



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus de Botucatu



**JÉSSICA KARINE BURIM CARDOSO**

**MÉTODOS DE DETECÇÃO DE *Ceratocystis* spp. EM MUDAS DE OHIA  
(*Metrosideros polymorpha*) E EUCALIPTO (*Eucalyptus* spp.)**

**Botucatu**

**2019**



**JÉSSICA KARINE BURIM CARDOSO**

**MÉTODOS DE DETECÇÃO DE *Ceratocystis* spp. EM MUDAS DE OHIA  
(*Metrosideros polymorpha*) E EUCALIPTO (*Eucalyptus* spp.)**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agronômicas da Unesp Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Doutora em Proteção de Plantas.

Orientador: Prof. Dr. Edson Luiz Furtado

**Botucatu**

**2019**

C268m

Cardoso, Jéssica Karine Burim

Métodos de Detecção de *Ceratocystis* spp. em mudas de  
ohia (*Metrosideros polymorpha*) e eucalipto (*Eucalyptus* spp.) /  
Jéssica Karine Burim Cardoso. -- Botucatu, 2019  
61 p.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),  
Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu  
Orientador: Edson Luiz Furtado

1. Murcha de *Ceratocystis*. 2. Real-Time PCR. 3. Murcha  
Vascular. 4. Propagação Vegetativa. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da  
Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

**TÍTULO DA TESE:** MÉTODOS DE DETECÇÃO DE *Ceratocystis* spp. EM MUDAS DE OHIA (*Metrosideros polymorpha*) E EUCALIPTO (*Eucalyptus* spp.)

**AUTORA:** JÉSSICA KARINE BURIM CARDOSO

**ORIENTADOR:** EDSON LUIZ FURTADO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em AGRONOMIA (PROTEÇÃO DE PLANTAS), pela Comissão Examinadora:

  
Prof. Dr. EDSON LUIZ FURTADO  
Proteção Vegetal / Faculdade de Ciências Agrônômicas de Botucatu - UNESP

~~Pesquisador Dr. (Voluntário) LEO ZIMBACK  
Proteção Vegetal / Faculdade de Ciências Agrônômicas de Botucatu - UNESP~~

~~Prof.ª Substituta CRISTIANE DE PIERI  
Proteção Vegetal / Faculdade de Ciências Agrônômicas de Botucatu - UNESP~~

~~Prof. Dr. MARCELO LUIZ DE LARA  
Engenharia Florestal / Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri~~

Pesquisadora Dr.ª CHRISTIANE CERIANI APARECIDO  
Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Vegetal / Instituto Biológico de São Paulo

  
Botucatu, 13 de dezembro de 2019



## AGRADECIMENTOS

À Deus, por sempre me guiar pelos melhores caminhos.

À minha família, minha mãe Sônia, meu pai Joaquim e minha irmã Amanda, por me apoiarem em todas as minhas decisões e estarem sempre ao meu lado, me dando muito amor, incentivo e sendo exemplos para mim.

Ao meu noivo Artur, por sempre acreditar em mim, por tanto amor, paciência, carinho, apoio, parceria e cumplicidade.

Aos meus sogros Adriana e Paulo, por me acolherem tão bem e estarem sempre dispostos a ajudar.

Ao meu orientador professor Edson Luiz Furtado, pela oportunidade de aprendizado que me deu, pela confiança e apoio.

A Dra. Lisa Keith e toda a equipe do PBARC - USDA, por ter possibilitado uma das experiências mais incríveis que vivi, pela receptividade e por todos os aprendizados.

A minha família no Havaí, Beth e Eddie, por terem nos acolhido tão bem.

A todos os meus amigos, que tive a oportunidade de fazer em Botucatu, e os de Maringá, por trazerem leveza e amor aos meus dias.

Aos colegas do laboratório de Patologia Florestal, pela ajuda em diversos momentos.

Ao programa de Pós Graduação em Proteção de Plantas da FCA/Unesp, todo o corpo docente e funcionários, pelo suporte e ensinamentos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelas bolsas de estudos concedidas.

Muito Obrigada!



## RESUMO

O gênero *Ceratocystis* engloba diversas espécies que são patogênicas a plantas, especialmente arbóreas. *C. fimbriata* provoca danos significativos na cultura do eucalipto (*Eucalyptus* spp.), a principal árvore plantada do Brasil, enquanto *C. lukuohia* tem causado a morte de inúmeras árvores de ohia (*Metrosideros polymorpha*), a espécie arbórea nativa mais importante do Havaí. As duas espécies fúngicas possuem semelhanças quanto ao comportamento do patógeno e manifestação dos sintomas na planta, provocando enormes prejuízos nos ecossistemas em que estão envolvidas. Estudos sobre a disseminação e propagação desses patógenos são necessários, para que medidas de controle sejam tomadas. Tendo em vista indícios apontados em trabalhos anteriores de que *C. fimbriata* possa ser disseminado por meio de mudas infectadas e assintomáticas, objetivou-se com esse trabalho, identificar uma metodologia capaz de detectar o patógeno em mudas antes da manifestação dos sintomas. Para isso, o estudo foi dividido em duas partes. A primeira parte consistiu em testar uma metodologia existente no laboratório de patologia de plantas do PBARC/USDA usada para detecção de *C. lukuohia* no campo. Devido a semelhança do patógeno com *C. fimbriata*, testou-se a capacidade do protocolo de Real-Time PCR em detectar o DNA de *C. lukuohia* em mudas inoculadas e relacioná-las a presença de sintomas. O experimento mostrou que para *C. lukuohia* a presença do patógeno está diretamente ligado ao aparecimento dos sintomas. A segunda parte do trabalho foi realizada com *C. fimbriata* e consistiu em testar a metodologia de PCR convencional e Real-Time PCR em amostras retiradas de mudas de eucalipto inoculado com o patógeno e brotações obtidas de árvores infectadas naturalmente. A técnica de PCR convencional mostrou-se ineficiente para a detecção do material genético do fungo extraído diretamente da planta, pois os iniciadores testados não foram capazes de amplificar de forma concisa o DNA do patógeno. Já a técnica de Real-Time PCR mostrou-se promissora, podendo ser a metodologia mais eficaz para a detecção do DNA do fungo na planta, mesmo em baixas concentrações.

**Palavras chave:** Murcha de *Ceratocystis*. Real-Time PCR. PCR. Murcha vascular. Propagação vegetativa.

## ABSTRACT

There are several species that are pathogenic to plants in the genus *Ceratocystis*, especially trees. *C. fimbriata* causes significant damage to the eucalyptus (*Eucalyptus* spp.), the main planted tree in Brazil, at the same time, *C. lukuohia* has caused the death of a lot of ohia trees (*Metrosideros polymorpha*), the most important native tree in Hawaii. The two fungal species have similarities, like the pathogen behavior and the symptoms in the plant, both cause a huge damage to the ecosystems in which they are involved. Studies about the dissemination and spread of these pathogens are necessary to decide the better control. There are evidences from previous studies that *C. fimbriata* can be disseminated through infected and asymptomatic seedlings, so the main objective of this work was identify a methodology capable to detect the pathogen in seedlings before the manifestation of the symptoms. It was divided into two parts. At the first one, was tested an existing methodology in the PBARC / USDA Laboratory of plant pathology, used for field detection of *C. lukuohia*. Assuming the similarity of the pathogen to *C. fimbriata*, the Real-Time PCR protocol was tested to detect *C. lukuohia* DNA in inoculated seedlings and the relation with the symptoms. The experiment showed that for *C. lukuohia* the presence of the pathogen is directly related to the symptoms. The second part of the experimente was performed with *C. fimbriata* and consisted of testing the conventional PCR and Real-Time PCR methodology on eucalyptus samples that had been inoculated with the pathogen and buddings obtained from naturally infected trees. The conventional PCR technique was ineffective for detecting the fungal genetic material that was extracted directly from the plant, the primers tested were unable to concisely amplify the pathogen's DNA. On the other hand, the Real-Time PCR technique has indicated that it may be the most effective methodology for detecting fungal DNA in the plant, even with low concentrations.

**Keywords:** Ceratocystis wilt. Real-Time PCR. PCR. Vascular wilt. Vegetative propagation.



## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	<b>11</b>
<b>CAPÍTULO 1 - MÉTODOS DE DETECÇÃO DE <i>Ceratocystis lukuohia</i> EM MUDAS DE OHIA (<i>Metrosideros polymorpha</i>)</b> .....	<b>15</b>
RESUMO .....	15
ABSTRACT .....	16
1.1 INTRODUÇÃO.....	17
1.2 MATERIAL E MÉTODOS .....	18
1.2.1 Preparo do Inóculo .....	19
1.2.2 Preparo das mudas .....	19
1.2.3 Inoculação .....	20
1.2.4 Retirada das amostras .....	21
1.2.5 Discos de Cenoura .....	22
1.2.6 Extração do DNA e Real-time PCR.....	23
2. 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25
REFERÊNCIAS .....	38
<b>CAPÍTULO 2 - DETECÇÃO DE <i>Ceratocystis fimbriata</i> EM MUDAS DE EUCALIPTO (<i>Eucalyptus spp.</i>)</b> .....	<b>40</b>
RESUMO .....	40
ABSTRACT .....	41
2.1 INTRODUÇÃO.....	42
2.2 MATERIAL E MÉTODOS .....	44
2.2.1 Coleta dos isolados e obtenção de isolados monospóricos .....	44
2.2.2 Coleta de brotações e obtenção de mudas.....	45
2.2.3 Inoculação de mudas sadias .....	46
2.2.4 Extração do DNA das amostras .....	46
2.2.5 Análise por PCR convencional e Real-Time PCR.....	47
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	50
2.3.1 Obtenção de mudas e isolados monospóricos .....	50
2.3.2 Análise por PCR convencional e Real-Time PCR.....	51
REFERÊNCIAS .....	55
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>58</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>60</b>



## INTRODUÇÃO GERAL

O segmento de florestas plantadas tem um papel cada vez mais importante na economia brasileira. Com um crescimento de 13,1% em 2018, comparado ao ano anterior, ele alcançou uma receita setorial de R\$ 86,6 bilhões, gerando 513 mil empregos diretos e cerca de 3,8 milhões de trabalhos diretos e indiretos. Nesse cenário, o eucalipto ganha destaque, pois é a principal espécie arbórea utilizada em florestas plantadas, colaborando para que o Brasil seja o maior exportador de celulose no comércio mundial. (RELATÓRIO IBÁ, 2019).

Assim como outras espécies vegetais, o eucalipto está sujeito ao ataque de pragas e patógenos que podem afetar a produtividade. O ataque de patógenos é relatado tanto durante a fase de viveiro, no processo de produção de mudas, quanto no campo, em plantas adultas (FERREIRA & MILANI, 2012; FURTADO et al., 2009). Dentre os patógenos que provocam danos na cultura pode-se destacar o fungo *Ceratocystis fimbriata*, que foi observado pela primeira vez na cultura no ano de 1997, sendo relatado anteriormente apenas na mangueira (*Mangifera indica*) (FERREIRA et al., 1999; LAIA et al., 2000).

*C. fimbriata* é um patógeno vascular, cujo sintoma típico é a murcha e morte das plantas. O fungo cresce internamente e bloqueia os vasos condutores, de forma que a água absorvida pelo sistema radicular não consegue suprir a demanda da parte aérea. Em alguns casos observa-se também a emissão de brotações medianas e basais no tronco, resultado de uma alteração hormonal da planta, principalmente quando há o bloqueio dos vasos na parte mais alta da mesma. Internamente, observam-se estrias escuras, que saem da medula e progridem no sentido radial, de forma contínua ou descontínua ao longo do tronco (FERREIRA & MILANI, 2012; FERREIRA et al., 2006).

O gênero *Ceratocystis* é bem amplo, contempla diversas espécies fúngicas que estão distribuídas por todo o mundo e afetam as mais diferentes culturas. No Brasil além de *C. fimbriata* que acomete as espécies florestais, há relatos de *C. cacaofunesta*, que provoca grandes prejuízos em cacaueiro, *C. paradoxa*, que ocorre principalmente em monocotiledôneas como a cana de açúcar e com o avanço das pesquisas filogenéticas, o que antigamente atacava a cultura da manga e era classificado como *C. fimbriata* agora são duas novas espécies: *C. mangicola* e *C. mangifera* (FERREIRA, 2009; BEZERRA, 1997; FERREIRA et al., 1999).

Outras espécies antigamente denominadas *C. fimbriata* foram renomeadas após estudos morfológicos e genéticos de linhagens hospedeiro-especializadas, como é o caso das espécies que atacam o cacau e *Platanus* spp., que agora são denominadas como *C. cacaofunesta* e *C. platani* respectivamente (BAKER et al., 2003; ENGELBRECHT & HARRINGTON, 2005).

