

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CÂMPUS DE BOTUCATU

**“RESISTENCIA DO EUCALIPTO AO CANCRO DE *Chrysoporthe*
cubensis E *Botryosphaeria* sp.”**

HELENIZE GABRIELA DE SOUZA

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências
Agronômicas da UNESP – Campus de Botucatu,
para a obtenção do título de Mestre em Agronomia
(Proteção de Plantas)

BOTUCATU
Dezembro – 2008

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CÂMPUS DE BOTUCATU

**“RESISTENCIA DO EUCALIPTO AO CANCRO DE *Chrysoporthe*
cubensis E *Botryosphaeria* sp.”**

HELENIZE GABRIELA DE SOUZA

ORIENTADOR: Prof. Dr. EDSON LUIS FURTADO

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências
Agronômicas da UNESP – Campus de Botucatu,
para a obtenção do título de Mestre em Agronomia
(Proteção de Plantas)

BOTUCATU
Dezembro – 2008

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO - SERVIÇO TÉCNICO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP - FCA LAGEADO - BOTUCATU (SP)

S729r Souza, Helenize Gabriela de, 1980-
Resistência do eucalipto ao cancro de *Chrysosporthe cubensis* e *Botryosphaeria* sp / Helenize Gabriela de Souza.
- Botucatu : [s.n.], 2008.
v, 105 f. : il., color gráfs., tabs.

Dissertação (Mestrado)-Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2008
Orientador: Edson Luis Furtado
Inclui bibliografia

1. Eucalipto. 2. Cancro (Fitopatologia). 3. Eucalipto - Resistência. 4. Fungos. I. Furtado, Edson Luis. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Campus de Botucatu) Faculdade de Ciências Agrônômicas. III. Título

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: RESISTÊNCIA DO EUCALIPTO AO CANCRO DE *Chrysosporthe cubensis*
E *Botryosphaeria* sp.

ALUNA: HELENIZE GABRIELA DE SOUZA

ORIENTADOR: PROF. DR. EDSON LUIZ FURTADO

Aprovado pela Comissão Examinadora



PROF. DR. EDSON LUIZ FURTADO



PROFª DRª MARLI TEIXEIRA DE ALMEIDA MINHONI



PROF. DR. CELSO GARCIA AUER

Data da Realização: 15 de dezembro de 2008.

“ O verdadeiro lugar de nascimento é aquele em que lançamos pela primeira vez um olhar inteligente sobre nós mesmos (...)”

Margarete Yourcenar

DEDICO,

❖ *Aos meus pais **ANTONIO** e **ANA** que com um simples sorriso, tornam a jornada mais alegre e renovam a cada dia a esperança;*

❖ *Ao querido **FAUSTO**, pela paciência e compreensão, pelo companheirismo e por partilhar a esperança de um mundo melhor;*

❖ *Aos meus irmãos **Cecéu**, **Hélcia**, **Eduardo** e **Heloiza** pelo apoio;*

A realização deste trabalho só se concretizou porque algumas pessoas acreditaram na importância do mesmo, abrindo portas, criando oportunidades e facilitando o desenvolvimento deste processo. Por isso meus sinceros agradecimentos:

Ao professor EDSON LUIS FURTADO, orientador, pelo apoio nas horas difíceis e pelas sugestões para a realização deste trabalho;

Ao professor Edson Seizo Mori pelo auxílio nas análises estatísticas;

Ao curso de Pós-Graduação em Agronomia, da Faculdade de Ciências Agrônomicas de Botucatu pela oportunidade concedida;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) que financiou a pesquisa;

À empresa Votorantim Celulose e Papel pelo material cedido;

Aos funcionários da empresa Votorantim Celulose e Papel: Donizeti, Edmar e Edson pela colaboração e disponibilidade para a realização deste trabalho;

Aos amigos que foram verdadeiros companheiros pelo apoio e amizade: Daniel, Karolina, Marco, Haroldo e Cecília;

E finalmente, a toda a minha família, fundamental para ser o que sou, estar onde estou;

Aos meus queridos pais que, com muita dificuldade, lutaram para ajudar-me a concluir os estudos iniciais;

SUMÁRIO

RESUMO	6
SUMMARY	8
1- INTRODUÇÃO	10
2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
2.1. O Eucalipto	12
2.2. <i>Chrysoporthe cubensis</i>	13
2.2.1 Taxonomia de <i>Chrysoporthe cubensis</i>	13
2.2.2 Características do cancro de <i>Chrysoporthe cubensis</i>	15
2.2.3 O controle do cancro de <i>Chrysoporthe cubensis</i>	17
2.3 <i>Botryosphaeria</i> spp.	19
2.3.1 Características do cancro causado por <i>Botryosphaeria</i> spp.	19
2.3.2 Sintomas de <i>Botryosphaeria</i> spp.	20
2.3.3 O controle do cancro causado por <i>Dothiorella</i> spp.	21
2.4. Marcadores Moleculares	23
2.5. Análise de Segregantes em Amostras Agrupadas (BSA)	24
CAPÍTULO 1	25
Avaliação fenotípica para <i>Chrysoporthe cubensis</i>	25
RESUMO	26
ABSTRACT	27
INTRODUÇÃO	28
MATERIAL E MÉTODOS	29
Material Vegetal	29
Obtenção do inóculo	31
Inoculação do material vegetal	32
Análise estatística	32
RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
Avaliação da resistência dos clones candidatos a parentais	33
Avaliação da intensidade de sintomas em função da idade da árvore	41
Avaliação genética dos parentais e progênies	43
Distribuição de frequências com as progênies	48
AGRADECIMENTOS	51
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52
CAPÍTULO 2	55
Avaliação fenotípica para <i>Botryosphaeria</i> sp.	55
RESUMO	56
ABSTRACT	57
INTRODUÇÃO	58
MATERIAL E MÉTODOS	59
Material vegetal	59
Obtenção do inóculo	61
Inoculação do material vegetal	61
Análise estatística	62
Análise genética	63
RESULTADOS E DISCUSSÃO	64

Avaliação da resistência dos clones candidatos a parentais	64
Avaliação das progênies	68
Avaliação genética dos parentais e progênies	70
AGRADECIMENTOS	74
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74
CAPÍTULO 3	77
Seleção assistida através de marcadores moleculares em <i>Chrysoporthe</i>	
<i>cubensis</i> e <i>Dothiorella</i> sp.	77
RESUMO	78
ABSTRACT	79
INTRODUÇÃO	80
MATERIAL E MÉTODOS	81
Material vegetal	81
Extração de DNA	82
Quantificação do material vegetal	83
Composição do bulk e análise do marcador	84
RESULTADOS E DISCUSSÃO	86
Composição dos bulks e análise do marcador	86
AGRADECIMENTOS	89
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89
CONCLUSÕES GERAIS	93
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS	95

RESUMO

O termo cancro é utilizado para designar lesões localizadas na casca do caule de plantas lenhosas que podem resultar no anelamento do caule e no secamento da parte superior da copa e a morte da planta. A melhor opção para o controle da doença é a resistência genética dos indivíduos quanto ao patógeno utilizado. Com o objetivo de estudar o comportamento de resistência e mecanismos moleculares de clones dos parentais e das progênes de eucalipto quanto ao cancro causado por *Chrysosporthe cubensis* e *Botryosphaeria* sp. foram executados ensaios em casa de vegetação e em campo. Os isolados utilizados foram *Chrysosporthe cubensis* e *Botryosphaeria* sp. sendo produzidos em meio BDA e inoculados nos indivíduos pelo método do disco. A avaliação foi realizada 60 dias após a inoculação, medindo a área da lesão de cada material. Para o patógeno *C. cubensis* inoculados nos parentais foi encontrado uma média de 3,20 e 6,14 cm² de área de lesão do tronco causado pelos isolados provenientes de Piracicaba e Bofete, respectivamente, enquanto que para *Botryosphaeria* sp. a média variou de 7,29 cm² a 9,72cm² da área da lesão. Dos indivíduos testados, com *C. cubensis*, foram encontrados 46,66% de plantas classificadas como resistentes; 6,67% plantas moderadamente resistente, 13,33% planta moderadamente suscetíveis e 33,34% plantas suscetíveis. Já para o teste de clones com *Botryosphaeria* sp.

verificou-se 91,67% resistentes, 5% moderadamente resistentes, 1,67% moderadamente suscetível e 1,67% suscetíveis. As variâncias fenotípicas encontradas foram de 41,32 a 0,23 inoculados com *C. cubensis* e 0,285 a 156,88, quando inoculados com *Botryosphaeria* sp. Os coeficientes de variação foram de 125% a 15,05% para *C. cubensis* e 29,86% a 101,13% para *Botryosphaeria* sp. Os resultados indicam que os materiais genéticos testados possuem boa fonte de resistência para os dois fitopatógenos testados. Quanto à análise molecular através de bulks dos indivíduos contrastantes, não foi possível avaliar a co-segregação dos marcadores nas progênes das Fazendas São Joaquim, Baronesa e no viveiro de pesquisa da empresa devido aos progenitores serem poucos contrastantes quanto à característica fenotípica observada.

Palavras Chaves: Cancro, Eucalipto, Resistência, *Chrysosporthe cubensis*, *Botryosphaeria* sp.

SUMMARY

The term canker is used to assign to injuries located in the bark of stems of woody plants that can result in the anelamento of stems and drying of the superior part of the crown and the death of the plant. The best option for the control of the illness is the resistance genetic of the individuals concerning to the used patógeno. The objective of this study the molecular behavior of resistance and mechanisms of clonals of parental and the lineages the eucalyptus concerning the canker caused for *Chrysoporthe cubensis* and *Dothiorella* sp. The essays executed in the greenhouse and field. The isolated ones used concerning *Chrysoporthe cubensis* and *Dothiorella* sp. being produced in inoculated medium BDA and in the individuals for the method of the disk. The evaluation was concluded 60 days after the inoculation, measuring the area of the injury of each material. For pathogeno *C. cubensis* inoculated in the parental ones a 6,14 was found average of 3,20 and cm² of area of isolated injury of the trunk caused for the proceeding ones from Piracicaba and Bofete, respectively. The average of the area of the injury for the studied lineages varied of 7,29 cm² 9,72cm² for *Dothiorella* sp. The clonals inoculated *C. cubensis* were grouped into the categories HS (highly susceptible – 33,34%), MS (moderately susceptible -13,3%), MR (moderately resistant- 6,67%), and HR (highly resistant -46,66%). The clonal tested, with

Botryosphaeria sp., verified resistant 91.67%, 5% moderately resistant, 1.67% moderately susceptible and 5.26% susceptible. The phenotypic variation found was from 41.32 to 0.23, inoculated with *C. cubensis* while *Botryosphaeria* sp from 0.285 to 156.88. The coefficient of variation from 125% to 15.95% for *C. cubensis* and 29.86% to 101.13% for *Botryosphaeria* sp. The results indicate that the tested genetic materials possess good source of resistance for the two fitopatógenos tested. The molecular analysis concerning bulks of the contrasting individuals, were not possible to evaluate the co-segregation of the markers in the lineages of the São Joaquin and Baronesa Farms and in the shade of research of the company due to the ancestors ancestors were a little contrasting concerning the observed phenotypic characteristic.

Keywords: Canker, Eucalipto, Resistance, *Chrysosporthe cubensis*, *Botryosphaeria* sp.

1- INTRODUÇÃO GERAL

O *Eucalyptus* é atualmente o gênero florestal de maior importância mundial, devido à sua adaptação aos diferentes tipos de clima e solos e seu alto potencial como matéria prima para a indústria madeireira e a produção de celulose e papel. Seu uso, em larga escala no Brasil, tem cerca de 30 anos e o país já se tornou o maior produtor mundial do gênero, com cerca de 3,5 milhões de hectares plantados. Seu ciclo florestal, que varia entre 6 e 7 anos fez com que sua área de plantio ultrapasse a do gênero *Pinus*, que até 1981 dominava a área total reflorestada no país. Deste modo a eucaliptocultura tem-se demonstrado ser uma das mais produtivas, avançadas e competitivas do mundo.

A competitividade do Brasil frente aos demais países produtores de eucalipto deve-se ao clima tropical, somado a pesquisa na geração de tecnologias que oferecem ao agronegócio as seguintes vantagens: taxa de crescimento das espécies dez vezes maior que a do Hemisfério Norte, disponibilidade de áreas de plantio, domínio tecnológico, facilidade de acesso marítimo, gestão profissional e mão de obra qualificada para as indústrias (Roxo, 2003). Atualmente, o Brasil tem uma produtividade de 41 m³/ha/ano, podendo ter um potencial de 50 m³/ha/ano. O eucalipto tem como contribuição florestal a restauração de áreas

degradadas, conservação do solo, proteção da biodiversidade e sequestro de carbono (BRACELPA, 2007).

O cancro do eucalipto causado pelo fungo *Chrysosporthe cubensis* e *Botryosphaeria* sp. é considerada uma das doenças importantes para a cultura do eucalipto que levam a prejuízos quantitativos e qualitativos, pois retarda o crescimento da planta, ocorre à quebra de fuste pelo vento no local da lesão e a sua madeira tem o valor para o uso da serraria afetado, incluindo o baixo rendimento da celulose. O rendimento de madeira é reduzido significativamente quando os cancos atacam mais de 25 % do comprimento do tronco útil comercialmente (Ferrari et al. 1984). Comparado com a madeira normal, a madeira com cancro contém mais extrativos e lignina, afetando adversamente o descoramento (Foekel et al. 1976).

O principal dano as árvores causadas por *C. cubensis* e *Botryosphaeria* sp. é o desenvolvimento de grandes cancos que podem matar árvores durante o primeiro até o último ano do ciclo de crescimento. Sob condições climáticas favoráveis com espécies suscetíveis ou clone, o cancro pode afetar até 50 % das hastes (Alfenas et al. 1983). Os cancos são caracterizados pela morte do floema, do cambio formando quinos nas árvores.

A seleção de eucalipto resistente à doença tem reduzido grandes perdas nas plantações causadas por cancro. A propagação clonal de genótipos resistentes forneceu um controle eficaz da doença no Brasil, e na seleção de clone resistentes do híbrido baseados em *Eucalyptus grandis* e muitas outras espécies para a África do Sul (Van Zyl et al. 1999, Van Heerden et al. 2002).

Existem várias opções de controle para reduzir o impacto do cancro causado por *C. cubensis* e *Botryosphaeria* sp. O controle químico pode ser uma alternativa, porém é uma ferramenta economicamente inviável e atualmente, a mais viável é a multiplicação e seleção de árvores de eucalipto resistentes à doença.

O objetivo deste trabalho foi selecionar clones resistentes ao cancro de *Chrysosporthe cubensis* e *Botryosphaeria* sp. e primers do tipo RAPD para o caráter ligado ao gene de resistência, visando o melhoramento assistido.

2- REVISÃO DE LITERATURA

2.1. O Eucalipto

As espécies do gênero *Eucalyptus* tiveram sua origem na Austrália e regiões próximas como Nova Guiné, Indonésia, Timor, Irian Jaya e sul das Filipinas. Encontram-se predominantemente na faixa latitudinal entre 9°N e 45°S e estão amplamente distribuídas entre as latitudes 30 m a 2000 m. Possui mais de 720 espécies de eucaliptos, com grande número de variedades e híbridos interespecíficos (Waugh, 1998).

No Brasil, a introdução de povoamentos florestais para fins econômicos originou-se no início deste século, com a introdução do gênero *Eucalyptus*, na região de Rio Claro – SP, pela Companhia Paulista de Estrada de Ferro, visando à produção de dormentes (Silva, 1994).

Atualmente as plantações de eucalipto com o propósito industrial, somam aproximadamente três milhões de hectares estabelecidos para a produção de celulose, papel, carvão vegetal, lâminas e compensados de madeira e painéis de madeira reconstituída,

tais como as chapas de fibras, os aglomerados de madeira, MDF (fibras de densidade média) e OSB (painel de partículas orientadas).

Por ser uma espécie introduzida no país, tem sido predominantemente utilizada nos reflorestamentos brasileiros devido ao seu rápido crescimento, capacidade de readaptação de determinadas espécies às diversas regiões ecológicas e pelo potencial econômico da sua madeira. Deste modo a eucaliptocultura tem-se demonstrado ser uma das mais produtivas, avançadas e competitivas do mundo.

O Brasil é o sétimo país em plantio de florestas, com aproximadamente 5,2 milhões de hectares plantados, atrás da China, Índia, Rússia, Estados Unidos, Japão e Indonésia. Em 2005, o Brasil possuía 5,2 milhões de hectares de florestas plantadas com pinus e eucalipto, concentradas, principalmente nos estados de Minas Gerais, Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul, São Paulo e Bahia. Da área total plantada, o eucalipto representa 65 %, concentrando-se na região Sudeste, nos estados de Minas Gerais e de São Paulo, além da Bahia na região Nordeste (ABRAF, 2006).

Dentre as espécies mais utilizadas, *Eucalyptus grandis* e seus híbridos interespecíficos, principalmente com a espécie *Eucalyptus urophylla* são consideradas as mais importantes devido a seu bom crescimento em quase todo o Brasil e pode ser utilizada para fins industriais. Um fator importante de ser utilizada a espécie de *E. urophylla* é a maior estabilidade genética em todas as áreas onde foi testada e a resistência que apresenta ao cancro do eucalipto, superior a apresentada por procedências de *E. grandis* (Moura et al, 1980; Tonaco, 2002). Híbridos de *E. urophylla* com outras espécies, naturais e artificiais, estão sendo usados cada vez mais nos programas de reflorestamento, através de propagação vegetativa em massa e através de enraizamento de estacas. O Brasil, a China e o Congo são os países que estão liderando estes desenvolvimentos (Eldridge et al, 1994).

2.2. *Chrysoporthe cubensis*

2.2.1. Taxonomia de *Chrysoporthe cubensis*

Os cancrios são doenças que ocorrem normalmente em povoamentos naturais e plantações de eucalipto pelo mundo. *Chrysoporthe cubensis* é o patógeno mais conhecido associado a este tipo de doença no Brasil. Outros fungos associados a cancrios de

eucalipto são vistos como patógenos secundários, destacando-se *Botryosphaeria* sp, *Cytospora* sp, *Coniothyrium* sp entre outros (Alfenas et al, 2004).

O cancro do eucalipto causado por *Chrysosporthe cubensis* é uma das mais importantes doenças de *Eucalyptus*, em várias partes do globo onde a cultura é plantada como exótica. Embora este fungo seja conhecido na Austrália, onde o eucalipto é nativo, sua ocorrência não é muito clara e parece não estar associado como um problema à doença. A sua taxonomia é descrita pela seguinte forma Ascomycota (filo), Pyrenomycetes (classe), Diaphortales (ordem), Valsaceae (família) e *Chrysosporthe* (gênero) (Myburg et al., 2004)

A doença foi relatada primeiramente por Bruner (1917) em Cuba e o agente causal foi identificado e nomeado com *Diaporthe cubensis*. Em 1970 a doença foi relatada em várias outras regiões do mundo incluindo Suriname (Boerboom et al., 1970), Brasil (Hodges et al., 1973), Costa Rica (Hodges et al., 1976) e Estados Unidos – Florida, Havai e Porto Rico (Hodges et al., 1980). Hodges (1980) propôs uma nova combinação de *Cryphonectria cubensis* para a espécie, sendo encontrada subsequente em Camarões (Gibson, 1981), Índia (Sharma, 1985), África do Sul (Wingfield et al., 1989), Trinidad e Tobago, Bolívia, Hong Kong, Venezuela (Ferreira, 1989) e Colômbia (Merwe et al., 2001).

Atualmente estudos realizados com comparações de DNA mostram que a taxonomia de *Cryphonectria* requer uma revisão porque grupos reorganizados recentemente foram suportados por características morfológicas que são excessivamente diversas para conservar em um simples gênero. Somente as espécies *C. parasitica*, *C. radicalis sensu lato*, *C. nitschkei* e *C. macrospora* tem sido citados como representante do gênero *Cryphonectria*, pois todos têm a mesma característica morfológica que definem este gênero (Myburg et al., 2004).

Na história da taxonomia *Cryphonectria* também tem sido tratado como sinônimo de *Endothia*, mas baseados em comparações de sequências de DNA, estas duas espécies podem ser distintas (Venter et al. 2002). Este fato é suportado por diferenças nas características morfológicas como ascósporos asseptados e estroma superficial o qual são características de *Endothia* e não de *Cryphonectria* (Myburg et al, 2004).

Chrysosporthe é o novo gênero que tem sido descrito para isolados de *C. cubensis* em várias partes do mundo (Gryzenhout et al., 2004). O fungo conhecido como *C.*

cubensis são os principais patógenos que causam cancro em *Eucalyptus*, e também são patogênicos para outras espécies de plantas do gênero myrtales. Todas as espécies de *Chrysoporthe* são caracterizadas pelo tecido ascostromático limitado cobrindo a base de peritécios, pescoço longo coberto com tecido estromático preto e superficial, geralmente piriforme. O gênero *Chrysoporthe* tem sido descrito como a fase anamórfica de *Chrysoporthe* (Gryzenhout et al., 2004).

Através de características morfológicas, ecológicas e análises de sequências de DNA, quatro espécies pertencem ao gênero *Chrysoporthe*, sendo: *Chr. cubensis*, *Chr. austroafricana*, *Chr. doradensis* que é a mais recente espécie descrita patogênica de *Eucalyptus* no Equador e finalmente *Chrysoporthe hodgesiana* cuja a fase teleomórfica ainda não foi descrita (Gryzenhout et al., 2005).

2.2.2. Características do cancro de *Chrysoporthe cubensis*

No Brasil, em 1970, o cancro de eucalipto foi à enfermidade biótica mais importante da eucaliptocultura. Várias empresas dos estados de Espírito Santo, Minas Gerais e São Paulo procuraram conhecer a suscetibilidade ou a resistência de espécies, procedências e clones de *Eucalyptus* sp. ao cancro por meio de inoculações artificiais e de levantamento de percentuais de plantas mortas pela doença e de plantas sobreviventes naturalmente infectadas em plantações e testes experimentais (Ferreira et al., 2004).

Esta doença possui uma ampla distribuição geográfica, ocorrendo desde o extremo sul do Estado de São Paulo até a Amazônia, observando-se prejuízos sensíveis em regiões de baixa altitude de Espírito Santo, do Vale do rio Doce em Minas Gerais e Recôncavo Baiano (Hodges et al., 1976). É uma doença que ocorre em todas as regiões tropicais e subtropicais do mundo, principalmente em regiões onde a temperatura média é de 23°C e a precipitação esteja por volta de 1200 mm anuais.

