Inoculação de *Ceratocystis fimbriata* Ellis & Halsted em *Eucalyptus* spp. e avaliação da diversidade genética por marcadores ISSR

Inoculation of *Ceratocystis fimbriata* Ellis & Halsted IN *Eucalyptus* spp.
And evaluation pf genetic diversity by ISSR markers

Caio Augusto Fidelix Carneiro Gomes¹, Fernanda Bortolanza Pereira², Flávio Augusto de Oliveira Garcia¹, Alexandre Techy de Almeida Garret¹, Leandro de Siqueira³ e Evandro Vagner Tambarussi^{1*}

RESUMO

Ceratocystis fimbriata é o fungo causador de murcha em uma ampla gama de hospedeiros. O fungo se desenvolve pelo sistema vascular e é autóctone do solo, de modo que a busca por genótipos resistentes é uma das poucas estratégias de controle viável. Assim, o objetivo desta pesquisa foi estudar o comportamento de espécies do gênero *Eucalyptus* após inoculação de dois isolados de *C. fimbriata*. O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado (DIC), em esquema fatorial (hospedeiros x isolados). A avaliação da severidade da doença foi feita a partir da medida da extensão das lesões no caule em mudas de três espécies de *Eucalyptus* aos 190 dias de idade, após 40 dias da inoculação. Dentro de cada espécie, seis indivíduos foram classificados em subgrupos quanto ao nível de severidade e avaliadas para oito marcadores ISSR. Apenas *Eucalyptus nitens* diferiu estatisticamente quanto à severidade observada em relação às demais espécies. Em todas as espécies, os isolados foram capazes de causar doença, quando comparadas plantas inoculadas e plantas controle. Observou-se um índice de fixação maior dentro de subgrupos (0,26) quando comparado ao das espécies (0,15), indicando uma maior diversidade genética dentro das espécies avaliadas. Os marcadores utilizados conseguiram diferenciar plantas que apresentaram diferentes graus de resistência, mostrando que a seleção assistida por marcadores moleculares pode ser uma alternativa viável para o melhorista.

Palavras chave: Murcha-de-Ceratocystis; ISSR; Seleção Assistida.

ABSTRACT

Ceratocystis fimbriata is the wilt-causing fungus in a wide range of hosts. The fungus develops through the vascular system and is autochthonous of the soil, so that the search for resistant genotypes is one of the few viable control strategies. Thus, the objective of this research was to study the behavior of species of the genus *Eucalyptus* after the inoculation with two *C. fimbriata* isolates. The experiment was carried out in a completely randomized design (DIC), in a factorial scheme (hosts x isolates). The disease severity evaluation was based on the lesion extension in the stem of three *Eucalyptus* species seedlings at 190 days of age, after 40 days from inoculation. Within each species, six individuals were classified into subgroups for severity level and evaluated by eight ISSR markers. Only *Eucalyptus nitens* differed statistically regarding the severity observed in relation to the other species. In all the species, the isolates were able to cause disease when we compared inoculated plants to control plants. We observed a higher fixation index within the subgroups (0.26) when compared to the species (0.15) ones, indicating a greater genetic diversity within the evaluated species. The markers used were able to differentiate plants that presented higher and lower severity, showing that the selection assisted by molecular markers can be a viable alternative for the breeder.

Keywords: Ceratocystis-wilt; ISSR; Marker Assisted Selection.

INTRODUÇÃO

Os cultivos de espécies puras de *Eucalyptus* e seus híbridos são altamente produtivos no Brasil. Todavia, estão sujeitos a ocorrência de doenças que podem diminuir substancialmente o crescimento das árvores nos plantios e afetar a qualidade da madeira produzida (ALFENAS, 2009). Novas doenças

1. Setor de Ciências Agrárias e Ambientais – SEAA, Universidade Estadual do Centro Oeste – UNICENTRO. Irati / PR, Brasil.

2. Faculdade de Ciências Agrônomicas – FCA, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Unesp. Botucatu / SP, Brasil.