O gênero *Ceratocystis* pode ser dividido em quatro grupos ou clados distintos: o da América Latina, o da América do Norte, o da Ásia e o da África (HARRINGTON et al. 2011). O clado da América Latina engloba espécies consideradas bem agressivas, como *C. fimbriata* e *C. lukuohia*, que foi recentemente descrito como patógeno em ohia (*Metrosideros polymorpha*) no Havaí (BARNES et al., 2018). Por apresentar sintomas bem semelhantes nas árvores, além de analogias na morfologia e em análises moleculares, que mostraram similaridade de 98% em testes que compararam a região ITS, o patógeno que provoca murcha e morte em ohia foi inicialmente identificado como *C. fimbriata*. Entretanto, estudos recentes com análises filogenéticas mais aprofundadas mostraram que o agente causal é na verdade outras duas espécies do gênero: *C. lukuohia* e *C. huliohia* (BARNES et al., 2018, KEITH et al., 2015).

A observação do gênero *Ceratocystis* em ohia é recente, as primeiras constatações ocorreram no ano de 2010, e com o passar dos anos, a doença progrediu rapidamente para novas áreas (MORTENSON et al., 2016). Isso reflete o que tem acontecido no cenário de forma mundial, pois em um período de vinte anos, os relatos de murchas provocadas por espécies do gênero *Ceratocystis* nas mais diversas culturas aumentou cerca de três vezes (ROUX & WINGFIELD 2009).

A penetração de *Ceratocystis* spp. em arbóreas ocorre pelas raízes ou por ferimentos no tronco, que podem ser causados durante os tratamentos silviculturais, por condições ambientais como ventos fortes, estresse hídrico, granizo ou ainda por insetos (FERREIRA & MILANI, 2012).

Depois que o patógeno se instala na planta, devido à natureza sistêmica da infecção, o controle é extremamente difícil em espécies arbóreas, não existindo um método de controle eficiente baseado no princípio de terapia. Esse fato, aliado a elevada gama de hospedeiros que o patógeno é capaz infectar e a capacidade de produzir esporos de resistência que podem sobreviver no solo durante anos tornam o controle de *Ceratocystis* spp. ainda mais difícil (MAFIA et al., 2011).

Em eucalipto recomenda-se o uso de genótipos resistentes como alternativa de controle, mas em espécies nativas como a ohia, as alternativas de controle ficam mais restritas, baseando-se em evitar a disseminação de partes da planta para novas áreas e cuidados com a movimentação do solo, a fim de deter a propagação da doença, conscientizando a população para isso (FERREIRA & MILANI, 2012).

A disseminação de *Ceratocystis* spp. é atribuída ao movimento de tecidos vegetais pelo ser humano, a movimentação do solo infectado, e a scolytídeos da família *Platypodidae*, conhecidos como besouros ambrósia, que foram encontrados em associação com a doença em diversas culturas, como na manga, eucalipto e ohia (ROUX et al., 2018). Eles perfuram o tronco da árvore, e essa perfuração pode servir como porta de entrada para o patógeno (BARNES et al., 2018; BAKER et al., 2003). A planta infectada por *Ceratocystis* spp. produz um odor característico de fruta madura que atrai o inseto e esse pode carregar os esporos do patógeno após penetrar em uma árvore doente (ROUX & WINGFIELD 2009).

Em eucalipto, também existem indícios de que a propagação vegetativa que é realizada na cultura possa disseminar o patógeno para novas áreas, na forma de mudas infectadas (FERREIRA et al., 2017; LI et al., 2016; HARRINGTON et al., 2015; TUMURA, 2011).

Nesse sentido, objetivou-se com este trabalho desenvolver um protocolo para a detecção molecular do fungo *C. fimbriata* em eucalipto, a fim de diagnosticar o patógeno em mudas que possam estar contaminadas e não manifestam o sintoma. Para isso, o trabalho foi dividido em duas etapas: uma delas foi realizada no centro de pesquisa “Pacific Basin Agricultural Research Center - PBARC”, do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos. O laboratório utiliza um protocolo de detecção molecular para amostras de campo, com a técnica de Real-Time PCR, que é capaz de fazer o diagnóstico de maneira rápida e eficaz do patógeno e identificar qual das duas espécies está presente na área, ou se elas estão associadas (HELLER & KEITH, 2018). Devido à semelhança entre *C. fimbriata* e *C. lukuohia*, testou-se o protocolo já utilizado no campo para a identificação do patógeno em mudas assintomáticas.

A segunda parte do trabalho consistiu em análises realizadas no Brasil, na tentativa de se obter uma técnica molecular que fosse capaz de detectar o *C. fimbriata* em mudas de eucalipto assintomáticas, visando controlar a propagação do

patógeno para novas áreas e evitar os prejuízos causados pelo mesmo nessa cultura tão importante para o Brasil.

## CAPÍTULO 1

### MÉTODOS DE DETECÇÃO DE *Ceratocystis lukuohia* EM MUDAS DE OHIA (*Metrosideros polymorpha*)

Jéssica Karine Burim Cardoso, Wade Heller, Eva Brill, Lisa Keith, Edson Luiz Furtado

#### RESUMO

‘Ōhi‘a lehua (*Metrosideros polymorpha*) também chamada de ohia, é a espécie arbórea predominante nas ilhas do Havaí. Ela é uma árvore nativa do arquipélago e extremamente adaptada a diversidade do clima presente na ilha, ocupando desde áreas extremamente úmidas a climas quase desérticos. No ano de 2010 começaram a ser observadas árvores de ohia com sintomas de murcha e consequente morte das plantas. Com o passar dos anos a doença avançou de forma rápida para outras regiões da ilha e o agente causal foi identificado como sendo duas novas espécies do gênero *Ceratocystis*: *C. lukuohia*, que tem um comportamento vascular e mais agressivo e *C. huliohia*, que ataca árvores já debilitadas, provocando cancrios. Para o monitoramento e detecção do patógeno no Havaí, são utilizadas duas técnicas em conjunto, o isolamento com disco de cenoura e um protocolo de Real-Time PCR. O presente trabalho teve como objetivo testar as metodologias em mudas de ohia inoculadas com *C. lukuohia*, a fim de verificar se elas seriam capazes de detectar o patógeno antes da manifestação dos sintomas de murcha ou escurecimento do lenho. Para isso foram separados nove grupos, um com três plantas testadas antes da inoculação, e os outros oito grupos com quatro plantas em cada, sendo três inoculadas com o fungo e uma testemunha. Cada grupo foi avaliado semanalmente, com análises destrutivas nas quais era observado o sintoma de escurecimento dos vasos condutores e retiravam-se as amostras para os testes de diagnose por meio do disco de cenoura e Real-Time PCR de diferentes alturas da planta. Ambas as técnicas foram eficientes na detecção do patógeno, entretanto, a presença dele mostrou-se diretamente ligada ao sintoma, de forma que na grande maioria das amostras, nas partes da planta nas quais não foram verificados os sintomas, ele não foi detectado.

**Palavras chave:** Real-Time PCR. Disco de cenoura. Murcha de *Ceratocystis*.

## ABSTRACT

‘Ōhi‘a lehua (*Metrosideros polymorpha*) also named ohia, is the predominant tree on the Hawaii’s islands. It is a native tree from there and is very well adapted to the climate in the island, occupying from extremely humid areas to almost desert climates. In 2010, ohia trees with wilting symptoms and consequent plant death began to be observed. On these last years, the disease has advanced rapidly to other regions of the island and the causal agent has been identified as two new species of the genus *Ceratocystis*: *C. lukuohia*, which is a very aggressive vascular pathogen and *C. huliohia*, which attacks weakened trees causing cankers. For monitoring the pathogen in Hawaii, two techniques have been used, isolation with carrots and a Real-Time PCR protocol. The present work aimed to test both methodologies of ohia seedlings inoculated with *C. lukuohia* in order to verify if they could detect the pathogen before the symptoms of wilting or darkening of the wood. Nine groups were separated, one with three plants tested before inoculation, and the other eight groups with four plants in each, three inoculated with the fungus and one control. Destructive analyzes were evaluated weekly, analysing if the conduction vessel have the darkening symptom. Samples were taken from different heights for diagnostic tests by carrot disc and Real-Time PCR. Both techniques were efficient to detect the pathogen, however, its presence was directly linked to the symptom, in the most part of the samples, in parts of the plant that has no symptoms, it was not detected.

**Key words:** Real-Time PCR. Carrots discs. *Ceratocystis* wilt.

## 1.1 INTRODUÇÃO

‘Ōhi‘a lehua (*Metrosideros polymorpha*) é uma árvore que pertence à família Myrtaceae, que como o próprio nome sugere possui grande variação morfológica: em altura, formato e pilosidade das folhas e coloração das flores. Nativa do Havaí, ela está presente nas seis principais ilhas do arquipélago: Hawai‘i, Maui, Moloka‘i, Lana‘i, O‘ahu e Kaua‘i, ocupando uma área total de 350.000 ha (FRIDAY & HERBERT, 2006).

Ohia tem uma enorme importância para a população local, a madeira é usada para diversos fins que vão desde mobília, construções navais, pisos, postes até objetos como o instrumento musical típico do Havaí, o ukulele. Além disso, há um valor cultural. Lendas relacionam os deuses dos vulcões com as árvores de ohia, e suas flores além de serem muito empregadas para a confecção de colares que são usados em comemorações, também são importantes para a fauna local, principalmente para a alimentação dos pássaros (LITTLE JR & SKOLMEN, 2003).

Outro fator que faz da ohia uma árvore de grande relevância para o Havaí é o fato de que ela consegue crescer e se adaptar a diversas condições ambientais, sendo capaz de tolerar geadas, gases e vapores emitidos pelos vulcões assim como excessos e deficiências hídricas. Dessa forma, ela está presente desde áreas que estão no nível do mar até locais mais elevados, com 2500 m de altitude (FRIDAY & HERBERT, 2006).

Em 2010 começaram a ser constatadas árvores de ohia com sintomas de seca seguidos de morte no distrito de Puna na ilha do Hawai‘i. A morte acontecia de forma rápida e generalizada, em meio a florestas aparentemente saudáveis. Observou-se que nas plantas mortas havia o escurecimento dos vasos do xilema e estudos posteriores indicaram *Ceratocystis fimbriata* como o patógeno responsável pela morte das árvores (KEITH et al., 2015). A disseminação da doença ocorreu de forma acelerada. Pesquisas de monitoramento a fim de compreender e avaliar a dispersão do patógeno mostraram que os locais com árvores mortas devido à doença aumentaram 30% em apenas dois anos (2012 – 2014) (MORTENSON et al., 2016).

A doença é conhecida por Morte Rápida da Ohia (Rapid Ohia Death – ROD), pelo fato de matar a planta rapidamente após a manifestação do sintoma de murcha e também pela maneira acelerada com a qual ela se disseminou pela ilha. Estudos recentes de filogenética reclassificaram o patógeno responsável pela ROD, sendo

na verdade duas novas espécies de *Ceratocystis* spp.: *Ceratocystis lukuohia* e *Ceratocystis huliohia* (BARNES et al., 2018).

As duas espécies apresentam algumas diferenças nos sintomas causados e na taxa de desenvolvimento da doença. *C. lukuohia* provoca a seca e morte da planta mais rapidamente, estando associada com o escurecimento da madeira em tons pretos no tronco de forma radial. Já a espécie *C. huliohia* é mais comumente encontrada em árvores que já estão debilitadas por algum outro motivo, ela se manifesta também na forma de cancrios e com manchas mais acinzentadas ao redor do xilema. Observações dos sintomas no campo mostram que *C. lukuohia* é uma espécie mais agressiva do que *C. huliohia* (BARNES et al., 2018).

Para a detecção do patógeno são utilizadas duas técnicas: o isolamento de propágulos vegetais em iscas de cenoura e um protocolo de Real-Time PCR que permite a detecção de forma mais rápida do que a primeira (HELLER et al., 2018).

Esse protocolo funciona muito bem e é amplamente utilizado para a emissão de laudos de confirmação do patógeno em novas áreas das ilhas do Havaí. Dessa forma, objetivou-se com esse trabalho verificar a eficiência das técnicas usadas para a detecção do patógeno no campo, na planta inoculada com *C. lukuohia*, correlacionando a detecção do patógeno com a presença de sintomas, a fim de saber se o patógeno pode ser transmitido por meio de mudas infectadas e que estão assintomáticas.

## 1.2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido de 11/02/2019 à 25/04/2019 nas dependências do centro de pesquisa “Pacific Basin Agricultural Research Center - PBARC”, no Laboratório de Patologia de Plantas liderado pela pesquisadora Dra. Lisa Keith. Essa unidade pertence ao United States Department of Agriculture (USDA) e está localizada em Hilo no Havaí.