O cancro é caracterizado pela morte dos tecidos da casca, decorrente da ação de vários agentes abióticos e bióticos. Porém as condições climáticas parecem ter uma participação maior na manifestação deste tipo de problema, com ligação entre a incidência de certos cancos e as condições adversas ao desenvolvimento da planta. Por exemplo,

temperaturas elevadas provocadas pelo fogo servem como porta de entrada para o patógeno, provocando o trincamento da casca que pode causar mortalidade dos tecidos por desidratação (Ferreira, 2001).

A sintomatologia é bastante variada podendo atacar plantas de 5 meses de idade até o final da rotação. Em plantios jovens podem ocorrer mortes esporádicas associadas a lesões nas regiões basais do caule, próxima ao colo, sem apresentar o sintoma típico do cancro. As plantas jovens, por apresentarem diâmetros reduzidos, podem ser aneladas na sua base pelo cancro, sendo levadas à morte. (Ferreira, 1989). Do ataque em plantas mais velhas resultam lesões com pouco ou abundante trincamento até cancros típicos, podendo ser encontrados a diversas alturas do tronco.

O cancro basal é aquele cuja evolução da lesão deu origem a partir das imediações da interface tronco/solo. O início das lesões dos cancros basais pode ser bem mais afetado por fatores abióticos, haja visto que os genótipos já conhecidos como suscetíveis ou moderadamente suscetíveis, o percentual de árvores com lesões ou cancros basais é bem maior que o percentual de árvores com lesões ou cancros altos (Alfenas, 2004).

O cancro típico é caracterizado por lesão margeada de calos, com a morte do câmbio e de parte da circunferência do tronco, tratando-se de uma lesão profunda. Os calos são respostas da planta ao patógeno, que impedem o anelamento do tronco pela lesão. As presenças destes calos indicam que a planta não morrerá, pois a lesão encontra-se delimitada pelos calos.

Outra forma de se visualizar o sintoma é em forma de sapata e intumescimento em que as árvores com lesões pouco profundas formam uma periderme necrofilática na casca. Com o desenvolvimento da nova casca na árvore, a casca externa da lesão é pressionada para fora do tronco e o seu trincamento, ocorrido primeiramente pelo ressecamento ou perda de turgescência das células após a colonização do patógeno é intensificado, fazendo com que a casca tende a se desgarrar do tronco em formas de tiras (Ferreira, 1989).

Até recentemente *Chrysosporthe cubensis* tem sido conhecido por ocorrer em árvores da família Myrtaceae nativas e exóticas no Brasil, porém vários estudos relatam que o patógeno aparece em outras espécies de famílias. Os hospedeiros predominantemente são as espécies de *Eucalyptus*, *Syzygium aromaticum*, *Psidium*

cattleianum, *P. americana*, *P. caimito*, *Tibouchinia urvilleana*, *Tibouchinia lepidota*, *Miconia theaezeans*, *Miconia rubiginosa* entre outras. (Barreto et al., 2006; Myburg et al., 2003; Old et al., 2003; Wingfield et al., 2003; Rodas et al., 2005; Seixas et al 2004, Hodges et al., 1986; Hodges et al, 1988, Wingfield et al., 2001). Várias espécies de eucalipto são altamente suscetíveis à infecção, *E. grandis*, *E. camaldulensis*, *E. saligna* e *E. tereticornis*. O *E. urophylla* mostra-se como uma espécie altamente tolerante a infecção de *C. cubensis*.

2.2.3. O Controle do Cancro de *Chrysoporthe cubensis*

Nas décadas de 1970 e 80 várias empresas eucaliptocultoras dos Estados de Espírito Santo, Minas Gerais e São Paulo procuraram conhecer a suscetibilidade ou a resistência de espécies, procedências e clones de *Eucalyptus* spp. ao cancro do eucalipto, causado por *Chrysoporthe cubensis* (Bruner) Hodges, por meio de inoculações artificiais e de levantamentos de percentuais de plantas mortas pela doença e de plantas sobreviventes naturalmente infectadas em plantações e testes experimentais. A partir desses trabalhos, chegou-se a conclusão de que a resistência a doença era relativamente abundante tanto em nível inter e intra-espécies e inter e intra-procedências (Ferreira et al., 1977).

O controle do cancro do eucalipto é exemplo mundial de sucesso do uso do método de resistência de plantas para o efetivo controle de doença florestal no campo. Esse controle tem sido feito com o plantio inicial ou de reposição florestal, com material resistente, empregando-se mudas a partir de sementes ou de enraizamento de estacas provenientes de matrizes selecionadas intra ou interpopulacionais (Ferreira, 1989).

A maioria das espécies de eucalipto, cerca de 150 espécies estabelecidas, hibridizam-se facilmente. Essa livre hibridização é responsável pelas atuais populações heterogêneas espalhadas por todo o país. Dentre as espécies mais plantadas, *E. saligna* é a mais suscetível. No grupo das moderadamente suscetíveis *E. alba* e *E. grandis* são muito plantadas, mas seus graus de infecção variam consideravelmente, provavelmente devido ao problema da hibridação não controlada. Dentre as espécies resistentes, *E. urophylla* é a mais recomendada para fins de celulose (Hodges, 1976).

As circunstâncias ambientais e o genótipo de indivíduos causam papéis importantes na resposta à doença, porém nem todos os genótipos respondem na mesma maneira ao patógeno, para todas as circunstâncias ambientais. A interação genótipo · ambiente (G · E) complicam experimentações da seleção quando os genótipos são tolerantes a porque as árvores devem ser testadas em ambientes diferentes. Selecionar clones diferentes de eucalipto para a tolerância de doença em locais diferentes através da inoculação artificial ao *C. cubensis* deve ilustrar o efeito desta interação (Van Heerden, 2002).

Em termos intrapopulacionais, a espécie *E. grandis* é a que oferecem melhores perspectivas para a exploração da resistência. Esta é feita através de seleções de árvores fenotipicamente resistentes em povoamentos com alta incidência da doença e avaliação de sua resistência através de teste de progênies. Outro método que vem sendo empregado é a produção de híbridos vigorosos e resistentes de *E. grandis* e *E. urophylla*, propagados vegetativamente através da estaquia (Ferreira, 1989).

A evolução da doença nos plantios de eucalipto embora variável em função do material genético (espécies, procedências, progênies, clones), da qualidade do sítio, da idade da planta e das condições climáticas da época do ano, deve estar ligada a um importante fator, que é a adaptação genética do material plantado, com o aumento gradativo do inóculo na região. Dentro deste contexto, as medidas de controle químico tornam-se inviáveis economicamente, sendo os caminhos mais promissores a seleção genética de materiais resistentes a estes patógenos.

Outra estratégia promissora para reduzir o impacto do cancro de *Cryphonectria* é através do controle biológico envolvendo a hipovirulência com *Cryphonectria parasitica*. As cepas hipovirulentas se caracterizam pela presença de um hipovírus de cadeia dupla de RNA (dsRNA) que se replica no citoplasma. Estes dsRNA não tem nenhum efeito sobre a planta hospedeira. A hipovirose pode ser transmitida em duas vias, uma verticalmente através de esporos assexuais ou horizontalmente via anastomose de hifas que depende do sistema de incompatibilidade vegetativa governado por 5 a 7 locus gênicos. Essa infecção do hipovírus resulta na mudança morfológica pronunciada que incluem o aumento na produção de pigmentação, redução do crescimento micelial e redução da esporulação (Van Heerden et al. 2002)

2.3. *Botryosphaeria* sp.

2.3.1. Características do cancro causado por *Botryosphaeria* sp.

O cancro de *Botryosphaeria* é uma doença de ocorrência comum em áreas de solo arenoso no Estado de São Paulo, afetando principalmente plantios de *Eucalyptus citriodora*. Pode determinar sérios prejuízos, especialmente nos plantios destinados à produção de postes.

O fungo *Dothiorella spp.* segundo (Wolf, 1939), apresenta um estágio perfeito ascógeno conhecido como *Botryosphaeria ribis*. Este fungo foi primeiramente descrito em 1911 por Grossen backer e Duggar, como agente fitopatogênico em espécies de *Ribis* (Wolf, 1939). Spaulding (Spaulding, 1969) e Magnani (1964) citam a ocorrência de *Botryosphaeria ribis* var. *Chromogena* causando «die-back» em eucalipto no Havaí. Azevedo e Santos relatam a existência de uma outra espécie de *Botryosphaeria* causando «die-back» em *Eucalyptus globulus* em Portugal. *B. berengiana* que apresenta estágio imperfeito em duas formas: macropicnídios (*Dothiorella vulgaris*) e micropicnídios (*B. berengiana*). Esta espécie é menos patogênica que *B. ribis* var. *chromogena* (Krugner et al., 1973) Duas espécies de *Botryosphaeria* têm sido constantemente associadas às lesões: *B. ribis* e *B. rhodina*, esta última mais conhecida pela sua fase anamórfica. Estes fungos, que são considerados parasitas fracos ou saprófitas em um grande número de plantas em todo mundo, tiveram sua patogenicidade demonstrada através de inoculações artificiais por ferimento.

A doença do cancro causada por *Botryosphaeria dothidea* tem uma grande quantidade de hospedeiros entre plantas arborizadas da Tailândia incluindo o *Eucalyptus camaldulensis*, *Casuarina equisetifolia* e *Acácia auriculiformis*. Barber et al. (2005) estudando *Eucalyptus* em florestas nativas e nas plantações na Austrália observou duas espécies distintas de *Botryosphaeria* previamente descrito spp. baseado em seqüências de DNA, mas sinônimo com *D. versiformis* e *D. eucalypti*. *D. gregaria* é um parasita facultativo que ataca plantas cítricas subnutridas, encontrado, geralmente, associado aos tecidos mais debilitados ou quase mortos (Weaver, 1999; Whiteside et al., 1988). Sua penetração dá-se principalmente por ferimentos ou aberturas naturais (Nsolomo et al., 2000; Mirzaee et al., 2002; Valencia-Botin et al., 2003).

Três gêneros *Diplodia*, *Lasiodiplodia* e *Dothiorella* encontrados em espécies de pinus, que são difíceis de se distinguir, foram relacionados molecularmente entre si. Os resultados indicaram que as espécies de *Diplodia* ocorrem principalmente em gymnospermas, com algumas espécies em gymnospermas e em angiospermas. As espécies de *Lasiodiplodia* ocorrem igualmente em ambos os gymnospermas e angiospermas e as espécies de *Dothiorella* são restringidas as angiospermas (Wet et al., 2008).

2.3.2. Sintomas de *Botryosphaeria* spp.

Uma ampla gama de hospedeiros tem sido associada com infecções de *Botryosphaeria* em espécies de eucalipto tendo como principais *Corymbia citriodora*, *E. globulus*, *E. grandis* e *E. urophylla*. É uma doença caracterizada pela necrose dos ramos, que evolui da extremidade destes para os pontos de inserção de modo que os tecidos da casca e do limbo tornam-se escuros e secos, as folhas perdem a turgescência e secam (Krugner et al., 1973). As lesões necróticas no tronco das árvores podem ser delimitadas pelo desenvolvimento do calo cicatricial, formando cancrios típicos, ou se desenvolver em toda a circunferência do caule, resultando em secamento da parte superior da copa e, comumente, quebra do fuste pelo vento, na altura da região lesionada. Apesar de normalmente haver recuperação da árvore com a emissão de novos brotos a partir da área abaixo da lesão, ocorre bifurcação do tronco e sua conseqüente deformação. É observada a formação de bolsas de quino, tanto na casca como no lenho que, ao extravasar seu conteúdo, criam aspecto típico de uma gomose. Essa gomose, associada ou não aos cancrios do tronco pode continuar ocorrendo em árvores mais velhas até o final do ciclo da cultura (Krugner et al., 2005). Estas bolsas de quino persistem na madeira tornando-a inaceitável para a produção de madeira serrada. Em condições severas, sintomas similares são encontrados em ramos laterais e tronco quebrado nos locais onde existem cancrios.

2.3.3. O Controle do Cancro causado por *Botryosphaeria*

O manejo de perdas associadas a *Botryosphaeria* é complicado em função do patógeno se manifestar sob diversas condições de estresse. Existem algumas evidências que mostram que o patógeno infecta folhas saudáveis e tecido de ramos e tronco tornem-se estressados. Existem também boas evidências que sugerem que diferentes clones de eucalipto diferem quanto à suscetibilidade ao patógeno. Portanto, existe uma oportunidade considerável de se selecionar materiais que apresentem alta tolerância ao fungo. Perdas podem ser reduzidas pela detecção precoce da doença em campo e pelo plantio de espécies ou clones tolerantes.

Caracteres morfológicos, idade e estado nutricional das plantas, ou fatores do ambiente e práticas culturais podem alterar a suscetibilidade da planta (Krüger et al., 1995; Bendendo, 1995; Luque et al., 2002). Queimaduras do sol, injúrias, ferimentos, infecções prévias determinadas por outros organismos, aplicações de pesticidas, condições ambientais desfavoráveis ou outros fatores debilitantes podem ser condições necessárias ao desenvolvimento e proliferação da doença (Averna-Saccá, 1938; Salzedas et al., 1985; Whiteside et al., 1988; Ferreira, 1989; Krüger et al., 1995; Sánchez-Hernández et al., 2002). Além da elevada densidade do hospedeiro suscetível, é importante que, na fase crítica em que a epidemia vá se estabelecer, o hospedeiro apresente-se propenso a contrair a doença. O déficit hídrico e deficiência/desequilíbrio nutricional podem ocasionar fissuras na casca e seca de ponteiro favorecendo a penetração e a infecção por fungos causadores de cancro, como os do gênero *Botryosphaeria*. No entanto, em condições de campo Tokeshi et al. (1976) mostrou que um dos sintomas da deficiência de boro em *Eucalyptus* foram rachaduras e fissuras no caule. Isto mostra que a deficiência de boro no campo constitui-se num dos fatores de predisposição mais importantes para a ocorrência de cancrios em espécies de *Eucalyptus*, principalmente em solos arenosos nas regiões com período de déficit hídrico.

De um modo geral, recomenda-se que sejam adotadas medidas silviculturais que minimizem os efeitos aos fatores do estresse a que as plantas podem ser submetidas. Alguns fatores ambientais como a deficiência do boro tem sido comum nos plantios de eucalipto. Os sintomas dessa deficiência são: folhas novas cloróticas,

encarquilhadas e coriáceas que se tornam quebradiças, morte de gema apical, fendilhamento da casca e tronco, com exsudação de goma e necrose dos tecidos, que podem afetar o crescimento e desenvolvimento das árvores, essa deficiência parece ser um fator de predisposição de fungos patogênicos secundários.

Silveira et al (1998) estudando a agressividade de *Botryosphaeria* e sua relação com boro observou que os sintomas de infecção iniciaram-se uma semana após a inoculação do fungo, sendo caracterizados pelo escurecimento da casca e do lenho nas proximidades do ponto de inoculação. Num estágio mais avançado, em torno de 20 dias após a inoculação, verificou-se nas plantas deficientes em boro, que esses escurecimentos progrediam rapidamente ao longo do tronco, dando origem a extensas lesões. Outro sintoma foi à formação de bolas de quino, na casca e no lenho, cujo extravasamento originou o surgimento de gomose típica. A gomose tem sido associada à infecção por fungos do gênero de *Botryosphaeria* em espécies de *Eucalyptus*. Na carência de boro, as plantas apresentam baixa capacidade de cicatrizar as lesões.

A menor capacidade de defesa dessas plantas pode ser explicada pela deficiência de boro diminuir a atividade meristemática e, em situações extremas, causar até a morte do câmbio (Carvalho et al.,1980) tecido este responsável pela formação dos calos cicatriciais, os quais tem a função de recompor a estrutura afetada, bem como impedir a colonização de novos tecidos pelo patógeno.

O controle de *Dothiorella* sp. em eucalipto pode ser feito através de indivíduos resistentes, evitar o estresse na planta e o manejo químico *in vitro*. Dentro deste contexto, as medidas de controle químico no campo tornam-se inviáveis economicamente. Segundo Colturato et al. (2007) observou 7 tratamentos químicos como carbendazim, clorotalonil, difenoconazole, picoxystrobin + ciproconazole, azoxystrobin, e picoxystrobin, sendo que o ingrediente ativo carbendazim foi o de maior eficiência, seguido de clorotalonil e difenoconazole. Silva et al. (2007) observou que os extratos de mil folhas, melão de são Caetano e eucalipto a uma concentração de 7,5 e 10% mostrou-se mais eficiente no controle de *Dothiorella* sp. O controle *in vitro* com óleos essenciais como folhas de menta, eucalipto e palma rosa e não encontrou diferenças estatísticas a 5% de probabilidade entre elas, sendo que a concentração de 1% foi mais eficiente o controle do patógeno (Bocardo et al. 2007).

2.4. Marcadores moleculares

A rapidez e o dinamismo com que novas técnicas descobertas são divulgadas garantem o acúmulo de informações em um período de tempo muito curto, permitindo que metodologias que utilizam o DNA estejam em contínuo aperfeiçoamento.

O uso de marcadores moleculares é definido como um fenótipo molecular obtido de um gene expresso ou de um segmento específico de DNA. Seu desenvolvimento tem sido extremamente rápido e sua utilização tem sido ampla em vários organismos e com diversas finalidades (Ferreira et al., 1998).

Com o advento das técnicas modernas de biologia molecular, surgiram diversos métodos de detecção de fragmentos específicos de DNA. A primeira técnica utilizada foi o RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) que permitia a análise de polimorfismo de comprimento de fragmentos de DNA. A partir do surgimento da PCR (Mullis et al., 1987), novas classes de marcadores moleculares foram descritas como o RAPD (Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso).

A técnica RAPD baseia-se na amplificação de segmentos específicos de DNA genômico através do uso de primers com sequência arbitrária, embora a amplificação não ocorra ao acaso e sim em regiões onde os primers encontram homologia com o genoma. Estes marcadores expressam caracteres dominantes, ou seja, o genótipo homozigoto recessivo é identificado pela ausência da banda no gel (fenótipo nulo), enquanto que os genótipos homozigotos dominante e heterozigotos são considerados na mesma classe fenotípica, com a presença da banda no gel de eletroforese (Ferreira et al., 1998).

Segundo Chen et al (1996) a técnica é considerada rápida, precisa, sensível e relativamente barata para análise genômica de árvores, permitindo a avaliação de numerosos loci no genoma. O RAPD é utilizado na obtenção de fingerprints genômicos de indivíduos, análise na estrutura e diversidade genética em populações naturais, construção de mapa genético de alta cobertura genômica e a localização de genes de interesse econômico (Grattapaglia et al., 1994; Gaiotto et al., 1996; Barril et al., 1997; Verhaegen et al., 1997; Paris, 2000; Rocha et al., 2002; Leite et al, 2002; Zamprogno, 2005).

2.5. Análise de segregantes em amostras agrupadas (BSA)

A técnica foi proposta com base no uso de marcadores RAPD em vista da grande eficiência deste tipo de marcador para detectar polimorfismo. Consiste em detectar diferenças entre duas amostras agrupadas de DNA obtidas de uma população segregante (Michelmore et al., 1991). Estas amostras agrupadas (bulk) são constituídas da mistura de quantidades iguais de DNA de indivíduos selecionados com base na expressão fenotípica de um caráter ou gene de interesse, por exemplo, a resistência ou suscetibilidade de uma doença em particular, mas não arbitrários para outro gene. Assim, as duas amostras de DNA tendem a diferir somente na região selecionada.

As duas amostras agrupadas são testadas com um grande número de marcadores, buscando-se aqueles que apresentarem bandas presentes em uma amostra e/ou ausência na outra (Ferreira et al., 1995). Marcadores que são polimórficos entre os bulks estarão potencialmente ligados aos locos que controlam a característica usada para construir os bulks. Esta evidência de ligação gênica entre o marcador polimórfico e o loco alvo são confirmados através de uma análise de segregação de todos os indivíduos da população segregante. Estima-se desta forma o valor da frequência de recombinação entre o marcador e o loco genético que controla o caráter.

Esta técnica tem sido usada com sucesso na identificação de genes de resistência, permitindo fazer a seleção de plantas resistentes nas próximas gerações por meio do marcador sem a necessidade de inoculação.

CAPÍTULO 1:

AVALIAÇÃO FENOTÍPICA PARA *Chrysoporthe cubensis*

AValiação Fenotípica para *Chrysosporthe cubensis*

Helenize Gabriela de Souza ^{1 2 *}

Edson Luis furtado¹

¹ Faculdade de Ciências Agronômicas, UNESP, Departamento de Produção Vegetal, Setor de Defesa Fitossanitária, CP 237, 18603-970, Botucatu, SP.

² Bolsista FAPESP

*E-mail: helegabis@gmail.com

RESUMO

O termo cancro é utilizado para designar lesões localizadas na casca do caule de plantas lenhosas que podem resultar no anelamento do caule e secamento da parte superior da copa e a morte da planta. O objetivo deste estudo foi avaliar o comportamento de resistência de clones e suas progênes de eucalipto quanto ao cancro causado por *Chrysosporthe cubensis*. Os ensaios foram conduzidos em casa de vegetação, sob condições controladas de irrigação, utilizando 15 clones de eucalipto com 4 e 14 meses de idade. Após identificar os genótipos contrastantes dos parentais, foram selecionadas progênes de diferentes fazendas da empresa. Para cada fazenda foram selecionadas diferentes quantidades de indivíduos que estavam dispostos em campo. Os isolados utilizados de *C. cubensis* foram provenientes de Piracicaba e Bofete, produzidos em meio BDA e inoculados nos clones e progênes pelo método do disco. A avaliação foi realizada 60 dias após a inoculação, medindo a área da lesão de cada material. Dos clones testados com *C. cubensis*, verificou-se que o isolado de Bofete foi mais patogênico com 46,66 % de indivíduos resistentes, 6,67 % moderadamente resistentes 13,33 % moderadamente suscetíveis e 33,34 % suscetíveis. As variâncias fenotípicas encontradas foram de 0,23 a 41,32 enquanto que os coeficientes de variação foram de 15 a 125%. Os resultados indicam que os materiais genéticos testados possuem boa fonte de resistência para os fitopatógenos testados.

Palavras Chave: *Eucalyptus* sp., cancro, resistência, *Chrysosporthe cubensis*

EVALUATION PHENOTYPIC OF *Chrysoporthe cubensis*.

Helenize Gabriela de Souza ^{1 2 *}

Edson Luis furtado¹

¹ Faculdade de Ciências Agronômicas, UNESP, Departamento de Produção Vegetal, Setor de Defesa Fitossanitária, CP 237, 18603-970, Botucatu , SP.