3. Suzano Papel e Celulose S.A. Itapetininga / SP, Brasil.

* Autor correspondente: tambarussi@gmail.com

e patógenos têm sido descritos ao longo dos anos. Dentre os diversos relatos, a espécie fúngica *Ceratocystis fimbriata* Ellis & Halsted foi descrita causando doença em diversas espécies arbóreas de importância econômica, como *Theobroma cacao* L., *Acacia decurrens* Wild., *Hevea brasiliensis* Wild. ex A. Jesus, *Mangifera indica* L., *Eucalyptus* spp. (TRINDADE; FURTADO, 1997), *Colocasia esculenta* L., *Ficus carica* spp., *Gmelina arborea* Roxb., dentre outras (HARRINGTON et al., 2005; VALARINI; TOKESHI, 1980). A murcha-de-ceratocystis em eucalipto foi descrita pela primeira vez no Brasil em 1997 em cultivos monoclonais de híbridos de *Eucalyptus urophylla* S.T. Blake x *Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden do sudeste da Bahia. Neste plantio, foi constatado uma mortalidade entre 20 a 25% nos primeiros meses, chegando a 40% aos 18 meses da observação da presença doença (FERREIRA et al., 2006).

Existem evidências de que estirpes do clado Latino-Americano de *C. fimbriata* são específicas para diferentes hospedeiros nativos. Por outro lado, a relação patógeno x hospedeiro com espécies exóticas, como as do gênero *Eucalyptus*, é mais ampla, o que permite que diferentes estirpes de *C. fimbriata* parasitem as plantas (BAKER et al., 2003). Nesse contexto, a busca por genótipos resistentes é uma das poucas estratégias de controle viável (ZAUZA et al., 2004; ALFENAS et al., 2009). Contudo, uma triagem puramente fenotípica na seleção para resistência pode conter aspectos considerados indesejáveis, mas que podem ser eliminados optando pela seleção assistida por marcadores moleculares (SAM), aumentando a eficiência do processo, uma vez que se elimina a influência do ambiente na expressão da resistência (FUGANTI et al., 2004).

Desta forma, esta pesquisa buscou avaliar a resposta de três espécies de *Eucalyptus* a dois isolados de *C. fimbriata* e responder as seguintes perguntas: i) quais espécies de *Eucalyptus* apresentam maior resistência ao ataque de *C. fimbriata*?; ii) é possível fazer a seleção assistida por marcadores ISSR para resistência à *C. fimbriata*?

MATERIAL E MÉTODOS

Descrição da área e material vegetal de estudo

O ensaio foi realizado na área da casa de sombra do viveiro florestal, pertencente ao Departamento de Engenharia Florestal (DEF) da Universidade Estadual do Centro-Oeste (UNICENTRO), Campus de Irati (25° 32' S; 50° 39' O), no município de Irati, Estado do Paraná. Segundo a classificação climática de Köppen e Geiger (1936), o clima de Irati é do tipo Cfb (temperado húmido com verão temperado).

As espécies utilizadas foram: *Eucalyptus deanei* Maiden (procedência Kedumba Valley), *Eucalyptus nitens* H. Deane & Maiden (procedência Rubicon) e *Eucalyptus dunnii* Maiden (procedência CSIRO). Para produção das mudas, foram utilizadas sementes de polinização aberta cedidas pelo Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais (IPEF-ESALQ/USP), semeadas em tubetes de plásticos com capacidade de 290 cm³, contendo substrato Maxfertil® (casca de pinus + serragem bioestabilizados) e fertilizadas com Osmocote® (14-14-14).

As mudas foram irrigadas duas vezes por dia durante todo o período de condução do experimento. A complementação nutricional foi realizada uma vez por semana até a inoculação do patógeno, aplicando-se 5 mL por muda da formulação de NPK triturado com concentração final de 4% de nitrogênio (N) (2,4% nitrogênio amoniacal, 1,6% nitrogênio nítrico), 14% de pentóxido de fósforo (P₂O₅) e 8 de óxido de potássio (K₂O). A inoculação do patógeno ocorreu aos 190 dias após a germinação.