### 1.2.1 Preparo do Inóculo

Para a produção do inóculo foram utilizados dois isolados monospóricos diferentes de *C. lukuohia* da Micoteca do Laboratório de Patologia de Plantas do PBARC. No preparo do inóculo foi utilizada uma placa de cada isolado com sete dias de crescimento em meio de cultura V8. Em cada uma delas foi adicionado 2 mL de água destilada e autoclavada, realizando-se a raspagem superficial dos esporos com auxílio de uma alça de Drigalski. Em seguida, foram misturadas as duas suspensões de esporos, resultando em 4 mL provenientes dos dois isolados diferentes, com uma concentração de  $7,8 \times 10^6$  esporos/mL.

Discos de papel filtro autoclavados com 0,6 cm foram colocados na suspensão de esporos por 2 minutos. Em seguida esses discos foram depositados em novas placas com meio de cultura V8, sendo acomodados seis discos por placa, de forma equidistantes.

Para o preparo das testemunhas, utilizaram-se discos de papeis filtro embebidos em água destilada e autoclavada. Esses discos foram colocados em placas com meio de cultura V8 de forma equidistantes.

Todas as placas com discos de papel filtro foram acomodadas em câmara de crescimento do tipo BOD com temperatura de  $\pm 25^\circ\text{C}$  e fotoperíodo de 12h por nove dias para o crescimento do patógeno.

### 1.1.2 Preparo das mudas

Para a realização do experimento foram utilizadas trinta e cinco mudas de ohia (*Metrosideros polymorpha*) com três anos de idade. Uma semana antes da inoculação foi realizado o desbaste das mudas, de forma que todas elas permanecessem com apenas a haste principal. As mudas usadas no experimento foram mantidas em casa de vegetação até o momento da inoculação, recebendo irrigação uma vez ao dia, até atingir a capacidade de campo.

As plantas a serem avaliadas a cada semana foram previamente selecionadas para evitar qualquer interferência na aleatoriedade da escolha das amostras. Para a padronização do experimento elas foram divididas de acordo com a altura, e distribuídas nos grupos referentes a cada semana, de forma que em cada avaliação, houvesse representação das diferentes alturas (Figura 1).

**Figura 1 – Divisão das plantas em grupos pré-determinados para as avaliações semanais realizadas. AI – Antes da Inoculação. 1 – Plantas avaliadas 7 dias após inoculação. 2 – Plantas avaliadas 14 dias após inoculação. 3 – Plantas avaliadas 21 dias após inoculação. 4 – Plantas avaliadas 28 dias após inoculação. 5 – Plantas avaliadas 35 dias após inoculação. 6 – Plantas avaliadas 42 dias após inoculação. 7 – Plantas avaliadas 49 dias após inoculação. 8 – Plantas avaliadas 56 dias após inoculação.**



### 1.2.3 Inoculação

Três mudas não passaram pelo processo de inoculação, pois delas foram retiradas as amostras de Antes da Inoculação (AI). A inoculação (Figura 2) ocorreu no dia 20/02/2019, sendo que oito plantas foram inoculadas como controle e vinte quatro plantas com o patógeno. Com auxílio de um bisturi previamente esterilizado, fez-se um corte longitudinal no tronco da planta, três cm acima do solo, com aproximadamente 0,2 cm de profundidade e 0,5 cm de comprimento. O corte foi feito para expor parte do sistema vascular, mantendo-se a casca na planta.

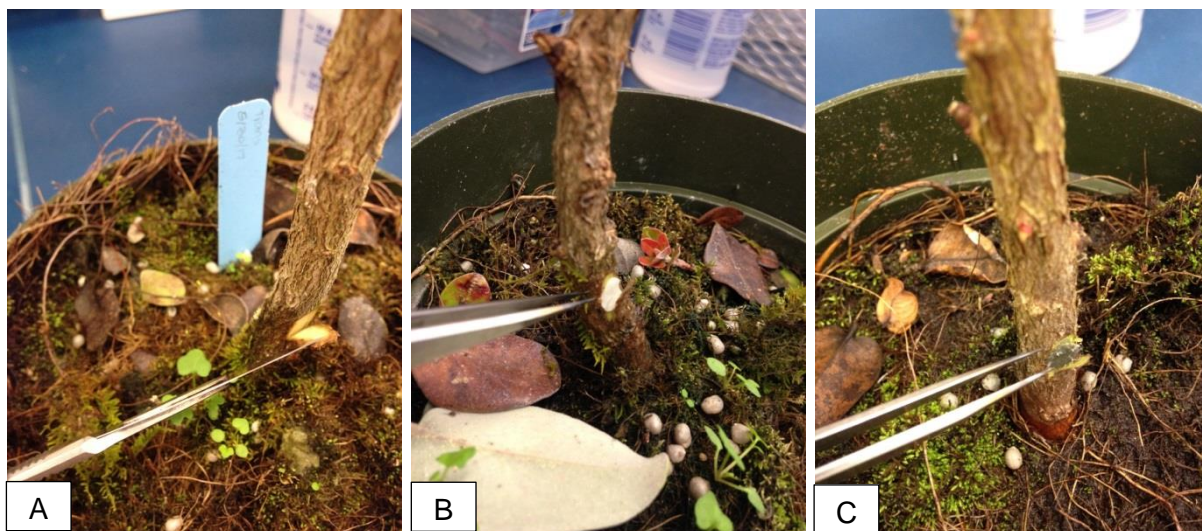
Primeiramente foram inoculadas as testemunhas. Com a ajuda de uma pinça devidamente esterilizada retiraram-se os discos de papel que haviam sido embebidos na água destilada e autoclavada e estavam na placa com meio de

cultura V8. Eles foram depositados sobre o corte longitudinal e em seguida esse foi vedado com um filme de parafina plástica. Por fim, borrifou-se água destilada e autoclavada sobre o ponto de inoculação para manter a umidade do local elevada.

De forma semelhante foi realizada a inoculação com o patógeno. Com o auxílio de uma pinça previamente esterilizada retirou-se um disco de papel da placa com meio de cultura V8 que estava com crescimento fúngico. Depositou-se o disco no corte realizado entre o alburno e a casca e depois o ferimento foi vedado com filme de parafina plástica. Também foi borrifada água destilada e autoclavada sobre o ponto de inoculação para elevar a umidade do local. Esse processo foi reproduzido com todas as mudas de forma que os materiais de auxílio como bisturi e pinça foram esterilizados entre todas as repetições.

Após a inoculação todas as mudas foram distribuídas aleatoriamente em uma câmara de crescimento com temperatura controlada de  $25 \pm 1^\circ \text{C}$  e fotoperíodo de 12h. Essas receberam irrigação uma vez ao dia até a capacidade de campo durante o período de condução do experimento.

**Figura 2 – Procedimento de inoculação usado em mudas de ohia. A – Corte longitudinal realizado em todas as plantas. B – Inoculação das testemunhas. C – Inoculação de *C. lukuhia***



#### 1.2.4 Retirada das amostras

Na avaliação de antes da inoculação foram usadas três mudas de ohia, já nas demais avaliações foram amostradas quatro plantas, sendo uma testemunha e três

inoculadas com *C. lukuohia*. As avaliações tiveram início no dia 20/02/2019, de forma que os sintomas de murcha foram observados diariamente e as avaliações destrutivas, nas quais foram verificados os sintomas de escurecimento dos vasos foram realizadas a cada sete dias.

As análises destrutivas das plantas consistiram em: com o auxílio de uma tesoura de poda e de um bisturi, retiraram-se três amostras das plantas menores: 5 cm acima do local da inoculação, 30 cm acima do local da inoculação, a porção apical da muda. Nas plantas mais altas, além desses três, foram retiradas amostras 60 cm acima do local da inoculação e 90 cm acima da inoculação. Os instrumentos de corte foram esterilizados entre cada uma das amostragens. Em cada uma dessas amostras observou-se a presença ou ausência de sintomas visíveis nos tecidos, como o escurecimento dos mesmos, e também foram retiradas subamostras para os testes de diagnose em disco de cenoura e Real-time PCR.

#### 1.2.5 Discos de Cenoura

Para o isolamento em discos de cenoura utilizou-se como base o método descrito por Moller & DeVay (1968). Primeiramente os fragmentos de tecido vegetal foram imersos em solução com etanol 70% por um minuto, em seguida transferidos para uma solução de hipoclorito de sódio a 2% também por um minuto, então foram imersos em um recipiente com água destilada e esterilizada, e finalmente foram secos em papel filtro autoclavado. Colocaram-se os fragmentos em discos de cenoura que haviam sido esterilizados com etanol, formando “sanduíches de cenoura” que foram vedados com filme de parafina plástica para manter o tecido vegetal em contato com a cenoura. Cada sanduíche foi acondicionado em um saco plástico com zíper, no qual foi borrifada água destilada antes de este ser fechado. As amostras foram colocadas em caixas plásticas e deixadas sob temperatura ambiente por sete dias, sendo avaliadas ao final desse período. As avaliações consistiram em observações das estruturas características do patógeno ao microscópio estereoscópio.

### 1.2.6 Extração do DNA e Real-time PCR

Para a extração do DNA das amostras utilizou-se o kit comercial de extração de DNA de plantas (NucleoSpin Plant-II DNA kit, Machery-Nagel, Bethlehem, PA) obedecendo o protocolo fornecido pelo fabricante com as algumas alterações. Primeiramente, os volumes adicionados do tampão PL2, que é usado com a amostra de madeira inicial e o reagente PL3, usado com o material previamente triturado foram o dobro (600  $\mu$ l e 150  $\mu$ l, respectivamente). Além disso, as amostras iniciais e as que estavam com o tampão de extração foram homogeneizadas duas vezes por 60s em um homogeneizador de tecidos (FastPrep-24, MP Biomedicals, Solon, OH) com uma incubação de 10 minutos a 65° C entre os dois intervalos de moagem. Apenas 300  $\mu$ l do produto clarificado da lise foram transferidos para dar sequencia a obtenção do DNA, da os demais reagentes foram usados conforme dizia o protocolo.

Diluiu-se 1  $\mu$ l do DNA extraído em 40  $\mu$ l de água destilada e autoclavada. Para as reações de qPCR eram utilizados 4  $\mu$ l do DNA diluído e 6  $\mu$ l de um Master Mix composto por 5  $\mu$ l de uma mistura para reações (SensiFAST Probes Hi-ROX, Bioline, Taunton, MA) e 1  $\mu$ l de uma mistura de Primers e Sondas (*C. lukuohia*/MeNu47 e *C. huliohia*/MeNu47) usados em práticas de rotina do laboratório (Tabela 1).

As condições da reação foram: uma desnaturação inicial de 2 min a 95°C seguida de quarenta ciclos de 10 s a 95°C e 30 s a 60°C. Valores de CT entre 16 e 40 foram considerados positivos para as detecções do patógeno.

Tabela 1 – Sequencia dos nucleotídeos de Primers e Sondas utilizadas nas análises de detecção de *C. lukuohia*

<b>Espécie alvo</b>	<b>Primer / Sonda</b>	<b>Sequencia (5´- 3´)</b>	<b>TM (°C)</b>	<b>Tamanho do produto (Pb)</b>
<i>C. lukuohia</i>	CP_For_A	TCCTGACATCGCCGGC	58,7	147
<i>C. lukuohia</i>	CP_Rev_A	CCAACCAGTTTGTAGTGAAGGCAGT	58,4	147
<i>C. huliobia</i>	CP_For_B	GGTGTTCCCTGACATTGCCAG	61,3	151
<i>C. huliobia</i>	CP_For_B	CAACCAGTTTAATGAAGGCATCG	59,5	151
<i>Ceratocystis</i> spp.	CP_Uni_Probe FAM	TACTTGCTGGAAGGTCAC	70,0	147-152
<i>Myrtaceae</i>	MeNu47_+20For	CTCCTATAAGGTAATCAACTCCTCATTG	58,0	167
<i>Myrtaceae</i>	MeNu47_+186R	CAACGACTAGGCAATTTATGGAGAA	59,8	167
<i>Myrtaceae</i>	MeNu47_Probe	CTTCTGATGTCAAAGCAGA	69,0	167

## 2. 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para melhor entendimento e visualização, os resultados estão apresentados na forma de tabelas (Tabela 2 a 10), sendo que cada tabela corresponde às avaliações feitas em uma semana, começando pelo tratamento de antes da inoculação, até os cinquenta e seis dias após a inoculação.

