O experimento do presente trabalho foi repetido (dados não apresentados), porém em épocas diferentes do ano. Os resultados seguiram o mesmo padrão, porém o experimento realizado na época mais fria do ano teve menores valores de severidade para todos os isolados testados, indicando que a temperatura influencia diretamente no desenvolvimento da doença.

5. CONCLUSÃO

Os resultados do presente trabalho permitem concluir que existe variabilidade patogênica nos isolados de *C. fimbriata* obtidos de plantas de *Eucalyptus* spp. e que os isolados mais agressivos, principalmente os que possuam uma eficácia semelhante ao isolado RM35, são os mais recomendados para programas de melhoramento do eucalipto que visam resistência à esse patógeno. Este trabalho também identificou clones resistentes e suscetíveis que podem ser utilizados como comparadores nos experimentos de inoculação artificial de clones de *Eucalyptus* spp com isolados de *C. fimbriata*.

6. REFERÊNCIA BIBLIOGRAFICA

- ALFENAS, A. C., ZAUZA, E. A., MAFIA, R. G. & ASSIS, T. F. Clonagem e doenças do eucalipto - 2ª Edição. Editora UFV. 2009. 442p
- BAKER, C.J., HARRINGTON, T.C., KRAUS, 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. *Ceratocystis fimbriata* infecting *Eucalyptus grandis* in Uruguai. *Australian Plant Pathology*. 32: 361-366. 2003.
- BATISTA, A.C. *Ceratocystis fimbriata* Ell. & Halst. sobre *Mangifera indica* L. Publicação 244. Instituto de Micologia da Universidade de Recife. 1-46. 1960.
- BRUTON, B.D. Soilborne diseases in cucurbitaceae: pathogen virulence and host resistance. *International Society of Horticultural Science*. 143-166. 1998.
- ENGELBRECHT, C.J.B. & HARRINGTON, T.C. Intersterility, morphology and taxonomy of *Ceratocystis fimbriata* on sweet potato, cacao and sycamore. *Mycologia*. 97:57-69. 2005.
- FERREIRA, F. A. Sintomatologia da murcha de *Ceratocystis fimbriata* em eucalipto. *Revista Árvore*. 30: 155-162. 2006.

- FERREIRA, F.A., DEMUNER, A.M.M., DEMUNER, N.L. & PIGATO, S. Murcha de *Ceratocystis* em eucalipto no Brasil. *Fitopatologia Brasileira*. 24:284. 1999.
- FERREIRA E.M., 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.
- GALLI, F. Nota sobre a ocorrência de *Ceratostomella fimbriata* (E. e H.) Elliot em *Crotalaria retusa* L. e *Cassia fistula* L. *Revista de Agricultura*. 33:225-227. 1958.
- HARRINGTON, T. C. Host specialization and speciation in the American wilt pathogen *Ceratocystis fimbriata*. *Fitopatologia Brasileira*. 25:262-263. 2000.
- HARRINGTON, T.C., THORPE, D.J., MARINHO, V.L.A. & FURTADO, E.L. First report of black rot of *Colocasia esculenta* caused by *Ceratocystis fimbriata* in Brazil. *Fitopatologia Brasileira*. 30:88-89. 2005.
- JOHNSON J.A., BAKER C.J., HARRINGTON T.C. & NASON J.D. Allozyme and DNA sequence analysis of *Ceratocystis fimbriata* isolates reveal geographic groupings and host associated lineages. *Phytopathology*. 92: S40. 2002.
- LAIA, M.L., ALFENAS, A.C. & HARRINGTON, T.C. Isolation, detection in soil, and inoculation of *Ceratocystis fimbriata*, causal agent of wilting, die-back and canker in *Eucalyptus* (Abstract). *Fitopatologia Brasileira*. 25:384. 2000.
- 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.
- MCDONALD, B.A., LINDE, C. Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. *Annual Review of Phytopathology* 40:349-379.2002.
- METHA, Y. R. Molecular and pathogenic variability of *Drechslera* isolates from oats. *Fitopatologia Brasileira*. 26:590-596. 2001.

- MUCHOVEJ, J.J., ALBUQUERQUE, F.C. & RIBEIRO, G.T. *Gmelina arborea* – a new host of *Ceratocystis fimbriata*. Plant Disease Reporter. 62:717-719. 1978.
- RIBEIRO, I.J.A., ITO, M.F. & ROSSETO, C.J. *Cassia renigera* Wall.: a new host of *Ceratocystis fimbriata* Ell. & Halt. Bragantia. 46:417-423. 1987.
- ROSSETTO, C.J. & RIBEIRO, I.J.A. Seca da mangueira. XII. Recomendações de controle. Revista de Agricultura de Piracicaba. 65:173-180. 1990.
- ROUX, J., WINGFIELD, M.J., BOUILLET, J.P., WINGFIELD, B.D. & ALFENAS, A.C. A serious new wilt disease of *Eucalyptus* caused by *Ceratocystis fimbriata* in Central Africa. Forest Pathology. 30:175-184. 2000.
- ROUX, J. Diseases in plantation *Eucalyptus* in Uganda. South African Journal of Science. 97:16-18. 2001.
- ROUX J., VAN WIK 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.
- TEVIOTDALE, B. L. & HARPER, D. H. Infection of pruning and small bark wounds in almond by *Ceratocystis fimbriata*. Plant Disease. 75:1026–1030. 1991
- THORPE, D.J., HARRINGTON, T.C. & UCHIDA, J.Y. Pathogenicity, phylogenetics and human dispersal of *Ceratocystis fimbriata* on the family Araceae. Phytopathology. 95:316-323. 2005.
- VALARINI, P.J. & TOKESHI, H. *Ceratocystis fimbriata*, causal agent of fig dieback, and its control. Summa Phytopathologica. 6:102-106. 1980.
- VAN WIK, M., WINGFIELD, B.D., MARIN, M., WINGFIELD, M.J. New *Ceratocystis* species infecting coffee, cacao, citrus and native trees in Colombia. Fungal Diversity. 40:103–117. 2010

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., HARRINGTON, T.C., MIZUBUTI, E.S. and
SILVA J.F. Resistance of *Eucalyptus* clones to *Ceratocystis fimbriata*. Plant
Disease 88:758-760. 2004.