Isolados de *Ceratocystis fimbriata*

Para as inoculações foram utilizados dois isolados de *C. fimbriata* cedidos pela coleção microbiana da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). Os isolados avaliados foram obtidos por Piveta (2013) em plantios de *Actinia deliciosa* A. Chev (kiwi) e denominados C1 e C5, sendo o isolado C1 proveniente do município de Fraiburgo, Estado de Santa Catarina, e C5 do município de Farroupilha, Estado do Rio Grande do Sul.

Metodologia de inoculação

Os isolados fúngicos foram cultivados durante dez dias em incubadora do tipo BOD (*Biochemical Oxygen Demand*), em placas de Petri de 90 mm de diâmetro, contendo o meio de cultura Extrato de Malte-Ágar (MEA), sob 28 °C de temperatura e fotoperíodo de 12 horas. Após o período de crescimento, adicionaram-se 10 mL de água destilada esterilizada em cada placa, seguido da raspagem

da superfície da colônia fúngica com uma alça de Drigalski, obtendo-se a suspensão de esporos. A suspensão de esporos foi filtrada em gaze de dupla camada e teve sua concentração determinada em câmara de Neubauer para $2,5 \times 10^6$ conídios mL^{-1} (LAIA et al., 2000).

Para inoculação da suspensão de conídios nas mudas, fez-se uma incisão longitudinal de aproximadamente um centímetro de comprimento na epiderme do caule de cada muda com auxílio de uma régua e um estilete esterilizado, três centímetros acima do coleto. A inoculação imediata após a incisão foi realizada via aplicação de 500 μL de suspensão de conídios em cada planta, com auxílio de uma pipeta automática. A lesão foi revestida com filme de PVC para evitar a evaporação da água da suspensão e garantir as condições favoráveis à colonização dos tecidos pelo patógeno. Nas mudas controles, utilizou-se água destilada autoclavada no lugar da suspensão com o inóculo. Após a inoculação, as plantas permaneceram em casa de sombra por um período de 40 dias.

Delineamento experimental e avaliação da severidade

O experimento foi estruturado em delineamento inteiramente casualizado, com tratamentos em esquema fatorial e quatro repetições (mudas) por tratamento. Os tratamentos foram compostos por três espécies de *Eucalyptus* (Fator 1) avaliadas quanto a resposta à inoculação de dois isolados de *C. fimbriata* (Fator 2). O tratamento controle consistiu em três repetições (mudas) para cada espécie testada sem a inoculação do patógeno. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey para comparação das médias, em ambiente R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2016), utilizando o pacote *nlme* (PINHEIRO et al., 2018).

Após 40 dias após a inoculação (DAI), o comprimento da lesão externa foi mensurado com um paquímetro digital para cada muda. A severidade (S) da doença foi calculada pela relação entre o comprimento da lesão externa e altura da muda, em porcentagem, segundo metodologia adaptada de Oliveira (2010):

$$S(\%) = \frac{CL}{HP} \times 100,$$

em que CL é o comprimento da lesão externa e HP é a altura da planta.

Análises moleculares

A extração de DNA e as análises moleculares foram feitas no Laboratório de Genética e Biologia Molecular Vegetal (LGBMV) da UNICENTRO – Campus CEDETEG, localizado no município de Guarapuava, Estado do Paraná. A partir da análise da severidade, foram selecionados 18 mudas, seis de cada espécie em estudo com graus distintos de severidade ao ataque de *C. fimbriata*. Cada espécie foi dividida em dois subgrupos: i) três plantas que apresentaram maiores severidades (classificadas como grupo A); ii) três plantas que apresentaram menores severidades (classificadas como grupo B). Destas mudas, foram coletadas as folhas para extração de DNA, que foram acondicionadas em sacos plásticos contendo sílica gel devidamente identificados. A extração de DNA foi feita utilizando o protocolo de Ferreira e Grattapaglia (1998).

