Análise histológica de plantas de eucalipto resistentes
e suscetíveis inoculadas com *Ceratocystis fimbriata*Histological analysis of resistant and susceptible
eucalyptus plants inoculated with *Ceratocystis fimbriata*Ana Carolina Firmino¹, Hugo José Tozze Junior¹, Camila Maciel Viana²,
Everton Pires Soliman³, Izabel Christina Gava de Souza³, Magali Ribeiro da Silva⁴,
Larissa Escalfi Tristão² e Edson Luiz Furtado⁴**Resumo**

O gênero *Ceratocystis* contempla diversas espécies distribuídas em vários lugares do mundo. Uma planta infectada com este fungo apresenta como sintomas primários o escurecimento do sistema vascular e como sintomas secundários murcha, seca e morte da planta, decorrentes do colapso do xilema, causando pelo fungo. Estes sintomas são típicos de estresse hídrico e ocorre em plantas doentes como resultado do desenvolvimento do patógeno no interior de seus vasos e também por mecanismos de defesa da planta que bloqueiam vasos do xilema. O presente trabalho teve como objetivo realizar as análises das reações estruturais e bioquímicas que possam estar ligadas a resistência de plantas de eucalipto a *Ceratocystis*. Para observação das reações estruturais e bioquímicas das plantas de eucalipto à colonização do fungo, plantas de eucalipto de *Eucalyptus grandis* (Clone C3 resistente ao fungo e Clone C10 suscetível ao fungo) foram inoculadas com um isolado de *C. fimbriata*. Após a inoculação, fragmentos dos caules das plantas inoculadas foram coletados (7 e 21 dias após inoculação), fixados em "Karnovsky" e processadas para polimerização em historesina. Foram usadas diferentes técnicas para visualização de gomas e géis, grãos de amido, arginina, ligninas e tiloses. As tiloses, os géis e gomas foram observados em todas as plantas inoculadas com *Ceratocystis*. O acúmulo de lignina foi observado somente em plantas resistentes. O amido e a arginina foram observados em todas as plantas trabalhadas. Estes resultados sugerem que a resistência de eucalipto ao fungo *Ceratocystis* pode estar ligada a capacidade de acúmulo de ligninas nas células, já que esta estrutura somente foi visualizada em plantas resistentes inoculadas com o fungo.

Palavras-chave: doença vascular, murcha-do-eucalipto, patologia florestal, resistência.

Abstract

The genus *Ceratocystis* includes several species distributed throughout the world. A plant infected with this fungus presents as primary symptoms the darkening of the vascular system and as secondary symptoms wilt, dryness and death of the plant, due to the collapse of the xylem caused by the fungus. These symptoms are typical of water stress and occur in diseased plants as the result of the development of the pathogen inside their vessels and also by plant defense mechanisms that blocks xylem vessels. The present work had the objective of analyzing the structural and biochemical reactions that could be related to eucalyptus plants resistance to *Ceratocystis*. To observe the structural and biochemical reactions of eucalyptus plants colonized by the fungus, eucalyptus plants of *E. grandis* (Clone C3 resistant to fungus and Clone C10 susceptible to fungus) were inoculated with a *C. fimbriata* isolate. After inoculation, inoculated stems fragments were collected (7 and 21 days after inoculation), fixed in Karnovsky and processed by historesin polymerization. Different techniques were used to visualize gums and gels, starch grains, arginine, lignins and tyloses. Tyloses, gels and gums were observed in all plants inoculated with *Ceratocystis*. Lignin accumulation was observed only in resistant plants. Starch and arginine were observed in all worked plants. These results suggest that the eucalyptus resistance to the *Ceratocystis* fungus may be linked to the accumulation capacity of lignin in the cells, since this structure was only visualized in resistant plants inoculated with the fungus.

Keywords: Vascular disease, eucalyptus wilt, forest pathology, resistance.

¹Doutora em Proteção de Plantas. Unesp – Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" / Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas. Rodovia Comandante João Ribeiro de Barros, Km 651 - 17900000 - Dracena, SP, Brasil. E-mail: anacarfir@gmail.com; htozze@gmail.com.

