

Resistência de genótipos de Eucalipto a *Ceratocystis* spp.Resistance of *Eucalyptus* genotypes to *Ceratocystis* sp.Ana Carolina Firmino¹, Hugo José Tozze Junior²,
Izabel Christina Gava de Souza³ e Edson Luiz Furtado⁴**Resumo**

Eucalipto é uma das culturas mais importantes do Brasil. No sul da Bahia em 1998 o fungo *Ceratocystis fimbriata* foi relatado causando murcha em plantas de eucalipto, híbridas de *E. grandis* x *E. urophylla*, e desde então este fungo vem se disseminando por todo o Brasil nesta cultura. Este trabalho teve como objetivo estudar a reação de diferentes genótipos de eucalipto quando inoculados com *Ceratocystis*, e assim encontrar uma possível fonte de resistência a este fungo. Para isso foram usados quatro isolados *Ceratocystis* de eucalipto coletados em diferentes regiões dos Estados de Minas Gerais e São Paulo. Para inoculação das plantas um disco de contendo estruturas dos fungos de 1 cm de diâmetro (coletado de colônias cultivadas em meio de cultura MEA com 10 dias de idade) foi inoculado no caule de plantas com cerca de seis meses de idade. O local da inoculação foi envolvido com algodão (umedecido com água destilada estéril) e filme plástico. Plantas utilizadas como testemunha, foram inoculadas com apenas um disco de MEA sem o fungo. As plantas inoculadas foram mantidas em casa de vegetação. Os sintomas de murcha foram observados 90 dias após a inoculação. As mudas foram cortadas no sentido longitudinal da haste para observação da colonização do fungo no xilema da planta e medição desta lesão com uma régua milimetrada. Dos vinte genótipos de eucalipto testados, apenas cinco apresentaram resistência a todos os isolados de *Ceratocystis*, cada um pertencente a diferentes espécies de eucalipto: *E. urophylla* (C2 e C9), *E. grandis* (C3), *E. saligna* (C6 e C13). A maioria dos genótipos que foram mais suscetíveis a todos os isolados pertencem à espécie *E. grandis*. Estes resultados dão suporte para futuros estudos relacionados à resistência de eucalipto a *Ceratocystis*.

Palavras-chaves adicionais: *Eucalipto* sp., murcha de eucalipto, resistência.

Abstract

Eucalyptus is the most important plantation forest species in Brazil. Wilt and canker caused by *Ceratocystis fimbriata* on eucalyptus were first reported in 1998 in plantations of an *E. grandis* x *E. urophylla* hybrid in southern Bahia, Brazil. This work aimed at studying the reaction of different eucalyptus genotypes after inoculation with *C. fimbriata* isolates, in order to find a possible source of resistance. The study included four isolates of *Ceratocystis* collected from eucalyptus in different regions. One disc of fungal mycelium with 1-cm-diameter (from colonies growing for 10 days on malt extract agar medium-MEA) was inoculated on the stem of thus injured eucalyptus plants (six months old). A cotton wool moistened with sterile distilled water was wrapped with plastic film. Control plants were inoculated with discs of MEA without fungal colonies. The inoculated plants were kept in a greenhouse. Wilt symptoms were observed 90 days after inoculation. The seedlings were cut in the longitudinal direction of the stem in order to observe the colonization of fungus in the plant xylem. We tested twenty eucalyptus genotypes, but only five showed resistance to all isolates of *Ceratocystis*, belonging to different species of *Eucalyptus*: *E. urophylla* (C2 and C9), *E. grandis* (C3), *E. saligna* (C6 and C13) Most *E. grandis* genotypes were more susceptible to all four fungal isolates. These results support future studies related to eucalyptus resistance to *Ceratocystis*.

Keywords: *Eucalyptus* sp., wilt in eucalypts, resistance.

¹Pós Doutora, Departamento de Produção Vegetal/Defesa Fitossanitária, Faculdade de Ciências Agrônomicas/ UNESP - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". CEP 18610-30, Botucatu, SP. Bolsista FAPESP (2011/05710-0). E-mail: anacarfir@gmail.com

²Doutor em Fitopatologia, Departamento de Entomologia e Nematologia, USP - Universidade de São Paulo/ ESALQ - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". CEP. 13.418-900, Piracicaba, SP. E-mail: htozze@gmail.com

³Pesquisadora, Suzano Papel e Celulose, Itapetininga/SP/Brasil.