**Tabela 2 – Resultado das avaliações de antes da inoculação**

<b>Plantas (repetições)</b>	<b>Murcha</b>	<b>Parte da planta amostrada (cm)</b>	<b>Escurecime nto dos vasos condutores</b>	<b>Cenoura</b>	<b>Real-Time PCR</b>
R1	Não	5	–	–	–
		30	–	–	–
		60	–	–	–
		90	–	–	–
		Apical	–	–	–
R2	Não	5	–	–	–
		30	–	–	–
		60	n.a.	n.a.	n.a.
		90	n.a.	n.a.	n.a.
		Apical	–	–	–
R3	Não	5	–	–	–
		30	–	–	–
		60	–	–	–
		90	n.a.	n.a.	n.a.
		Apical	–	–	–

n.a: não avaliada – a planta não possuía a altura suficiente para a retirada dessas amostras.

Tabela 3- Resultado das avaliações sete dias após a inoculação

Plantas (repetições)	Murcha	Parte da planta amostrada (cm)	Escurecime nto dos vasos condutores	Cenoura	Real- Time PCR
T	Não	5	-	-	-
		30	-	-	-
		60	-	-	-
		90	n.a.	n.a.	n.a.
		Apical	-	-	-
R1	Não	5	-	+	+
		30	-	-	-
		60	-	-	-
		90	n.a.	n.a.	n.a.
		Apical	-	-	-
R2	Não	5	+	+	+
		30	-	+	+
		60	n.a.	n.a.	n.a.
		90	n.a.	n.a.	n.a.
		Apical	-	-	-
R3	Não	5	+	+	+
		30	-	+	+
		60	-	-	-
		90	-	-	-
		Apical	-	-	-

n.a: não avaliada – a planta não possuía a altura suficiente para a retirada dessas amostras.

Tabela 4 – Resultado das avaliações de quatorze dias após a inoculação

Plantas (repetições)	Murcha	Parte da planta amostrada (cm)	Escurecimento dos vasos condutores	Cenoura	Real-Time PCR
T	Não	5	–	–	–
		30	–	–	–
		60	n.a.	n.a.	n.a.
		90	n.a.	n.a.	n.a.
		Apical	–	–	–
R1	Não	5	+	+	+
		30	+	+	+
		60	–	–	–
		90	–	–	–
		Apical	–	–	–
R2	Não	5	+	+	+
		30	+	+	+
		60	n.a.	n.a.	n.a.
		90	n.a.	n.a.	n.a.
		Apical	–	–	–
R3	Não	5	–	+	+
		30	–	–	–
		60	–	–	–
		90	–	–	–
		Apical	–	–	–

n.a: não avaliada – a planta não possuía a altura suficiente para a retirada dessas amostras.

Tabela 5 – Resultado das avaliações de vinte e um dias após a inoculação

Plantas (repetições)	Murcha	Parte da planta amostrada (cm)	Escurecimento dos vasos condutores	Cenoura	Real-Time PCR
T	Não	5	–	–	–
		30	–	–	–
		60	–	–	–
		90	–	–	–
		Apical	–	–	–
R1	Sim	5	+	+	+
		30	+	+	+
		60	+	+	+
		90	+	+	+
		Apical	–	–	–
R2	Sim	5	+	+	+
		30	+	+	+
		60	–	–	–
		90	–	–	–
		Apical	–	–	–
R3	Não	5	+	+	+
		30	–	–	–
		60	–	–	–
		90	–	–	–
		Apical	–	–	–

Tabela 6 – Resultado das avaliações de vinte e oito dias após a inoculação

Plantas (repetições)	Murcha	Parte da planta amostrada (cm)	Escurecimento dos vasos condutores	Cenoura	Real-Time PCR
T	Não	5	–	–	–
		30	–	–	–
		60	–	–	–
		90	n.a.	n.a.	n.a.
		Apical	–	–	–
R1	Sim	5	+	+	+
		30	+	+	+
		60	–	–	–
		90	–	–	–
		Apical	–	–	–
R2	Sim	5	+	+	+
		30	+	+	+
		60	+	+	+
		90	+	+	+
		Apical	–	–	–
R3	Não	5	–	–	–
		30	–	–	–
		60	n.a.	n.a.	n.a.
		90	n.a.	n.a.	n.a.
		Apical	–	–	–

n.a: não avaliada – a planta não possuía a altura suficiente para a retirada dessas amostras.

Tabela 7 – Resultado das avaliações de trinta e cinco dias após a inoculação

Plantas (repetições)	Murcha	Parte da planta amostrada (cm)	Escurecimento dos vasos condutores	Cenoura	Real-Time PCR
T	Não	5	–	–	–
		30	–	–	–
		60	–	–	–
		90	n.a.	n.a.	n.a.
		Apical	–	–	–
R1	Não	5	+	+	+
		30	+	+	+
		60	–	–	–
		90	–	–	–
		Apical	–	–	–
R2	Sim	5	+	+	–
		30	+	+	+
		60	+	+	+
		90	+	+	+
		Apical	–	–	–
R3	Sim	5	+	+	+
		30	+	+	+
		60	–	–	–
		90	n.a.	n.a.	n.a.
		Apical	–	–	–

n.a: não avaliada – a planta não possuía a altura suficiente para a retirada dessas amostras.

Tabela 8 – Resultado das avaliações de quarenta e dois dias após a inoculação

Plantas (repetições)	Murcha	Parte da planta amostrada (cm)	Escurecimento dos vasos condutores	Cenoura	Real-Time PCR
T	Não	5	–	–	–
		30	–	–	–
		60	–	–	–
		90	n.a.	n.a.	n.a.
		Apical	–	–	–
R1	Não	5	+	+	+
		30	+	+	+
		60	–	–	–
		90	–	–	–
		Apical	–	–	–
R2	Sim	5	+	+	+
		30	+	+	+
		60	+	+	+
		90	+	+	+
		Apical	–	–	–
R3	Não	5	+	+	+
		30	+	+	+
		60	–	–	–
		90	n.a.	n.a.	n.a.
		Apical	–	–	–

n.a: não avaliada – a planta não possuía a altura suficiente para a retirada dessas amostras.

Tabela 9 – Resultado das avaliações de quarenta e nove dias após a inoculação

Plantas (repetições)	Murhca	Parte da planta amostrada (cm)	Escurecimento dos vasos condutores	Cenoura	Real-Time PCR
T	Não	5	–	–	–
		30	–	–	–
		60	–	–	–
		90	–	–	–
		Apical	–	–	–
R1	Sim	5	+	+	+
		30	+	+	+
		60	+	–	+
		90	n.a.	n.a.	n.a.
		Apical	–	–	–
R2	Sim	5	+	+	+
		30	+	+	+
		60	+	+	+
		90	+	+	+
		Apical	–	–	–
R3	Sim	5	+	+	+
		30	+	–	+
		60	n.a.	n.a.	n.a.
		90	n.a.	n.a.	n.a.
		Apical	–	–	–

n.a: não avaliada – a planta não possuía a altura suficiente para a retirada dessas amostras.

Tabela 10 – Resultado das avaliações de cinquenta e seis dias após a inoculação

Plantas (repetições)	Murcha	Parte da planta amostrada (cm)	Escurecimento dos vasos condutores	Cenoura	Real-Time PCR
T	Não	5	–	–	–
		30	–	–	–
		60	–	–	–
		90	n.a.	n.a.	n.a.
		Apical	–	–	–
R1	Não	5	+	+	+
		30	–	–	–
		60	–	–	–
		90	n.a.	n.a.	n.a.
		Apical	–	–	–
R2	Sim	5	+	+	+
		30	+	+	+
		60	+	+	+
		90	+	+	+
		Apical	–	–	–
R3	Não	5	+	+	+
		30	+	+	+
		60	n.a.	n.a.	n.a.
		90	n.a.	n.a.	n.a.
		Apical	–	–	–

n.a: não avaliada – a planta não possuía a altura suficiente para a retirada dessas amostras.

A avaliação de Antes da Inoculação não foi observado qualquer sintoma e os testes de isolamento com disco de cenoura e Real-Time PCR confirmaram resultados negativos para o patógeno em todas as repetições, comprovando a sanidade das mudas antes da aplicação dos tratamentos, de forma que todos os sintomas apresentados por elas foram posteriores às inoculações.

As plantas avaliadas com sete dias depois da inoculação não apresentavam murchas ou qualquer sintoma que fosse visível externamente, entretanto com a análise destrutiva da planta, observaram-se estrias escuras em duas das três repetições inoculadas (R1 e R2), na região de 5 cm acima da inoculação. Os sintomas eram característicos de *C. lukuohia* e ocorreram apenas nessas amostras. Entretanto, os testes de disco de cenoura e Real-Time PCR foram positivos para o patógeno em todas as amostras de 5 cm, com exceção da testemunha, isso significa que mesmo sem a descoloração dos tecidos visível a olho nú, o patógeno já havia colonizado o local. Firmino et al. (2015) mostraram que a colonização do patógeno ocorre de maneira muito rápida, trabalhando com isolados de *Ceratocystis* sp. provenientes de diferentes hospedeiros que foram capazes de germinar, penetrar e se desenvolver em cerca de seis horas em eucalipto, sendo que com doze horas foi possível observar um grande aumento no crescimento micelial do fungo e vinte e quatro horas após a inoculação alguns isolados já apresentavam a formação de conidióforos.

Os sintomas de murcha começaram a aparecer com 15 dias depois da inoculação, sendo que com 21 dias algumas plantas já estavam completamente secas. Essa observação mostra uma diferença entre os patossistemas de *C. lukuohia* em ohia e *C. fimbriata* em eucalipto, uma vez que os trabalhos de inoculação de mudas de eucalipto com *C. fimbriata* não apresentaram sintomas de murcha ou morte das plantas com menos de 30 dias de inoculação. A agressividade apresentada por *C. lukuohia* foi semelhante à *C. cacaofunesta*, que provocaram a murcha de mudas de cacau com 15 dias e morte com 30 dias após a inoculação (FIRMINO et al., 2018; FIRMINO et al., 2013; ZAUZA et al., 2004).

Em todo o experimento, de uma maneira geral a detecção do patógeno por ambas as técnicas foi extremamente ligada à presença de sintomas como a descoloração dos tecidos. De todas as amostras, menos de 7% tiveram resultados que divergiram entre a detecção do patógeno e a presença dos sintomas.

Todas as mudas amostradas aos 49 dias após a inoculação estavam completamente secas, de forma que nas amostras R1 60 e R3 30 verificou-se a presença do escurecimento dos vasos, entretanto a detecção ocorreu apenas pelo método de Real-Time PCR. Esse método de detecção baseia-se na presença do material genético do patógeno, não importando se ele está viável ou não (PILOTTI et al., 2012). Já no disco de cenoura, o patógeno precisa estar viável para se reproduzir e isso não aconteceu nas partes mais estreitas do caule, visto que elas estavam extremamente secas. Para o monitoramento de *C. lukohia*, realizado na ilha, é importante que o patógeno seja detectado, estando viável ou não, entretanto, para a questão de transmissão do mesmo ele precisa estar em condições de se reproduzir para ser propagado, portanto, não existe vantagem do método de Real-Time PCR nesse aspecto.

Apenas em quatro amostras não foram observados sintomas de escurecimento do caule e os testes de diagnose foram positivos, sendo que todas elas ocorreram logo no início do experimento: R1 5, R2 30 e R3 30 da avaliação com sete dias após a inoculação e R3 5 avaliada duas semanas depois da inoculação. Nas demais semanas, observou-se uma relação muito forte entre a descoloração do tecido e a detecção do patógeno. Para confirmar ainda mais essa relação, em alguns pontos de amostragem foram feitas divisões das análises em: com sintoma e sem sintoma, e em alguns pontos onde havia brotação lateral na região com sintoma, foram feitos os testes de diagnose nessas brotações (Figura 3).

Figura 3 – Amostras usadas nos testes de detecção de *C. lukuohia* em ohia. A: Divisão do caule 30 cm acima da inoculação de acordo com o escurecimento do tecido. B: Caule 5 cm acima da inoculação com escurecimento dos vasos e brotação lateral.



Foram cinco plantas testadas com a separação de cada ponto de amostragem de acordo com o sintoma, e em todas elas os dois testes de diagnose foram positivos apenas para a parte com escurecimento do tecido. Mesmo estando ao lado da região sintomática, a detecção do patógeno nesses pontos não foi possível, assim como nas brotações laterais ele não foi detectado, por ambas as técnicas.