²Graduanda em Engenharia Florestal. Unesp – Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" / Faculdade de Ciências Agrárias de Botucatu. Rua Doutor José Barbosa de Barros - 18610307 - Botucatu, SP, Brasil. E-mail: cramila@hotmail.com; larissaescalfi@hotmail.com.

³Pesquisador Doutor. Suzano Papel e Celulose. Unidade de Itapetininga, Av. Dr. José Lembo, 1010 - 18207-78 -Itapetininga, SP - Brasil. E-mail: epsoliman@suzano.com.br; izabelsouza@suzano.com.br.

⁴Professora Doutora no Departamento de Ciências Florestais. Unesp – Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" / Faculdade de Ciências Agrárias de Botucatu. Rua Doutor José Barbosa de Barros - 18610307 - Botucatu, SP, Brasil. E-mail: magaliribeiro@fca.unesp.br.

INTRODUÇÃO

O gênero *Ceratocystis* engloba diversas espécies de fungos amplamente distribuídas pelo mundo. No Brasil, *C. fimbriata* é uma das mais importantes, pois ataca espécies de importância econômica como mangueira (*Mangifera indica*) e eucalipto (*Eucalyptus* spp.) (FERREIRA, et al., 1999), figo (*Ficus carica*) (VALARINI; TOKESHI, 1980), seringueira (*Hevea brasiliensis*) (SILVEIRA, et al., 1994) e em teca (*Tectona grandis*) (FIRMINO et al, 2013).

A murcha-de-ceratocystis em eucalipto foi constatada primeiramente no sudeste da Bahia, 1997 (FERREIRA et al., 1999). Já foram registrados ocorrência no Espírito Santo, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, São Paulo, Maranhão e no Pará (ALFENAS et al., 2009; FERREIRA, 2009). Estudos sobre perdas no campo ocasionados pelo fungo *Ceratocystis* no sul da Bahia mostraram uma redução de 58% no incremento volumétrico de clones híbridos de eucalipto (*E. urograndis*) e de 13,7% no rendimento depurado de celulose (FERREIRA, et. al., 2007).

A disseminação de espécies de fungos do gênero *Ceratocystis* está associada com scolytídeos, conhecidos como besouros da Ambrósia (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae e Platypodinae) (BAKER, et al., 2003; ROSSETO et al., 1980). Uma vez no interior da planta, seu desenvolvimento inicial dá-se na região do câmbio.

O fungo *C. fimbriata* é um patógeno que coloniza o xilema da planta, causando o entupimento e o colapso deste. Assim, a planta infectada apresenta como sintoma característico estrias radiais escuras que seguem da medula para o exterior do lenho (FERREIRA; MILANE, 2002; FERREIRA et al., 2006). Estudos realizados com microscópio eletrônico de varredura, para o acompanhamento da colonização de *C. fimbriata* no xilema de eucalipto, apontam que ele é capaz de germinar, penetrar e se desenvolver nos elementos de vasos de plantas de eucalipto no período de seis horas, sendo que em doze horas após a inoculação observou-se um aumento da quantidade de micélio (FIRMINO et al., 2013).

As plantas infectadas por *Ceratocystis* também apresentam sintomas externos de perda de coloração verde-escura da folhagem, murcha das folhas e seca seguida de morte da planta. O estresse hídrico em plantas doentes pode ocorrer como resultado do crescimento de hifas do patógeno e/ou produção de esporo, nestes casos a presença dessas estruturas no interior dos vasos acaba por obstruir as perfurações existentes nos elementos traqueais (PASCHOLATI et al, 2008). Este estresse também pode ser atribuído ao incremento da viscosidade da seiva, decorrente da ação enzimática sobre os componentes dos tecidos do xilema.