⁴Professor, Departamento de Produção Vegetal/Defesa Fitossanitária, Faculdade de Ciências Agrônomicas/ UNESP - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", CEP 18610-307, Botucatu, SP. E-mail: elfurtado@fca.unesp.br

INTRODUÇÃO

Fungos pertencentes ao gênero *Ceratocystis* são causadores de doença em muitas plantas importância econômica como manga (*Mangifera indica*) e eucalipto (*Eucalyptus* spp.) (FERREIRA, et al., 1999). Ainda pode-se citar a ocorrência deste fungo em acácia negra (*Acacia mearnsii*) (RIBEIRO et al., 1988; SANTOS; FERREIRA, 2003), batata doce (*Ipomoea batatas*) (BARNES et al., 2001), café (*Coffea arabica*) (MARIN, 2003), citrus (*Citrus* spp.) (BORJA et al, 1995), figo (*Ficus carica*) (VALARINI; TOKESHI, 1980), gmelina (*Gmelina arborea*) (RIBEIRO, 1982) e seringueira (*Hevea brasiliensis*) (SILVEIRA, et al., 1994). Recentemente foram realizados relatos em teca (*Tectona grandis*) (FIRMINO et al, 2012a) e atemóia (híbrido de *Annona cherimola* com *A. squamosa*) (FIRMINO et al, 2012b).

Segundo Harrington et al (2011), podem ser encontrados quatro cladogramas distintos que englobam as espécies deste gênero: o da América Latina, o da América do Norte, o da Ásia e o da África. A distribuição geográfica e diversidade genética do gênero *Ceratocystis* são muito grandes, e a maior parte desta diversidade é encontrada nas Américas (BARNES, et al., 2001; BAKER; HARRINGTON, 2004; BAKER et al., 2003). Agrupar as espécies encontradas neste gênero é muito difícil visto que a grande similaridade morfológica e a ocorrência de interfertilidade dificultam a distinção da maioria das espécies. Porém, com base nas seqüências de DNA obtidas da região ITS-5.8S rDNA do DNA ribossômico nuclear e de outras análises genéticas está sendo provado que as espécies deste gênero podem ser agrupadas em vários subgrupos (BAKER; HARRINGTON, 2004).

No Brasil são reconhecidas somente as presenças de três espécies: *C. paradoxa*, atacando principalmente monocotiledôneas, *C. cacaofunesta* acarretando grandes problemas em plantações de cacau (BEZERRA, 1997), e *C. fimbriata*, causadora de doença em muitas plantas lenhosas. Novos estudos realizados por Van Wyk et al. (2010), com vários isolados de manga de diferentes regiões, sugerem que os isolados do Brasil não tenham relação com os isolados de outros países e que ainda os isolados brasileiros sejam divididos em dois grupos distintos, sendo que um grupo seja classificado como *C. mangicola* e outro como *C. mangivora*.

Ferreira et al (2011) também apontam uma grande diversidade genética entre isolados de

Ceratocystis coletados de eucalipto de diferentes regiões. Estes autores apontam que os maiores valores de diversidade genética e genotípica foram encontrados em plantações de outrora eram ocupadas por Cerrado em Minas Gerais.

A probabilidade de novas espécies, que não *C. fimbriata*, estejam atacando plantas de eucalipto na América Latina já foi comprovadas por Bodas et al (2008). Estes autores através de análises morfológicas e moleculares, relataram a existência de *C. neglecta* causando doença em plantas de *E. grandis*. Van Wyk et al. (2011), relatam a ocorrência de *C. moniliformis* em eucalipto no Equador. Estes mesmos autores ainda citam a provável existência de mais duas novas espécies de *Ceratocystis* atacando plantas de eucalipto neste país, *C. curvata* sp. nov., *C. ecuadoriana* sp. nov. and *C. diversiconidia* sp. nov.

Fungos pertencentes ao gênero *Ceratocystis* atacam o xilema das plantas (BAKER; HARRINGTON, 2004), cujo sintoma característico é expresso na forma de estrias radiais escuras, em geral da periferia para a medula (FERREIRA; MILANE, 2002).

No Brasil até meados de 1990, *C. fimbriata* era considerado problema somente em plantações de manga. Em 1997, no sudeste da Bahia, foi constatada a primeira ocorrência de murcha-de-*Ceratocystis* em eucalipto, causada por *C. fimbriata*, (FERREIRA, et al., 1999). Atualmente, já foram registradas ocorrências no Espírito Santo, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, São Paulo e, recentemente, Maranhão e Pará (ALFENAS et al., 2009; FERREIRA, 2009).

Normalmente, uma planta infectada com este fungo, apresenta como primeiros sintomas a perda de coloração verde-escura da folhagem, seguida de murcha das folhas e consequente seca e morte da planta. Um estresse hídrico em plantas doentes pode ocorrer como resultado do crescimento de hifas do patógeno e/ou produção de esporos, nestes casos a presença dessas estruturas no interior dos vasos acaba por obstruir as perfurações existentes nos elementos traqueais (PASCHOLATI, et al., 2008). Este estresse também pode ser atribuído ao incremento da viscosidade da seiva, decorrente da ação enzimática sobre os componentes dos tecidos do xilema, como exemplo tem-se os glicopeptídeos produzidos por *C. ulmi* (ISAAC, 1992 apud PASCHOLATI, et al., 2008).