Para genotipagem, foram utilizados oito marcadores do tipo ISSR (Tabela 1). A reação de amplificação via PCR foi conduzida em um volume final de 12,5 μL contendo: 2 μL de DNA, 0,2 μM do *primer*, 200 μM de cada dNTP, 1,5 mM de MgCl_2 e 1 U de Taq DNA Polimerase (Invitrogen) em 1 X de tampão para PCR da Taq DNA Polimerase (Invitrogen). Para a amplificação, foi utilizado o

Tabela 1 – Relação dos oito primers ISSR amplificados para *Eucalyptus dunnii*, *Eucalyptus nitens* e *Eucalyptus deanei*. TA: temperatura de anelamento.

Table 1 – List of eight amplified ISSR primers for *Eucalyptus dunnii*, *Eucalyptus nitens* and *Eucalyptus deanei*. TA: annealing temperature.

Primers Sequências TA (°C)		
UBC 807	(AG) ₈ T	52
UBC 808	(AG) ₈ C	50
UBC 823	(TC) ₈ C	52
UBC 834	(AG) ₈ CTT	52
UBC 855	(AC) ₈ CTT	55
UBC 866	C(TCC) ₈ TC	55
UBC 873	(GACA) ₄	50
UBC 890	VHV(GT) ₇	54

termociclador Veriti da *Applied Biosystems* programado para uma desnaturação inicial a 94 °C por cinco minutos seguida de 35 ciclos de 94 °C por 45 s, 50–55 °C por 45 s e 72 °C por 90 s, e por fim uma extensão final de 72 °C por cinco minutos. Os produtos de amplificação foram visualizados em gel de agarose 1,8%, corado com brometo de etídio (0,5 µg mL⁻¹). Para o padrão de bandamento foi utilizado o marcador *Ladder* de peso molecular de 100 pb. Os resultados das eletroforeses foram revelados em luz UV e fotodocumentados em sistema digital L-PIX Image (Loccus Biotecnologia).

Análises estatísticas para os dados moleculares

Os indivíduos foram genotipados de acordo com a presença (1) e ausência (2) de bandas nos géis, gerando uma matriz binária de dados. O software TFPGA 1.3 (MILLER, 1997) foi utilizado para estimar os seguintes parâmetros, seguindo metodologia de Nei (1978): distâncias genéticas entre subpopulações e espécies (D), proporção de locos polimórficos (P) e heterozigosidade esperada (H_e). Os valores de índice de fixação para as subpopulações (adotadas como subgrupos) $F_{ST}^{(Sub)}$ e para as espécies $F_{ST}^{(Esp)}$ também foram estimados, utilizando 10.000 reamostragens *bootstraps*. O agrupamento dos indivíduos foi estimado pelo software TFPGA 1.3 (MILLER, 1997) e a construção do dendrograma foi feita pelo método UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*), com 10.000 reamostragens *bootstraps*.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As variações de severidade entre espécies de *Eucalyptus*, isolados de *C. fimbriata* e a interação entre Espécies x Isolados foram estatisticamente significativos a 1% de probabilidade (resultados não apresentados). Houve diferença estatística entre as plantas controle de cada espécie quando comparadas aquelas inoculadas pelos diferentes isolados de *C. fimbriata*. No entanto, não houve diferença significativa para severidade da doença entre os isolados C1 e C5. A espécie que apresentou as maiores médias de severidade foi *E. nitens*, diferindo significativamente das demais (Tabela 2).

Tabela 2 – Médias de severidade (%) para a interação entre as espécies *Eucalyptus nitens*, *Eucalyptus deanei* e *Eucalyptus dunnii* com e sem inoculação dos isolados de *Ceratocystis fimbriata* (C1 e C5) testados.

Table 2 – Severity averages (%) for the interaction between *Eucalyptus nitens*, *Eucalyptus deanei* and *Eucalyptus dunnii* species with and without inoculation of *Ceratocystis fimbriata* (C1 and C5) tested isolates.