² Bolsista FAPESP

*E-mail: helegabis@gmail.com

ABSTRACT

The term canker is used to assign injuries located in the bark of stems of woody plants that can result in the anelamento of stems and drying of the superior part of the crown and the death of the plant. The objective of this study was to evaluate the behavior of resistance of clonal and its lineages of eucalyptus concernig the canker caused by *Chrysoporthe cubensis*. The essays were made in the grennhouse, under controlled conditions of irrigation, using 15 clonals of eucalyptus. After identifying the contrasting genotypes of the parental ones, lineages of different farms of the company were selected. For each farm different amounts of individuals were selected from the ones available in field. The isolated ones used the for *C.cubensis* are proceeding from Piracicaba and Bofete, produced in medium BDA and inoculated in clonals and lineages by the method of the disk. The evaluation was concluded 60 days after the inoculation, measuring the area of the injury of each material. The clonals were grouped into the categories HS (highly susceptible – 33,34%), MS (moderately susceptible - 13,3%), MR (moderately resistant- 6,67%), and HR (highly resistant -46,66%). It was verified that the isolated one from Bofete was more pathogenic. The phenotypic variation found was from 41,32 to 0,23, while the coefficient of variation from 125% to 15,95%. The results indicate that the tested genetic materials possess good source of resistance for the tested fitopatógeno.

Keywords: *Eucalyptus* sp., canker, resistance, *Chrysosporthe cubensis*

INTRODUÇÃO

O *Eucalyptus* é atualmente o gênero florestal de maior importância mundialmente, devido a sua adaptação a diferentes tipos de clima, solos e seu alto potencial como matéria prima para a indústria madeireira e para a produção de celulose e papel. A introdução de seu uso em larga escala no Brasil tem cerca de 30 anos, tornado o país um dos maiores produtores mundiais do gênero, com cerca de 3,7 milhões de hectares plantados. Deste modo a eucaliptocultura tem-se demonstrado ser uma das mais produtivas, avançadas e competitivas do mundo.

A principal vantagem competitiva do Brasil são as suas tecnologias florestais, baseadas em programas de melhoramento genético e de multiplicação clonal do eucalipto, gerando um ganho na produtividade das plantações florestais. Atualmente o Brasil tem uma produtividade atual de 41m³/ha/ano, e tem um potencial de 50 m³/ha/ano. O eucalipto tem como contribuição florestal a restauração de áreas degradadas, conservação do solo, proteção da biodiversidade e seqüestro de carbono (BRACELPA, 2007).

O cancro do eucalipto causado pelo fungo *Chrysosporthe cubensis*, mais conhecido como *Cryphonectria cubensis*, foi considerada a enfermidade biótica mais importante da eucaliptocultura na década de 70. Segundo Ferreira (1977) as inoculações artificiais indicaram que uma população de *Eucalyptus grandis*, aos sete anos de idade, bastante infectada por *C. cubensis*, a maioria das árvores encontradas com infecção natural da doença, era suscetível ao patógeno e poucas encontradas sem sintomas da enfermidade eram resistentes. A partir disto, vários trabalhos procuraram conhecer a suscetibilidade ou a resistência das espécies e procedências e clones de *Eucalyptus* ao cancro do eucalipto, causado por *C. cubensis*, por meio de inoculações artificiais e levantamentos de percentuais de plantas mortas.

Atualmente esta doença é considerada potencial importante para a cultura do eucalipto, podendo causar prejuízos quantitativos e qualitativos, pois pode retardar o crescimento e a madeira afetada além de ter seu valor prejudicado para uso em serraria, também tem seu rendimento em celulose e caloríficos reduzidos.

Existem várias opções para reduzir o impacto do cancro por *Chrysoporthe*. O controle químico pode ser uma alternativa, porém é uma ferramenta economicamente inviável. Já o controle biológico usando a hipovirulência do patógeno, é atrativo, mas é uma opção muito cara e necessita de um tempo maior para estudo (Van Heerden et al., 2001). Atualmente, o mais viável economicamente é a multiplicação e seleção de árvores de eucalipto resistentes à doença.

A disposição da seleção de eucalipto resistente à doença tem reduzido grandes perdas nas plantações causadas por *C. cubensis*. As plantações monoclonais são atrativas para companhias florestais devido à uniformidade dos clones selecionados e a maior produtividade em períodos de tempo pequenos. Essa uniformidade genética e a combinação favorável de condições ambientais dessas plantações podem levar as grandes perdas se os clones plantados forem suscetíveis ao patógeno *C. cubensis* (Van Heerden et al., 2001). O objetivo deste trabalho foi avaliar fenotipicamente os híbridos de eucalipto quanto ao patógeno *Chrysoporthe cubensis*.

MATERIAL E MÉTODOS

Material Vegetal

O material genético utilizado no presente estudo é oriundo do programa de melhoramento do Setor Florestal da Empresa Votorantim Celulose e Papel. Estes materiais genéticos são provenientes de clones de *Eucalyptus grandis*, *Eucalyptus urophylla* e *Eucalyptus camaldulensis*, oriundos de seleção massal. Foram selecionados 15 clones de eucalipto com idade variando de 4 a 14 meses situado no município de Jacareí (SP), possuindo um total de 119 árvores para a avaliação.

Tabela 1: Material vegetal utilizado no estudo com os diferentes isolados de *C. cubensis*

Amostras	Material Vegetal
VR1	<i>Eucalyptus grandis</i> x <i>Eucalyptus urophylla</i>
C1	<i>Eucalyptus grandis</i> x <i>Eucalyptus urophylla</i>
P1	<i>Eucalyptus grandis</i> x <i>Eucalyptus urophylla</i>
VR2	<i>Eucalyptus grandis</i> x <i>Eucalyptus urophylla</i>
TC1	<i>Eucalyptus grandis</i> x <i>Eucalyptus urophylla</i>
C2	<i>Eucalyptus grandis</i> x <i>Eucalyptus urophylla</i>
P2	<i>Eucalyptus urophylla</i>
E1	<i>Eucalyptus camaldulensis</i> (Penápolis)
E2	<i>Eucalyptus camaldulensis</i> (IPEF)
C3	<i>Eucalyptus grandis</i> x <i>Eucalyptus urophylla</i>
VR3	<i>Eucalyptus grandis</i> x <i>Eucalyptus urophylla</i>
P3	<i>Eucalyptus grandis</i> x <i>Eucalyptus urophylla</i>
TC2	<i>Eucalyptus grandis</i>
C4	<i>Eucalyptus grandis</i> x <i>Eucalyptus urophylla</i>
TC3	<i>Eucalyptus grandis</i> x <i>Eucalyptus urophylla</i>

Após identificar os genótipos contratantes desses parentais, ou seja, resistentes e suscetíveis, foram selecionadas progênies de diferentes fazendas da empresa. Para cada fazenda foram selecionadas diferentes quantidades de indivíduos que estavam dispostos em campo. Na Fazenda São Joaquim situada no município de Jacareí (SP) com o cruzamento C2 x P3 foram inoculados 17 indivíduos em campo enquanto que o cruzamento VR1 x VR2 apresentou 95 plantas. Para a Fazenda Baronesa, situada no município de Jacareí, o patógeno foi inoculado em 79 plantas em campo no cruzamento de

C1 x VR2, enquanto que para as demais Fazendas como Três Marias e Vitória (C1 x TC2) apresentaram 23 e 11 indivíduos respectivamente.

Obtenção do inóculo

Foram utilizados dois isolados de *Chrysosporthe cubensis* proveniente de diferentes locais (Piracicaba e Bofete - SP) obtidos a partir de plantas de *Eucalyptus* sp. naturalmente infectadas em campo. Pequenos pedaços do tecido lesionado foram cortados, submetidos a uma assepsia com álcool 70 % (1minuto), hipoclorito 2 % (30 segundos) e lavados com água destilada autoclavada (Figura 1). Atualmente estes isolados de *Chrysosporthe cubensis* pertencem à micoteca do Departamento de Produção Vegetal da Faculdade de Ciências Agronômicas – Campus de Botucatu – São Paulo.

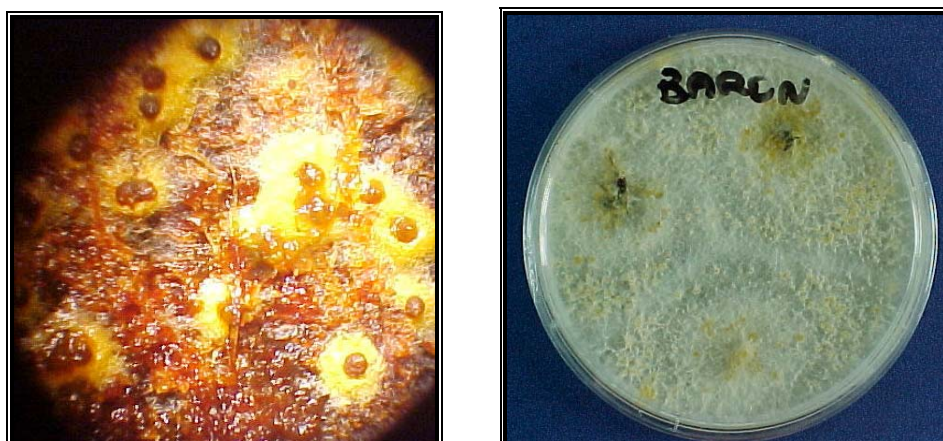


Figura 1: A: Esporulação do fungo em pedaços de madeira. B: isolamento do fungo *Chrysosporthe cubensis* em meio BDA com os pedaços de tecido lesionado.

A partir desses isolados, foram obtidas culturas puras do fungo, em placas de Petri de 9 cm de diâmetro, contendo o meio BDA (39g de extrato comercial de batata-dextrose-ágar para 1L de água destilada), incubadas a 25-28 °C por 7-10 dias com um fotoperíodo alternado de 12 h para as

inoculações nas mudas de *Eucalyptus*. Os isolados foram identificados e realizados reinoculações periódicas a fim de manter a patogenicidade.

Inoculação do material vegetal

A metodologia utilizada neste estudo consistiu em colocar discos de 0,5 cm de diâmetro contendo meio de cultura e inóculo em contato interno com os tecidos da planta após ferimento, com o auxílio de um vazador cilíndrico de metal, de 0,7 cm de diâmetro, retirando-se discos de casca e expondo o lenho. Em cada ferimento aberto, foi então colocado um disco do inóculo, com a face contendo o micélio voltado para o lenho. Os discos possuíam o tamanho de 5 mm de diâmetro contendo o meio BDA com o micélio retirado das colônias de isolado de *C. cubensis*, com idade de 7 a 10 dias de incubação. O disco de casca em seguida foi recolocado no lugar, sendo pressionado contra o inóculo. Os locais inoculados foram cobertos com algodão umedecidos com água destilada e envoltos com fita adesiva de 5 cm de largura, para proteção contra dessecação. A proteção com as fitas foram mantidas até a leitura dos resultados, durante um período que variou de 30 a 60 dias. Plantas testemunhas foram inoculadas somente com meio BDA.

Para a avaliação das lesões dos indivíduos, fez-se o uso de um canivete cortando-se e removendo-se a casca para expor a lesão e medir a área lesionada. A avaliação foi efetuada aos 30 e 60 dias após a inoculação, onde a área da lesão provocada pelo patógeno foi transferida em um desenho para um papel contacto transparente, circundando a lesão da casca com o auxílio de caneta pincel. A área da lesão foi obtida utilizando uma mesa digitalizadora.

Análise estatística

Para obter uma melhor análise dos clones foi realizada a distribuição de frequência das progênes das fazendas em estudo onde foram analisados em função do tamanho da área de lesão do tronco produzida por *C. cubensis*. Os resultados obtidos foram divididos em classes e com uma

amplitude variável com diferentes níveis de resistência como R (resistente), MR (moderadamente resistente), MS (moderadamente suscetível), e S (suscetível).

- ✓ A amplitude total da variação (At) foi calculada entre as diferenças da menor a maior variável;
- ✓ Foi utilizada a regra de Sturges para a determinação do número de classes:

$$K = 1 + 3,3 \log N$$

Onde: K: número de classes

N: número total de observações

- ✓ A amplitude do intervalo de classe (h): foi obtida dividindo a amplitude total da variação pelo número de classes.
- ✓ As frequências das classes correspondem ao número de observações realizadas no experimento que caem entre os limites de classe.

Análise genética

Nos testes de progênies foram mensuradas as áreas da lesão (cm) causada por *Chrysosporthe cubensis* utilizando os seguintes parâmetros da variância genética. A definição e expressão do coeficiente de variação genética pode ser expressa como:

$$\sigma^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}$$

- n: número de indivíduos observados
- $\bar{x}$: média da amostra

- x_i : valor individual

Esse valor nos dá a idéia de quanta variação existe em nossa amostra. Este método é restrito aos casos onde podemos conseguir indivíduos geneticamente idênticos. Isso nem sempre é possível. Na maioria dos estudos em genética quantitativa os valores de fenótipo, genótipo e ambiente não são utilizados diretamente, mas sim suas variâncias, ou seja:

$$\sigma_F^2 = \sigma_G^2 + \sigma_E^2$$

Onde:

- σ_F^2 é a variância fenotípica (ou total, aquela que pode ser medida)
- σ_G^2 é a variância genotípica
- σ_E^2 é a variância ambiental

Coefficiente de variação: Expressa a variabilidade genética existente no indivíduo analisado

$$CV = \frac{\sigma_F^2}{\bar{x}}$$

- σ_F^2 é a variância fenotípica
- $\bar{x}$: média da população das progênes de cada fazenda;

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Avaliação da resistência dos clones candidatos a parentais

Trinta e sessenta dias após a inoculação, a maioria das plantas tinham desenvolvido os sintomas da lesão no lenho. A avaliação da resistência baseou-se fundamentalmente no tamanho atingido pelas lesões em função da área da casca lesionada (Figura 3).

O desenvolvimento das lesões necróticas no lenho ocorreu a partir do ponto de inoculação, servindo como a porta de entrada do patógeno, que produziu uma lesão inicialmente circular e evoluindo para a forma elipsoidal vertical. Em alguns clones as lesões apresentavam um contorno geométrico bem definido e em outra forma irregular (Figura 2).

Através de análises estatísticas as larguras da lesão diferiram significativamente entre os isolados provenientes de Bofete e Piracicaba ($F = 9,08$; desvio padrão = $0,4431$; coeficiente de variação = $28,45\%$), mostrando ser o isolado de Bofete como o mais agressivo.



Figura 2: A: Lesão com evolução de formato circular definido; B: Lesão com evolução elipsoidal no sentido longitudinal.

Na primeira avaliação a área da lesão média foi de 1,52 e 2,77cm² enquanto na segunda avaliação encontrou-se uma média de 3,20 e 6,14 cm² de área de lesão do tronco causado pelos isolados provenientes de Piracicaba e Bofete, respectivamente. Alguns indivíduos diferiram quanto ao tamanho da lesão, conseqüentemente diferindo na sua resistência quando comparados com o grau de patogenicidade do isolado.

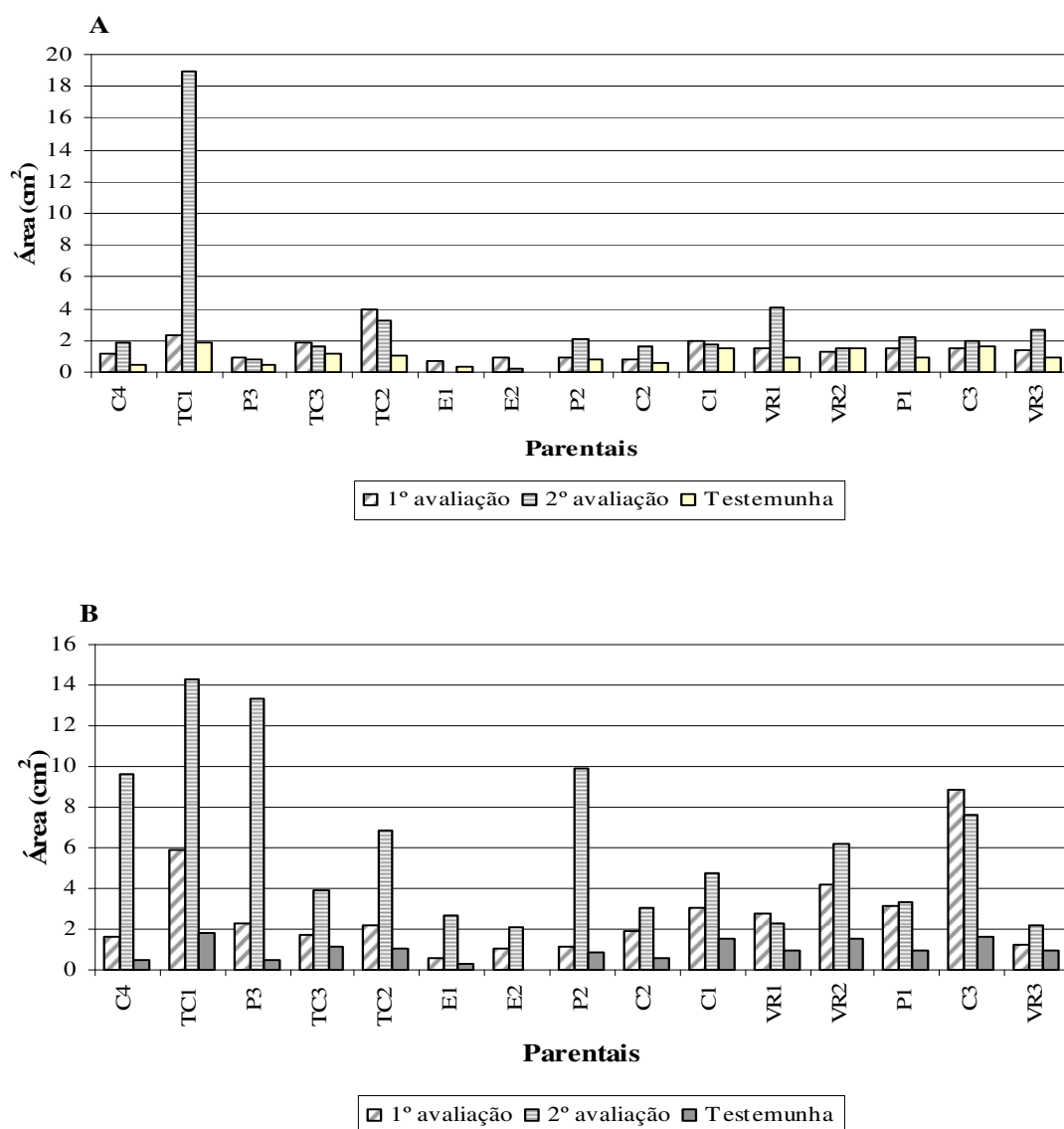


Figura 3: Área da lesão do tronco aos 30 e 60 dias nos diferentes clones após a inoculação com *Chrysosporthe cubensis* proveniente de Piracicaba (A) e Bofete –SP (B).

Houve também uma resposta diferenciada do clone com o isolado, indicando que nem todos os clones tenham respondido da mesma maneira aos isolados, a exemplo o VR1 que respondeu como mais suscetível ao isolado de Piracicaba.

Para a primeira avaliação, 30 dias após a inoculação, observou uma mudança nítida quanto ao tamanho da lesão. A interação do clone TC1 com o isolado de Bofete ($5,923 \text{ cm}^2$) obteve uma área média da lesão superior em relação ao isolado de Piracicaba ($2,382 \text{ cm}^2$). O mesmo comportamento pode ser observado para os clones C3 e VR2 e a sua interação com o isolado de Bofete sendo superior o tamanho médio da lesão.

Uma resposta interessante foi o clone TC2 que apresentou uma redução no tamanho da lesão do isolado de Piracicaba ($3,996 \text{ cm}^2$) para o isolado de Bofete ($2,149 \text{ cm}^2$). Os clones TC3, P2, E1 e E2 não apresentaram diferença quanto ao tamanho da lesão para os dois isolados.

Considerando a segunda avaliação aos 60 dias após a inoculação, a resposta do clone C4 ao isolado de Piracicaba teve uma área média de lesão inferior ($1,845 \text{ cm}^2$) quando comparado com o isolado de Bofete ($9,666 \text{ cm}^2$). O mesmo pode ser observado para os clones P3, TC2, E1, E2, P2, VR2 e C3. Uma combinação interessante foi do clone VR3 com os dois isolados que não apresentou diferença quanto ao tamanho da lesão e do clone VR1 em que foi observado, apresentando uma redução no tamanho da lesão do isolado de Piracicaba ($4,061 \text{ cm}^2$) para o isolado de Bofete ($2,28 \text{ cm}^2$).

O estudo realizado por Van Heerden (2002) com a inoculação de *C. cubensis* em diferentes clones mostrou que houve diferenças nas respostas dos clones após a inoculação com um período de 6 a 12 meses. Foi observado que em alguns clones, havia uma redução no tamanho da lesão após 12 meses. Isto pode ser porque os clones tinham começado a recuperar e tal recuperação pôde refletir em um grau maior de tolerância à doença. Os clones que possuíam lesões avançadas após 6 meses de inoculação foi considerado com um alto grau de suscetibilidade.

A partir dos resultados obtidos pode-se verificar uma maior agressividade do isolado proveniente de Bofete na maioria dos clones, única exceção para o VR1 Na avaliação aos 60 dias, as

lesões foram maiores que aos 30 dias para ambos os isolados. Desta forma a sequência ao estudo para relação dos parentais, foi realizada com base no isolado proveniente de Bofete e com avaliação aos 60 dias.

A distribuição de frequência dos 15 clones foram analisados em função do tamanho da área de lesão do tronco formados pelos isolados e mostra que a classe que teve maior frequência foi a primeira com uma amplitude variando de 0 a 2,044 para o isolado de Bofete.

Tabela 2: Distribuição de frequência dos intervalos de classe variável da área do tamanho da lesão do tronco em 15 clones de *Eucalyptus* sp. em clones inoculados com *Chrysoporthe cubensis*.

classes	Piracicaba		Bofete	
	amplitude	observações*	amplitude	observações*
1	0 - 2,715	54	0 - 2,044	30
2	2,715 - 5,43	3	2,044 - 4,088	17
3	5,43 - 8,145	1	4,088 - 6,132	3
4	8,145 - 10,86	0	6,132 - 8,176	5
5	10,86 - 13,575	0	8,176 - 10,22	2
6	13,575 - 16,29	0	10,22 - 12,264	1
7	16,29 - 19,005	1	12,264 - 14,308	2

A distribuição da frequência dos clones formados em função do tamanho da área da lesão mostra que a classe de tamanho mais frequente foram as classes 1 a 3 consideradas resistentes a moderadamente resistentes. Foram encontrados 46,66 % de plantas classificadas como resistentes; 6,67 % plantas moderadamente resistente, 13,33 % planta moderadamente suscetíveis e 33,34 % plantas suscetíveis.

A maior área de lesão do tronco nos clones foi constatada nos indivíduos que pertencem as classes 5 a 7, sendo considerados suscetíveis, com uma frequência de 8,33 % para o intervalo de classe 8,176 a 14,308 cm², para isolado de Bofete. Os indivíduos que constituem esta classe são TC1, P3,

P2, C4 e C3, em que apresentam área da lesão do tronco bem desenvolvido com um tamanho superior que os demais clones considerados neste estudo.