A reação da planta hospedeira à invasão do fungo também pode gerar sintomas reflexos de murcha e seca. Isso ocorre devido a mecanismos

de defesa que bloqueiam segmentos dos próprios vasos do xilema. Um desses mecanismos é formação de tiloses, que são uma extensão do protoplasma das células do parênquima para o interior dos vasos do xilema. Um exemplo disso são as tiloses detectadas nos vasos de *Ulmus* atacados por *C. ulmi* (MACDONALD; MCNABB, 1974). Tumura (2011), ao realizar cortes semifinos dos vasos de plantas de eucaliptos sadios e infectados com *Ceratocystis*, notou a presença de tiloses somente nas plantas infectadas.

Espécies de *Ceratocystis* estão fortemente associadas com insetos apesar de ainda não se conhecer os vetores específicos de *C. fimbriata* na América Latina. Árvores infectadas com o fungo *Ceratocystis* são freqüentemente atacadas por scolytídeos, conhecidos como besouros da Ambrósia (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae e Platypodinae). Estes besouros, ao escavarem túneis e adentrarem o tronco da árvore, eliminam, através do orifício aberto, as fezes e restos de madeira com estruturas do fungo que podem ser levados pelo vento ou pela água (BAKER, et al., 2003; ENGELBRECHT et al., 2007; OCASIO-MORALES et al, 2007). Estudos realizados com scolytídeos coletados em árvores de cacauero infectadas com *C. cacaofunesta*, mostram que o inseto pode carregar esporos de *Ceratocystis* aderidos na parte inferior de seu abdômen (FIRMINO et al., 2012b). Ainda há registros sobre a disseminação de *Ceratocystis* sp. pelo contato entre as raízes das plantas.

O uso de porta-enxerto resistente é um método de controle usado em mangueira para evitar infecção a partir do solo, porém para eucalipto ainda não há relatos de fontes de resistência consistentes. Diante deste problema e da importância que este patógeno vem tomando dentro da cultura do eucalipto, o presente trabalho teve como objetivos estudar a reação de diferentes materiais de eucalipto à inoculação de isolados de *Ceratocystis* sp., com objetivo de se encontrar uma fonte de resistência à murcha-de-ceratocystis.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção dos isolados de *Ceratocystis* sp.

Os isolados foram obtidos a partir de coletas realizadas em áreas de produção de eucalipto com ocorrência de murcha e seca de plantas (Estados de São Paulo e Minas Gerais).

Para isolamento do patógeno, os fragmentos do material coletado foram submetidos a uma desinfestação superficial com álcool 70% du-

rante 1 minuto, seguido de uma submersão em hipoclorito de sódio a 2%, durante 1 minuto finalizando com uma lavagem em água destilada autoclavada por mais 1 minuto. Os fragmentos desinfestados foram depositados sobre discos de cenoura, que são usados como isca, sendo esta técnica considerada seletiva por Moller e DeVay (1968). Após formação completa do peritécio, estrutura característica de *Ceratocystis* sp., foi coletada uma pequena porção da mucilagem com esporos contida nesta estrutura. Esta mucilagem foi riscada em placas de Petri contendo meio MEA (2% de Malte, 0,2% de extrato de levedura e 1% de Agar) que foram incubadas em condições controladas (25±1°C, fotoperíodo de 12 horas).

Para a obtenção de culturas monospóricas, as colônias obtidas do isolamento foram lavadas com água destilada esterilizada e as concentrações das suspensões de esporos cilíndricos foram padronizadas para aproximadamente 10² esporos/mL. Foi depositado 100uL dessa suspensão de esporos em placas contendo meio MEA acrescido de 0,005% de oxitetraciclina. Através de visualização em microscópio ótico, os esporos foram individualizados e transferidos com agulha entomológica para meio MEA para formação das colônias.

Os isolados obtidos foram previamente testados em plantas de eucalipto para confirmação de patogenicidade. Além disso, estes isolados tiveram sua identidade confirmada por técnicas moleculares. Os isolados tiveram seus DNAs extraídos pelo método desenvolvido por Murray e Thompson (1980) modificado. Estes DNAs foram utilizados para amplificação da região ITS-5.8S rDNA segundo protocolo descrito por Johnson et al. (2005). Deste modo as sequências obtidas foram comparadas com outras sequências depositadas no GenBank.

Inoculação das plantas a serem avaliadas

O experimento foi montado em duas etapas, de acordo com a disponibilidade de mudas. A primeira etapa foi realizada no segundo semestre de 2009 (mudas inoculadas no mês de agosto), com 13 genótipos de eucalipto. A segunda etapa foi realizada no primeiro semestre de 2010 (mudas inoculadas no mês de fevereiro), com sete clones (Tabela 1).

Foram testados 20 materiais, entre genótipos e clones de eucalipto, que foram obtidos a partir de sementes do banco de germoplasma e de clones cedidos pela Empresa Suzano. Para inoculação,

foram escolhidos quatro isolados patogênicos, sendo cada um de uma região diferente. Os testes foram realizados em casa de vegetação com ventilação forçada, localizada na Faculdade de Ciências Agrônômicas, UNESP, Campus Botucatu, na Fazenda Experimental Lageado, no Departamento de Produção Vegetal/Defesa Fitossanitária.