Espécie	Médias de severidade (%)		Testemunhas
	C1	C5	
<i>Eucalyptus nitens</i>	4,9 bA	6,2 bA	0,82 aB
<i>Eucalyptus deanei</i>	3,2 aA	2,5 aA	0,46 aB
<i>Eucalyptus dunnii</i>	2,8 aA	3,7 aA	0,34 aB

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

A análise molecular com os marcadores ISSR revelou um total de 399 locos dentro de um intervalo com tamanho de 100 a 1.100 pares de base (pb) de DNA. O número total de marcadores amplificados por iniciador para todas as três espécies variou de 30 (UBC 855) a 81 (UBC 807) (Tabela 3). A distância genética (D) entre as espécies e subgrupos (menores e maiores severidades) variou de 0,163 a 0,405. A maior distância genética foi observada para os subgrupos de *E. deanei* e *E. nitens* que apresentaram maiores severidades (A) (Tabela 4).

Tabela 3 – Número de fragmentos amplificados, por loco ISSR e por espécie, para *Eucalyptus nitens*, *Eucalyptus dunnii* e *Eucalyptus deanei*.

Table 3 – Number of amplified fragments, per ISSR loco and per species, for *Eucalyptus nitens*, *Eucalyptus dunnii* and *Eucalyptus deanei*.

Espécie	Loco								Total por espécie
	UBC808	UBC 807	UBC 823	UBC 855	UBC 834	UBC 866	UBC 873	UBC 890	
<i>Eucalyptus nitens</i>	16	24	11	5	16	9	14	7	102
<i>Eucalyptus dunnii</i>	16	26	16	8	9	10	10	10	105
<i>Eucalyptus deanei</i>	27	31	25	17	26	29	20	17	192
Total por loco	59	81	52	30	51	48	44	34	399

Tabela 4 – Valores de distância genética de Nei (1978) entre as subpopulações de *Eucalyptus* spp. estimados usando dados de polimorfismos gerados com oito primers ISSR.

Table 4 – Nei's genetic distance (1978) values among *Eucalyptus* spp. subpopulations estimated using polymorphism data generated with eight ISSR primers.

Espécie (Subgrupo)	<i>E. nitens</i> (A)	<i>E. nitens</i> (B)	<i>E. dunnii</i> (A)	<i>E. dunnii</i> (B)	<i>E. deanei</i> (A)
<i>E. nitens</i> (B)	0,222				
<i>E. dunnii</i> (A)	0,163	0,216			
<i>E. dunnii</i> (B)	0,204	0,205	0,180		
<i>E. deanei</i> (A)	0,405	0,337	0,352	0,360	
<i>E. deanei</i> (B)	0,303	0,245	0,259	0,249	0,256

Entre parênteses, A indica subpopulação que apresentou maior severidade e B, a que apresentou menor severidade, por espécie.

A média do percentual de locos polimórficos (P) entre os subgrupos foi de 35,6%, enquanto a diversidade genética (H_e) resultou em 0,13 e os valores dos índices de fixação genético de subgrupos dentro das espécies e entre as espécies resultaram 0,26 ($F_{ST(Sub)}$) e 0,15 ($F_{ST(Esp)}$), respectivamente (Tabela 5).

Tabela 5 – Índices de diversidade e fixação genética entre as espécies de *Eucalyptus* spp. testadas. %LP: Percentual de locos polimórficos; H_e : Heterozigosidade esperada; $F_{ST(Sub)}$: diferenciação genética entre subgrupos; $F_{ST(Esp)}$: diferenciação genética entre espécies.

Table 5 – Diversity and genetic indexes among tested *Eucalyptus* spp. %LP: Percentage of polymorphic loci; H_e : Expected heterozygosity; $F_{ST(Sub)}$: fixation index for subgroups; $F_{ST(Esp)}$: fixation index for species.

Espécie/nível de severidade	LP(%)	H_e
<i>E. nitens</i> (A)	29,2	0,10
<i>E. nitens</i> (B)	38,5	0,14
<i>E. dunnii</i> (A)	40,6	0,15
<i>E. dunnii</i> (B)	27,1	0,09
<i>E. deanei</i> (A)	39,6	0,15
<i>E. deanei</i> (B)	38,5	0,14
Média	35,6	0,13
$F_{ST(Sub)}$	0,26 (0,17 - 0,33)	
$F_{ST(Esp)}$	0,15 (0,06 - 0,23)	

Entre parênteses, A indica subpopulação que apresentou maior severidade e B, a que apresentou menor severidade, por espécie.