Na avaliação de 28 dias após a inoculação havia duas mudas completamente secas (R1 e R3), entretanto em uma delas (R3) não foi observado o escurecimento dos vasos e nem se detectou *C. lukuohia* com os testes de diagnose. Após a penetração do fungo na planta, ele se movimenta pelo xilema e parênquima radial, mas as plantas lenhosas possuem mecanismos de defesa para tentar conter a avanço do microrganismo (MAFIA et al., 2013). Uma delas é a formação de tiloses, constatadas em eucalipto infectado por *C. fimbriata*, que consistem na deposição de géis e gengivas de forma parcial ou total nos vasos do xilema e acabam provocando o bloqueio dos mesmos até para a passagem de água (TUMURA et al., 2011, CLÉRIVET et al. 2000). Esse pode ter sido o motivo pelo qual houve a morte da planta sem a constatação dos sintomas e do patógeno, ou então, foi o próprio crescimento micelial do patógeno no interior dos vasos, pois em um curto espaço de tempo ele pode causar o mesmo efeito, obstruindo as perfurações nos elementos da

traqueia, resultando em falta de água na parte superior das plantas e podendo levar a morte (PASCHOLATI et al., 2008).

Dessa forma, pode-se concluir que para *C. lukuohia* a presença do patógeno em mudas está estreitamente ligado ao escurecimento dos tecidos, de forma que a disseminação por meio de mudas assintomáticas não é um problema a ser investigado mais a fundo. Outras formas de disseminação da doença são apontadas como mais problemáticas, como é o caso dos besouros escolitídeos (BARNES et al., 2018).

## REFERÊNCIAS

BARNES, I.; FOURIE, A.; WINGFIELD, M. J.; HARRINGTON, T.C.; MCNEW D.L.; SUGIYAMA, L.S.; LUIZ, B.C.; HELLER, W.P.; KEITH, L.M. New *Ceratocystis* species associated with rapid death of *Metrosideros polymorpha* in Hawaii. **Persoonia**. v. 40, p. 154-181, 2018.

CLÉRIVET, A.; D\_EON, V.; ALAMI, I.; LOPEZ, F.; GEIGER, J. P.; NICOLE, M. Tyloses and gels associated with cellulose accumulation in vessels are responses of plane tree seedlings (*Platanus acerifolia*) to the vascular fungus *Ceratocystis fimbriata* f. sp. platani. **Trees**. v. 15, p. 25–31, 2000.

FIRMINO, A.C.; TOZZE JÚNIOR, H. J.; FURTADO, E. L. Characterization of isolates of *Ceratocystis* spp. collected from different hosts In: FURTADO, E. L.; PASCHOLATI, S. F.; JESUS JUNIOR, W. C.; MORAES, W. B. (Org.). **Phitopathology of precision frontiers of science**. Botucatu: FEPAF, 2018, p. 247 - 330.

FIRMINO, A. C.; TANAKA, F. A. O.; SILVA, S. D. V. M.; ITO, M. F.; FURTADO, E. L. Colonização do xilema de eucalipto por *Ceratocystis* spp. isolado de diferentes hospedeiros. **Summa Phytopathol.**, Botucatu, v. 41, n. 2, p. 138-143, 2015.

FIRMINO, A. C.; TOZZE JÚNIOR, H. J.; DE SOUZA, I. C. G.; FURTADO, E. L. Resistência de genótipos de Eucalipto a *Ceratocystis* spp. **Scientia Forestalis**. Piracicaba, v. 41, n. 98, p. 165-173, 2013.

FRIDAY, J. B.; D. A. HERBERT. **Species Profiles for Pacific Island Agroforestry: *Metrosideros polymorpha*** (‘ōhi‘a). Hōlualoa, Hawai‘i. Permanent Agricultural Resources (PAR), 2006, p. 295. Disponível em: <http://www.traditionaltree.org>. Acesso em: 17 mar. 2019.

HELLER, W. P.; KEITH, L. M. Real-time PCR Assays to Detect and Distinguish the Rapid ‘Ōhi‘a Death Pathogens *Ceratocystis lukuohia* and *Ceratocystis huliohia*. **Phytopathology**. v. 108, n. 12, p. 1395-1401, 2018.

KEITH, L. M.; HUGHES, R. F.; SUGIYAMA, L. S.; HELLER, W. P.; BUSHE, B. C.; FRIDAY, J. B. First Report of *Ceratocystis* Wilt on ‘Ōhi‘a (*Metrosideros polymorpha*). **Plant Disease**.v. 99, p. 9, 2015.

LITTLE JR, E. L.; SKOLMEN, R. G. **Agriculture Handbook**. Manoa, College of Tropical Agriculture and Human Resources, University of Hawaii. 2003, n. 679. Disponível em: [https://www.ctahr.hawaii.edu/gsp/doc/Forestry/Little\\_Skolmen\\_CFT/CFT\\_Metrosideros\\_polymorpha.pdf](https://www.ctahr.hawaii.edu/gsp/doc/Forestry/Little_Skolmen_CFT/CFT_Metrosideros_polymorpha.pdf). Acesso em: 17 mar. 2019.

MAFIA, R. G.; FERREIRA, M. A.; ZAUZA, E. A. V.; SILVA, J. F.; COLODETTE, J. L.; ALFENAS, A. C. Impact of *Ceratocystis* wilt on eucalyptus tree growth and cellulose pulp yield. **Forest Pathology**. v. 43, p. 379-385, 2013.

MOLLER, W. J., AND DEVAY, J. E. Carrot as a species-selective medium for *Ceratocystis fimbriata*. **Phytopathology**. v. 58, p. 123-124, 1968.

MORTENSON, L. A.; HUGHES, R. F.; FRIDAY, J. B.; KEITH, L. M.; BARBOSA, J. M.; FRIDAY, N. J.; LIU, Z.; SOWARDS, T. G. Assessing spatial distribution, stand impacts and rate of *Ceratocystis fimbriata* induced 'o'hi'a (*Metrosideros polymorpha*) mortality in a tropical wet forest, Hawai'i Island, USA. **Forest Ecology and Management**. v.377, p. 83-92, 2016.

PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B.; STANGARLIN, J.R.; CIA, P. **Interação planta-patógeno: Fisiologia Bioquímica e Biologia Molecular**. 1th Ed. Piracicaba SP. Fealq, 2008. 627 p.

PILOTTI, M.; LUMIA, V.; DI LERNIA, G.; BRUNETTI, A. Development of Real-Time PCR for in wood-detection of *Ceratocystis platani*, the agent of canker stain of *Platanus* spp. **Eur J Plant Pathol**. v. 134; p. 61–79; 2012.

TUMURA, K. G. **Avaliação de resistência, análise epidemiológica e caracterização anatômica da madeira em clones de *Eucalyptus* sp. infectados por *Ceratocystis fimbriata***. 2011. 52f. Dissertação (Mestrado em Ciência Florestal) – Faculdade de Ciências Agronômicas – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

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

## CAPÍTULO 2

### DETECÇÃO DE *Ceratocystis fimbriata* EM MUDAS DE EUCALIPTO (*Eucalyptus* spp.)

Jéssica Karine Burim Cardoso, Bruno César Rossini, Celso Luis Marino, Edson Luiz Furtado

#### RESUMO

O eucalipto (*Eucalyptus* spp.) é a espécie predominante nas florestas plantadas do Brasil, sendo muito importante para a economia do país. Existem diversos patógenos que podem interferir na cultura durante todas as fases da planta, dentre os quais pode-se destacar o fungo *Ceratocystis fimbriata*. O patógeno provoca a chamada murcha de Ceratocystis, ele coloniza e bloqueia os vasos do xilema, resultando na murcha e morte das plantas. Existem indícios de que o patógeno possa ser propagado por meio de mudas contaminadas assintomáticas, sendo assim, o objetivo desse trabalho foi identificar uma técnica capaz de detectar o fungo em mudas de eucalipto inoculadas ou brotações obtidas de árvores que estavam naturalmente infectadas, ambas sem os sintomas característicos da doença. Foram testados os primers ITS, IGS, TEF-1 $\alpha$ ,  $\beta$ - tubulina, Cer-MCM7, CMFAT1 e o conjunto X9978a / CFM2-F com a técnica de PCR convencional, entretanto nenhum foi eficiente na detecção do DNA do patógeno extraído diretamente do eucalipto. Um protocolo de Real-Time PCR também foi testado, com primers e probes para *C. fimbriata* e mostrou que essa técnica é mais eficiente em detectar o DNA do patógeno mesmo em baixas quantidades, entretanto, mais análises com esse protocolo devem ser realizadas para verificar se *C. fimbriata* pode ser transmitido por meio de mudas de eucalipto assintomáticas.

**Palavras chave:** Murcha de Ceratocystis. Murcha vascular. Propagação vegetativa. Real-Time PCR. PCR convencional.

## ABSTRACT

*Eucalyptus* (*Eucalyptus* spp.) is the predominant tree in planted forests in Brazil and is very important for the country's economy. There are several pathogens that cause damage in the crop, in the seedlings and adult plants. The fungus *Ceratocystis fimbriata* is one of the most important, it causes the Ceratocystis wilt. The fungus colonizes and blocks xylem vessels, resulting in wilting and death of plants. There are some hypothesis that the pathogen can be propagated by asymptomatic contaminated seedlings. So, the objective of this work was to identify a technique capable to detect the fungus in inoculated eucalyptus seedlings or buddings obtained from naturally infected trees, both without the symptoms of the disease. The ITS, IGS, TEF-1 $\alpha$ ,  $\beta$ -tubulin, Cer-MCM7, CMFAT1 primers and X9978a / CFM2-F primers were tested using the conventional PCR technique, but none were efficient to detect the DNA of the pathogen that was extracted directly from eucalyptus. A Real-Time PCR protocol was also tested, with primers and probes for *C. fimbriata* and showed that this technique is more efficient in detecting the DNA of the pathogen even in low amounts, however, further analysis with this protocol should be performed to verify that *C. fimbriata* can be transmitted by asymptomatic eucalyptus seedlings.

**Key words:** Ceratocystis wilt. Vascular wilt. Vegetative propagation. Real-Time PCR. Conventional PCR.

## 2.1 INTRODUÇÃO

O Brasil possui 7,83 milhões de hectares com florestas plantadas, dos quais 5,7 milhões são áreas com eucalipto (*Eucalyptus* spp.) que se distribuem principalmente nos estados de Minas Gerais (24%), São Paulo (17%) e no Mato Grosso do Sul (16%) (RELATÓRIO IBA, 2019). A predominância do gênero é justificada pelos inúmeros produtos e subprodutos obtidos com cultura, como papel, celulose, carvão vegetal, biomassa, postes, moirões, pisos laminados, entre outros (LONGUE JÚNIOR & COLODETTE, 2013). Isso mostra a importância econômica que o eucalipto tem para o Brasil, visto que apesar da área total com florestas plantadas não ser significativa comparada à extensão territorial do país, ela é responsável por mais de 90% da madeira produzida para fins industriais e por 6,9% do PIB industrial do país (RELATÓRIO IBA, 2019).

Pertencente à família Myrtaceae, as espécies do gênero *Eucalyptus* são originárias da Austrália e regiões próximas, como o sul das Filipinas, Timor e Indonésia, mas várias delas se adaptaram muito bem às regiões brasileiras e por possuírem uma elevada capacidade de extração de água e nutrientes podem ser cultivadas em ambientes considerados desfavoráveis para outras culturas (ELDRIDGE et al. 1994, FERREIRA et al., 2006).

Assim como as demais culturas, o eucalipto (*Eucalyptus* spp.) está sujeito ao ataque de patógenos durante todo seu desenvolvimento, ou seja, desde a fase de mudas em viveiros até a formação de plantas adultas. Esses ataques podem provocar a morte das plantas ou perdas na produtividade das plantações (FERREIRA & MILANI, 2012).

Um patógeno que tem causado danos econômicos importantes no eucalipto é o *Ceratocystis fimbriata* Ellis & Halsted, que provoca a chamada murcha de Ceratocystis, relatada pela primeira vez no Brasil em 1997, em plantas de eucalipto no sudoeste da Bahia (FERREIRA et al., 1999; LAIA et al., 1998). *C. fimbriata* pertence ao filo Ascomycota, classe Sordariomycetes, subclasse Hypocreomycetidae, ordem Microascales e família Ceratocystidaceae (INDEX FUNGORUM, 2019).

O patógeno se caracteriza por produzir ascos hialinos, unicelulares, que são liberados de dentro de corpos de frutificação do tipo peritécio com um aspecto gelatinoso. Os peritécios são pretos e eruptivos, cujo rostro é facilmente visível.

Além disso, há também a produção de conidióforos com microconídios hialinos em seu interior e macroconídios pigmentados em sua extremidade (TRINDADE & FURTADO, 1997).

A doença é sistêmica, sendo esse patógeno típico de xilema, ou seja, ela coloniza inicialmente o cambium, entre a casca e o xilema. Os sintomas observados são murcha e morte das plantas, sendo que existem dois padrões observados no campo. No primeiro a murcha começa pelos ramos finos da copa e progride lentamente em direção ao tronco, portanto a morte da árvore acontece aos poucos, no segundo caso, observa-se uma morte rápida da planta, antes mesmo da manifestação dos sintomas de murcha característicos, isso acontece quando a infecção do patógeno começa pelas raízes ou partes inferiores da planta (FURTADO et al., 2009).