Foram utilizadas mudas com seis meses de idade, conduzidas em vasos de plásticos de 10 litros, em substrato orgânico Plantimax HT®. A inoculação foi realizada diretamente no caule da planta segundo Silveira et. al. (2006), com algumas modificações. Para isso, foi aberta uma incisão no local de inoculação e o inóculo foi depositado entre a casca e o lenho na forma de disco de micélio. Após inoculação foi colocado um algodão umedecido com água destilada no local da inoculação e, em seguida, este foi vedado com fita plástica. Foram inoculadas seis mudas de cada genótipo para cada um dos isolados. A testemunha foi inoculada somente com um disco de meio de cultura (MEA) sem o fungo.

A avaliação foi realizada 90 dias após a inoculação. As mudas foram cortadas no sentido transversal do caule para acompanhamento da invasão do fungo pelo xilema da planta. Esta in-

vasão do fungo no xilema da planta tem como característica uma descoloração e escurecimento do vaso, decorrente do colapso dos tecidos invadidos por este fungo. Assim a invasão pode ser medida a partir do ponto de inoculação, com o auxílio de uma régua.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após 30 dias de inoculação, algumas plantas já apresentavam sintomas de murcha característica deste patógeno (Figura 1). A partir desta murcha, em poucos dias foi possível observar seca de ponteiro e morte de algumas plantas.

Durante a condução da primeira etapa do experimento (Tabela 1), foi observado que a maioria das progênies inoculadas não apresentava sintomas expressivos de murcha, sendo estes notados somente em horas mais quentes do dia ou na presença de estresse hídrico, mas de maneira sutil. Porém 90 dias após a inoculação, as plantas mostraram descoloração do xilema e estruturas do patógeno no seu interior. Assim, estas plantas que aparentemente eram assintomáticas, eram suscetíveis aos isolados estudados e provavelmente poderiam morrer se mantidas

Tabela 1. Número de plantas mortas após inoculação com isolados de *Ceratocystis* spp.
Table 1. Number of dead plants after inoculation with *Ceratocystis* spp. isolates.

Espécie	Isolados					Total de plantas mortas
	Material	ACF40*	ACF30*	ACF38*	ACF45*	
<i>E. grandis</i> ¹	C1	6/0	6/1	6/0	6/0	1
<i>E. urophylla</i> ¹	C2	6/0	6/0	6/0	6/0	0
<i>E. grandis</i> ¹	C3	6/2	6/1	6/1	6/1	5
<i>E. urophylla</i> ¹	C4	6/1	6/3	6/3	6/0	7
<i>E. saligna</i> ¹	C5	6/1	6/3	6/1	6/0	5
<i>E. saligna</i> ¹	C6	6/1	6/5	6/2	6/1	9
<i>E. urophylla</i> ¹	C7	6/0	6/0	6/0	6/0	0
<i>E. saligna</i> ¹	C8	6/0	6/0	6/1	6/1	2
<i>E. urophylla</i> ¹	C9	6/0	6/1	6/1	6/1	3
<i>E. grandis</i> ¹	C10	6/2	6/2	6/2	6/2	8
<i>E. grandis</i> ¹	C11	6/1	6/0	6/1	6/2	4
<i>E. grandis</i> ¹	C12	6/1	6/0	6/0	6/1	2
<i>E. saligna</i> ¹	C13	6/1	6/1	6/2	6/1	5
<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i> ²	C14	5/1	5/1	5/4	5/4	6
<i>E. grandis</i> x <i>E. dunnii</i> ²	C15	5/0	5/1	5/2	5/0	3
<i>E. grandis</i> x <i>E. smithii</i> ²	C16	5/4	5/0	5/5	5/3	12
<i>E. grandis</i> ²	C17	5/2	5/4	5/4	5/1	11
<i>E. grandis</i> ²	C18	5/0	5/1	5/3	5/3	7
<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i> ²	C19	5/0	5/0	5/1	5/0	1
<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i> ²	C20	5/1	5/2	5/1	5/3	7

* número de plantas inoculadas/número de plantas mortas

¹ Plantas inoculadas em agosto de 2009

² Plantas inoculadas em fevereiro de 2010



Figura 1. Plantas inoculadas com *Ceratocystis* sp. com sintomas de murcha (A) e seca do ponteiro (B)
Figure 1. Plants inoculated with *Ceratocystis* sp. with symptoms of wilt (A) and plants with symptoms of drought (B)

mais tempo em condições de casa de vegetação. Na segunda etapa do experimento (tabela 1), foi observada maior mortalidade das plantas inoculadas, mesmo de clones que apresentaram lesões no xilema de tamanho mediano, como pode ser visto no clone C14. Esta diferença visual na apresentação de sintomas de murcha e seca entre as etapas do experimento pode estar relacionada com a época do ano em que estes clones foram inoculados. A segunda etapa do experimento foi montada na época mais quente, com temperaturas médias próximas de 25°C, enquanto a primeira etapa foi montada em época de temperatura mais amena, temperaturas médias de 21°C, entre os meses de agosto a outubro (AGRITEMPO, 2011). Isso evidencia a influência de fatores climáticos na expressão dessa doença, que pode ser camuflada no campo em épocas que exigem menor transpiração da planta, ou seja, épocas com temperaturas amenas e períodos de chuvas bem distribuídos.