Os clones que são considerados moderadamente suscetíveis apresentam um elevado tamanho da área da lesão do tronco, porém, em geral são mais baixos do que apresentados pelos clones suscetíveis. Este nível de suscetibilidade são observados para a classe 4 com um intervalo de classe de 8,145 a 10,86 para o isolado de Piracicaba e 6,132 a 8,176 para o isolado de Bofete, sendo representados pelos clones VR2 e TC2 (8,33 %).

A menor área de lesão do tronco nos clones foi constatada nos indivíduos que pertencem as classes 1 e 2, sendo considerados resistentes, com uma frequência de 78,33% para o intervalo de classe de 0 a 4,088 cm² para isolado de Bofete. Os clones encontrados nesta classe são a maioria dos indivíduos utilizados neste estudo sendo eles VR1, P1, VR3, C2, E1, E2 e TC3. Estes clones geralmente apresentam uma área muito reduzida de lesão no tronco ou praticamente não possuem as lesões. Van Heerden (2002) trabalhando com 21 genótipos de *Eucalyptus* sp. e um isolado de *C. cubensis* bastante virulento observou que as larguras da lesão também diferiram significativamente entre clones. Vários desses clones indicaram um grau elevado de resistência à doença, mostrando que os genótipos respondem diferentemente à infecção causada pelo *C. cubensis*.

Os indivíduos moderadamente resistentes possuem uma lesão superficial apresentando lesões menores do que as apresentadas pelos indivíduos suscetíveis e moderadamente suscetíveis. Neste nível os indivíduos moderadamente resistentes são representados pela classe 3 possuindo uma amplitude de classe que variou de 4,088 a 6,132 cm².

Muitos dos clones utilizados neste estudo foram classificados como moderadamente resistente e resistente. Isto porque em alguns clones e na testemunha foram observadas as formações de um tecido caloso que se desenvolvia a partir da região cambial e recobria em intensidade variável a superfície do lenho exposta no ferimento de inoculação. Estes calos chegavam muitas vezes, a tomar toda a cavidade de inoculação podendo até projetar-se para fora, tornando-as salientes. Esta formação

calosa pode ser considerada como uma possível expressão de resistência, pois demonstra a capacidade da planta em delimitar o desenvolvimento da lesão no sentido da profundidade da casca, impedindo que os tecidos do lenho sejam atingidos pelo patógeno, tendo uma rápida reação de cicatrização.

Um estudo realizado com 25 clones de *Eucalyptus* sp. inoculados artificialmente com um isolado virulento de *C. cubensis* mostrou que a capacidade das feridas fecharem e a produção de calos foram correlacionadas com a suscetibilidade destes clones a infecção do patógeno (Van Zyl et al. 1999). Clones que possuíam capacidade de fechamento dos ferimentos mais rápida foram também os mais resistentes à infecção ao *C. cubensis*, aqueles que possuíam uma capacidade menor de fechar as feridas foram considerados os mais suscetíveis ao cancro causado por *C. cubensis* (Van Zyl et al. 1999).

Os métodos rápidos para avaliar diferenças em clones de *Eucalyptus* sp. quanto a suscetibilidade do patógeno *C. cubensis* são desejáveis nos programas de melhoramento para produzir indivíduos que sejam tolerantes a essa doença. A inoculação artificial é utilizada frequentemente para avaliar árvores que sejam tolerantes ao cancro do eucalipto (Ferreira et al. 1977; Alfenas et al. 1983). Van Der Westhuizen et al. (1990) mostrou que os híbridos de *E. grandis* com *E. camaldulensis*, *E. urophylla* ou *E. tereticornis* são mais resistentes ao cancro do eucalipto causado por *C. cubensis*.

As alternativas para selecionar indivíduos resistentes a doença, tal como a inoculação em plantas jovens como as experimentações em estufa renderam resultados valiosos e similares às experimentações de campo (Conradie et al. 1992). Além disso, Van Zyl et al. (1999) mostraram também que a capacidade dos clones para recuperarem feridas causadas pelos danos mecânicos está correlacionada diretamente com sua suscetibilidade ao *C. cubensis*. Futuramente, pode ser possível incluir a capacidade de recuperação aos ferimentos como um critério de seleção para os programas de melhoramento. Além disso, os marcadores moleculares ligados à resistência forneceriam um método ideal para selecionar plantas do programa.

Avaliação da intensidade de sintomas em função da idade da árvore

Considerando a classe de idade das plantas foi observada que para quatorze meses foram encontradas uma proporção de 46,7 % para indivíduos resistentes, 26,7 % para moderadamente resistentes, 13,3 % para moderadamente suscetível e 13,3 % para suscetível, não havendo uma classe de idade na qual os danos fossem mais pronunciados.

Para a classe de idade de quatro meses os indivíduos estão representados da seguinte forma: 57,2 % resistentes 28,6 % moderadamente resistentes 7,1 % moderadamente suscetíveis e 7,1 % suscetíveis.

Comparando entre 4 e 14 meses, houve um aumento de 10,5% para os indivíduos resistentes com uma quantidade menor de idade. Isto se deve a alta relação inversa entre o crescimento da árvore e a porcentagem de casca. Árvores maiores (em diâmetro e altura) de uma mesma espécie tendem a ter menor percentual de casca, sendo especializada no armazenamento de madeira. A influência da idade da árvore está também relacionada às suas dimensões e ao fenômeno de perda de casca por queda do ritidoma. Entretanto, apesar de esses teores serem menores nas árvores maiores, as quantidades totais de casca (em metros cúbicos ou toneladas por hectare) é maior nos povoamentos mais velhos que em povoamentos mais jovens. (Foelkel, 2008)

Alguns clones variaram quanto ao nível de resistência em função da idade avaliada. Os clones TC1 e P3 foram considerados suscetíveis para os 14 meses de idade e moderadamente resistentes aos 4 meses de idade. Os clones C4 e P2 foram considerados moderadamente suscetíveis aos 14 meses de idade e resistentes aos 4 meses.

Em resposta à degradação das células do floema, o câmbio vascular promove a superprodução de novas células de floema, que posteriormente também são degradadas (Román *et al.*, 2004). Este processo contínuo de degradação e síntese causa o “anelamento” ao redor de todo tronco e, como consequência, prejudica o transporte dos produtos sintetizados pela fotossíntese nas folhas da copa para as raízes. O fluxo restrito de seiva elaborada para as raízes por um período de tempo prolongado, por

sua vez, acaba por exaurir as reservas de carboidratos das mesmas, favorecendo o ataque de patógenos secundários e causando a morte por desnutrição (Bassanezi *et al.*, 2003) em plantas mais novas a quantidade de células mais novas é maior, facilitando a regeneração do tecido vegetal.

Tabela 3: Avaliação do nível de resistência nos diferentes clones estudados aos 4 e 14 meses de idade.

NR*	4 meses	14 meses
R	TC3, TC2, P2, VR2, C4, C1, P1, VR1	TC3, E1***, E2, C2, VR1, P1, VR3
MR	VR3, TC1, P3, C2	TC2, C1, VR2, C3
MS	C3	C4, P2
S	E2**	TC1, P3

*NR: Nível de resistência

** Muitas plantas foram mortas por causa do vento

*** Ausência de *Eucalyptus camaldulensis* proveniente de Penápolis para os 4 meses de idade

Os clones TC3, VR1 e P1 mantiveram o mesmo nível de resistência para as duas idades avaliadas, enquanto que nos demais clones houve uma pequena diferença quanto ao tipo de resistência. Os clones TC2, VR2 e C1 variaram de resistentes a moderadamente resistentes, com o aumento da idade, levando a um pequeno aumento do tamanho da lesão. O clone C3 variou de moderadamente suscetível para moderadamente resistente, tendo uma diminuição da área lesionada. Diferentemente pode ser observado com os clones que possuem os contrastes de resistência como, por exemplo, resistência/suscetibilidade onde o tamanho da lesão é estatisticamente significativa.

Avaliação genética dos parentais e progênes

A variância fenotípica dos parentais pode ser observada na tabela 4. As maiores variâncias encontradas foram para os indivíduos P3, TC1, C4 e P2 com amplitude de 21,55 a 41,32 enquanto a menor variação encontrada foram para os parentais TC3, C2, VR1, P1, VR3, E1 e E2, variando de 0,23 a 1,57.

A variação dos parentais observados foi muito grande, variando de 125% a 15 %, sendo o P2 e P1 respectivamente. Com base nos coeficientes estimados nos ensaios realizados no campo, Pimentel – Gomes (1985) classificou-os como baixos, quando inferiores a 10 %; médios, quando de 10 % a 20 %; altos, quando de 20 % a 30 % e muitos altos, quando superiores a 30%. Contudo, essa classificação é muito abrangente e não leva em consideração as particularidades da cultura estudada, e principalmente, não faz distinção quanto a natureza do caráter avaliado (Garcia, 1989; Scapim et al., 1995; Costa et al., 2002). Além disso, essa classificação pode variar das condições edafoclimáticas ou ciclo reprodutivo da cultura (Scapim et al., 1995). Num programa de melhoramento genético, a classificação de Coeficiente de Variação pode ser útil, por exemplo, para informar a variação que o clone obteve quanto ao tamanho da lesão do cancro do eucalipto.

Os indivíduos P2, P3 e C4 que se encontram nas classes suscetíveis e moderadamente suscetíveis, foram os que obtiveram maior variação no tamanho da lesão. Isto também pode ser observado para os parentais TC2 e E1 que se encontram nas classes moderadamente resistentes e resistentes. Isto significa que mesmo tendo diferentes níveis de resistência a variação quanto ao tamanho da lesão foi muito diferente, o que eleva o coeficiente de variação (Figura 6).

Tabela 4: Parâmetros estatísticos e genéticos avaliados nas progênies para os diferentes parentais.

Parentais	$\bar{x}$	σ^2_F	CV (%)
C4	4,314	21,55	107,6
TC1	8,718	23,58	55,70
P3	5,938	41,32	108,25
TC3	2,450	1,57	51,14
TC2	3,723	7,46	73,36
E1	1,259	0,83	72,36
E2	1,393	0,35	42,47
P2	4,054	25,71	125
C2	2,260	0,53	32,21
C1	3,627	0,98	27,29
VR1	2,615	0,39	23,88
VR2	4,887	2,32	31,21
P1	3,186	0,23	15,05
C3	8,480	4,17	24,08
VR3	1,542	0,40	41,01

$\bar{x}$: média da população; σ^2_F : variância fenotípica; CV: Coeficiente de variação;

As variâncias foram estimadas pela análise das fazendas com testes de progênies dos cruzamentos avaliados neste estudo. A maior parte da variância fenotípica foi detectada na fazenda Três Marias (7,64), indicando a possibilidade de aproveitamento desta por meio de seleção dos melhores indivíduos em cada progênie, enquanto que a menor variação foi encontrada na fazenda São Joaquim I com 0,56. Na identificação e seleção dos genótipos superiores, a variância se caracteriza

como uma das ferramentas mais importantes para a quantificação do potencial de melhoramento da população e para o mérito da estratégia de seleção utilizada, visando à alteração da frequência dos alelos favoráveis (Cruz, 1994).

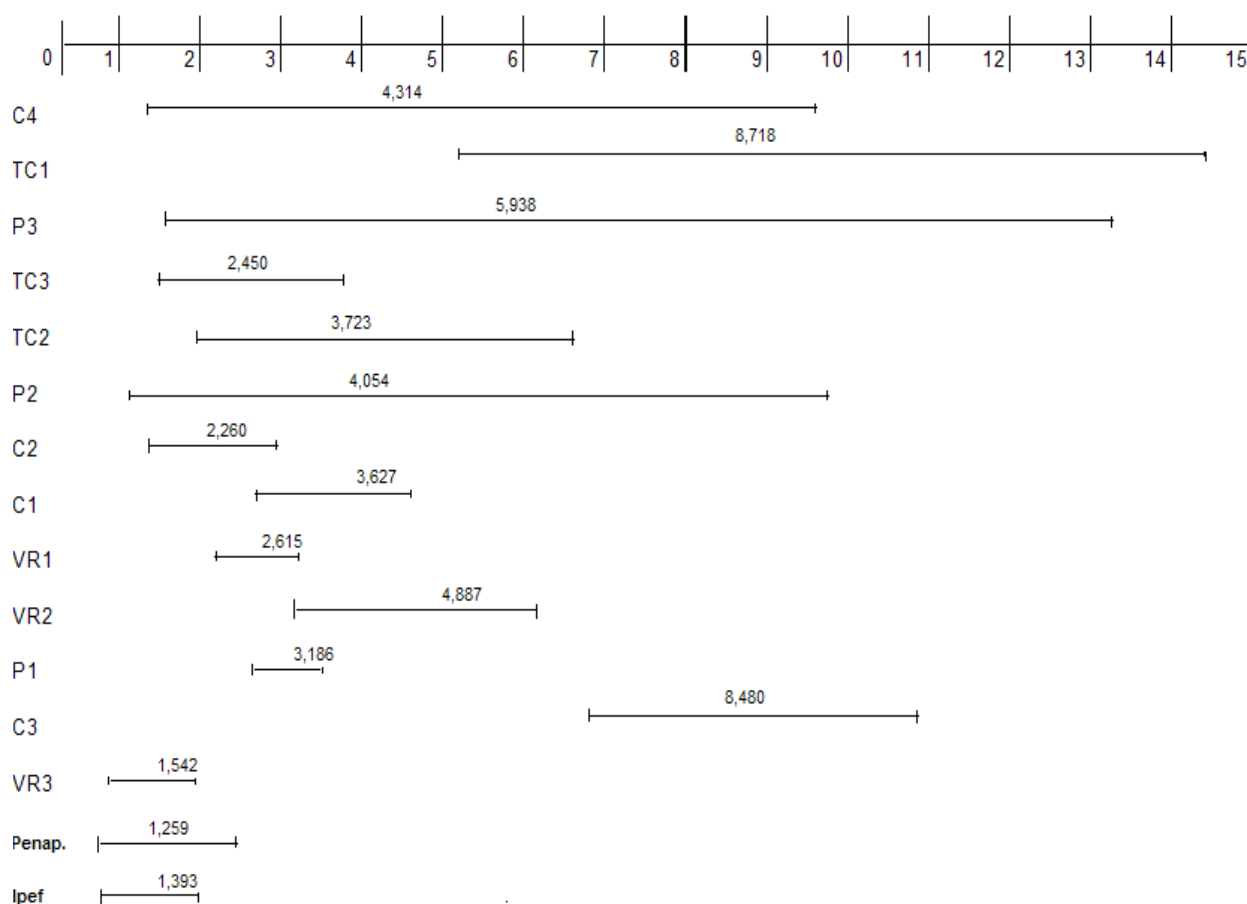


Figura 4: Representação gráfica da variância com o menor, maior valor e a média da área da lesão dos parentais ao patógeno *C. cubensis*.

Uma vez que a resistência ao cancro causado por *C. cubensis* é suficientemente elevada na população não foi necessário recorrer a cruzamentos para introduzir nestas espécies genes da resistência. Os estudos evidenciaram que a resistência ao cancro no eucalipto é um carácter genético de controle quantitativo (poligênico). Na realidade, os cruzamentos entre plantas resistentes não originam necessariamente gerações totalmente resistentes, como se verifica quando a resistência é controlada por

um único gene. A descendência mostra um comportamento variável ao longo de uma escala de valores que vai da suscetibilidade a resistência. Todavia, como seleção quantitativa, obtêm-se plantas resistentes que exercem uma fraca pressão de seleção sobre o patógeno, o qual terá maior dificuldade em ultrapassar as defesas das plantas selecionadas e provocar grandes danos.

Nos programas de melhoramento convencional, a seleção dos genótipos apresentam características desejáveis é realizada com base nas informações fenotípicas dos indivíduos. Como a grande maioria dos caracteres de importância agrônômica é de natureza quantitativa, ou seja, controlados por um grande número de genes, os caracteres sofrem elevada influência ambiental na expressão do fenótipo. A seleção fenotípica vem sendo aplicada há muito tempo, apresentando resultados bastante significativos.

Tabela 5: Parâmetros estatísticos e genéticos avaliados nas progênies para os diferentes materiais genéticos.

Fazendas	$\bar{X}$	σ^2_F	CV (%)
Baronesa (C041H x VR3709H)	3,835	5,13	59,06
São Joaquim II (VR 3748H x VR3709H)	3,361	2,189	44,02
Vitória (C041H x TC50G)	3,038	4,65	70,98
Três Marias (C041H x TC50G)	3,515	7,64	78,64
São Joaquim I (C219H x P002H)	2,652	0,56	28,22

$\bar{X}$: média da população; CV: Coeficiente de variação; h^2 : Coeficiente de herdabilidade; Δg : ganho genético.

O coeficiente de variação genética (CV) é outro parâmetro usualmente utilizado para comparar a variabilidade genética expressa para cada caráter avaliado, conforme destacado por Resende (2001).

Os coeficientes de variação para a área da lesão causada por *C. cubensis* foram 59,06 % na fazenda Baronesa e para a São Joaquim II foi de 44,02 %. O menor coeficiente de variação encontrado foi de 28,22 % para a fazenda São Joaquim I, indicando que existe uma menor variação das progênes quanto à área da lesão.

No patossistema eucalipto-*Chrysoporthe cubensis*, a interação hospedeiro-patógeno-ambiente foi significativa em muitos dos genótipos testados. Em geral, um dado genótipo pode exprimir diversos fenótipos conforme as condições de clima e solo. Isto pode ser observado para a fazenda Vitória que apresentou uma variação fenotípica de 4,65 cujo cruzamento, C1 x TC2, é o mesmo utilizado para a fazenda Três Marias que apresentou uma variação de 7,64 na população estudada.

O êxito do melhoramento genético está associado à capacidade de acerto na escolha dos melhores indivíduos que serão os genitores das próximas gerações (Cruz et al., 2003). Uma das maneiras de identificar os indivíduos portadores de genes desejáveis é a avaliação genética dos candidatos à seleção. Em plantas perenes, recomenda-se que a seleção seja feita com base nos valores genéticos dos indivíduos que serão utilizados na recombinação e nos valores genotípicos dos indivíduos que serão clonados (Resende, 2002).

O melhoramento genético de espécies arbóreas florestais é uma atividade de médio-longo prazo e que comporta custos elevados, incluindo recursos humanos. Por outro lado, dado que a seleção para o melhoramento de um dado caráter reduz a variabilidade de todos os outros caracteres, com o intuito de conservar tanto quanto possível à diversidade da população e assegurar a elasticidade de adaptação a diversas condições ambientais é necessário criar uma ampla base genética de plantas resistentes, não se baseando na seleção de um número reduzido de clones. Por estes motivos, na área florestal, o melhoramento genético com vista à resistência a fatores bióticos ou abióticos adversos encontra justificativa apenas para espécies de elevado valor silvícola e ecológico, ornamental ou tecnológico.

Distribuição de frequências com as progênies

A distribuição da frequência das progênies mostra que as classes de tamanho mais freqüente foram as classes 1 a 3, consideradas resistentes e moderadamente resistentes.

A fazenda São Joaquim I (C2 x P3) e São Joaquim II (VR1 x VR2) apresentaram uma distribuição de frequência equilibrada, apresentando um número de indivíduos maiores nos níveis de resistência de moderadamente resistente (MR) e moderadamente suscetível (MS). Para São Joaquim I observa-se 17,65 % de plantas classificadas como MR com o intervalo de classe de 2,3 a 2,875 e 23,53 % de plantas classificados como MS com o valor de classe de 2,875 a 3,45. O mesmo pode ser observado para São Joaquim II com 45,26 % de plantas MR e 26,32 % indivíduos de MS. Na avaliação da resposta do hospedeiro à infecção do fungo foram efetuadas observações muito interessantes sobre plantas de comportamento intermediário. Nestas plantas em geral o processo necrótico desenvolve-se muito lentamente e raramente é fatal. Os indivíduos que manifestam este comportamento são definidos como tolerantes, já que não sofrem alterações no ritmo de crescimento e funcionalidade ainda que afetados por diversos cancos ativos.

Uma grande quantidade de indivíduos resistentes foi apresentada para todas as fazendas. A fazenda Baronesa, Vitória e Três Marias possuem 68,35 %, 63,64 % e 69,56 % de indivíduos resistentes, respectivamente. Este fato pode ser explicado quando um hospedeiro vigoroso, afetado superficialmente por injúria na casca viva, mais ainda distante do cambio vascular, pode ser capaz de iniciar um processo de barreira fisiológica anatômica impermeabilizante na casca viva, com a finalidade de parar a perda de líquidos a partir de seus tecidos sadios limítrofes a lesão. Após esta reação, inicia-se a formação de uma nova casca ou periderme, logo atrás da barreira mencionada. Essa forma de defesa em nível de casca é facilmente perceptível, sendo tecnicamente denominado mecanismo de defesa pela formação de periderme necrofilática (Ferreira et al, 2002).



Figura 5: Variações no tamanho das lesões de *C. cubensis* observadas em trocos de híbridos de eucalipto. **A, C:** Desenvolvimento da lesão; **B:** Formação da periderme necrofilática; **D:** Desenvolvimento de calos.

As plantas suscetíveis avaliadas dentro das progênes nas diferentes fazendas não possuem os mecanismos necessários para deter o avanço do processo necrótico entre as plantas restantes. Quando uma lesão ocasionada pelo fitopatogeno for profunda aproximando-se demasiadamente do câmbio vascular ou atingindo-o há a sua morte não sendo mais possível haver a regeneração de nova periderme para barrar a lesão. A fonte da injúria que matou porção do câmbio vascular afetará o lenho justaposto (xilema), acarretando distúrbio no sistema condutor ascendente de água e sais minerais, com conseqüente perda de líquidos e acesso de flora microbiana para o lenho (xilema). Assim somente a partir dos limites laterais da lesão é que haverá câmbio vascular e casca sadia. Na fazenda Baronesa foi encontrada o menor número de indivíduos suscetíveis com 1,27 % pertencente a esta classe, enquanto na fazenda Vitória foi observado 18,18 % de indivíduos compostos pela classe suscetível. As demais fazendas apresentaram 5,88 %, 5,26 % e 13,04 % para São Joaquim I, São Joaquim II e Três Marias respectivamente.