Os danos provocados na cultura podem refletir economicamente. Estudos com *C. fimbriata* em eucalipto revelaram que na cadeia produtiva do carvão vegetal a doença pode provocar prejuízos de R\$ 7.000,00 ha<sup>-1</sup> no processo silvicultural, pois apesar de não alterar a produção e qualidade do carvão, ela reduz o número de plantas e a produtividade, conseqüentemente faz-se necessária uma maior área de plantio para suprir a demanda energética esperada (FERNANDES et al., 2012). Além disso, a incidência do patógeno pode provocar uma redução volumétrica nas árvores, diminuindo o rendimento de celulose durante a produção, aumentando a necessidade de reagentes químicos durante o processo industrial para a produção de papel e celulose, elevando em até 26,9 % o custo de produção do setor (ARAÚJO et al., 2007; MAFIA et al., 2013).

Trabalhos realizados com *C. fimbriata* na cultura do eucalipto mostraram que em mudas inoculadas, não houve a manifestação dos sintomas da doença externamente, mesmo em tecidos que foram colonizados pelo fungo (TUMURA, 2011; ZAUZA et al., 2004). Em viveiros, *C. fimbriata* foi constatada em hastes de brotações em banco clonal destinadas ao enraizamento de estacas e em mudas enraizadas na fase de aclimatação, no viveiro a céu aberto, além de serem encontradas no campo (FERREIRA et al., 2006).

Tendo em vista a importância do patógeno, a dificuldade de controle terapêutico em patógenos de xilema e os indícios de que o mesmo pode ser propagado para novas áreas por meio da propagação vegetativa feita na cultura do eucalipto, o objetivo desse trabalho foi encontrar um método de detecção molecular do patógeno

na planta antes mesmo da manifestação dos sintomas, para que ele possa ser usado em jardins clonais e viveiros a fim de evitar a disseminação de *C. fimbriata* para novas áreas por meio da distribuição de mudas contaminadas.

## 2.2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos nos Laboratórios do Instituto de Biotecnologia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, no Laboratório de Patologia Florestal localizado no Departamento de Proteção Vegetal da Faculdade de Ciências Agrônômicas, ambos em Botucatu, São Paulo, Brasil e no Laboratório de Patologia de Plantas do USDA, em Hilo no Havaí, EUA.

### 2.2.1 Coleta dos isolados e obtenção de isolados monospóricos

Para a realização do experimento foram coletados isolados de duas áreas diferentes com eucalipto plantado no estado de São Paulo, uma em Lençóis Paulista e outra na Fazenda Experimental Lageado em Botucatu. Com auxílio de um facão, cortaram-se os troncos de árvores aparentemente sintomáticas para a murcha de *Ceratocystis* e delas retiraram-se fragmentos dos tecidos que estavam escurecidos. Essas amostras foram levadas ao laboratório de Patologia Florestal do Departamento de Proteção Vegetal da FCA/Unesp, para o isolamento do patógeno.

Os fragmentos foram lavados com água corrente e sabão neutro, secos em papel toalha e cortados em segmentos de aproximadamente 0,5 cm. Passaram por uma desinfestação superficial, imersos em álcool 70% por um minuto, em seguida foram colocados em uma solução de hipoclorito de sódio a 2% e por fim lavados em água destilada e autoclavada e secos em papel filtro autoclavado. Os fragmentos foram depositados em placas de Petri com meio de cultura V8, armazenados sob condições controladas, com fotoperíodo de 12 horas e temperatura de  $25 \pm 1^\circ \text{C}$  por cerca de sete dias, quando foram repicados para novas placas de Petri com meio de cultura V8.

Quando os isolados estavam com dez dias de crescimento, foi realizado o procedimento para a obtenção dos isolados monospóricos. Retirou-se um fragmento do micélio e esse foi colocado em um erlenmeyer com 5 mL de água destilada e

autoclavada, sendo posteriormente agitado. Com o auxílio de um conta-gotas foram depositadas gotas da suspensão de esporos em áreas previamente demarcadas em placas de Petri com meio de cultura ágar-água. Essas placas ficaram sob condições controladas de temperatura e fotoperíodo ( $25 \pm 1^\circ \text{C}$  e 12h) por 24 horas. Após esse período, observaram-se no microscópio óptico os esporos que germinaram e estes foram transferidos com auxílio de agulhas descartáveis para novas placas com meio de cultura V8. Esses isolados foram incubados sob as mesmas condições anteriores para o seu crescimento e posteriormente foram preservados pelo método Castellani e armazenados na Micoteca do Departamento de Proteção de Plantas, da Faculdade de Ciências Agronômicas, FCA/Unesp, Campus de Botucatu.

### 2.2.2 Coleta de brotações e obtenção de mudas

Nas áreas em que se coletaram os isolados, foram coletadas também brotações aparentemente sadias de árvores de eucalipto com sintoma de murcha de *Ceratocystis* para a obtenção de mudas. Da Fazenda Experimental Lageado foram usadas duas árvores de *Eucalyptus grandis* como matrizes e da área em Lençóis Paulista foram usadas cinco árvores de *Eucalyptus urograndis*.

Com auxílio de uma tesoura de poda esterilizada com álcool e chama, cortaram-se as brotações de árvores mortas, sendo estas acondicionadas em caixas de isopor com jornal úmido, para evitar a perda de umidade das mesmas. O material de corte foi esterilizado entre todas as repetições.

Algumas brotações foram armazenadas no freezer a  $-20^\circ\text{C}$  para posterior extração do DNA, as demais foram levadas a casa de vegetação localizada no viveiro de mudas da FCA. Dessas brotações foram obtidas as estacas, com dois pares de folhas novas, cujas bases foram colocadas em um pó enraizador (Ácido Indol Butírico 5000ppm) e em seguida alocadas em bandejas com substrato previamente umedecido e composto por turfa, vermiculita, resíduo orgânico, resíduo orgânico agroindustrial classe A e calcário. As estacas permaneceram em casa de vegetação até o enraizamento, depois foram para a casa de sombra e posteriormente área de pleno sol para o crescimento e rustificação. Quando as mudas estavam prontas, foram transplantadas para uma casa de vegetação do Departamento de Proteção Vegetal da FCA, em um canaletão com substrato areia. As mudas foram adubadas diariamente com fertirrigação composta por: 100,8 g de

Nitrato de Cálcio, 34,8 g de Cloreto de Cálcio, 25,2 g de MAP, 44,4 g de KCl, 24,0 g de Sulfato de Amônio, 44,4 g de Sulfato de Magnésio, 60 mL de uma solução concentrada com micronutrientes em 1000 L de água.

### 2.2.3 Inoculação de mudas sadias

Para o experimento também foram inoculadas mudas de eucalipto (*Eucalyptus grandis*). Três mudas de eucalipto com 18 meses de idade foram obtidas junto ao viveiro de mudas da FCA e inoculadas com um dos isolados de *Ceratocystis fimbriata*.

No tronco, que estava com aproximadamente 1,5 cm de diâmetro, foi feito um corte longitudinal com o auxílio de um bisturi esterilizado, de maneira que as plantas tiveram o xilema exposto, sem que a casca fosse retirada. O inóculo utilizado foi um isolado de *Ceratocystis fimbriata* que havia sido incubado a 25°C por sete dias em meio de cultura V8. Com um furador de 0,5 cm de diâmetro previamente esterilizado, foram cortados os discos de micélio do fungo. Cada disco foi depositado no ponto de incisão, e sobre este foi colocado um algodão umedecido com água autoclavada, em seguida o local foi envolto por um filme de parafina plástica para evitar a dessecação no local. As plantas inoculadas foram mantidas em casa de vegetação sendo irrigadas diariamente até o dia da retirada de amostras.

### 2.2.4 Extração do DNA das amostras

Dois meses após a inoculação foram retiradas as subamostras para a extração do DNA. Cada planta foi segmentada em quatro partes, sendo elas: a região apical, cinquenta cm acima do ponto de inoculação, dois cm acima do ponto de inoculação e folhas da porção inferior da planta. Uma das plantas já estava com a parte apical completamente seca, de forma que desta não foi retirada a amostra da região apical, sendo assim, obteve-se um total de onze amostras provenientes das plantas inoculadas. Utilizaram-se também quatro brotações coletadas nas árvores sintomáticas da Fazenda Experimental Lageado. Dessa forma, foram testadas quinze amostras. Como controle utilizaram-se plântulas provenientes de sementes de eucalipto e que cresceram em placas de Petri com meio de cultura BDA e três mudas de eucalipto do viveiro de mudas da FCA.

Para a extração do DNA das amostras foi utilizado o protocolo conhecido como CTAB (Doyle & Doyle 1987) com algumas adaptações, sendo assim, macerou-se o tecido vegetal em nitrogênio líquido e para cada amostra adicionou-se 700 µL de tampão CTAB e 5 µL de β-mercapto. A mistura foi incubada a 65°C por meia hora, adicionou-se 600 µL de CIA (Clorofórmio: Álcool Isoamílico na proporção 25:1) e centrifugou-se a 12.000 rpm por cinco minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo, onde se adicionou 400 µL de isopropanol gelado e as amostras foram colocadas no ultra freezer a – 80°C por vinte minutos. Em seguida as amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm por dez minutos e o sobrenadante foi descartado. Lavou-se o precipitado com etanol 70% por duas vezes e com etanol absoluto uma vez, sendo cada lavagem de cinco minutos. O precipitado foi colocado na estufa a 50°C até a secagem e então se adicionou 100 µL de tampão tris\_EDTA com RNase (10 µg/mL) e incubaram-se as amostras a 37°C por uma hora. As amostras foram acondicionadas no freezer a -20°C.

#### 2.2.5 Análise por PCR convencional e Real-Time PCR.

A primeira metodologia escolhida para testar as amostras foi a PCR (Polymerase Chain Reaction) convencional. Para as reações de PCR utilizou-se 12,5 µL de PCR Master Mix (GoTaq Master Mix, Promega, EUA), 6 µL de água ultrapura, 3 µL do DNA e 1,75 µL do primer forward e 1,75 µL do primer reverse. Os primers testados foram escolhidos com base na literatura, adotando-se os conjuntos mais utilizados em trabalhos com *Ceratocystis fimbriata* e que apresentavam especificidade para este patógeno. Além desses, também foram testados primers desenhados com base no DNA de isolados que foram sequenciados. Os primers utilizados, suas sequencias e condições térmicas de funcionamento estão descritas na Tabela 11. Os resultados foram observados por eletroforese em gel de agarose 2%.

Tabela 11 – Informações sobre os primers usados nesse trabalho

Primers	Sequência (5' – 3')	Gene Alvo	Condições térmicas	Tamanho dos amplicons	Referencia
ITS	TCCGTAGGTGAACCTGCGG TCCTCCGCTTATTGATATGC	rDNA ITS	94°C 2 min; 32 x (94° 1 min; 55°C 30 s; 72°C 1 min); 72°C 7 min	550 pb	White et al. (1990)
$\beta$ - tubulina	TTCCCCCGTCTCCACTTCTTC ATG GACGAGATCGTTCATGTTGAA CTC	$\beta$ - tubulina	94°C 4 min; 30 x (94°C 50 s; 55°C 50 s; 72°C 50 s); 72°C 10 min.	600 pb	Glass & Donaldson (1995)
TEF-1 $\alpha$ (EFCF 2 / EFCF3)	TGCTCAACGGGTCTGGCCAT ATGGCCAGACCCGTGAGCA	Fator de alongação 1 $\alpha$	85°C 2 min; 94°C 1 min 35 s; 36 x (60°C 1 min; 72°C 1 min 30 s; 94° 30 s); 72°C 15 min.	1600 pb	Harrington (2009)
X9978a / CFM2-F	GCTAACCTTCACGCCAATTTT GCC GTTACAAGTGTTCCCAAAG	Mating types	94°C 2 min; 36 x (94°C 1 min, 58°C 1 min; 72°C 2 min); 72°C por 10 min.	1115 pb	Harrington (2014)
CMFAT1 – F / CMFAT1 – R	CAGCCTCGATTGAKGGTATGA GGCATT TTTACGCTGGTTAG	Mating types	94°C 2 min; 36 x (94°C 1 min, 58°C 1 min; 72°C 2 min); 72°C por 10 min.	1000 pb	Harrington (2014)

Cer-MCM7F /	ACICGIGTITCIGAYGTNAAGCC	Complexo de	96°C 5 min;	900 pb	Beer et al. (2014)
Cer-MCM7R	TTRGCAACACCAGGRTCACCC AT	manutenção de mini cromossomo componente 7	35 x (95°C 30 s, 55°C 30 s; 72°C 60 s); 72°C por 8 min.		
IGSf / IGSr	ACTTGTTGGCGTTGAGATCC CATGCATGGCTTAATCTTTGA	Intergenic spacer	94°C 5 min; 35 x (94°C 1 min, 54°C 1 min; 72°C 2 min) 72°C por 10 min.	600 pb	-