A falta de sintomas de murcha e seca em plantas infectadas já foi observada em vários estudos de resistência conduzidos com *Ceratocystis* sp. em eucalipto (TUMURA, et al., 2010; ZAUZA et al., 2004). A evidência de plantas assintomáticas também pode estar relacionada com a idade e com as condições de crescimento das plantas, sendo que estes fatores merecem ser melhor estudados. Independente disso, o fato de algumas plantas se apresentarem assintomáticas deve ser considerado um problema, já que elas podem servir de veículo de disseminação do patógeno. Plantas infectadas, sem sintomas, podem ser levadas para o campo ou até serem transportadas entre municípios e estados, servindo assim de

fonte de inóculo primário para uma epidemia.

Baseado no comprimento da descoloração do xilema (escurecimento), os clones tiveram reações diferentes (Tabela 2). Os clones C10, C11, C12, C17, C18 e C20 foram os que se mostraram mais suscetíveis a maioria dos isolados. Com exceção do clone C20 que é oriundo de um cruzamento de *E. grandis* x *E. urophylla*, todos os outros clones são originários de *E. grandis*. Segundo a literatura, clones derivados de *E. grandis* parecem ser mais resistentes a *Ceratocystis* sp. que *E. urophylla* (ALFENAS et al., 2009), fato não constatado no presente trabalho.

O clone C1 foi mais suscetível ao isolado ACF38, assim como o C19. Em contraste, os clones C7 e C14, mostraram certa resistência a este isolado. Já as progênes C4, C5, C8, C15 e C16 mostraram-se mais suscetíveis ao isolado ACF30, ao contrário da progênie C7, que teve menor lesão no xilema (0,9cm) quando inoculada com este mesmo isolado e que se mostrou mais suscetível ao isolado ACF40. Os clones C10, C11 e C12, oriundos de *E. grandis*, se mostraram suscetíveis a todos os isolados, principalmente ao isolado ACF45, que gerou lesões no xilema de 19,7cm, 13,3cm e 16,1cm, respectivamente. Baker et al (2003), realizando estudos de patogenicidade de isolados de *Ceratocystis* coletados de diferentes hospedeiros, também constataram uma variação de agressividade entre isolados de uma mesma espécie. Por exemplo, o isolado C1442 foi o mais agressivo dos três isolados de eucalipto testados pelos autores, enquanto o isolado denominado C1451 deixou de ser usado no decorrer do trabalho por não causar descoloração significativa do xilema.

Esta diferenciação na reação dos genótipos testados em função do isolado usado pode ser explicada pela variabilidade genética encontrada entre os isolados testados. Com base na sequência de DNA da região ITS os isolados ACF 30 de São Paulo (KC479036), ACF 38 (KC479034) e ACF 40 (KC479035) de Minas Gerais foram identificados como *C. fimbriata*. Sendo que estes isolados, ACF30, ACF 38 e ACF 40, apresentaram 98% de similaridade com as sequências dos isolados de *Ceratocystis* C1441 da Bahia, CMW5312 da Uganda e CMW 4101 da África do Sul, respectivamente. O isolado ACF 45 (KC479037) foi identificado como *C. mangicola*, tendo 98% de similaridade com a sequência de DNA do isolado CMW14797 isolado de manga no Brasil (VAN WYK et al., 2010). Este fato é de suma importância visto que até o momento não há relato desta última espécie de *Ceratocystis* ocorrendo no Brasil em plantas de eucalipto.

Esta variabilidade genética, ligada a capacidade de causar doença em diferentes clones, foi observada por Bodas et al. (2008). Estes autores observaram que dos isolados de *C. neglecta* coletados de eucalipto na Colômbia, um (CMW1285) gerava lesões oito vezes maiores que os outros isolados, quando inoculados no clone 301, derivado de *E. grandis*. Porém, quan-

do estes mesmos isolado eram inoculados no clone 02, também derivado de *E. grandis*, o isolado CMW1285 não apresentava agressividade diferenciado, gerando lesões no xilema pouco maiores que as dos outros isolados.

A variação de reação de genótipos de eucalipto conforme o isolado inoculado também foi relatada por Zauza et al., (2004), os quais trabalhando com clones derivados de híbridos de *E. grandis* x *E. urophylla*, observaram que 5 dos 18 clones testados apresentam maior suscetibilidade a um dos isolados trabalhados. Situação semelhante já foi relatada em trabalhos de resistência de manga a este fungo. Variedades Kent e Sensation, classificadas como resistentes em Campinas, comportaram-se como suscetíveis em Jaboticabal. No Instituto Agrônomo de Campinas, são conhecidos dois isolados do fungo com virulência distinta: o IAC FITO 334-1, que não infecta as variedades Jasmim e Kent, e o IAC FITO 4905, que infecta ambas as variedades (ROSSETTO, 1996).