Os sintomas de murcha e seca também podem ser consequência da ativação dos mecanismos de defesa da planta que bloqueiam partes dos vasos do xilema, como por exemplo, as tiloses, que são uma extensão do protoplasma das células do parênquima para o interior dos vasos do xilema (MACDONALD, MACNABB, 1974). TUMURA (2011) ao realizar cortes semi-finos dos vasos de plantas sadias e infectadas com *Ceratocystis*, notou a presença de aglomerados de amidos somente nas plantas infectadas.

A resistência ou suscetibilidade das plantas ao ataque de fungos fitopatogênicos é um fator determinado geneticamente, podendo ser elucidada por meio de estudos moleculares de regiões específicas do material genético. Outra forma de avaliação do grau de resistência/suscetibilidade da planta hospedeira pode ser feita através da análise de cortes histológicos recolhidos de tecidos de plantas inoculadas com fungos patogênicos e suas reações (ARAÚJO; MATSUOKA, 2004).

A análise microscópica destes cortes histológicos permite a identificação de mecanismos de resistência tanto estruturais, representados pelo aumento da lignificação das paredes e formação de tilos nos vasos do xilema, quanto bioquímicos (presença de compostos fenólicos e seus derivados, aminoácidos e amido) os quais representam tentativas do hospedeiro em paralisar a ação do fungo patogênico (TUMURA, 2011). Deste modo, o presente trabalho teve como objetivo terminar os mecanismos de resistência, estruturais e bioquímicos, envolvidos na interação de plantas de eucaliptos com *C. fimbriata*.

MATERIAL E MÉTODOS

A presente pesquisa foi desenvolvida nas dependências do Departamento de Patologia Florestal da Faculdade de Ciências Agrônômicas (FCA) da UNESP/Campus Botucatu e a preparação e observação das amostras foram feitas no Centro de Microscopia Eletrônica localizado na ESALQ/USP.

Obtenção dos isolados de *Ceratocystis*

O isolado de *Ceratocystis fimbriata* de eucalipto AFC38 (número no Genbank KC479034) foi obtido da micoteca do Laboratório de Patologia Florestal da FCA. Este isolado já havia sido identificado em nível de espécie via sequenciamento da região ITS-5.8S rDNA (FIRMINO et al., 2013). Para a realização dos testes, os fungos foram cultivados em meio MEA (malte, extrato de levedura e ágar).

Plantas de eucalipto utilizadas para o trabalho

Com base nos estudos realizados por Firmino et al. (2013), os quais testaram vários clones de eucaliptos em busca de resistência a *Ceratocystis*, foram utilizadas, no presente trabalho, plantas de *E. grandis* (com 3 meses de idade) que demonstraram reação de resistência (clone C3) e suscetibilidade (clone C10) a *Ceratocystis*.

Inoculação das plantas para desenvolvimento do trabalho

Para observação das reações estruturais e bioquímicas das plantas de eucalipto à *Ceratocystis*, primeiramente foi realizada uma incisão na planta (de cerca de dois centímetros no caule, 15 centímetros acima do solo) entre a casca e o lenho, e foi depositado 100µL de uma suspensão de 10⁸ esporos/ml (esporos do tipo cilíndricos). Após a inoculação, foi colocado um algodão umedecido com água esterilizada no local e, em seguida, este foi vedado com fita plástica. Como testemunhas, plantas foram inoculadas somente com 100µL água esterilizada. Foram realizadas 10 repetições por para cada tratamento.

Fragmentos dos caules (um centímetro acima do ponto de inoculação) das plantas usadas no experimento foram coletados em tempos pré-determinados: 7 e 21 dias após inoculação.

Avaliação das amostras em Microscópio Óptico de Luz (MOL)

As análises das amostras em MOL foram realizadas para observação das possíveis reações de resistência estruturais e bioquímicas de plantas de eucalipto inoculadas com *Ceratocystis*.