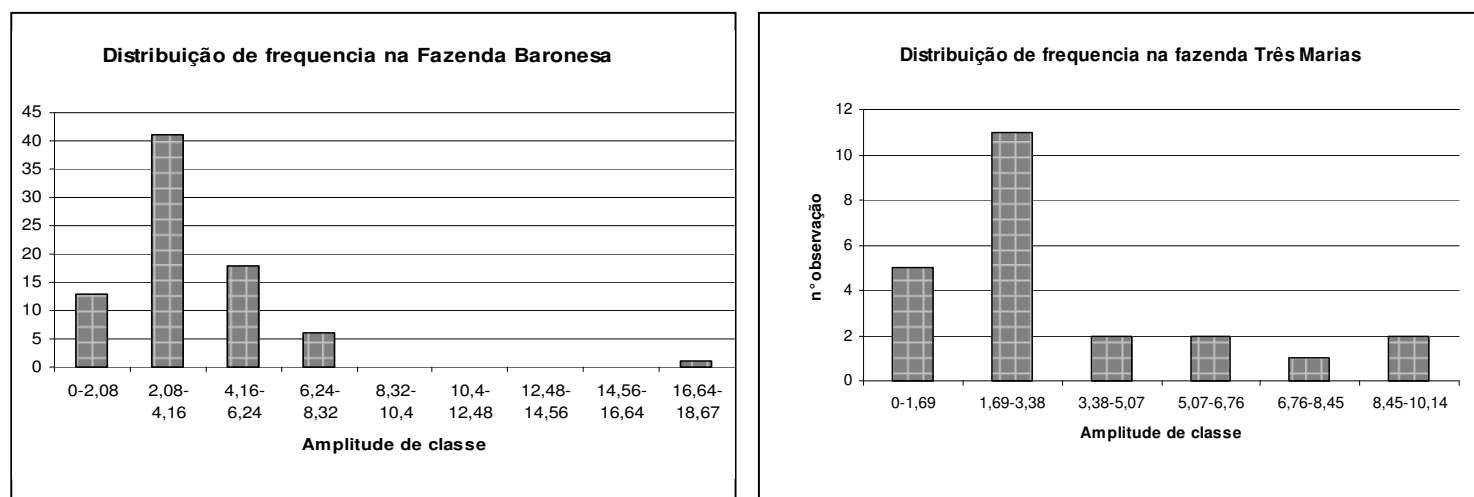


Figura 6: Distribuição de frequência das progênes pertencentes a diferentes sítios locais.

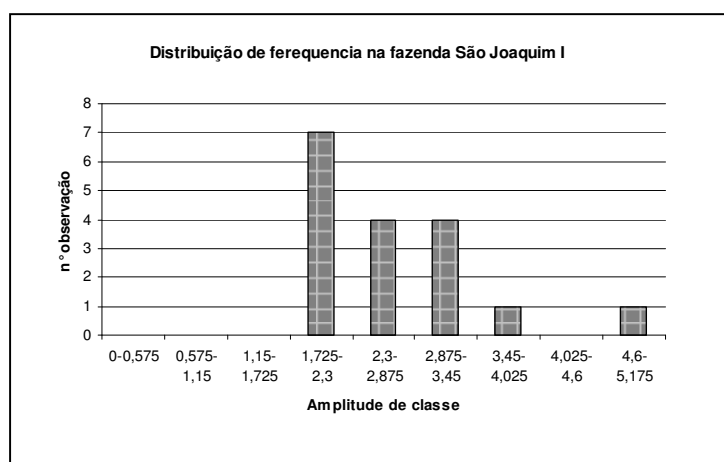
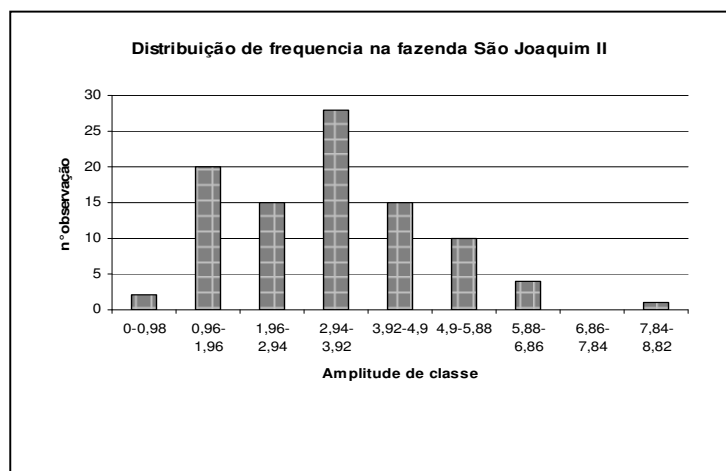
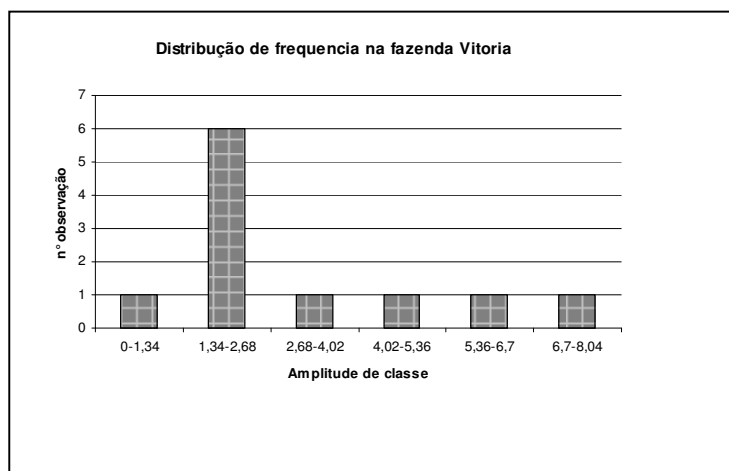


Figura 7: Distribuição de frequência das progênes pertencentes a diferentes sítios locais.

AGRADECIMENTOS

Os autores expressam seus agradecimentos a empresa Votorantim Celulose e Papel pelas facilidades para a experimentação e a FAPESP pelo apoio financeiro.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

ALFENAS, A. C., JENG, R., AND HUBBES, M. 1983. Virulence of *Cryphonectria cubensis* on *Eucalyptus* species differing in resistance. **Eur. J. For. Pathol.** 13:179-205.

BASSANEZI, R.B., GIMENES-FERNANDES, N. & YAMAMOTO, P.T. Morte Súbita dos Citros. Araraquara: Fundecitrus/EECB, **Boletim Citrícola**, 24. 2003.

BRACELPA, 2007 **In:** Associação Brasileira de de Celulose e Papel (<http://www.bracelpa.org.br/bra/estatisticas/pdf/booklet/DesempenhoAgosto2008.pdf>). Acesso em 19/08/08.

CONRADIE, E., SWART, W. J., AND WINGFIELD, M. J. 1992. Susceptibility of *Eucalyptus grandis* to *Cryphonectria cubensis*. **Eur. J. For. Pathol.** 22:312-315.

CRUZ, C. D.; CARNEIRO, P. C. S. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2003. v.2. 585p.

CRUZ, C. D.; REGAZZI, A. J. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 1994. 390p.

DANTI, R.; RADDI, P. et al. O melhoramento genético do cipreste para a resistência ao cancro cortical. (<http://www.arsia.toscana.it/filfor/cypmed-arsia/download/algarve%20brochure%20pdf/11-melhorament-28-35.pdf>). Acesso em 19/08/2008.

FERREIRA, F.A. Resistência de *Eucalyptus* spp. ao cancro causado por *Diaporthe cubensis* Bruner. Viçosa: Universidade federal de Viçosa, 75p. 1977.

FERREIRA, F.A.; MILANI, D. Diagnose visual e controle das doenças abióticas e bióticas do eucalipto no Brasil. – Mogi Guaçu, SP: **International Paper**, 2002. 98p.

FOELKEL, C. [Casca da árvore do eucalipto: aspectos morfológicos, fisiológicos, florestais, ecológicos e industriais, visando a produção de celulose e papel](http://www.eucalyptus.com.br/index.html). In: **Eucalyptus Online Book & Newsletter** (<http://www.eucalyptus.com.br/index.html>). Acesso em 20/08/2008

FLORENCE, E. J. M., SHARMA, J. K., AND MOHANAN, C. 1986. Stem canker disease of *Eucalyptus* caused by *Cryphonectria cubensis* in Kerala. Kerala **For. Res. Inst. Sci. Pap.** 66:384-387.

HODGES, C. S., GEARY, T. F., AND CORDELL, C. E. 1979. The occurrence of *Diaporthe cubensis* on *Eucalyptus* in Florida, Hawaii and Puerto Rico. **Plant Dis. Rep.** 63:216-220.

RESENDE, M.D.V. de. **Genética biométrica e estatística no melhoramento de plantas perenes**. Brasília: Embrapa, 2002. 975p

ROMÁN, M.P., CAMBRA, M., JUÁREZ, J., *et al.* Sudden death of citrus in Brazil: a graft-transmissible bud union disease. **Plant Disease** 88:453-467. 2004.

SHARMA, J. K., MOHANAN, C. et al. Occurrence of *Cryphonectria* canker disease of *Eucalyptus* in kerala, India. **Annals of Applied Biology**, n.106, p.265-276, 1985.

VAN HEERDEN, S. W., AND WINGFIELD, M. J. 2002. Effect of environment on the response of *Eucalyptus* clones to inoculation with *Cryphonectria cubensis*. **For. Pathol.** 32:395-402.

Van HEERDEN, S.W.; GELETKA, L.M.; PREISIG, D.L.; et al. Characterization of South African *Cryphonectria cubensis* Isolates Infected with a *C. parasitica* Hypovirus. **Phytopathology**, v.91, n.7, p.628-632, 2001.

VAN ZYL, L. M., AND WINGFIELD, M. J. 1999. Wound response of *Eucalyptus* clones after inoculation with *Cryphonectria cubensis*. **Eur. J. For. Pathol.** 29:161-167.

CAPÍTULO 2:

AVALIAÇÃO FENOTÍPICA DE *Botryosphaeria* sp.

AValiação Fenotípica de *Botryosphaeria* sp.

Helenize Gabriela de Souza ^{1 2 *}

Edson Luis Furtado¹

¹ Faculdade de Ciências Agronômicas, UNESP, Departamento de Produção Vegetal, Setor de Defesa Fitossanitária, CP 237, 18603-970, Botucatu , SP.

² Bolsista FAPESP

*E-mail: helegabis@gmail.com

RESUMO

O termo cancro é utilizado para designar lesões localizadas na casca do caule de plantas lenhosas que podem resultar no anelamento do caule e secamento da parte superior da copa e a morte da planta. O objetivo deste estudo foi avaliar o comportamento de resistência de clones e suas progênes de eucalipto quanto ao cancro causado por *Botryosphaeria* sp. Os ensaios foram conduzidos em casa de vegetação, sob condições controladas de irrigação, utilizando 15 clones de eucalipto. Após identificar os genótipos contrastantes dos parentais, foram selecionadas progênes no viveiro de pesquisa da empresa. Foram selecionados 96 indivíduos que estavam dispostos em campo. Os isolados utilizados de *Botryosphaeria* sp. são provenientes de Botucatu sendo produzidos em meio BDA e inoculados nos clones e progênes pelo método do disco. A avaliação foi realizada 60 dias após a inoculação, medindo a área da lesão de cada material. Dos clones testados, com *Botryosphaeria* sp., verificou-se 91,67 % resistentes 5 % moderadamente resistentes, 1,67 % moderadamente suscetíveis e 5,26 % suscetíveis. A média da área da lesão para as progênes estudadas variou de 7,29 cm² a 9,72cm². As variâncias fenotípicas encontradas foram de 0,285 a 156,88, enquanto os coeficientes de variação foram de 29,86 % a 101,13 %.

Palavras Chave: *Eucalyptus* sp., cancro, resistência, *Botryosphaeria* sp.

EVALUATION FENOTÍPICA OF *Botryosphaeria* sp.

Helenize Gabriela de Souza ^{1 2 *}

Edson Luis Furtado¹

¹ Faculdade de Ciências Agronômicas, UNESP, Departamento de Produção Vegetal, Setor de Defesa Fitossanitária, CP 237, 18603-970, Botucatu , SP.

² Bolsista FAPESP

*E-mail: helegabis@gmail.com

ABSTRACT

The term canker is used to assign injuries located in the bark of stems of woody plants that can result in the anelamento of stems and drying of the superior part of the crown and the death of the plant. The objective of this study was to evaluate the behavior of resistance of clonal and its lineages of eucalyptus concerning the canker caused for *Botryosphaeria* sp. The essays were made in greenhouse, under controlled conditions of irrigation, using 15 clones of eucalyptus. After identifying the contrasting genotypes of the parental ones, lineages in the shade research of the company had been selected. For the farm 96 of individuals were selected from the available in field. The isolated ones used for *Botryosphaeria* sp. are proceeding from Botucatu, produced in medium BDA and inoculated in clones and lineages by the method of the disk. The evaluation was concluded 60 days after the inoculation, measuring the area of the injury of each material. The clonal tested, with *Botryosphaeria* sp., verified resistant 91.67 %, 5 % moderately resistant, 1.67 % moderately susceptible and 5,26 % susceptible. The average of the area the injury for the studied lineages varied from 7,29 cm² to 9,72 cm². The phenotypic variation found was from 0,285 to 156,88, while the coefficient of variation from 29,86 % to 101,13 %. The results indicate that the tested genetic materials possess good source of resistance for the tested fitopatógeno.

Keywords: *Eucalyptus* sp., canker, resistance, *Botryosphaeria* sp.

INTRODUÇÃO

O eucalipto no Brasil tem sido extensivamente utilizado em plantios florestais por diversas razões: pela grande plasticidade do gênero devido à diversidade de espécies adaptadas a diferentes condições de clima e solo; pela elevada produção de sementes e facilidade de propagação vegetativa; pelas características silviculturais desejáveis, como rápido crescimento, produtividade e boa forma de fuste; em função do melhoramento genético e ao manejo e pela adequação ao mais diferentes usos industriais com ampla aceitação no mercado (Mora et al., 2000; Silva, 2005)

O sucesso do eucalipto fez com que o Brasil se tornasse a nação mais competitiva para a produção de madeira por meio de florestas plantadas, que já atingem 6,5 milhões de hectares distribuídos em 19 estados da Federação, sendo os principais estados produtores Minas Gerais, São Paulo, Bahia, rio Grande do Sul e Espírito Santo. O agronegócio florestal tem participação equivalente a 4 % do produto interno bruto (ABRAF, 2008).

Em solos arenosos é comum a existência de níveis limitantes de nutrientes, devido ao rápido ressecamento, o que agrava a deficiência de boro e outros nutrientes. Nas árvores novas pode ocorrer rachadura natural da casca desde a base, predispondo-a ao ataque de um complexo de fungos como, por exemplo, *Dothiorella* sp. (Furtado, 2006).

O cancro do eucalipto é uma das doenças mais importantes de ocorrência no campo causado por *Botryosphaeria* sp., cuja fase anamórfica é *Dothiorella* sp., que causa danos severos. Caracteriza-se por lesões necróticas nos tecidos do caule, ao longo do tronco e ramos, manifestando-se inicialmente pelo escurecimento do tecido da casca e do lenho, as folhas perdem a turgescência secando-se posteriormente. Pode haver a formação de um calo cicatricial ou mesmo o anelamento, ou seja, a lesão se desenvolve em toda a circunferência do caule, causando morte da parte aérea da planta, afetando

também os ramos secundários de um plantio de eucalipto, sendo freqüentemente observada a formação de gomose na área lesionada. É comum a ocorrência de quebra de fuste pelo vento na altura da região lesionada.

Uma ampla gama de hospedeiros tem sido associada com infecções de *Botryosphaeria* sp. em espécies de eucalipto, tendo como principais *Corymbia citriodora*, *E. globulus*, *E. grandis* e *E. urophylla*. É uma doença caracterizada pela necrose dos ramos, que evolui da extremidade destes para os pontos de inserção de modo que os tecidos da casca e do limbo tornam-se escuros e secos, as folhas perdem a turgescência e secam (Krugner et al., 1973).

O manejo de perdas associadas a *Botryosphaeria* sp é complicado em função do patógeno se manifestar sob diversas condições de estresse. Existem algumas evidências que mostram que o patógeno infecta folhas saudáveis e tecido de ramos e tronco tornam-se estressados. Existem também boas evidências que sugerem que diferentes clones de eucalipto diferem quanto à suscetibilidade ao patógeno. Portanto, existe uma oportunidade considerável de se selecionar materiais que apresentem alta tolerância ao fungo. Perdas podem ser reduzidas pela detecção precoce da doença em campo e pelo plantio de espécies ou clones tolerantes. Caracteres morfológicos, idade e estado nutricional das plantas, ou fatores do ambiente e práticas culturais podem alterar a suscetibilidade da planta (Krüchner et al., 1995; Bendendo, 1995; Luque et al., 2002; Avena-saccá, 1938; Salzedas et al., 1985; Whiteside et al., 1988; Ferreira, 1989; Sánchez-Hernández et al., 2002). O objetivo deste trabalho foi avaliar fenotipicamente os híbridos de eucalipto quanto ao patógeno *Botryosphaeria* sp.

MATERIAL E MÉTODOS

Material Vegetal

O material genético utilizado no presente estudo é oriundo do programa de melhoramento do Setor Florestal da Empresa Votorantim Celulose e Papel. Estes materiais genéticos são provenientes de

clones de *Eucalyptus grandis*, *Eucalyptus urophylla* e *Eucalyptus camaldulensis*, em que foram oriundos de seleção massal. Foram selecionados 15 clones de eucalipto com idade 14 meses situado no município de Luis Antonio (SP), possuindo um total de 60 árvores para a avaliação.

Tabela 1: Material vegetal utilizado no estudo com os diferentes isolados de *C. cubensis*

Amostras	Material Vegetal
VR1	<i>Eucalyptus grandis</i> x <i>Eucalyptus urophylla</i>
C1	<i>Eucalyptus grandis</i> x <i>Eucalyptus urophylla</i>
P1	<i>Eucalyptus grandis</i> x <i>Eucalyptus urophylla</i>
VR2	<i>Eucalyptus grandis</i> x <i>Eucalyptus urophylla</i>
TC1	<i>Eucalyptus grandis</i> x <i>Eucalyptus urophylla</i>
C2	<i>Eucalyptus grandis</i> x <i>Eucalyptus urophylla</i>
P2	<i>Eucalyptus urophylla</i>
E1	<i>Eucalyptus camaldulensis</i> (Penápolis)
E2	<i>Eucalyptus camaldulensis</i> (IPEF)
C3	<i>Eucalyptus grandis</i> x <i>Eucalyptus urophylla</i>
VR3	<i>Eucalyptus grandis</i> x <i>Eucalyptus urophylla</i>
P3	<i>Eucalyptus grandis</i> x <i>Eucalyptus urophylla</i>
TC2	<i>Eucalyptus grandis</i>
C4	<i>Eucalyptus grandis</i> x <i>Eucalyptus urophylla</i>
TC3	<i>Eucalyptus grandis</i> x <i>Eucalyptus urophylla</i>

Após identificar os genótipos contratantes desses parentais foram selecionadas progênies da empresa. Para a fazenda situada no município de Luis Antonio (SP) foram selecionados 96 indivíduos

com o cruzamento C1 x VR1 que estavam dispostos em campo para a inoculação de *Botryosphaeria* sp.

Obtenção do inóculo

O isolado de *Botryosphaeria* sp. proveniente de Botucatu foi obtido a partir de plantas de *Eucalyptus* sp naturalmente infectadas em campo. Pequenos pedaços do tecido lesionado foram cortados, submetidos a uma assepsia com álcool 70 % (1minuto), hipoclorito 2 % (30 segundos) e lavados com água destilada autoclavada. Atualmente o isolado de *Botryosphaeria* sp. pertence à micoteca do Departamento de Produção Vegetal da Faculdade de Ciências Agronômicas – Campus de Botucatu – São Paulo.

A partir deste isolado, foi obtida cultura pura do fungo, em placas de petri de 9cm de diâmetro, contendo o meio BDA (39g de extrato comercial de batata-dextrose-ágar para 1L de água destilada), incubadas a 25-28 °C por 7-10 dias com um fotoperíodo alternado de 12 h para as inoculações nas mudas de *Eucalyptus*. Os isolados foram identificados e realizados reinoculações periódicas a fim de manter a patogenicidade.

Inoculação do material vegetal

A metodologia utilizada neste estudo consistiu em colocar discos de 0,5cm de diâmetro contendo meio de cultura e inóculo em contato interno com os tecidos da planta após ferimento, com o auxílio de um vazador cilíndrico de metal, de 0,7cm de diâmetro, retirando-se discos de casca e expondo o lenho. Em cada ferimento aberto, foi então colocado um disco do inóculo, com a face contendo o micélio voltado para o lenho. Os discos possuíam o tamanho de 5 mm de diâmetro contendo o meio (BDA) com o inóculo retirado das colônias de isolado de *Botryosphaeria* sp., com idade de 7 a 10 dias de incubação. O disco de casca em seguida foi recolocado no lugar, sendo pressionado contra o inóculo. Os locais inoculados foram cobertos com algodão umedecidos com água destilada e envoltos com fita adesiva de 5 cm de largura, para proteção contra dessecação. A proteção

com as fitas foram mantidas até a leitura dos resultados, durante um período que variou de 30 a 60 dias. Plantas testemunhas foram inoculadas somente com meio BDA.

Para a avaliação dos indivíduos, fez-se o uso de um canivete cortando-se e removendo-se a casca para expor a lesão e medir a área lesionada. A avaliação da doença foi efetuada aos 30 e 60 dias após a inoculação, onde a área da lesão provocada pelo patógeno foi transferida em um desenho para um papel contacto transparente, circundando a lesão da casca com o auxílio de caneta pincel. A área da lesão foi obtida utilizando uma mesa digitalizadora.

Análise estatística

Para obter uma melhor análise dos clones foi realizada a distribuição de frequência das progênes das fazendas em estudo onde foram analisados em função do tamanho da área de lesão do tronco produzida por *Botryosphaeria* sp. Os resultados obtidos foram divididos em classes e com uma amplitude variável com diferentes níveis de resistência como R (resistente), MR (moderadamente resistente), MS (moderadamente suscetível), e S (suscetível).

- ✓ A amplitude total da variação (At) foi calculada entre as diferenças da menor a maior variável;
- ✓ Foi utilizada a regra de Sturges para a determinação do número de classes:

$$K = 1 + 3,3 \log N$$

Onde: K: número de classes

N: número total de observações

- ✓ A amplitude do intervalo de classe (h): foi obtida dividindo a amplitude total da variação pelo número de classes.
- ✓ As frequências das classes correspondem ao número de observações realizadas no experimento que caem entre os limites de classe.