Os materiais C2, C3, C6, C9 e C13 foram os que mostraram melhores resultados, sendo pertencentes a diferentes espécies de eucalipto: *E. urophylla* (C2 e C9), *E. grandis* (C3) e *E. saligna* (C6 e C13). Deste modo, estes materiais tornam-se promissores para estudos de herança genética de resistência a *Ceratocystis*.

Tabela 2. Médias do comprimento (cm) da descoloração do xilema em clones de *Eucalyptus* inoculados com diferentes isolados de *Ceratocystis* sp¹.

Table 2. Mean lengths of xylem discoloration (cm) in clones of *Eucalyptus* inoculated with four isolates of *C. fimbriata*

Espécie	Material	Isolados				Teste.
		ACF40	ACF30	ACF38	ACF45	
<i>E. grandis</i>	C1	1,7 a AB	2,0 a A	16,2 b C	1,7 a A	0,5 a A
<i>E. urophylla</i>	C2	1,7 ab AB	2,0 ab A	2,3 b A	2,8 b A	0,5 a A
<i>E. grandis</i>	C3	1,2 ab A	2,3 b A	1,4 ab A	2,3 b A	0,5 a A
<i>E. urophylla</i>	C4	1,7 a AB	5,5 b AB	2,3 a A	2,4 a A	0,5 a A
<i>E. saligna</i>	C5	2,2 ab AB	4,3 b AB	0,9 a A	3,5 b A	0,5 a A
<i>E. saligna</i>	C6	2,6 b AB	2,0 ab A	2,4 b A	3,0 b A	0,5 a A
<i>E. urophylla</i>	C7	4,7 b AB	1,0 a A	0,9 a A	3,8 b A	0,5 a A
<i>E. saligna</i>	C8	2,3 ab AB	4,1 c AB	1,5 ab A	3,0 b A	0,5 a A
<i>E. urophylla</i>	C9	1,2 ab A	2,4 bc A	2,2 bc A	3,0 c A	0,5 a A
<i>E. grandis</i>	C10	9,7 b B	11,8 b C	15,3 bc C	19,7 c C	0,5 a A
<i>E. grandis</i>	C11	4,5b AB	6,3 b B	14,8 c C	13,3 c B	0,5 a A
<i>E. grandis</i>	C12	5,5 b AB	4,3 b AB	6,7 bc B	16,1c BC	0,5 a A
<i>E. saligna</i>	C13	0,5 a A	2,6 b A	2,5 b A	1,3 ab A	0,5 a A
<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>	C14	7,5dC	5,8cB	3,3bA	5,7cB	1,3 aA
<i>E. grandis</i> x <i>E. dunnii</i>	C15	2,0aA	4,8bB	2,4bA	3,3bA	1,2 aA
<i>E. grandis</i> x <i>E.smithii</i>	C16	1,8aA	4,1bB	3,5bA	4,3bAB	1,2 aA
<i>E. grandis</i>	C17	5,3bBC	12,4dC	12,0dC	10,4cC	0,8 aA
<i>E. grandis</i>	C18	5,6bBC	9,8cC	11,0dC	11,6dC	1,2 aA
<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>	C19	1,0aA	1,3aA	5,6cB	2,4bA	1,3 aA
<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>	C20	4,2bB	5,6cB	5,5cB	5,7cB	1,1 aA

¹ As análises estatísticas (teste de Tukey), foram realizadas separadamente para cada etapa (Coeficiente de variação da etapa 1: 43,14%; Coeficiente de variação da etapa 2: 38,15%).

*Valores seguidos da mesma letra maiúscula na vertical não diferem entre si pelo intervalo de confiança (0,05)

**Valores seguidos da mesma letra minúscula na horizontal não diferem entre si pelo intervalo de confiança (0,05)

Híbridos de *E. grandis* x *E. urophylla* vêm sendo fonte de estudos para resistência a *Ceratocystis*. Em trabalhos realizados na Universidade de Viçosa, dentre os 18 clones derivados deste cruzamento inoculados, 4 foram altamente suscetíveis, 5 suscetíveis, 3 resistentes e 6 altamente resistentes (ZAUZA, et al., 2004). Os clones que apresentaram alta suscetibilidade têm muitas características superiores em relação aos outros clones testados, como a alta produtividade de celulose, rápido crescimento, queda precoce de ramos e resistência ao cancro causado por *Cryphonectria cubensis*. Este fato é preocupante, pois clones ditos de elite como estes são os mais procurados pela indústria madeireira.