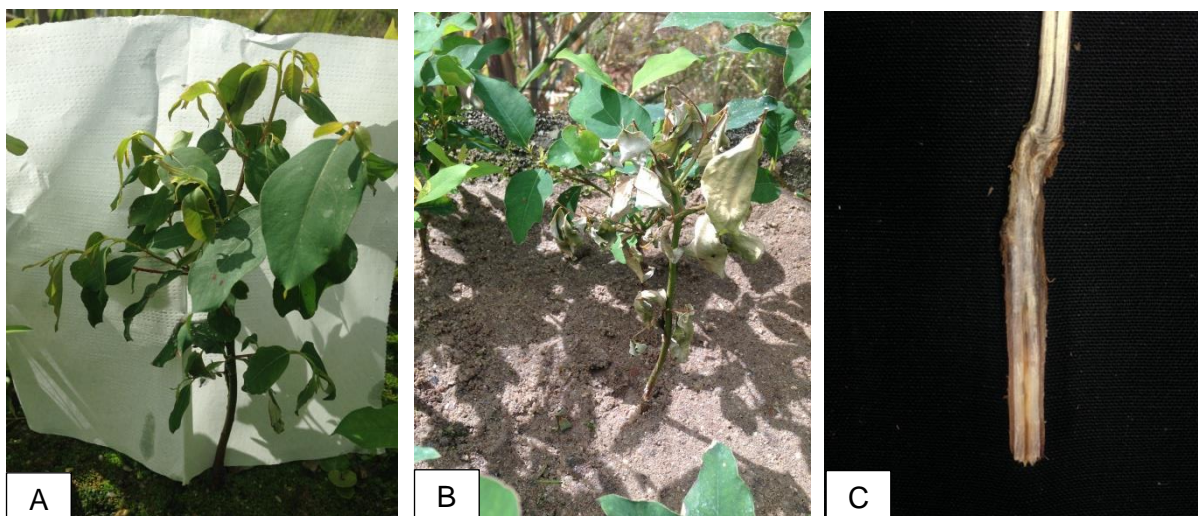
Outro teste realizado foi o Real-Time PCR, no laboratório de Patologia de Plantas do USDA, Hilo, EUA. Para a reação foi utilizado 4 µl do DNA e 6 µl do Master Mix composto por 5 µl de uma mistura para reações (SensiFAST Probes Hi-ROX, Bioline, Taunton, MA) e 1 µl de uma mistura de Primers e Sondas. O conjunto de primers escolhido havia sido desenhado para *C. fimbriata*, que ataca a cultura da batata doce no Haváí, sendo ele: CP\_For\_D 5' GGTATTCCTGACATCGCTGGA 3'; CP\_Rev\_D 5' CCAACCAGTTTAACAAAGGCATC 3' e a sonda CP\_Uni\_Probe FAM - TACTTGCTGGAAGGTCAC – MGB. A reação foi feita com uma desnaturação inicial de 2 min, com quarenta ciclos de 10 s a 95°C e 30 s a 60°C. Os valores de CT entre 16 e 40 foram considerados positivos para o patógeno.

## 2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 2.3.1 Obtenção de mudas e isolados monospóricos

Foram obtidas 96 mudas provenientes da área de Lençóis Paulistas e 70 mudas das brotações retiradas da Fazenda Experimental Lageado. As mudas provenientes do Lageado não manifestaram qualquer sintoma de murcha, entretanto, cinco mudas retiradas de Lençóis Paulistas secaram e morreram nos canaletões, mesmo com irrigações diárias. As mudas com sintomas de murcha apresentavam escurecimento do xilema e odor de fruta madura, sintomas característicos de *C. fimbriata*. Procedeu-se o isolamento conforme explicado no item 2.2.1 e verificou-se a presença de do patógeno (Figura 4).

**Figura 4 – Muda obtida de brotações de árvores com sintoma de *C. fimbriata*. A - sintomas iniciais de murcha. B – Sintomas avançados de murcha. C – Sintomas internos de escurecimento dos tecidos**



Os isolados obtidos das mudas também tiveram seu DNA extraído pelo método descrito em 2.2.4 e foram sequenciados pelo método Sanger como os demais obtidos anteriormente. O resultado do sequenciamento mostrou que utilizando a região ITS (ITS4/ITS5) tanto os isolados obtidos das árvores sintomáticas em Lençóis Paulistas, das mudas provenientes de suas brotações quanto da fazenda experimental do Lageado foram 100% idênticos ao isolado de *C. fimbriata*, número de acesso KF302679 no GenBank. Trabalhos anteriores já evidenciaram que os isolados encontrados no Brasil possuem grande semelhança genética entre si, com variações em poucos alelos, mas com diferenças na agressividade com relação aos hospedeiros (HARRINGTON et al., 2010).

Assim como evidenciado por pesquisas anteriores (TUMURA et al., 2011; ZAUZA et al., 2004; FIRMINO et al., 2013; FERREIRA et al., 2006) o fato de mudas obtidas de brotações aparentemente saudáveis, que estavam em árvores contaminadas com *C. fimbriata*, morrerem por causa desse patógeno fortalece a hipótese de que a transmissão da doença pode ocorrer por meio da propagação vegetativa que é realizada na cultura.

### 2.3.2 Análise por PCR convencional e Real-Time PCR.

As primeiras tentativas para encontrar uma metodologia capaz de diagnosticar o DNA do patógeno em mudas foram usando PCR convencional. Nos

testes com os isolados do fungo e o controle negativo, que era a plântula de eucalipto, os primers ITS 1 e 4 e EFCF3 apontaram resultado positivo para o controle negativo, em diversas repetições. Foram testados também outros DNAs de eucalipto já extraídos pertencentes ao laboratório do Instituto de Biotecnologia e os resultados foram os mesmos nos géis. Ao analisar o genoma do eucalipto (*Eucalyptus grandis*) foi constatado que existem regiões compatíveis deste com o conjunto de primers ITS e o primer TEF-1 $\alpha$ , dessa forma, esses primers foram excluídos das análises porque apesar de serem usados em trabalhos com o patógeno, ao se trabalhar com extrações do fungo direto do eucalipto, na presença do DNA vegetal o gel também aponta resultado positivo, pois os primers amplificam o DNA do eucalipto, mascarando o resultado do patógeno (PHYTOZOME, 2017).

O conjunto de primers da  $\beta$ - tubulina e o Cer-MCM7F / Cer-MCM7R não tiveram um bom desempenho com os isolados testados. Eles não amplificaram o DNA do patógeno, de forma que as bandas não apareceram no gel. Foram realizadas modificações nas condições de trabalho do termociclador e ainda assim, os resultados não foram satisfatórios. Geralmente a explicação para o não funcionamento de primers é atribuído a divergências nas condições de reação da PCR, como diferenças na enzima polimerase, na composição dos tampões e ajustes nos programas do termociclador (HORISAWA et al., 2009).

Os demais primers funcionaram nos testes preliminares com o DNA do patógeno e da planta controle. Entretanto, quando foram realizados os testes com o DNA das diferentes partes da mudas inoculadas e com as brotações coletadas de árvores sintomáticas no campo, conjunto de primers X9978a / CFM2-F não mostrou resultado positivo em nenhuma das amostras. O conjunto CMFAT1 – F / CMFAT1 – R não apresentou resultados consistentes. Em um dos géis ele apresentou bandas fracas para duas amostras de uma planta inoculada (cinquenta cm acima do ponto de inoculação e dois cm acima do ponto de inoculação). Mas na repetição do gel, não foram observadas bandas positivas para nenhuma das amostras. Resultado semelhante ocorreu com os conjuntos de primers IGSf/IGSr que apresentou bandas fracas em um dos géis, mas nas repetições esse resultado não foi mantido.

A técnica de PCR convencional tem menor custo quando comparada com outras técnicas moleculares, entretanto, sua eficiência para detecção é bem menor quando se trata de baixas quantidades de DNA na amostra, que é o caso de infecções que não apresentam sintomas visíveis. Já a técnica de Real-Time PCR

permite a detecção do fungo mesmo em baixas quantidades de DNA na amostra, de maneira que outros trabalhos que utilizaram essa metodologia foram capazes de identificar patógenos em plantas aparentemente saudáveis, que estavam infectadas mas antes da manifestação dos sintomas (LUCCHI et al., 2005; LUCCHI et al., 2006). Um desses trabalhos foi realizado com outra espécie do gênero *Ceratocystis*, no qual os pesquisadores conseguiram detectar a presença de *C. platani* em árvores de plátano que estavam aparentemente saudáveis, mas encontravam-se próximas a árvores com os sintomas da doença (LUCCHI et al., 2013).

O teste de Real-Time PCR apresentou sinais fortes para as amostras retiradas das regiões de inoculação, sendo o valor de CT do patógeno isolado igual a 20, e os valores para as regiões de inoculação iguais a 24, 25 e 27. Já para as demais regiões das plantas inoculadas e das brotações provenientes de mudas infectadas no campo, foram encontrados sinais fracos, que variaram de 34 a 38. Entretanto, o teste foi realizado em poucas amostras, que passaram por um período de viagem, descongelamento do DNA, ou seja, condições que podem ter degradado o material genético, dessa forma, o interessante é que seja feita a repetição da metodologia de Real-Time PCR em um maior número de amostras, para a validação do teste. Sendo assim, conclui-se que o teste de PCR convencional não é indicado para a detecção de *C. fimbriata* em tecidos assintomáticos, entretanto, a técnica de Real-Time PCR pode ser uma importante ferramenta para auxiliar na identificação do patógeno mesmo em mudas assintomáticas, portanto, deve-se encontrar maneiras de realizar o teste em mais amostras, para a confirmação dos indícios mostrados nesse em outros trabalhos de que o patógeno pode ser disseminado via propagação vegetativa, por meio de mudas contaminadas e assintomáticas.



## REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, J. C. P.; CARNEIRO, C. J. G.; SILVA, J. F.; GOMIDE, J. L. Influência da madeira com fungo *Ceratocystis fimbriata* no processo de produção de celulose e qualidade da celulose. **O Papel**. v. 68, n. 12, p. 95-105, 2007.
- BEER, Z. W. DUONG, T. A.; BARNES, I.; WINGFIELD, B.D.; WINGFIELD, M.J. Redefining *Ceratocystis* and allied genera. **Studies in Mycology**. v. 79, p. 187-219, 2014.
- DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, Ithaca, v.19, p.11-15, 1987.
- ELDRIDGE K.; DAVIDSON J.; HARWOOD C.; WYK G. **Eucalypt domestication and breeding**. Oxford: Oxford Science Publications, 1994. 288 p.
- FERNANDES, B. V. **Dinâmica espaço-temporal e quantificação dos danos e perdas da murcha de ceratocystis em eucalipto na produção de carvão vegetal**. 2012. 78f. Dissertação (Mestrado em Ciência Florestal) – Faculdade de Ciências Agrônomicas – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.
- FERREIRA, F.A.; MAFFIA, L.A.; BARRETO, R. W.; DEMUNER, N.L.; PIGATTO, S. Sintomatologia da murcha de *Ceratocystis fimbriata* em eucalipto. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 30, n. 2 p. 155-162, 2006.
- FERREIRA, F.A.; MILANI, D. **Diagnose visual e controle das doenças abióticas e bióticas do eucalipto no Brasil**. Viçosa: UFV, 2012. 97 p.
- FERREIRA, F. A.; DEMUNER, A. M.; DEMUNER, M. L.; PIGATO, S. Murcha de *Ceratocystis* em eucalipto no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 24, p. 284, 1999.
- FIRMINO, A. C.; TOZZE JÚNIOR, H. J.; DE SOUZA, I. C. G.; FURTADO, E. L. Resistência de genótipos de Eucalipto a *Ceratocystis* spp. **Scientia Forestalis**. Piracicaba, v. 41, n. 98, p. 165-173, 2013.
- FURTADO, E. L.; DIAS, D. C.; OHTO, C. T.; ROSA, D. D. **Doenças do eucalipto no Brasil**. 1 ed. Botucatu: Faculdade de Ciências Agrônomicas, 2009. 74 p.
- GLASS, N. L. E DONALDSON, G. C. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 61, p. 1323-1330, 1995.
- HARRINGTON, T. C.; KAZAMI, M. R.; AL-SADI, A. M.; ISMAIL, S. I. Intraspecific and intragenomic variability of ITS rDNA sequences reveals taxonomic problems in *Ceratocystis fimbriata* sensu stricto. **Mycologia**. v.106, p. 224-242, 2014.