As amostras foram fixadas em "Karnovsky" e submetidas à desidratações em séries crescentes de concentração de etanol (40%, 50%, 70%, 90% – 10 minutos cada e 100% por três vezes de 10 minutos). Após esta etapa, as amostras foram infiltradas com uma mistura de etanol 100% misturado com solução de "Basic Resin" (v/v de 1:1) por duas horas. Na sequência, as amostras foram infiltradas somente com solução de "Basic Resin" pura durante 24 horas. Decorrido este tempo, as amostras foram colocadas em formas de silicone preenchidas com "Basic Resin" pura e historesina e secas em temperatura ambiente (na capela). Após total polimerização da resina, as amostras foram cortadas com o auxílio de uma navalha de aço para a obtenção de seguimentos semi-finos, que foram coletados e montados em lâminas de vidro contendo o corante específico para a estrutura ou composto a ser observado. Estas amostras foram processadas de acordo com o corante usado e foram visualizadas em MOL.

Foram realizadas colorações com: Lugol para visualização do amido e -Naftol para arginina, géis e gomas (FIGUEIREDO et al., 2007). Como ligninas possuem fluorescência natural, a visualização deste tipo de reação da planta foi realizada sem corante, em Microscópio Óptico com Luz Ultravioleta, utilizando filtro de excitação de 490nm (SOMAVILLA, 2010).

As lâminas foram analisadas em microscópio Jena Lumar, marca Zeiss. A captação das imagens foi realizada utilizando-se sistema de vídeo-câmara Opton, modelo TA-0124XS, instalada em microscópio óptico.

Avaliação das amostras em Microscópio de varredura

Para complementação do trabalho foram realizadas análises em Microscópio Eletrônico de Varredura. Fragmentos da planta inoculada (cerca de cinco milímetros de diâmetro) foram coletados e fixados em "Karnovsky" (glutaraldeído 2,5%, paraformaldeído 2,0%, tampão fosfato 0,05M, pH 7,2), por um período mínimo de 24 horas, para serem preparadas e analisadas ao microscópio eletrônico de varredura LEO435-VP. Após este período, as amostras foram retiradas do fixador e fragmentadas, seguindo a transferência destas para microtubos de 1,5 mL contendo tampão fosfato de sódio 0,05M, onde permaneceram por dez minutos. O tampão foi trocado três vezes. Subsequentemente as amostras foram desidratadas em série crescentes de concentração de acetona (30%, 50%,

70%, 90% – 10 minutos cada e 100% por três vezes de 10 minutos). Após esta etapa, as amostras foram levadas ao aparelho de ponto crítico (Baltec CPD 030) para completar a secagem. Após completa a desidratação as amostras foram cuidadosamente montadas em “stubs” com fita de carbono dupla face para aderência das amostras e cobertas com 20nm de ouro em aparelho Baltec SCD 050.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram observados em todas as plantas inoculadas com o isolado de *C. fimbriata* em todos os períodos analisados, a presença de tiloses (Figura 1 e 2) e de gomas e géis (Figura 1 e Tabela 1). As tiloses são uma extensão do protoplasma das células do parênquima para o interior dos vasos do xilema. Os géis são formados em decorrência da degradação das substâncias pécicas da célula e podem vir a formar gomas após a infusão dos compostos fenólicos. Géis e gomas podem interagir com polissacarídeos de origem fúngica incrementando a viscosidade da seiva e afetando mais a translocação do xilema (PASCHOLATI et al, 2008).

Tabela 1. Estruturas observadas nas amostras de plantas de eucalipto inoculadas e não inoculadas com *C. fimbriata*
Table 1. Structures observed in samples of eucalyptus plants inoculated and not inoculated with *C. fimbriata*

Estruturas* observadas	Plantas resistentes		Plantas suscetíveis	
	Inoculadas com <i>Ceratocystis</i>	Inoculadas somente com água	Inoculadas com <i>Ceratocystis</i>	Inoculadas somente com água
Tiloses	+	-	+	-
Gomas e géis	+	-	+	-
Lignina	+	-	-	-
Amido	+	+	+	+
Arginina	+	+	+	+

* Não observado (-); observado (+)

As tiloses, gomas e géis são formados após a colonização da planta pelo patógeno, são consideradas de resistência, pois impedem que o fungo colonize e se reproduza no seu interior, já que obstruem os vasos do xilema (PASCHOLATI et al, 2008). Há relatos que alguns tipos de géis produzidos pelas plantas para se defender de patógenos são constituídos de pectinas e hemiceluloses, podendo ser estabilizado pela formação de ligações cruzadas com fenóis ou então impregnado com substâncias antimicrobianas, como enxofre (COOPER et al., 1996).