Essa diferença nas reações dos clones quando inoculados com diferentes isolados de *Ceratocystis* pode estar associada à variabilidade genética do patógeno. Ainda segundo trabalho realizado por Machado et al. (2008), o comprimento da lesão causada por *Ceratocystis* em plantas de eucalipto pode variar em função da espécie e procedência do material testado. Ao estudarem a resistência interespecífica de eucalipto ao fungo *C. fimbriata*, estes autores observaram que *E. grandis*, *E. saligna* e *E. dunni* mostraram-se às espécies mais suscetíveis, e que *E. camaldulensis* e *E. saligna* tiveram maior porcentagem de genótipos resistentes, enquanto *E. urophylla* se encaixou dentro da classe de plantas moderadamente resistentes.

CONCLUSÕES

Dos vinte genótipos de eucalipto testados, apenas cinco, de diferentes espécies, apresentaram resistência a todos os isolados de *Ceratocystis*: *E. urophylla* (C2 e C9), *E. grandis* (C3), *E. saligna* (C6 e C13). A maioria dos genótipos que foram mais suscetíveis a todos os isolados são originários de plantas *E. grandis*.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Empresa Suzano Papel e Celulose por cederem o material para este estudo, e ao CNPq e a FAPESP pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS

AGRITEMPO. Disponível em: <<http://www.agritempo.gov.br/>>. Acesso em: 08 jun. 2011.

ALFENAS, A. C.; ZAUZA, E. A. V.; MAFIA, R. G.; ASSIS, T. F. **Clonagem e doenças do eucalipto**. Viçosa: UFV. 2009. 442 p.

BAKER, C. J.; HARRINGTON, T. C. *Ceratocystis fimbriata*. In: _____. **Crop Protection Compendium**. Kew, Surrey: CABI Publishing, 2004. 14 p.

BAKER, C. J.; HARRINGTON, T. C.; KRAUSS, U.; ALFENAS, A. C. Genetic variability and host specialization in the Latin American clade of *Ceratocystis fimbriata*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 93, n. 10, p.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**, London, v. 2, n. 6, p. 319-325, 2001.

BEZERRA, J. L. *Ceratocystis fimbriata* causing death of buddedcocoa seedlings in Bahia, Brazil. **Incoped Newsletter**, Ghana, v. 1, p. 6, 1997.

BODAS, C.A.; ROUX, J.; VAN WYK, M.; WINGFIELD, B.D.; WINGFIELD, M.J. *Ceratocystis neglecta* sp. nov., infecting *Eucalyptus* trees in Colombia. **Fungal Diversity**, Amsterdam, v. 28, n. 1, p. 73-84, 2008.

BORJA, D. C.; CAYCEDO, J. E. L.; RÍOS, J. A. L. El secamiento de los citricos em la zona cafetera central. **Cenicafé Avances Tecnicos**, Colombia, n. 212, p. 1-8, 1995.

ENGELBRECHT, C. J. B.; HARRINGTON, T. C.; ALFENAS, A. C.; SUAREZ, C. Genetic variation of populations of the cacao wilt pathogen, *Ceratocystis cacaofunesta*. **Plant Pathology**, London, v. 56, n. 6, p. 923-933, 2007.

FERREIRA, F. A.; MILANE, D. **Diagnose visual e controle de doenças abióticas e bióticas do eucalipto no Brasil**. Mogi Guaçu: International Paper, 2002.104p.

FERREIRA, F. A.; DEMUNER, A. M.; DEMUNER, M. L.; PIGATO, S. Murcha de *Ceratocystis* em eucalipto no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 24, p. 284, 1999.

FERREIRA, M. A.; HARRINGTON, T. C.; ALFENAS, A. C.; MIZUBUTI, E. S. G. Movement of genotypes of *Ceratocystis fimbriata* within and among *Eucalyptus* plantations in Brazil. **Phytopathology**, v.101, n. 8, p.1005-1012, 2011.