Análise genética

Nos testes de progênies foram mensuradas as áreas da lesão (cm) causada por *Botryosphaeria* sp. utilizando os seguintes parâmetros da variância genética. A definição e expressão do coeficiente de variação genética pode ser expressa como:

$$\sigma^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}$$

- n: número de indivíduos observados
- $\bar{x}$: média da amostra
- x_i : valor individual

Esse valor nos dá a idéia de quanta variação existe em nossa amostra. Este método é restrito aos casos onde podemos conseguir indivíduos geneticamente idênticos. Isso nem sempre é possível. Na maioria dos estudos em genética quantitativa os valores de fenótipo, genótipo e ambiente não são utilizados diretamente, mas sim suas variâncias, ou seja:

$$\sigma_F^2 = \sigma_G^2 + \sigma_E^2$$

Onde:

- σ_F^2 é a variância fenotípica (ou total, aquela que pode ser medida)
- σ_G^2 é a variância genotípica

- σ^2_E é a variância ambiental

Coefficiente de variação: Expressa a variabilidade genética existente no indivíduo analisado

$$CV = \frac{\sigma^2_F}{\bar{X}}$$

- σ^2_F é a variância fenotípica
- $\bar{X}$: media da população das progênes de cada fazenda;

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Avaliação da resistência dos clones candidatos a parentais

A quantidade das doenças em plantios de eucalipto, embora variável em função do material genético (espécies, procedências, progênes e clones), da qualidade do sitio, da idade da planta e das condições climáticas da época do ano, deve estar ligada a um importante fator, que é a adaptação genética do patógeno ao material plantado, com aumento gradativo do inóculo na região. Dentro deste contexto, as medidas de controle químico tornam-se economicamente inviáveis, sendo os caminhos mais promissores a seleção genética de materiais resistentes e a melhoria do estado nutricional das árvores (Silveira, et al. 2003).

Os parentais foram escolhidas de forma a manter uma ampla base genética em relação a outras características, no caso resistência do cancro causado por *Botryosphaeria* sp., incidindo sobre os indivíduos não doentes, dotados de características silviculturais.

A avaliação do material vegetal foi observada trinta e sessenta dias após a inoculação, sendo que o desenvolvimento das lesões necróticas ocorreu a partir do ponto de inoculação.

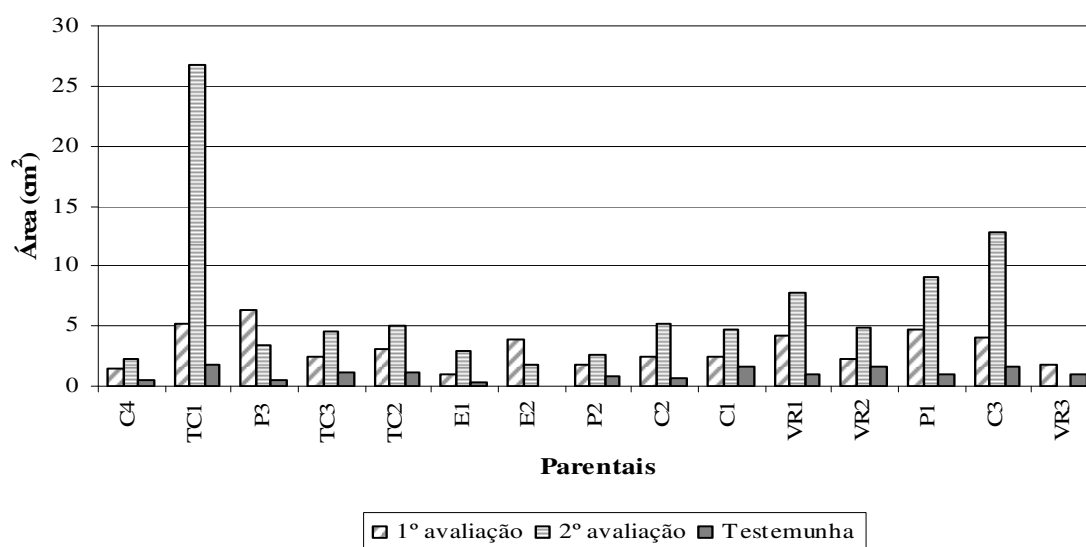


Figura 1: Área da lesão do tronco aos 30 e 60 dias nos diferentes clones após a inoculação com *Botryosphaeria* sp. proveniente de Botucatu –SP.

Para a primeira avaliação aos trinta dias após a inoculação com o patógeno *Botryosphaeria* sp. foi observada uma área de lesão média que variou de 0,677 cm² a 6,611cm². A menor lesão foi encontrada para o E1 enquanto a maior área da lesão foi observada no clone P3, seguido de TC1 e P1.

Na segunda avaliação, sessenta dias após a inoculação foi observada uma media da lesão variando de 0,243 a 26,8 cm². A menor média foi encontrada em E2, seguido do clone C4, enquanto a maior é representada pelo clone TC1 e C3. Esses indivíduos que diferiram quanto ao tamanho da lesão, conseqüentemente diferiram na sua resistência quando comparados com o grau de patogenicidade do isolado.

Tabela 2: Distribuição de frequência dos intervalos de classe da área do tamanho da lesão do tronco nos clones de *Eucalyptus* spp. inoculados com *Botryosphaeria* sp.

nº de classes	Intervalo	Observações
1	0 - 3,833	43
2	3,833 - 7,666	12
3	7,666 - 11,499	3
4	11,499 - 15,332	1
5	15,332 - 19,165	0
6	19,165 - 22,998	0
7	22,998 - 26,831	1

A distribuição da frequência dos clones mostra que a classe de tamanho mais freqüente foram as classes 1 a 3 consideradas resistentes e moderadamente resistentes. Foram encontrados 91,67 % de plantas classificadas como resistentes; 5 % plantas moderadamente resistente, 1,67 % planta moderadamente suscetíveis e 1,67 % plantas suscetíveis. Souza et al. (2008) estudando 10 clones de eucalipto inoculados com *Dothiorella* sp verificaram que 68,42 % eram resistentes, 26,32 % eram moderadamente resistentes, e 5,26 % suscetíveis.

O intervalo de classes variou entre os indivíduos em resistentes (0 – 7,666 cm²), moderadamente resistentes (7,666 - 11,499 cm²), moderadamente suscetíveis (11,499 – 15,332 cm²) e suscetíveis (15,332 – 26,831 cm²). Este valor foi superior ao encontrado por Souza et al. (2007) que observaram o comportamento de clones e foram agrupados em resistentes (0 – 4,088 cm²), moderadamente resistente (4,088 – 6,132 cm²), moderadamente suscetível (6,132 – 8,176 cm²) e suscetível (8,176 – 14,308 cm²).

A menor lesão do tronco nos clones foi no intervalo de classe de 0 a 3,833 sendo encontrado a maioria dos indivíduos. Os clones pertencentes a esta classe são representados por C4, VR3, P2, E1, VR2, C1, C2, TC2, TC3, P3 e E2. Esses clones mostraram um grau elevado de resistência à doença, podendo responder diferentemente a infecção causada por *Botryosphaeria* sp. Muitos destes clones exibiram nível de resistência devido ao aparecimento de um tecido caloso que se desenvolvia a partir da região cambial e recobriu em intensidade variável a superfície do lenho exposta no ferimento de inoculação.

Os indivíduos considerados moderadamente resistentes foram representados pelos clones VR1 e P1, possuindo uma lesão superficial e apresentaram o tamanho das lesões menores do que as apresentadas pelos indivíduos suscetíveis e moderadamente suscetíveis.



Figura 2: Desenvolvimento de calo nas plantas de eucalipto inoculado por *Botryosphaeria* sp.

A maior área da lesão do tronco foi representado pelo clone TC1 sendo considerado suscetível quanto ao patógeno *Botryosphaeria* sp. O clone C3 possui uma capacidade menor de fechar a ferida quando inoculado artificialmente pelo patógeno, sendo considerado moderadamente suscetível e representado pela classe 4.

As alternativas para selecionar indivíduos resistentes a doença, tal como a inoculação em plantas jovens como as experimentações em casa de vegetação renderam resultados valiosos e similares às experimentações de campo (Conradie et al. 1992). Futuramente pode ser possível incluir a capacidade de recuperação dos ferimentos como um critério de seleção para os programas de melhoramento.

3.4. Avaliação das progênies

A distribuição de frequências de lesões nas progênies baseada no comprimento médio da lesão (cm²) causado por *Botryosphaeria* sp. em híbridos obtidos do cruzamento entre VR1 e C1 revelou a resposta dos considerados resistentes e moderadamente resistentes ao patógeno em estudo. A Figura 3 mostra a distribuição dos resultados das inoculações dos parentais e dos 96 híbridos aos sessenta dias após a inoculação.

No gráfico constata-se que a média das lesões dos híbridos ficaram entre 7,29 e 9,72 cm² de área da lesão. Os parentais VR1 e C1 apresentaram médias de 4,927 e 7,806 respectivamente. A distribuição de frequência foi dividida em sete classes cujo intervalo variou conforme os indivíduos responderam a resposta ao patógeno *Botryosphaeria* sp. O maior número de indivíduos foi observado nos níveis de resistência com 46,87 % e moderadamente resistente 43,75 %. Uma grande quantidade de indivíduos resistentes foi verificada em decorrência do cruzamento VR1 e C1.

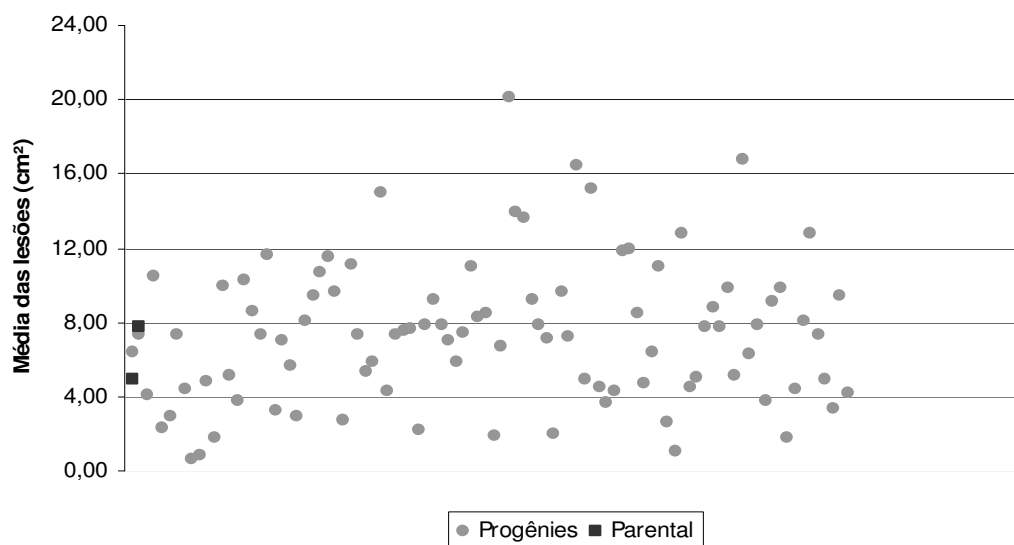


Figura 3: Distribuição das médias de lesões causada por *Botryosphaeria* sp nos parentais e seus híbridos aos sessenta dias após a inoculação.

As plantas, apesar de não possuírem a capacidade de deter de modo definitivo o processo infeccioso, induzem uma reação impedindo que o fungo colonize os tecidos corticais da mesma forma que ocorre nas plantas suscetíveis. Após esta reação, inicia-se a formação de uma nova casca ou periderme. Essa forma de defesa em nível de casca é facilmente perceptível, sendo denominado mecanismo de defesa pela formação de periderme necrofilática (Ferreira, 2002).

Um número muito pequeno de indivíduos moderadamente suscetíveis (4 indivíduos) e suscetíveis (5 indivíduos) também foram observados nas progênie com um intervalo de classe que variou de 12,15 a 14,58 cm² e 14,58 a 20,07 cm², respectivamente. Muitas vezes, verificou-se a presença de goma exsudada das lesões da casca. Abaixo das cascas, na maioria dos casos notou-se a sua regeneração, dando o aspecto de um processo de fechamento das lesões. Fazendo-se uma raspagem superficial, observam-se com frequência os limites da lesão, que se assemelha às feridas provocadas pelo fungo *Botryosphaeria* sp em eucalipto; entretanto, tirando-se completamente a casca nesses

pontos, nota-se apenas uma leve descoloração dos tecidos do lenho, que raramente são atingidos pela lesão.

Observando o cruzamento dos parentais, ou seja, resistente e moderadamente resistente, o cancro causado por *Botryosphaeria* sp possui um caráter de controle genético quantitativo (poligênico). Na realidade, os cruzamentos entre plantas resistentes não originam necessariamente plantas resistentes. A descendência mostrou um comportamento variável ao longo de uma escala de valores que vai da suscetibilidade à resistência. Isso foi devido ao aumento da proporção das plantações de parentais e com isso, com forte estreitamento da base genética.

Avaliação genética dos parentais e progênes

A variância fenotípica dos parentais pode ser observado na Tabela 3. As maiores variâncias encontradas foram para os indivíduos C3, P3 e TC1 com valores de 26,52; 19,05 e 156,88, enquanto a menor variação encontrada foram para os parentais VR3, P2 e C4 com valores de 0,637, 0,723 e 0,285, respectivamente.

O coeficiente de variação (CV) é outra análise usualmente utilizada para comparar a variabilidade genética expressa para cada caráter avaliado, conforme destacado por Resende (2002). O maior coeficiente de variação para a área da lesão foi de 101,13 % para o parental TC1, indicando que a planta apresenta uma maior variabilidade quanto ao tamanho da lesão, enquanto o menor valor observado foi no indivíduo TC2 com 28,67 %. Esses coeficientes de variação segundo Pimentel-Gomes (1985) são considerados altos a muitos altos quando superiores a 20 e 30 % respectivamente.



Figura 4: Variações no tamanho das lesões de *Botryosphaeria* sp. observadas em trocos de híbridos de eucalipto. **A, C, D:** Desenvolvimento da lesão; **B:** Desenvolvimento de calos.

Tabela 3: Parâmetros estatísticos avaliados nas progênies para as diferentes parentais.

Parentais	$\bar{X}$	σ^2_F	CV (%)
C4	1,788	0,285	29,86
TC1	12,385	156,88	101,13
P3	5,295	19,05	82,43
TC3	3,122	1,66	41,26
TC2	3,756	1,16	28,67
E1	1,590	1,32	71,98
E2	3,225	1,66	39,95
P2	2,021	0,723	42,07
C2	3,368	7,43	80,93
C1	3,160	1,91	43,72
VR1	5,403	5,69	44,15
VR2	3,166	2,71	52,0
P1	6,182	9,74	50,48
C3	6,963	26,52	73,96
VR3	1,422	0,64	56,13

$\bar{X}$: média da população; σ^2_F : variância fenotípica; CV: Coeficiente de variação;

Os indivíduos representados por C4, VR3, P2, E1, VR2, C1, C2, TC2, TC3, P3 e E2 que pertencem à classe dos indivíduos resistentes podem responder diferentemente à infecção causada por *Botryosphaeria* sp. para o coeficiente de variação. Isto significa que a variação quanto ao tamanho da lesão foi muito diferente, o que eleva o coeficiente de variação (Figura 5).

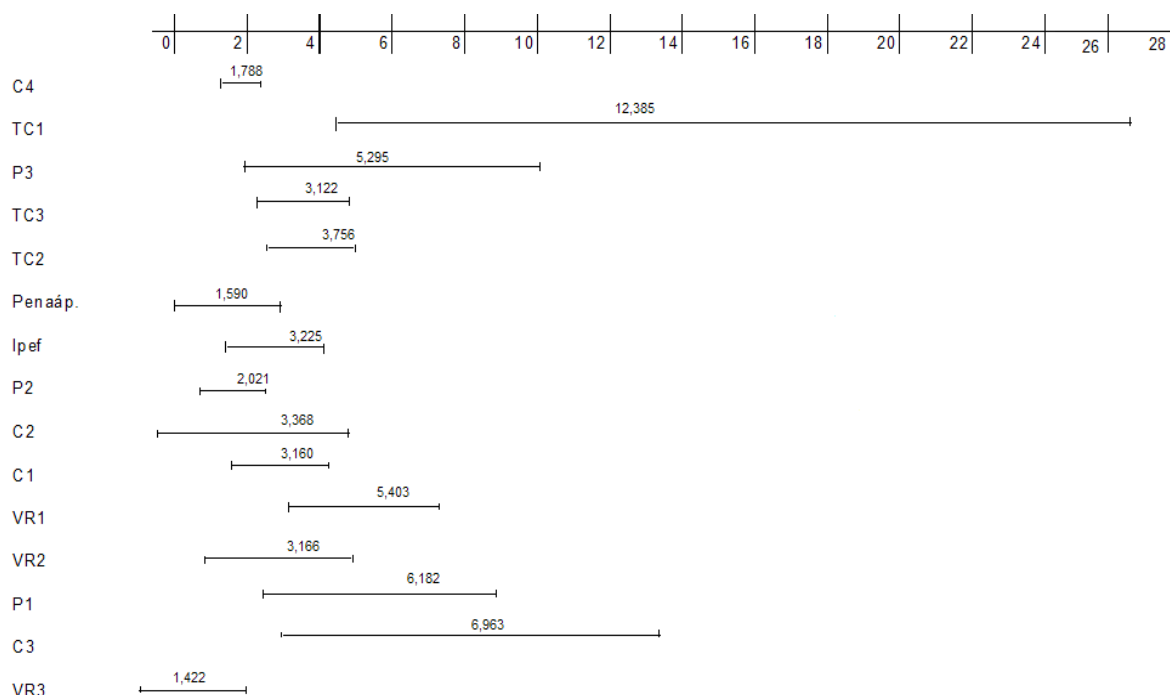


Figura 5: Representação gráfica da variância com o menor, maior valor e a média da área da lesão dos parentais ao patógeno *Botryosphaeria* sp.

Ao selecionar indivíduos que apresentam a característica resistência ao cancro do eucalipto, usando a variação fenotípica, os indivíduos podem compor uma nova população que será propagada vegetativamente, transmitindo uma proporção elevada de sua superioridade genética para o caráter em questão. Essa seleção de genótipos superiores pode ser utilizada como uma ferramenta para a quantificação do potencial de melhoramento de uma população. O coeficiente de variação observado nos teste de progênie cujos parentais são C1 X VR1 foi de 51,18 %, enquanto os seus parentais possuem uma variação de 43,72 % e 44,15 % respectivamente.

O melhoramento genético de espécies arbóreas florestais é uma atividade de médio-longo prazo e está associado à capacidade de acerto na escolha dos melhores indivíduos que serão os genitores das próximas gerações (Cruz et al., 2003), com uma ampla base genética de plantas

resistentes. É por estes e outros motivos que na área florestal, o melhoramento genético com vista à resistência ao cancro do eucalipto encontra justificativa apenas para espécies de elevados valores silviculturais, ecológicos e tecnológicos.

AGRADECIMENTOS

Os autores expressam seus agradecimentos a empresa Votorantim Celulose e Papel pelas facilidades para a experimentação e a FAPESP pelo apoio financeiro.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAF – Associação Brasileira de produtores de Florestas Plantadas – Anuário estatístico da ABRAF 2008 – disponível em <http://www.abraflor.org.br/estatistica.asp>. Acesso em 19 de agosto de 2008.

AVENA-SACCÁ, R. Contribuição para o estudo das doenças criptogâmicas das plantas cítricas: uma gomose produzida por *Dothiorella*. **Revista de Agricultura**, v. 13, p.107-126, 1938.

BENDENDO, I.P. Ambiente e doença. In: BERGAMIN, F.A. et al. **Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos** 3ed. São Paulo: Ceres, 1995, v1.

CONRADIE, E., SWART, W. J., AND WINGFIELD, M. J. 1992. Susceptibility of *Eucalyptus grandis* to *Cryphonectria cubensis*. **Eur. J. For. Pathol.** 22:312-315.

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

FERREIRA, F.A.; MILANI, D. Diagnose visual e controle das doenças abióticas e bióticas do eucalipto no Brasil. – Mogi Guaçu, SP: **International Paper**, 2002. 98p.

FURTADO, E.L. Material didático. Disponível em: www.fca.unesp.br/intranet/furtado.pdf. Acesso em 20 de outubro de 2006.

KRUGNER, T.L. ET AL. Seca de ramos em plantas enxertadas de eucaliptos no Estado do espírito santo. Circular técnico **IPEF n.6, p.69-75, 1973**

KRUGNER, T.L.; BACCHI, L.M.A. Fungos. In: BERGAMIN, F.A. et al. **Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos** 3ed. São Paulo: Ceres, 1995, v1.

LUQUE, J. et al. Seasonal changes in susceptibility of *Quercus suber* to *Botryosphaeria stevensii* and *Phytophthora cinnamomi*. **Plant Pathology**, v.51, p.338-345, 2002.

MORA, A.L.; GARCIA, C.H. A cultura do eucalipto no Brasil. São Paulo: **Sociedade Brasileira de Silvicultura**, 2000, 112p.

RESENDE, M.D.V. de. **Genética biométrica e estatística no melhoramento de plantas perenes**. Brasília: Embrapa, 2002. 975p

SALZEDAS, L.F.; NETO, S.M.R. Ocorrência do cancro da goiabeira *Botryosphaeria dothidea* na região de Araçatuba, Estado de São Paulo. **O Biológico**, v.51, n.11, p.295-297, 1985.

SANCHES-HERNANDEZ, M.E. Botryosphaeria canker of *Cistus ladanifer*. **Plant Pathology** v.51, p.365-373, 2002.

SILVA, J.C. Cresce presença do eucalipto no Brasil. **Revista da Madeira**, Curitiba, n.92, p.61-66, 2005.

SILVEIRA, R.L.V.A.; HIGASHI, E.N. Aspectos nutricionais envolvidos na ocorrência de doenças com ênfase para o eucalipto. **Circular Técnica, IPEF**. n.200, p.01-13, 2003.

SOUZA, H.G.; DORIA, K.M.A.B.V.S. et al Avaliação da resistência de eucalipto ao *Chrysosporthe cubensis* e *Dothiorella* sp. **In:** XL Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 2007, Maringá, Anais do Congresso Brasileiro de Fitopatologia. Sociedade Fitopatológica do Brasil, 2007.

SOUZA, H.G.; DORIA, K.M.A.B.V.S. et al Comportamento de clones de *Eucalyptus* sp. à *Chrysosporthe cubensis* e *Dothiorella* sp. **In:** XLI Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 2008, Belo Horizonte, Anais do Congresso Brasileiro de Fitopatologia. Sociedade Fitopatológica do Brasil, 2008.

WHITESIDE, J.O. et al. Compendium of citrus disease. **Florida: APS**, 1988, 80p.

CAPÍTULO 3:
SELEÇÃO DE CLONES DE EUCALIPTO CONTRA O CANCRO DE *Chrysoporthe cubensis* e
***Botryosphaeria* sp.**

SELEÇÃO DE CLONES DE EUCALIPTO CONTRA O CANCRO DE *Chrysosporthe cubensis* e *Botryosphaeria* sp.