Através da análise de fluorescência foi observado o espessamento da parede das células e acúmulo de lignina somente em plantas resistentes (Figura 1). A autofluorescência ocorre em combinações planta-patógeno onde há uma resposta de hipersensibilidade oriunda de uma incompatibilidade entre o patógeno e a planta, ou seja, quando existe certa resistência da planta. Um experimento realizado por Carver et al. (1991) pode elucidar este fenômeno com mais clareza. Os autores demonstraram que quando plantas de aveias resistentes a *Erysiphe graminis* f.sp. *avenae* são tratadas com inibidores da fenilalanina amônia-liase (FAL), enzima chave para a síntese de lignina, e inoculadas com o fungo logo após este tratamento estas se tornam suscetíveis, pois é observado uma redução na intensidade e frequência das respostas de células hospedeiras com autofluorescência. Os mesmos autores sugerem que a há uma relação com o aumento da suscetibilidade a infecção e a supressão da autofluorescência, pois a inibição da FAL provavelmente suprime o acúmulo de compostos fenólicos nos sítios próximos a colonização do patógeno, aumentando a suscetibilidade da planta (CARVER et al., 1991; 1994).

Estudos comprovam que certos fenóis constitutivos estão relacionados com a resistência de alguns genótipos de cacau à *Ceratocystis*. Capriles de Reyes, et al. (1966) constataram que plantas de cacaueiro resistentes a *C. fimbriata* apresentavam teores de polifenóis e de ácidos clorogênicos mais altos do que as plantas de cacau suscetíveis. Alguns anos mais tarde, Capriles de Reyes e Reyes (1968) encontraram outros compostos fenólicos em maior nível, como um éster de álcool gentílico, expressados somente por plantas de cacau resistentes a *Ceratocystis*. Esse envolvimento de fenóis também já foi relatado na resistência de cacaueiro contra *Crinipellis pernicioso* (NOJOSA et al., 2003).

Figura 1. Exemplo das estruturas observadas em microscópio óptico de luz (Amostras de plantas coletadas 7 dias após a inoculação). **SI.** Planta suscetível inoculada com *C. fimbriata*; **RI:** Planta resistente inoculada com *C. fimbriata*; **SS:** Planta suscetível sem inoculação; **RS:** Planta resistente sem inoculação. (**t** = tilose; **e** = esporo (clamidósporo); **g** = gomas e géis; **l** = lignificação e acúmulo de fenóis; **m** = micélio lignificado; **a** = grãos de amido; **ar** = arginina).

Figure 1. Example of structures observed under optical light microscope (Plant samples collected 7 days after inoculation). **YES.** Susceptible plant inoculated with *C. fimbriata*; **RI:** Resistant plant inoculated with *C. fimbriata*; **SS:** Susceptible plant without inoculation; **RS:** Resistant plant without inoculation. (**t** = tilose, **e** = spore (chlamydospore), **g** = gums and gels, **l** = lignification and accumulation of phenols, **m** = mycelium, **a** = grain starch, **ar** = arginine).

Um número maior de grãos de amido e arginina foram observados nas plantas suscetíveis inoculadas quando comparadas com as resistentes inoculadas (Figura 1). Tumura (2011) ao realizar estudos histológicos em plantas de eucalipto infectadas com *Ceratocystis*, notou a presença de aglomerados de amidos somente nas plantas infectadas, podendo assim este composto também estar relacionado com a interação entre o fungo e planta. Bennice et al. (2005) relatam que plantas de *Platanus* sp., infectadas com *C. platani* apresentavam grânulos de amido após 48 horas após a inoculação do fungo. Além disso, os autores também descrevem a ocorrência da desorganização intercelular e intracelular das células do parênquima e do processo de plasmodiólise, além de aumento nos compostos fenólicos intracelulares nas células do tecido paliádico.