- FIRMINO, A. C.; TOZZE JÚNIOR, H. J.; FURTADO, E. L. First report of *Ceratocystis fimbriata* causing wilt in *Tectona grandis* in Brazil. **New Disease Reports**, Reading, v. 25, p. 24, 2012a.
- FIRMINO, A. C.; TOZZE JUNIOR, H. J.; COSTA, P. N.; FURTADO, E. L. *Ceratocystis* sp. causando murcha em atemóia na região de Botucatu-SP. **Summa phytopathologica**, Botucatu, v.38, n. 2, p. 171-171, 2012b
- HARRINGTON, T. C. **The genus *Ceratocystis*. Where does the oak wilt fungus fit?**, 2009. Disponível em: <http://www.texasoakwilt.org/NOWS/conference_assets/conferencepapers/Harrington.pdf>. Acesso em 08 jun. de 2011.
- JOHNSON, J. A.; HARRINGTON, T. C.; ENGELBRECHT, C. J. B. Phylogeny and taxonomy of the North American clade of the *Ceratocystis fimbriata* complex. **Mycologia**, New York, v. 97, n. 5, p.1067-1092, 2005.
- MACDONALD, W. L.; MCNABB, H. S. Electron microscope observations of *Ceratocystis ulmi* induced tylosis development in *Ulmus*. **European Journal of Plant Pathology**, London, v. 4, n. 1, p. 2-10, 1974.
- MACHADO, P. S.; FERREIRA, E. M.; BINOTI, D. H. B.; MAFIA, R. G.; ALFENAS, A. C. Resistência interespecífica de *Eucalyptus* à murcha-de-ceratocystis, causada por *Ceratocystis fimbriata*. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 33, p. 268, 2008.
- 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 an pathogenicity. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 151, n. 7-8, p. 395-405, 2003.
- MOLLER, W. J.; DEVAY, J. E. Carrot as a species selective isolation medium for *Ceratocystis fimbriata*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 58, n. 1, p.123-124, 1968.
- MURRAY, M. G.; THOMPSON, W. F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. **Nucleic Acid Research**, New York, v. 8, n. 19, p. 4321-4326, 1980.
- OCASIO-MORALES, R. G., TSOPELAS, P., HARRINGTON, T. C. Origin of *Ceratocystis platani* on native *Platanus orientalis* in Greece and its impact on natural forests. **Plant Disease**, New York, v. 91, n. 7, p. 901-904, 2007.
- PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B. ; STANGARLIN, J. R ; CIA, P. . **Interação planta-patógeno: Fisiologia, Bioquímica e Biologia Molecular**. Piracicaba: Fealq, 2008. v.1. 627 p.
- RIBEIRO, G. T. Avaliação preliminar da resistência de árvores de *Gmelina arborea* Lineaus, mediante inoculações do fungo *Ceratocystis fimbriata* Ell.; Halst., causador do cancro em gmelina. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 7, p. 517, 1982.
- RIBEIRO, I. J. A.; FUMIKOITO, M.; PARADELA FILHO, O.; CASTRO, J. L. Gomose da acácia-negra causada por *Ceratocystis fimbriata* Ell.; Halst.. **Bragantia**, Campinas, v. 47, n. 1, p. 71-74, 1988.
- ROSSETTO, C. J.; RIBEIRO, I. J. A.; IGUE, T.; GALLO, P. B. Seca-da-mangueira: XV. Resistência varietal a dois isolados de *Ceratocystis fimbriata*. **Bragantia**, Campinas, SP, v.55, n. 1, p.117-121, 1996.
- SANTOS, Á. F.; FERREIRA, F. A. Murcha-de-Ceratocystis em Acácia-Negra no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.28, p. 325-325, 2003.
- SILVEIRA, S. F.; HARRINGTON, T. C.; MUSSI-DIAS, V.; ENGELBRECHT, C. J. B.; ALFENAS, A. C.; SILVA, C. R. *Annona squamosa*, a new host of *Ceratocystis fimbriata*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.31, p. 394-397, 2006.
- SILVEIRA, A. P.; OLIVEIRA, D. A.; CARDOSO, R. M. G.; NETO F. B.; ORTOLANI A. A.; GODOY, G. Caracterização do prejuízo provocado pelo mofo cinzento (*Ceratocystis fimbriata*) em painéis de seringueira (*Hevea brasiliensis*). **Summa Phytopathologica**, Botucatu, SP, v. 20, n. 3-4, p. 196-199, 1994.
- TUMURA, K. G. **Avaliação de Resistência, Análise Epidemiológica, Distribuição Espacial e Caracterização Anatômica da Madeira de Clones de Eucalyptus sp. Infectados por *Ceratocystis fimbriata* Ellis. Et Halsted**. 2011. 50 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) - Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulist "Júlio Mesquita Filho", Botucatu, 2011.
- TUMURA, K. G.; CONCEIÇÃO, D. M. ; DE PIERI, C. ; FURTADO, E. L. Avaliação de resistência cruzada de clones de eucalipto a ferrugem e murcha de *Ceratocystis*. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 35, n. 4, p. 234, 2010.

VALARINI, P. J.; TOKESHI, H. *Ceratocystis fimbriata*: agente causal da seca da figueira e seu controle. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 6, n. 3-4, p. 102-106, 1980.

VAN WYK, M.; WINGFIELD, B. D.; WINGFIELD, M. J. Four new *Ceratocystis* spp. associated with wounds on *Eucalyptus*, *Schizolobium* and *Terminalia* trees in Ecuador. **Fungal Diversity**, Amsterdam, v. 46, n. 1, p.111-131, 2011.

VAN WYK, M.; WINGFIELD, B. D.; AL-ADAWI, A. O.; ROSETTO, C.; ITO, M. E.; WINGFIELD, M. J. **Two new *Ceratocystis* species associated with mango disease in Brazil**. 2010. Disponível em: < <http://www.mycotaxon.com/vol/abstracts/> > Acesso em: 8 out. 2011.

ZAUZA, E. A. V.; ALFENAS, A. C.; HARRINGTON, T. C.; MIZUBUTI, E. S.; SILVA, J. F. Resistance of *Eucalyptus* clones to *Ceratocystis fimbriata*. **Plant Disease**, New York, v. 88, n. 7, p. 758-760, 2004.

Recebido em 25/06/2012

Aceito para publicação em 25/02/2013