Helenize Gabriela de Souza ^{1 2 *}

Daniel Dias Rosa¹

Edson Luis Furtado¹

¹ Faculdade de Ciências Agronômicas, UNESP, Departamento de Produção Vegetal, Setor de Defesa Fitossanitária, CP 237, 18603-970, Botucatu , SP.

² Bolsista FAPESP

*E-mail: helegabis@gmail.com

RESUMO

A seleção de clones de eucalipto resistentes à doença tem auxiliado na redução das perdas nas plantações causadas por *Chrysosporthe cubensis* e *Botryosphaeria* sp. O uso de marcadores moleculares têm sido utilizado direta e indiretamente em programas de melhoramento de plantas permitindo o monitoramento da seleção de genes que controlam características de importância de florestal como a resistência ao cancro do eucalipto. O objetivo deste trabalho foi selecionar clones resistentes ao cancro de *Chrysosporthe cubensis* e *Botryosphaeria* sp. e primers do tipo RAPD para o caráter ligado ao gene de resistência, visando o melhoramento assistido. Dos indivíduos contrastantes constituíram que os bulks de resistência e suscetibilidade ao cancro foram extraídos DNA e realizada a sua amplificação com 410 primers do tipo RAPD para as diferentes fazendas. Para o isolado *Chrysosporthe cubensis* os parentais da fazenda Baronesa são constituídos do cruzamento de indivíduos moderadamente resistentes e moderadamente suscetíveis, enquanto para a São Joaquim possui o cruzamento de plantas resistentes e moderadamente suscetíveis. No caso do isolado *Botryosphaeria* sp. os parentais são resistentes e moderadamente resistentes quanto ao cancro. Foram selecionadas as progênies de cada cruzamento compondo os bulks resistentes e suscetíveis para cada fazenda. O número de bandas

monomórficas gerado foi elevado para três fazendas com valores de 97,3 %, 94,8 % e 87 % para a Fazenda Baronesa, Fazenda São Joaquim e para o viveiro de pesquisa, respectivamente. Cinco primers apresentaram polimorfismo entre os dois bulks das fazendas. Não foi possível avaliar a co-segregação dos marcadores nas progênies das Fazendas São Joaquim, Baronesa e no viveiro de pesquisa da empresa devido aos progenitores serem poucos contrastantes quanto à característica fenotípica observada.

Palavras Chave: Marcadores moleculares, RAPD, cancro do eucalipto, bulks

ABSTRACT

The selection of clonal of eucalyptus resistant to the illness has assisted in the reduction of losses in plantations caused by *Chrysoporthe cubensis* and *Botryosphaeria* sp. Molecular markers had been used directly and indirectly in programs of improvement of plants allowing the monitoramento of the selection of genes that control characteristics of forest importance as the resistance to the eucalipto canker. The objective of this work was to select resistant clonal to the canker of *Chrysoporthe cubensis* and *Botryosphaeria* sp. and primers type RAPD for the character related to the resistance gene, aiming the assisted improvement. From the contrastantes individuals that constituted the bulks of resistance and susceptibility to the canker it was extracted DNA and ti was made the amplification with 410 primers type RAPD for the different farms. For the isolated *Chrysoporthe cubensis* the parental from the Baronesa farm are constituted of the crossing of moderately resistant individuals and moderately susceptible, while the São Joaquin farm possesses the crossing of resistant and moderately susceptible plants. In the case of the isolated *Botryosphaeria* sp. the parental ones are resistant and moderately resistant concerning the canker. The lineages of each crossing were selected constituting of resistant and susceptible bulks for each farm. The number of monomorphic bands achieved was high for the three farms with values of 97,3%, 94.8% and 87% for the Baronesa Farm, São Joaquin Farm and for

the research shade respectively. Five primers presented polymorphism in to bulks from the farms enters the two. It was not possible to evaluate the co-segregation of the markers in the lineages of the São Joaquin and Baronesa Farms, and in the shade of research of the company due to the fact that the ancestors were a little contrasting concerning the observed phenotypic characteristic.

Keywords: Molecular markers, RAPD, eucalipto canker, bulks

INTRODUÇÃO

O cancro do eucalipto causado por *Chrysosporthe cubensis* e *Botryosphaeria* sp. é considerada importante doença nesta cultura por causar prejuízos, tanto na qualidade como na quantidade da madeira, reduzindo o crescimento da planta. O uso da madeira também tem o valor prejudicado para o uso em serraria e na redução de celulose.

A resistência genética é a melhor estratégia de controle e o conhecimento dos genes de resistência é fundamental para uma maior proteção efetiva contra o fungo. A vulnerabilidade da resistência específica, pela rápida adaptabilidade do patógeno, é a principal desvantagem.

Para isto a seleção de clones de eucalipto resistentes à doença tem auxiliado na redução das perdas nas plantações causadas por *C. cubensis* e *Botryosphaeria* sp. As plantações monoclonais são atrativas para companhias florestais devido à uniformidade dos clones selecionados e a maior produtividade em períodos de tempo pequenos. Essa uniformidade genética e a combinação favorável de condições ambientais dessas plantações podem levar à grandes perdas se os clones plantados forem suscetíveis aos patógenos *C. cubensis* e *Botryosphaeria* sp. (Van HEERDEN et al., 2002).

Diante disto, a busca pelo aumento da produtividade e redução do custo de produção nestes casos, tem levado a programas de melhoramento destinados à seleção de genótipos mais adaptados objetivando a obtenção de materiais resistentes ao cancro. O desenvolvimento de metodologias que possam auxiliar estes programas de melhoramento se torna extremamente útil abrindo novas

perspectivas no melhoramento florestal. A utilização de técnicas de biologia molecular permite a otimização do tempo e o direcionamento destes programas (Brondani *et al.*, 1998).

Os usos de marcadores moleculares têm sido utilizados direta e indiretamente em programas de melhoramento de plantas permitindo o monitoramento da seleção de genes que controlam características de importância agrícola ou florestal, e identificando corretamente os clones e planejando cruzamentos (Vaillancourt *et al.* 1998). Os marcadores do tipo RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) utilizam primers randômicos oligonucleotídios, garantindo uma boa amostragem do indivíduo, tanto para regiões codificadoras como para regiões repetitivas.

Uma técnica que pode auxiliar os programas de melhoramento com a busca de materiais resistentes ao cancro é a utilização do método BSA (Bulked Segregant Analysis) (Michelmore *et al.*, 1991), que consiste na comparação de DNA contrastantes com base na expressão fenotípica de um caráter ou gene de interesse, como a resistência ou a suscetibilidade a uma determinada doença. Esta técnica é muito útil para a identificação de marcadores ligados a qualquer gene específico e em regiões de mapas genéticos ainda não localizados (Ferreira *et al.*, 1998).

O objetivo deste trabalho foi selecionar clones resistentes ao cancro de *Cryphonectria cubensis* e primers do tipo RAPD para o caráter ligado ao gene de resistência, visando o melhoramento assistido.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal

O material utilizado neste estudo pertence ao programa de melhoramento da empresa Votorantim Celulose e Papel proveniente de parentais de *Eucalyptus* sp. Após identificar os genótipos contratantes, indivíduos resistentes e suscetíveis, desses parentais foram selecionadas progênies em diferentes plantações da empresa que constituíram os bulks. Para cada fazenda foram selecionadas

diferentes quantidades de indivíduos que estavam dispostos em campo, onde foram inoculados e observados quanto à resistência. Na fazenda São Joaquim, situado no município de Jacareí –SP, com o cruzamento VR1 x VR2 apresentaram 95 plantas que foram inoculados com *C. cubensis*, enquanto para a fazenda Baronesa o patógeno foi inoculado em 79 plantas em campo cujo cruzamento é C1 x VR2. A inoculação do patógeno *Botryosphaeria* sp. foi realizado no viveiro de pesquisa da empresa, situado em Luis Antonio –SP, com os cruzamentos VR1 x C1, composto por 96 indivíduos.

O isolado de *Botryosphaeria* sp. e *Chrysosporthe cubensis* são provenientes de Botucatu e Bofete respectivamente que foram obtidos a partir de plantas de *Eucalyptus* sp. naturalmente infectadas em campo. A metodologia utilizada neste estudo consistiu em colocar discos de 0,5cm de diâmetro contendo meio de cultura e inóculo em contato interno com os tecidos da planta após ferimento, com o auxílio de um vazador cilíndrico de metal, de 0,7cm de diâmetro, retirando-se discos de casca e expondo o lenho. A avaliação da doença foi efetuada aos 60 dias após a inoculação, onde a área da lesão provocada pelo patógeno foi transferida em um desenho para um papel contacto transparente, circundando a lesão da casca com o auxílio de caneta pincel. A área da lesão foi obtida utilizando uma mesa digitalizadora.

Extração de DNA

As amostras de folhas jovens foram coletadas de todos os indivíduos em estudo, e armazenadas a -20°C até a extração de DNA.

Para a extração do DNA foram utilizados 150 mg de tecido da folha de cada amostra de *Eucalyptus*. Estas amostras foram maceradas em nitrogênio líquido com bastão metálico em tubos de 1,7 mL para romper as paredes celulares, sendo que o material genético e as proteínas serão mantidos íntegros, devido à baixa temperatura. Ao tecido macerado foram adicionados 700 µL de solução de extração CTAB 2 %, homogeneizando e encaminhado ao banho-maria à 65 °C por 30 minutos com agitação constante. Após o banho, o material foi esfriado e realizado a primeira extração, adicionando

600 µL de Clorofórmio - Álcool Isoamílico (24:1) e agitando o material por inversão. Os tubos foram centrifugados por aproximadamente 12000 rpm de 5 a 10 minutos. O sobrenadante foi removido para outro tubo com os cuidados necessários para evitar contaminação entre as fases. A essa solução foi adicionado aproximadamente 400 µL de álcool isopropílico para promover a precipitação do DNA. Os tubos permaneceram cerca de 1 hora à -20°C e em seguida foram centrifugados nas condições anteriores para a formação do pellet.

O pellet foi lavado duas vezes com 1000 µL de etanol 70 % e centrifugado por 13000 rpm durante 5 minutos, retirando o sobrenadante. Após a centrifugação foi realizada uma nova lavagem com etanol 100 % e centrifugado nas mesmas condições anteriores. A secagem do pellet foi realizada em temperatura ambiente por 30 minutos. Logo após o pellet foi ressuscitado em 50 µL de tampão Tris-EDTA pH 8,0 (TE) com 10 µg/mL de RNase e a solução foi incubada para 37°C para inativação da enzima RNase até a completa dissolução do pellet.

Quantificação do material vegetal

Para a quantificação do DNA foi realizada uma eletroforese em gel de agarose (0,8 %), sendo aplicados no gel 3 µL da amostra de DNA e 5 µL de tampão de carregamento (TE acrescido de 0,25 % de azul de bromofenol e 40 % de sacarose). Como padrão foi utilizado 1 µL do marcador molecular DNA padrão – Invitrogen (50 ng).

A corrida foi conduzida em solução tampão Tris-borato TBE 1x, pH 8,0. A voltagem utilizada foi de 80 volts e 100 mA por 40 minutos. A visualização do gel foi feita a partir da incidência de luz ultravioleta e os sinais foram capturados pelo programa computacional “EagleSight” v. 3.2 (Stratagene).

Após a quantificação do DNA extraído foi possível preparar uma solução de trabalho em água miliQ autoclavada, diluindo o DNA mãe para uma concentração de 3 ng/µL permitindo a

homogeneização da quantidade de DNA das amostras e prevendo a degradação do DNA após congelamentos e descongelamentos.



Figura 1: Gel de quantificação do DNA genômico. No primeiro poço encontra-se o marcador a 50 ng e nos demais os indivíduos da Fazenda Baronesa e São Joaquim.

Composição do bulk e análise do marcador

Para a análise por BSA foram selecionados indivíduos que são contrastantes com base na expressão fenotípica de um caráter que no caso é a resistência ao cancro do eucalipto causado por *C. cubensis* e *Botryosphaeria* sp. Quantidades equimolares desses indivíduos foram utilizadas para a preparação dos respectivos bulks para cada fazenda estudada.

Na fazenda São Joaquim os seus parentais VR1 e VR2 foram considerados resistentes e moderadamente suscetível para o patógeno *C. cubensis* enquanto para a fazenda Baronesa os indivíduos contrastantes ao cruzamento da população segregantes foram considerados moderadamente resistente com o parental C1 e moderadamente suscetível (VR2) para o mesmo patógeno. Para o patógeno *Botryosphaeria* sp. os indivíduos contrastantes foram compostos por C1 (resistente) e por VR1 considerado moderadamente resistente.

A reação de amplificação RAPD tinha volume final de 13 μ L, com uma quantidade de 15 ng de DNA, 1,30 μ L de PCR Buffer 10X, 1 mM de $MgCl_2$, 1,04 μ L de BSA a 10 mg/mL (Bovine Serine Albumin – Invitrogen), 0,25 mM de cada dNTP, 0,3 μ M de “primer” e 1U de Taq DNA Polimerase (Invitrogen Brasil). As reações eram cobertas com óleo mineral para evitar evaporação e levadas a um termociclador PTC-100 (MJ Research). O programa de amplificação consistiu de uma desnaturação inicial de 3 min a 94 °C, e 41 ciclos de 1 min a 92 °C; 1 min a 35 °C e 2 min a 72 °C. As amostras

foram submetidas a uma extensão final de 5 min a 72 °C e mantidas a 4 °C até sua retirada do termociclador.

Os fragmentos da amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,5%, usando como tampão TBE 1X, corado com brometo de etídio. A visualização do gel foi realizada sobre um transiluminador de luz U.V., no sistema de fotodocumentação digital Eagle Eye II (Stratagene).

As análises de Segregantes em Bulk (“Bulk Segregant Analysis”, Michelmore et al., 1991) foram usadas para identificar marcadores moleculares associados à resistência de plantas aos patógenos *C. cubensis* e *Botryosphaeria* sp. Este procedimento consistiu em detectar diferenças entre duas amostras agrupadas de DNA obtidas de uma população segregante. Estas amostras foram constituídas ao se misturar quantidades iguais de DNA de indivíduos selecionados com base na expressão fenotípica de um caráter que no caso é a resistência ao cancro por *C. cubensis* e *Botryosphaeria* sp. para se ter um genótipo idêntico em uma região de interesse e genótipos aos acaso em regiões não ligadas a região alvo.

A fazenda Baronesa foi constituída por parentais moderadamente resistentes e moderadamente suscetíveis, e suas progênies constituíram os bulks com 10 indivíduos para a resistência e 9 indivíduos para a suscetibilidade. Analogamente ocorreu para a Fazenda São Joaquim onde DNA de parentais resistentes e moderadamente suscetíveis foram extraídos. Para a formação do bulk foram extraídos DNA das progênies compondo 12 plantas para o bulk resistente e 9 plantas para o suscetível. No caso dos bulks relacionado ao *Botryosphaeria* sp. foram utilizados parentais resistentes e moderadamente resistentes compondo 10 indivíduos da suas progênies com DNA resistente e suscetíveis.

Tabela 1: Indivíduos componentes dos bulks resistentes (BR) e bulks suscetíveis (BS) para a Fazenda São Joaquim, Baronesa e Viveiro de Pesquisa.

Fazendas	BR	BS
São Joaquim	8, 17, 18, 38, 51, 58, 60, 61, 68, 76, 80, 84	1, 6, 26, 36, 37, 40, 44, 47, 49
Baronesa	4, 6, 12, 17, 20, 22, 26, 29, 36, 38	27, 28, 30, 43, 44, 49, 50, 62, 64
Viveiro pesquisa	3, 6, 12, 50, 58, 67, 75, 33, 90, 96	21, 15, 35, 52, 62, 64, 84

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Composição dos bulks e análise do marcador

Na composição do “bulk” de DNA para a Fazenda Baronesa, de plantas resistentes, utilizaram-se apenas plantas com intervalo de classe de 2,08 a 4,16 enquanto que no bulk de DNA de indivíduos suscetíveis foram empregados plantas com intervalo de classe de maiores que 8,32 para o tamanho da lesão para o patógeno *C. cubensis*.

A seleção fenotípica vem sendo aplicada há muito tempo, apresentando resultados bastante significativos. No entanto, nas avaliações fenotípicas, principalmente para caracteres de baixa herdabilidade, são necessárias técnicas aprimoradas de experimentação, para que se tenha uma boa aproximação entre o fenótipo e o genótipo dos indivíduos. Além disso, a interação genótipo x ambiente existente para os caracteres de baixa herdabilidade pode dificultar os processos de seleção. Para aqueles caracteres em que a avaliação fenotípica apresenta elevado custo, ou exige ambientes específicos como a inoculação de patógenos, a técnica de BSA apresenta a vantagem de agrupar indivíduos contrastantes para o fenótipo de interesse.

Os bulks de DNA foram amplificados pela técnica de RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) (Williams *et al.*, 1990), com 410 *primers* da "Operon Technologies" Kits OPA-01 a OPZ-20.

Em algumas espécies vegetais, a BSA requer uma grande quantidade de “primers” RAPD, e de progênes F2 ou F3 para a avaliação de seus resultados. Yang *et al.* (2004) utilizaram 820 marcadores e progênes F1 e F2 para o mapeamento de um gene de resistência em milho; em cevada, foram necessários 186 “primers” e a análise de 140 linhagens para a identificação de genes de resistência por BSA (Kutcher *et al.*, 1996).

Os primers polimórficos potencialmente associados ao cancro do eucalipto foram identificados. Entre os primers avaliados 10,98 % não apresentou produtos de amplificação para os clones da Fazenda Baronesa e para a Fazenda São Joaquim foi obtido um valor de 11,95 % enquanto que para o viveiro de pesquisa encontrou-se um valor de 13,32 %. O número de bandas monomórficas gerado foi elevado com valores de 97,3 %, 94,8 % e 87 % para a Fazenda Baronesa, Fazenda São Joaquim e para o viveiro de pesquisa, respectivamente. Resultados das análises de RAPD têm revelado elevado nível de polimorfismo e baixa repetibilidade dos resultados (Hosokawa *et al.*, 2000). A técnica RAPD, no entanto, apresenta uma série de vantagens em relação aos demais métodos, que torna o seu uso bastante viável e popular. Dentre essas vantagens estão a rapidez, o baixo custo e a necessidade de pouco material. McKay *et al.* (2002) sugerem que marcadores moleculares e caracteres fenotípicos comportam-se de maneira diferente na divergência adaptativa das populações e, por isso, não se deve extrapolar as conclusões de um para outro.

Dos 410 primers testados, 5 deles apresentaram polimorfismo sendo X02, Y18, J10, W04 e X01, entre os dois bulks de todas as fazendas. Porém, estes primers que apresentaram polimorfismo à resistência ao cancro, não auxiliaram avaliar a segregação destes marcadores quando avaliados nas progênes. Isto se deve ao tipo de técnica utilizado.

A técnica de BSA associado ao RAPD foi usada para vários trabalhos para selecionar genes que estão ligados a característica de interesse.

De acordo com Yang (1994), no caso de macieiras a resistência ao fungo *Venturia inaequalis* é regulado pelo gene de Vf. O DNA de cinco indivíduos resistentes e de dez variedades suscetíveis

foram usados e os marcadores obtidos foram usados na seleção em um programa do gene de resistência. Tartarini (1995) relatou existência de oito genes na macieira a resistência do controle aos *Venturia inaequalis*. Em *Populus deltóides*, Tabor et al. (2000) utilizou a técnica BSA para estudar a resistência da ferrugem da folha causada por *Melampsora medusae* e encontrou uma distancia genética estimada em 2,6 e 7.4 cM para o locus resistente.

Em espécies de *Eucalyptus* sp. Junghans (2003) mapeou seis marcadores em acoplamento com o gene Ppr1, perfazendo uma janela genética de 11,2 cM. O marcador AT9/917 foi constatado apenas nas plantas resistentes a ferrugem. Zamprognio (2005) observou o marcador AK01 manteve-se presente na população segregante de indivíduos resistentes a ferrugem com uma distancia genética de 20 cM.

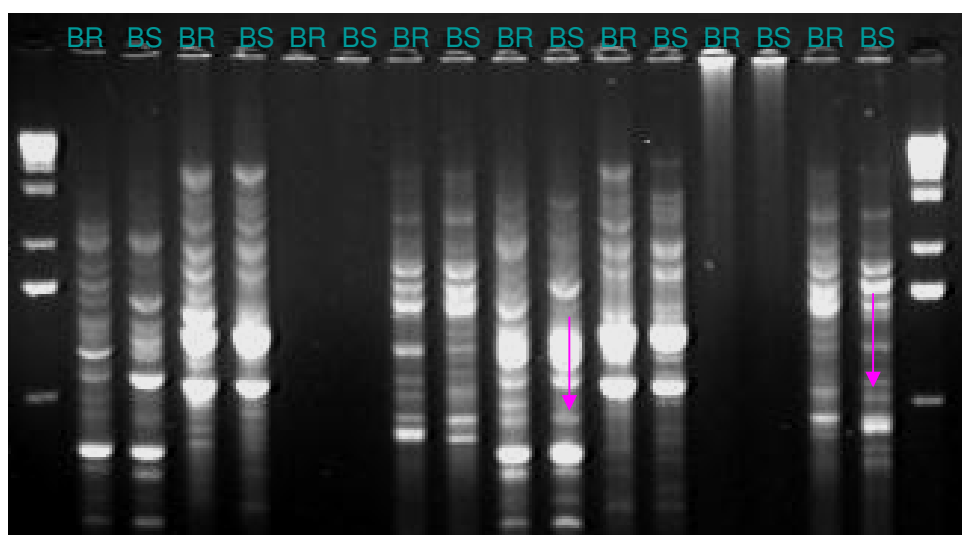


Figura 2: Gel de agarose 1,5% para os bulks resistentes e suscetíveis da fazenda Baronesa

O estudo da herança e da variação dos caracteres hereditários em plantas tem permitido a manipulação sistemática do processo de hereditariedade pela seleção dos indivíduos e famílias seguida pela recombinação preferencial dos genótipos portadores da maior frequência de alelos favoráveis ao

cultivo agrícola (Cruz et al. 2003). Além da relevância econômica das características quantitativas, as características governadas por poucos genes têm mostrado sua importância econômica em muitos cultivos, com destaque para as características de resistência das plantas às doenças (Alzate-Marin et al. 2005).

A genética molecular explica os mecanismos da patogenicidade do fungo e estuda a variação em fungos patogênicos. Os sinais genéticos são de fundamental importância no estudo dos genes ou dos grupos de genes associados com a resistência de doença. A associação dos marcadores com características fenotípicas com marcadores genéticos auxilia a seleção de indivíduos dentro de um programa de melhoramento.