Resultados semelhantes ao presente trabalho foram encontrados por Tumura (2011) que, segundo o autor, compostos fenólicos, tiloses e grãos de amido foram visualizados em maiores quantidades em plantas de eucalipto suscetíveis a *Ceratocystis*. Santos et al. (2012) citam estes mesmo mecanismos de resistência em estudos relacionados com plantas de cacauzeiro resistentes e suscetíveis inoculadas com *C. cacaofunesta*.

Figura 2. Exemplo de tiloses observadas em microscópio eletrônico de varredura (Amostras de plantas coletadas 7 dias após a inoculação). Tiloses em plantas resistentes (A) e suscetíveis (B). Planta suscetível sem inoculação do fungo e sem a presença de tiloses (C).

Figure 2. Example of tyloses observed in a scanning electron microscope (Plant samples collected 7 days after inoculation). Tyloses in resistant (A) and susceptible (B) plants. Susceptible plant without inoculation of the fungus and without the presence of tyloses (C).

CONCLUSÕES

As tiloses, géis e gomas foram observadas em todas as plantas inoculadas com *Ceratocystis*.

O acúmulo de lignina foi observado somente em plantas resistentes, sugerem que a resistência de eucalipto ao fungo *Ceratocystis* pode estar ligada a esta estrutura, já que somente ela foi visualizada em plantas resistentes inoculadas com o fungo.

O amido e a arginina foram observados em todas as plantas trabalhadas.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Empresa Suzano Papel e Celulose por cederem o material para este estudo, e ao CNPq e a FAPESP (processo 2011/05710-0) pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ARAÚJO, J. C. A.; MATSUOKA, K. Histopatologia da interação *Alternaria solani* em tomateiros resistentes e suscetíveis. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 29, p. 268-275, 2004.

- 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, p.1274-1284, 2003.
- BENNICI, A.; CALAMASSI R.; PAZZAGLI L.; COMPARINI C.; SCHIFF S.; BOVELLI R.; MORI B.; TANI C.; SCALA A. Cytological and ultrastructural responses of *Platanus acerifolia* (Ait.) Willd. leaves to cerato-platanin, a protein from *Ceratocystis fimbriata* f. sp. *platani*. **Phytopathologia Mediterranea**, Firenze, v. 44, p. 153-161, 2005.
- CAPRILES, L.R.; SHUTTZ SCHOMBUNGK, E.; MUNOZ, A. El contenido de ácido clorogénico en diferentes variedades de cacao y su relación con la resistencia contra el hongo *Ceratocystis fimbriata*. **Agronomia Tropical**, Manaus, v. 16, n. 4, p. 273-284, 1966.
- CARVER, T. L. W.; ZEYEN, R. J.; BUSHNELL, W. R.; ROBBINS, M. P. Inhibition of phenylalanine ammonia-lyase and cinnamyl alcoholdehydrogenase increases quantitative susceptibility of barley to powdery mildew (*Erysiphe graminis* DC). **Physiology and Molecular Plant Pathology**, v.44, n. 4, p.261–272, 1994.
- CARVER, T. L. W.; ROBBINS, M. P.; ZEYEN, R. J. Effects of two PAL inhibitors on the susceptibility and localized autofluorescent host-cell responses of oat leaves attacked by *Erysiphe graminis*. **Physiology and Molecular Plant Pathology**, v. 39, n. 4, p. 269–287, 1991.
- COOPER R. M., RESENDE M. L. V., FLOOD J., ROWAN M. G., BEALE M. H., POTTER U. Detection and cellular localization of elemental sulphur in disease-resistant genotypes of *Theobroma cacao*. **Nature**, London, v. 379, p.159–162, 1996.
- FERREIRA, M. A. **Estrutura genética de populações de *Ceratocystis fimbriata* e padrão espaço-temporal da murcha-de-*Ceratocystis***. 2009. 107 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2009.
- FERREIRA, F. A.; MILANE, D. **Diagnose visual e controle de doenças abióticas e bióticas do eucalipto no Brasil**. Mogi Guaçu: International Paper, 2002.104 p.
- FERREIRA, E. M.; ALFENAS, A. C.; BINOTI, D. H. B.; MACHADO, P. S.; SANTOS, C. A. G. Influência das murcha-de-*Ceratocystis* sobre o crescimento de um clone híbrido de *Eucalyptus* spp. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, p. 216, 2007.
- 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. M.; DEMUNER, N. L.; PIGATO, S. Murcha de *Ceratocystis* em eucalipto no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 24, p. 284, 1999.
- FIGUEIREDO A. C.; BARROSO, J. G.; PEDRO, L. G.; ASCENSÃO, L. Histoquímica e Citoquímica em Plantas: Princípios e Protocolos. 2007. Disponível em < <http://cbv.fc.ul.pt/HistoquimicaPP.pdf> > Acesso em 20 de jul. 2009.
- FIRMINO, A. C. **Caracterização de isolados de *Ceratocystis* sp., avaliação de resistência clonal de eucalipto e sensibilidade deste fungo a diferentes fungicidas**. 2011. 105 p. Tese (Doutorado em Agronomia/Proteção de Plantas) - Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista. Botucatu. 2011.
- FIRMINO, A. C.; FURTADO, E. L. Produção de enzimas extracelulares por *Ceratocystis* spp. **Summa Phytopathology**, Botucatu, v. 40, n. 4, p. 371-374, 2014.
- FIRMINO, A. C.; TOZZE JR, H. J.; FURTADO, E. L. Resistência de genótipos de eucalipto a *Ceratocystis* spp. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v. 41, n. 98, p. 165-173, 2013.