HARRINGTON, T. C. The genus *Ceratocystis*. Where does the oak wilt fungus fit? In: APPEAL, D. N. & BILLINGS, R. F (Eds). **Proceedings of the 2nd National Oak Wilt Symposium**. Texas Forest Service. p. 21-35, 2009.

HORISAWA, S.; SAKUMA, Y.; DOI, S. Qualitative and quantitative PCR methods using species-specific primer for detection and identification of wood rot fungi. **J Wood Sci**. v. 55, p. 133-138, 2009.

Index Fungorum. Disponível em: <http://www.indexfungorum.org/Names/Names.asp>. Acesso em: 09 mai. 2019.

LAIA, M. L.; ALFENAS, A. C.; HARRINGTON, T. C. Métodos de isolamento e inoculação de *Ceratocystis fimbriata*, um patógeno cosmopolita que infecta espécies arbóreas de alto valor econômico. In: VIII Simpósio de iniciação científica da UFV, 1998, Viçosa. Resumos do VIII Simpósio de iniciação científica da UFV. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1998. p. 288-288.

LONGUE JÚNIOR, D.; COLODETTE, J. L. Importância e versatilidade da madeira de eucalipto para a indústria de base florestal. **Brazilian Journal of Forestry Research**. Colombo. v. 33, n. 76, p. 429-438, 2013.

LUCCHI, N.; GHELARDINI, L.; BELBAHRI, L.; QUARTIER, M.; SANTINI, A. Rapid Detection of *Ceratocystis platani* Inoculum by Quantitative Real-Time PCR Assay. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 79, n.17, p. 5394-5404, 2013.

LUCCHI, N.; CAPRETTI, P.; VETTRAINO, A.M.; VANNINI, A.; PINZANI, P.; PAZZAGLI, M. EARLY detection of *Biscogniauxia nummularia* in symptomless Euro European beech (*Fagus sylvatica* L.) by TaqMan real-time PCR. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 43, p. 33–38, 2006.

LUCCHI, N.; CAPRETTI, P.; PINZANI, P.; ORLANDO, C.; PAZZAGLI, M. Real-time PCR detection of *Biscogniauxia mediterranea* in symptomless oak tissue. **Applied and Environmental Microbiology**. v.41, p. 61–68, 2005.

MAFIA, R. G.; FERREIRA, M. A.; ZAUZA, E. A. V.; SILVA, J. F.; COLODETTE, J. L.; ALFENAS, A. C. Impact of *Ceratocystis* wilt on eucalyptus tree growth and cellulose pulp yield. **Forest Pathology**. v. 43, p. 379-385, 2013.

PHYTOZOME –The Plant Genomic Resource. The Regents of the University of California. Disponível em: <https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html#!seqQueryResults?id=2871203>. Acesso em 08 de jul. 2017.

RELATÓRIO IBÁ 2019. São Paulo: Indústria Brasileira de Árvores. Disponível em: <https://iba.org/datafiles/publicacoes/relatorios/iba-relatorioanual2019.pdf>. Acesso em: 03 out. 2019.

SUMÁRIO EXECUTIVO IBÁ 2018. São Paulo: Indústria Brasileira de Árvores. Disponível em: <https://www.iba.org/datafiles/publicacoes/relatorios/digital-sumarioexecutivo-2018.pdf> Aceso em: 25 de jun. 2018.

TRINDADE, D. R.; FURTADO, E. L. Doenças da Seringueira. In: Kimati, H. et al. (Eds). **Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 3. ed. São Paulo: Ceres, 1997. v.2. p.628-641.

TUMURA, K. G. **Avaliação de resistência, análise epidemiológica e caracterização anatômica da madeira em clones de *Eucalyptus* sp. infectados por *Ceratocystis fimbriata***. 2011. 52f. Dissertação (Mestrado em Ciência Florestal) – Faculdade de Ciências Agronômicas – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

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

WHITE, T.J. et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR **Protocols: a guide to methods and applications**. INNIS, M.A.; GELFAND, D.H.; SNINSKY, J.J.; WHITE, T.J. eds. New York: Academic Press, 1990. p. 315–322.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

*Ceratocystis* spp. é um patógeno que causa grandes problemas em diversas culturas e estudos sobre a sua disseminação são importantes para evitar que a doença seja propagada para novas áreas. Diversos trabalhos indicam que na cultura do eucalipto, a propagação vegetativa possa ser uma forma de disseminação do patógeno, quando se utiliza uma matriz contaminada para a obtenção de mudas.

Dessa forma, o presente trabalho buscou ferramentas para conseguir comprovar essa teoria, visando encontrar uma técnica capaz de detectar o DNA do patógeno em mudas de eucalipto assintomáticas.

Para isso, foi testado um protocolo de Real-Time PCR já existente para *C. lukuohia*, trabalhando com o mudas de ohia inoculadas com *C. lukuohia*. Como o fungo é do mesmo gênero de *C. fimbriata* e a planta hospedeira pertence à mesma família do eucalipto, a ideia foi traçar um paralelo entre o comportamento dos patógenos. Entretanto, o trabalho mostrou que a presença de *C. lukuohia* está estritamente ligada aos sintomas, diferente do que se tem observado com o patógeno do eucalipto.

Trabalhando com *C. fimbriata* no eucalipto, algumas brotações coletadas de árvores infectadas naturalmente que passaram pelo processo de formação de mudas morreram com o passar do tempo, indicando a presença do patógeno nas brotações aparentemente saudias.

A fim de conseguir uma técnica molecular para confirmação dessa hipótese, foram testados protocolos de PCR convencional e Real-Time PCR em mudas de eucalipto inoculadas artificialmente e nas brotações aparentemente saudias, obtidas de árvores contaminadas com *C. fimbriata*. Entretanto, a técnica de PCR convencional não foi eficiente, pois as diversas tentativas, com os mais variados primers utilizados para o patógeno não mostraram-se capazes de detectar o DNA do patógeno extraído diretamente do tecido vegetal. Já a técnica de Real-Time PCR foi utilizada com algumas amostras, no Havaí, e mostrou que é capaz de detectar o patógeno na planta, porém, foram testadas poucas amostras e estas passaram por horas de voo, fora das condições ideais para o material genético, que pode ter sofrido degradação. Sendo assim, o ideal é a repetição do protocolo com um grande número de amostras, para dar confiabilidade ao teste. Existem alguns empecilhos,

como a dificuldade de obtenção dos materiais utilizados e o alto custo. Porém, deve-se considerar o fato de que esse pode ser o teste para a confirmação de uma hipótese que vem sendo sugerida há anos pelas pesquisas com *C. fimbriata* em eucalipto, e futuramente poderia ser utilizada para evitar que mudas contaminadas e assintomáticas sejam propagadas para novas áreas.

## REFERÊNCIAS

BAKER C.J.; HARRINGTON T.C.; KRAUSS U.; ALFENAS A.C.; Genetic variability and host specialization in the Latin American clade of *Ceratocystis fimbriata*.

**Phytopathology**, v. 93, n. 10, p. 1274-84, 2003.

BARNES, I.; FOURIE, A.; WINGFIELD, M. J.; HARRINGTON, T.C.; MCNEW D.L.; SUGIYAMA, L.S.; LUIZ, B.C.; HELLER, W.P.; KEITH, L.M. New *Ceratocystis* species associated with rapid death of *Metrosideros polymorpha* in Hawaii. **Persoonia**, v. 40, p. 154-181, 2018.

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

ENGELBRECHT, C. J. B.; HARRINGTON, T. C. Intersterility, Morphology and Taxonomy of *Ceratocystis fimbriata* on Sweet Potato, Cacao and Sycamore.

**Mycologia**, v. 97, n.1, p. 57-69, 2005.

FERREIRA M.A.; HARRINGTON T.C.; PIVETA G.; ALFENAS A.C. Genetic variability suggests three populations of *Ceratocystis fimbriata* are responsible for the *Ceratocystis* wilt epidemic on kiwifruit in Brazil. **Tropical Plant Pathology**, v. 42 p. 86-95, 2017.

FERREIRA, F.A.; MILANI, D. **Diagnose visual e controle das doenças abióticas e bióticas do eucalipto no Brasil**. Viçosa: UFV, 2012. 97 p.

FERREIRA, M. A. **Estrutura genética de populações de *Ceratocystis fimbriata* e padrão espaço-temporal da murcha-de-*Ceratocystis***. 2009. 107 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Viçosa.

FERREIRA, F.A.; MAFFIA, L.A.; BARRETO, R. W.; DEMUNER, N.L.; PIGATTO, S. Sintomatologia da murcha de *Ceratocystis fimbriata* em eucalipto. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 30, n. 2 p. 155-162, 2006.

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

FURTADO, E. L.; DIAS, D. C.; OHTO, C. T.; ROSA, D. D. **Doenças do eucalipto no Brasil**. 1 ed. Botucatu: Faculdade de Ciências Agrônômicas, 2009. 74 p.

HARRINGTON T.C.; HUANG Q.; FERREIRA M.A.; ALFENAS A.C. Genetic analyses trace the Yunnan, China population of *Ceratocystis fimbriata* on pomegranate and taro to populations on *Eucalyptus* in Brazil. **Plant Disease**, v.99, p. 106–111, 2015.

HARRINGTON, T.C.; THORPE, D.J.; ALFENAS, A.C. Genetic variation and variation in aggressiveness to native and exotic hosts among Brazilian populations of *Ceratocystis fimbriata*. **Phytopathology**, St. Paul, v.101, p. 555-566, 2011.

HELLER, W. P.; KEITH, L. M. Real-time PCR Assays to Detect and Distinguish the Rapid 'Ōhi'a Death Pathogens *Ceratocystis lukuohia* and *Ceratocystis huliohia*. **Phytopathology**. v. 108, n. 12, p. 1395-1401, 2018.

KEITH, L. M.; HUGHES, R. F.; SUGIYAMA, L. S.; HELLER, W. P.; BUSHE, B. C.; FRIDAY, J. B. First Report of *Ceratocystis* Wilt on 'Ōhi'a (*Metrosideros polymorpha*). **Plant Disease**. v. 99, p. 9, 2015.

LAIA, M. L.; ALFENAS, A. C.; HARRINGTON, T. C. Isolation, detection in soil and inoculation of *Ceratocystis fimbriata*, causal agent of wilting, dieback and canker in eucalyptus. **Fitopatologia Brasileira**, v.25, p. 384-385, 2000.

LI Q.; HARRINGTON T.C.; MCNEW D.; LI J.; HUANG Q.; SOMASEKHARA Y.M.; ALFENAS A.C. Genetic bottlenecks for two populations of *Ceratocystis fimbriata* on sweet potato and pomegranate in China. **Plant Disease** v.100, p. 2266–2274, 2016.

MAFIA, R. G.; ALFENAS, A. C.; FERREIRA, E. M.; BINOTI, D. H. B. Método de seleção e identificação de fontes de resistência à murcha do eucalipto causada por *Ceratocystis fimbriata*. **Revista Árvore**. v. 35, p.817-824, 2011.

MORTENSON, L. A.; HUGHES, R. F.; FRIDAY, J. B.; KEITH, L. M.; BARBOSA, J. M.; FRIDAY, N. J.; LIU, Z.; SOWARDS, T. G. Assessing spatial distribution, stand impacts and rate of *Ceratocystis fimbriata* induced 'o'hi'a (*Metrosideros polymorpha*) mortality in a tropical wet forest, Hawai'i Island, USA. **Forest Ecology and Management**. v.377, p. 83-92, 2016.

RELATÓRIO IBÁ 2019. São Paulo: Indústria Brasileira de Árvores, 2019. Disponível em: <<https://iba.org/datafiles/publicacoes/relatorios/iba-relatorioanual2019.pdf>>. Acesso em: 03 out. 2019.

ROUX, J.; WINGFIELD, B. D.; WINGFIELD, M. J. *Ceratocystis* species: Taxonomic challenges in a group of pathogens of increasing global importance. In: FURTADO, E. L.; PASCHOLATI, S. F.; JESUS JUNIOR, W. C.; MORAES, W. B. (Org.). **Phitopathology of precision frontiers of science**. Botucatu: FEPAF, 2018, p. 247 - 330.

ROUX J., WINGFELD, M.J. *Ceratocystis* species: Emerging pathogens of non-native plantation Eucalyptus and Acacia species. **Southern Forests**. v. 71, p. 115-120, 2009.

TUMURA, K. G. **Avaliação de resistência, análise epidemiológica e caracterização anatômica da madeira em clones de *Eucalyptus* sp. infectados por *Ceratocystis fimbriata***. 2011. 52f. Dissertação (Mestrado em Ciência Florestal) – Faculdade de Ciências Agrônômicas – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.