Não foi possível avaliar a co-segregação dos marcadores nas progênies das Fazendas São Joaquim, Baronesa e no viveiro de pesquisa da empresa devido aos progenitores serem poucos contrastantes quanto à característica fenotípica observada. Existe a possibilidade de, ao identificarmos o marcador potencialmente associado ao gene de resistência pela análise de BSA, não estarmos acompanhando efetivamente a co-segregação do marcador ao gene de reação ao cancro do eucalipto. Nestes casos em técnicas co-dominantes o uso do AFLP seria mais indicado por apresentar um poder de detecção mais sensível a essas variações.

AGRADECIMENTOS

Os autores expressam seus agradecimentos a empresa Votorantim Celulose e Papel pelas facilidades para a experimentação e a FAPESP pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALZATE-MARIN A.L., CERVIGNI G.D.L., MOREIRA M.A., BARROS E.G. Seleção

assistida por marcadores moleculares visando ao desenvolvimento de plantas resistentes a doenças, com ênfase em feijoeiro e soja. **Fitopatologia Brasileira**, v.30, n.4, p.333-342, 2005.

BRONDANI, R. P. V., BRONDANI C., TARCHINI R. E GRATTAPAGLIA D. Development, characterization, mapping strategy of microsatellites markers in *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla*. **Theoretical and Applied Genetic**, n. 97, p. 816-827, 1998.

CRUZ, C. D.; CARNEIRO, P. C. S. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2003. v.2. 585p.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. Edição. Brasília –DF: Embrapa-Cenargen, 220p. 1998.

HOSOKAWA, K.; MINAMI, M.; KAWAHARA, K.; NAKAMURA, I.; SHIBATA, T. Discrimination among three species of medicinal *Scutellaria* plants using RAPD markers. **Panta Medica**, New York, v. 66, n. 3, p. 270-272, 2000.

JUNGHANS, D.T.; ALFENAS, A.C.; BROMMONSCHENKEL, S.H.; ODA, S.; MELLO, E.J.; GRATTAPAGLIA, D. Resistance to rust (*Puccinia psidii* Winter) in *Eucalyptus*: mode of inheritance and mapping of a major gene with RAPD markers. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 108, p. 175-180, 2003.

KUTCHER, H.R.; BAILEY, K.L.; ROSSNAGEL, B.G.; LEGGE, W.G. Identification of RAPD markers for common root rot and spot blotch (*Cochliobolus sativus*) resistance in barley. **Genome**, v. 39, n. 1, p. 206-215, 1996.

McKAY, J.K.; LATTA, R.G. Adaptive population divergence: markers, QTL and traits. **Trends in Ecology and Evolution** 17: 285-291, 2002.

MICHELMORE, R.W.; PARAN, I.; KESSELI, R.V. Identification of markers linked to disease-resistance genes by “bulk”ed segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.88, p.9828-9832, 1991.

TABOR, G. M.; KUBISIAK, T. L. et al. Bulk segregant analysis identifies molecular markers linked to *Melampsora medusae* resistance in *Populus deltoides*. **Phytopathology**, 90(9), 1039-1042, 2000.

TARTARINI, S. RAPD markers linked to the Vf gene for scab resistance in apple. **Theoretical and Applied Genetics**. 92:803-810, 1995.

VAN HEERDEN, S. W., AND WINGFIELD, M. J. Effect of environment on the response of *Eucalyptus* clones to inoculation with *Cryphonectria cubensis*. **Forest. Pathology**. 32:395-402, 2002.

WILLIAMS, J.G.K. et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Res.**, 18: 6531-6535, 1990

YANG, D.E.; ZHANG, C.L.; et al. Genetic analysis and molecular mapping of maize (*Zea mays* L.) stalk rot resistant gene Rfg1. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 108, p. 706-711, 2004.

YANG, H. AND KRUGER, J. Identification of RAPD marker linked to the Vf gene for scab resistance in apples. **Euphytica**. 77:83-87, 1994.

ZAMPROGNO, K.C. Utilização de Bulk Segregant Analysis na identificação de marcadores ligados a genes que controlam a resistência à Ferrugem (*Puccinia psidii* WINTER) em

Eucalyptus. 52p. Tese de Mestrado em Agronomia – Área de Concentração - Proteção de Plantas) - Faculdade de Ciências Agronômicas da Unesp de Botucatu, 2005.

CONCLUSÕES GERAIS

- ❖ Dentro dos clones avaliados o patógeno *C. cubensis*, proveniente de Bofete foi mais patogênico que o isolado proveniente de Piracicaba;
- ❖ Para o isolado de *C. cubensis* foram encontrados 46,66% de indivíduos resistentes, 6,67% moderadamente resistentes 13,33% moderadamente suscetíveis e 33,34% suscetíveis. Enquanto o isolado de *Botryosphaeria* sp., verificou-se 91,67% resistentes 5% moderadamente resistentes, 1,67% moderadamente suscetíveis e 5,26% suscetíveis.
- ❖ Os parentais inoculados com *C. cubensis* encontram-se divididos em: R (VR1, P1, VR3, C2, *E. camaldulensis* Penápolis, *E. camaldulensis* Ipef e TC3); MR (C1); MS (VR2, TC2); S (TC1, P3, P2, C4 e C3);
- ❖ Os parentais inoculados com *Botryosphaeria* sp. encontram-se divididos em: R (C4, VR3, P2, *E.camaldulensis* Penápolis, *E.camaldulensis* Ipef, VR2, C1, C2, TC2, TC3 e P3); MR (VR1 e P1); MS (C3); S (TC1);

❖ As variâncias fenotípicas encontradas para os parentais inoculados com *C. cubensis* foram de 41,32 a 0,23 enquanto os coeficientes de variação foram de 125% a 15,05%. Já para *Botryosphaeria* as variâncias fenotípicas têm uma amplitude de 156,88 a 0,285 e os coeficientes de variação foram de 101,13% a 28,67%;

❖ O maior coeficiente de variação encontrado nas progênes foi na fazenda Três Marias (C1 x TC2) com 78,64%, enquanto o menor foi de 28,22% para a fazenda São Joaquim I (C2 x P3);

❖ O número de bandas monomórficas gerado foi de 97,3% (Fazenda Baronesa), 94,8% (Fazenda São Joaquim) e 87% (viveiro de pesquisa);

❖ Não foi possível avaliar a co-segregação dos marcadores nas progênes das Fazendas São Joaquim, Baronesa e no viveiro de pesquisa da empresa devido aos progenitores serem poucos contrastantes quanto à característica fenotípica observada.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS

ABRAF. **Anuário estatístico da ABRAF**: ano base 2005. Brasília, 80p. 2006.

ALFENAS, A. C., JENG, R., AND HUBBES, M. Virulence of *Cryphonectria cubensis* on *Eucalyptus* species differing in resistance. **Eur. J. For. Pathol.** 13:179-205, 1983.

ALFENAS, A.C.; ZAUZA, E.A.V.; et al. **Clonagem e doenças do eucalipto**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, Imprensa Universitária, 442p., 2004.

AVENA-SACCÁ, R. Contribuição para o estudo das doenças criptogâmicas das plantas cítricas: uma gomose produzida por *Dothiorella*. **Revista de Agricultura**, v. 13, p.107-126, 1938.

BARBER, P. A.. BURGESS, T. J. et al. *Botryosphaeria* species from *Eucalyptus* in Australia are pleoanamorphic, producing *Dichomera* synanamorphs in culture. **Mycological Research** , v. 109, Issue 12, p 1347-1363, 2005.

BARIL, C.P. et al. Struture of the specific ability between two species of *Eucalyptus*; 1- RAPD. **Theoretical applied genetics**, v.94, p.796-803, 1997.

BARRETO, R.W.; ROCHA, F.B. et al. First Record of natural infection of *Malierea edulis* by the eucalyptus canker fungus *Chrysosporthe cubensis*. New disease Reports. **Plant Pathology**, 55 (4), p.577-577, 2006.

BENDENDO, I.P. Ambiente e doença. In: BERGAMIN, F.A. et al. **Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos** 3ed. São Paulo: v1, Ceres, 1995.

BOCARD, P.J.; SILVA, R.R.; COLTURATO, A.B.; FURTADO, E.L. Controle de *Dothiorella* sp *in vitro* com óleos essenciais. **In: XL Congresso Brasileiro de Fitopatologia**, 2007, Maringá, Anais do Congresso Brasileiro de Fitopatologia. Sociedade Fitopatológica do Brasil, 2007.

BOERBOOM, J.H.A., MAAS, P.W.T. Canker of *Eucalyptus grandis* e *E. saligna* in Suriname caused by *Endothia havanensis*. **Turrialba** n.20, p. 90-94, 1970.

BRACELPA, 2007 **In:** Associação Brasileira de de Celulose e Papel (<http://www.bracelpa.org.br/bra/estatisticas/pdf/booklet/DesempenhoAgosto2008.pdf>). Acesso em 19/08/08.

BRUNER, S.C. Una enfermedad gangrenosa de los eucaliptos. Estacion Experimental Agronomica: Santiago de Las Vegas, Cuba. **Boletine** n. 37, p. 1-38, 1917.

CARVALHO, C.M.; et al. Aspectos sintomatológicos, morfológicos e anatômicos da deficiência de boro em plantações de *Eucalyptus*. **In:** Symposium and Wookshop on Genetic, Improvement and Productivity of Fast Growing Tree Species. Águas de São Pedro, 8p. 1980.

CHEN, D.M.; DE FILIPPIS, L.F. Applicationos Genomic DNA and RAPD-PCR in Genetic Analysis and Fingerprinting of Various Species of Woody Trees. **Aus. Forest.** V.59, p. 46-55, 1996.

COLTURATO, A. B.; FURTADO, E. L. Efeito dos fungicidas “*in vitro*” no controle do crescimento micelial de *Dothiorella* sp. causador de seca de ponteiro em *Corymbia citriodora*. **In:** XL Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 2007, Maringá, Anais do Congresso Brasileiro de Fitopatologia. Sociedade Fitopatológica do Brasil, 2007.

ELDRIGDE, K.; DAVIDSON, J.; HARWOOD, C.; et al. Eucalypt Domestication and Breeding. Oxford Science Publications, Claredon Press, Oxford, 1994.

FERREIRA, A.F.; MILANI, D. Avaliação de resistência de clones de Eucalipto às infecções naturais de *Cryphonectria cubensis*, com nova metodologia. **Árvore**, Viçosa –MG, v.28, n.2, p.313-316, 2004.

FERREIRA, F. A Portas de entrada para *Cryphonectria cubensis* em troncos de *Eucaluptus citriodora* e *Eucalyptus grandis*. **Revista Árvore**, v.25, n.4, p. 513-519, 2001.

FERREIRA, F.A. . **Patologia florestal – principais doenças florestais no Brasil**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, SIF, 570p. 1989.

FERREIRA, F.A. Resistência de *Eucalyptus* spp. ao cancro causado por *Diaporthe cubensis* Bruner. **Viçosa**: Universidade Federal de Viçosa, 75p. 1977.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. Edição. Brasília –DF: Embrapa-Cenargen, 220p. 1998.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética**. Brasília: EMBRAPA/CENARGEN, 220p., 1995.

FOELKEL, C.E.B.; ZVINAKEVICIUS, C. et al. Avaliação da qualidade da madeira de *Eucalyptus saligna* e *Eucalyptus grandis* afetados por cancro. **O Papel**, 37:12, 1976.

GAIOTTO, F.A. **Estimativa de recombinação e estrutura genética em uma população de melhoramento de *Eucalyptus urophylla* com marcadores RAPD e AFLP**. 1996. Dissertação de Mestrado – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. Botucatu, 66p. 1996.

GIBSON, I.A.S. A canker disease of *Eucalyptus* new to Africa. **FAO, Forest general Research Information**, n.10, p.23-24, 1981.

GRATTAPAGLIA, D. & SEDEROFF, R. Genetic linkage maps of *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus urophylla* using a pseudo-testcross: mapping strategy and RAPD markers. **Genetics**, n. 137, p. 1121-1137, 1994.

GRYZENHOUT, M.; MYBURG, H. et al. *Chrysoporthe*, a new genus to accommodate *Cryphonectria cubensis*. **Stud. Mycol.** N.50, p.119-142, 2004.

GRYZENHOUT, M.; WINGFIELD, M. J. et al. *Chrysoporthe doradensis* sp. nov. pathogenic to *Eucalyptus* in Ecuador. **Fung Div.** N.20, p.39-57, 2005.

HODGES, C. S., REIS, M. S. et al. Duas enfermidades em plantações de essências florestais exóticas no Brasil. **Brasil Florestal**, n.4, p.5-12, 1973.

HODGES, C.S., GEARY, T.F. et al. The occurrence of *Diaporthe cubensis* on *Eucalyptus* in florida, Hawai and puerto Rico. **Plant Disease**, n.63, p.216-220, 1980.

HODGES, C.S., REIS, M.S., FERREIRA,F.A., HENFLING, J.D.M. O cancro do eucalipto causado por *Diaporthe cubensis*. **Fitopatologia Brasileira**, v.1, p. 129-161, 1976.

HODGES, C.S.; ALFENAS, A.C.;CORDELL, C.E. The conspeceficity of *Cryphonectria cubensis* and *Endothia eugeniae*. **Mycologia**, n.78, p.334-350, 1986.

HODGES,C.S. Preliminary Exploration for Potencial Biology Control Agents for *Psidium cattleianum*. Honolulu, Hawaii: **Cooperative National Park Resources Studies Unit**, Unicersity of Hawaii at Manoa. (Technical Report66.), 1988.

KRUGNER, T.L. ET AL. Seca de ramos em plantas enxertadas de eucaliptos no Estado do Espírito Santo. **Circular técnico IPEF** n.6, p.69-75, 1973

KRUGNER, T.L., AUER, C.G. et al. Doenças dos Eucaliptos. In: KIMAT, H.; AMORIM, L. Et al. **Manual de Fitopatologia: Doenças das plantas cultivadas**, 4a ed. São Paulo: Agronômica Ceres, v.2, p.320-333, 2005.

KRUGNER, T.L.; BACCHI, L.M.A. Fungos. In: BERGAMIN, F.A. et al. **Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos** 3ed. São Paulo: v1, Ceres, 1995.

LEITE, S.M.M.; BONINE, C.A.V.; LOPES, C.R.; MORI, E.S.; VALLE, C. F.; MARINO, C.L. Genetic variability in a breeding population of *Eucalyptus urophylla* S.T. Blake. **Silvae Genetica**, v.51, p.253-256, 2002

LUQUE, J. et al. Seasonal changes in susceptibility of *Quercus suber* to *Botryosphaeria stevensii* and *Phytophthora cinnamomi*. **Plant Pathology**, v.51, p.338-345, 2002.

MAGNANI, G. 1964. Diseases of **Eucalyptus**. Proceedings of the FAO/IUFRO Symposium on Internationally Dangerous Forest Diseases and Insects; Oxford, England July 1964.

MERWE, N., MYBURG, H. et al. Identification of *Cryphonectria cubensis* from Colombia based on rDNA sequence data. **South African Journal of Science**, n.97, p.295-296, 2001.

MICHELMORE, R.W.; PARAN, I.; KESSELI, R.V. Identification of markers linked to disease-resistance genes by “bulk”ed segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.88, p.9828-9832, 1991.

MIRZAEI, M.R. et al. *Natrassia mangiferae*, the cause of die-back and trunk canker of *Ficus religiosa* and branch with of *Psidium guajava* in Iran. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v.150, p.244-247, 2002.

MOURA, V.P.G.; CASER, R.L.;ALBINO, J.C. et al. Avaliação de espécies e procedências de Eucalyptus em Minas Gerais e Espírito Santo: resultados parciais. Planaltina: EMBRAPA –CPAC, **Boletim técnico**, 104p., 1980.

MULLIS, K.; FALOONA, F. Specific synthesis of DNA in vitro via a polimerase catalysed chain reaction. **Methods Enzymology**, v. 55 p. 335-350, 1987.

MYBURG, H.; GRYZENHOUT, M. Et al. *Endothia eugeniae* and *Cryphonectria cubensis*: a re-evaluation based on morphology and DNA sequence data. **Mycoscience**, v. 44, p.187-196, 2003.

MYBURG, H.; GRYZENHOUT, M.; WINGFIELD, B.D. et al. DNA sequence data and morphology define *Cryphonectria* species in Europe, China and Japan. **Canadian Journal of Botanical** n. 82, p.1730-1743, 2004.

NSOLOMO, V.R. et al. The ability of some fungi to cause decay in the East African camphor tree, *Ocotea usambarensis*. **Mycology Research**, v.104, n.12, p.1473-1479, 2000.

OLD, K.M.; WINGFIELD, M.J. et al. **A manual of diseases of eucalypts in South-East Asia**. Center for International Forestry Research, 2003. 106p.

PARIS, A. **Caracterização molecular de clones de *Eucalyptus* sp.** Tese de Mestrado do Instituto de Biociências da Unesp de Botucatu em 2000, p. 90.

ROCHA, R. B., ABAD, J. I. M., PIRES, I. E., E ARAÚJO, E. F., Fingerprint and genetic diversity analysis of *Eucalyptus* ssp. genotypes using RAPD and SSR markers. **Scientia Florestalis**, **62**, 24-31, 2002:

RODAS, C.A.; GRYZENHOUT, M.; MYBURG, H.; WINGFIELD, B.D.; WINGFIELD, M.J. Discovery of the Eucalyptus canker pathogen *Chrysoporthe cubensis* on native *Miconia* (Melastomataceae) in Colombia. **Plant Pathology**, n.54, p.460-470, 2005.

ROXO, C.A. Proposta de agenda do setor brasileiro de florestas plantadas. Palestra no seminário “A questão Florestal e o Desenvolvimento”, Brasília, 8 de julho de 2003.

SALZEDAS, L.F.; NETO, S.M.R. Ocorrência do cancro da goiabeira *Botryosphaeria dothidea* na região de Araçatuba, Estado de São Paulo. **O Biológico**, v.51, n.11, p.295-297, 1985.

SANCHES-HERNANDEZ, M.E. *Botryosphaeria* canker of *Cistus ladanifer*. **Plant Pathology** v.51, p.365-373, 2002.

SEIXAS, C. D.S.; BARRETO, R.W.; ALFENAS, A.C.; FERRERIA, F.A. *Cryphonectria cubensis* on the indigenous host in Brazil: a possible origin for eucalyptus canker disease? **Mycologist**, v.18, p. 39-45, 2004.

SHARMA, J. K., MOHANAN, C. et al. Occurrence of *Cryphonectria* canker disease of *Eucalyptus* in kerala, Índia. **Annals of Applied Biology**, n.106, p.265-276, 1985.

SILVA, E. **Avaliação quantitativa de impactos ambientais do reflorestamento no Brasil. Viçosa**, 309p. Dissertação de Doutorado em Engenharia Florestal —Universidade Federal de Viçosa, 1994.

SILVA, R.R.; BOCARDO, P.J.;COLTURATO, A.B.; FURTADO, E.L. Extratos vegetais no controle de *Dothiorella* sp., causador da seca de ponteiro em *Corymbia citriodora*. **In:** XL Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 2007, Maringá, Anais do Congresso Brasileiro de Fitopatologia. Sociedade Fitopatológica do Brasil, 2007.

SILVEIRA, R.L.V.A.; GONÇALVEZ, A.N. et al. Estado nutricional de *Eucalyptus citriodora* Hook cultivado sob diferentes doses de boro e sua correlação com a agressividade de *Botryosphaeria ribis*. **Scientia Florestalis**, n.53, p.57-70, 1998.

SPAULDING, P. Foreign diseases of forest trees of the world. **Agric. Handbook** n.9 197, 1961.

TOKESHI, F.; GUIMARÃES, R.F.; et al. Deficiência de boro em *Eucalyptus* em São Paulo. **Summa Phytopathologica**, v.2, n.2, p.122-126, 1976.

TONACO, I.A.N. **Macho esterelidade em *Eucalyptus urophylla*** , 2002, 51p. Dissertação (Mestrado em genética e melhoramento de plantas)- Universidade Federal de Lavras, MG, 2002.

VALENCIA-BOTIN, A.J. et al. *Botryosphaeria dothidea* causing stem spots on *Hyloceurus undatus* in Mexico. **Plant pathology**, v.52, p.803, 2003

VAN HEERDEN, S. W., AND WINGFIELD, M. J. Effect of environment on the response of *Eucalyptus* clones to inoculation with *Cryphonectria cubensis*. **For. Pathol.** 32:395-402, 2002.

VAN ZYL, L. M.; WINGFIELD, M. J. Wound response of *Eucalyptus* clones after inoculation with *Cryphonectria cubensis*. **Eur. J. For. Pathol.** 29:161-167, 1999.

VENTER M., MUBURG. H. et al. A new species of *Cryphonectria* from South Africa and Australia, pathogenic on *Eucalyptus*. **Sydowia**, n.54, p.98-117, 2002

VERHAEGEN,D. et al. Quantitative trait dissection analysis in *Eucalyptus* using RAPD markers: 1- detec- using RAPD markers: 1- detec-tion of QTL in interespecific hybrid progeny, stability of QTL, expression across diferent ages. **Theoretical applied genetics**, v.95, p.597-608, 1997

WAUGH,G. Sawing of young fast-grow eucalyptus. **In:** Seminário internacional sobre produtos sólidos de madeira de alta tecnologia. Anais Belo Horizonte, p.69-81, 1998.

WEAVER, D.J. Role of conidia of *Botryosphaeria dothidea* in the natural spread of peach gummosis. **Phytopathology**, Saint paul, v.69, n.4, p.330-334, 1999.

[WET, J.](#) , [SLIPPERS B.](#) et al. Phylogeny of the *Botryosphaeriaceae* reveals patterns of host association. [Mol Phylogenet Evol.](#) v. 46(1), p.116-26, 2008.

WHITESIDE, J.O. et al. Compendium of citrus disease. **Florida: APS**, 1988, 80p.

WINFIELD, A.J. Increasing threat of diseases to exotic plantation forests in the Southern Hemisphere: lessons Cryphonectria canker. **Australian Plant Pathology**, v. 32, p.133-139, 2003.

WINGFIELD, M. J., ABEAR, B. First record of Cryphonectria canker of *Eucalyptus* in South Africa. **Phytophylactica**, n.21, p.311-313, 1989.

WINGFIELD, M.J.; RODAS, C.; WRIGHT, J. et al. First report of *Cryphonectria* canker on Tibouchina in Colombia. **Forest Pathology**, v.31, p.297-306, 2001

WOLF, F. T. e F. A. WOLF. A study of *Botryosphaeria ribis* on willow. **Mycologia** 31:217-227., 1939.

ZAMPROGNO, K.C. **Utilização de Bulked Segregant Analysis na identificação de marcadores ligados a genes que controlam a resistência à Ferrugem (*Puccinia psidii* WINTER) em *Eucalyptus***. 52p. Tese de Mestrado em Agronomia – Área de Concentração - Proteção de Plantas) - Faculdade de Ciências Agrônômicas da Unesp de Botucatu, 2005.