MACDONALD, W. L.; MCNABB, H. S. Electron microscope observations of *Ceratocystis ulmi* induced tylosis development in Ulmus. **European Journal of Plant Pathology**, v. 4, p.2-10, 1974.

NOJOSA, G. B. A.; RESENDE, M. L. V.; AGUILAR, M. A. G.; BEZERRA, K. M. T.; ANHERT, D. E. Componentes fenólicos e enzimas oxidativas em clones de *Theobroma cacao* resistentes e suscetíveis a *Crinipellis pernicioso*. **Fitopatologia brasileira**, Lavras, v. 28, n. 2, p.148-154, 2003.

PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B.; STANGARLIN, J. R.; CIA, P. **Interação planta-patógeno: fisiologia, bioquímica e biologia molecular**. Piracicaba: Fealq, 2008. v. 1. 627 p.

ROSSETTO, C. J.; RIBEIRO, I. J. A.; IGUE, T. Comportamento de variedades de mangueira, espécies de coleobrocas e comportamento de *Hypocryphalus mangiferae*. **Circular do Instituto Agrônomo**, Campinas, n. 106, p. 44, 1980.

SANTOS, R.M.F.; SILVA, S.D.V.M.; SENA, K.; MICHELI, F.; GRAMACHO, K.P. Kinetics and histopathology of the Cacao-Ceratocystis cacaofunesta interaction. **Tropical Plant Biology**, New York, v. 6, n. 1, p. 37-45, 2012.

SOMAVILLA, L. **Levantamento, caracterização do nematóide das galhas em videira nos estados do rio grande do sul e de Santa Catarina e estudo da resistência de porta-enxertos a *Meloidogyne* spp.** 2010. 81p. Tese (Doutorado em Fitossanidade) - Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2010.

TUMURA, K. G. **Avaliação de Resistência, Análise Epidemiológica, Distribuição Espacial e Caracterização Anatômica da Madeira de Clones de Eucalyptus sp. Infectados por *Ceratocystis fimbriata* Ellis. Et Halsted.** 2011. 50 p. Dissertação (Mestre em Ciências Florestais) - Faculdade de Ciências Agrônomicas, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Botucatu. 2011.

Recebido em 31/03/2017

Aceito em 13/11/2017