A partir da estimativa das distâncias genéticas de Nei entre as espécies, gerou-se um dendrograma que agrupou *E. nitens* e *E. dunnii* em um único clado, separando *E. deanei* como a espécie mais distante geneticamente. Quanto à similaridade genética entre os subgrupos, o dendrograma indicou uma clara distinção entre subgrupo mais resistente (B) e menos resistente (A) dentro de cada espécie (Figura 1).

Figura 1 - Dendrograma UPGMA gerado a partir da similaridade genéticas entre as subpopulações de *Eucalyptus* spp. testadas. Entre parênteses, A indica subpopulação que apresentou maior severidade da doença e B, a que apresentou menor severidade da doença, por espécie.

Figure 1 - UPGMA dendrogram based on genetic similarity between subpopulations of tested *Eucalyptus* spp. Between parenthesis, A indicates subpopulation that presented higher disease severity and B, that one that presented lower disease severity, per species.

De modo geral, a severidade (%) foi semelhante entre as espécies de *Eucalyptus* testadas, com maior média para *E. nitens*. Este resultado prova a capacidade dos isolados de *C. fimbriata* de infectar os tecidos do caule de *E. nitens*, acrescentando este registro ao relato de infecção por *Ceratocystis pirilliformis* em plantas dessa espécie feridas artificialmente (BARNES et al., 2003).

Firmino et al. (2013), avaliaram a resistência de 20 genótipos de *E. grandis* a quatro isolados de *C. fimbriata*, e encontraram resistência em apenas cinco genótipos, além de que, apenas aos 90 dias de avaliação, os sintomas típicos de murcha, característica da doença, estavam evidentes em todas as plantas. No presente estudo, as plantas avaliadas ainda não apresentavam sintoma de murcha e seca de ponteiros, possivelmente pelo tempo de avaliação (40 dias após inoculação) não ter sido suficiente para expressão de tais sintomas. Em estudos anteriores (TUMURA et al., 2012; ZAUZA et al., 2004) realizados em plantas de eucalipto infectadas com *C. fimbriata*, também foi identificado a ausência desses sintomas, e os autores explicam que diferente da doença em campo, experimentos realizados em mudas nem sempre apresentam a murcha.

Em um estudo efetuado por Piveta (2013), mudas clonais de *E. urophylla* x *E. globulus*, *E. urophylla* x *E. grandis*, *E. saligna* e mudas seminais de *E. dunnii* foram inoculadas com três isolados de *C. fimbriata* (PP08, PB01 e PM08) provenientes de Kiwi (*A. deliciosa*). Foi observado pela autora que a média de severidade variou entre os clones testados e que *E. dunnii* apresentou as menores médias de severidade, aos três diferentes isolados. Tal resultado condiz com o observado no presente estudo, em que *E. dunnii* também apresentou a menor média de severidade dentre as espécies testadas.

O comportamento dos isolados de *C. fimbriata* testados, provenientes de plantas de Kiwi (*A. deliciosa*), comprovam a capacidade dos mesmos em infectar os tecidos de eucalipto, apesar da não diferença de agressividade entre eles, dada ausência de diferença estatística para severidade. Baker et al. (2003) constataram uma variação na agressividade de isolados de *C. fimbriata* coletados em cacau (*T. cacao*), batata-doce (*Ipomoea batatas* Lam.) e plátano (*Platanus* spp.), bem como entre isolados de uma mesma espécie. É interessante ressaltar o fato de o patógeno não apresentar especificidade hospedeiro-patógeno, como já comprovado por Van Wyk et al. (2011), que observaram a ocorrência de *Ceratocystis moniliformis* em *Eucalyptus deglupta* Blume no Equador, bem como descreveram a existência de três novas espécies de *Ceratocystis* atacando plantas de eucalipto neste país, sendo elas: *Ceratocystis curvata*, *Ceratocystis ecuadoriana* e *Ceratocystis diversiconidia*.

Os resultados diferenciação genética entre os subgrupos ($FST_{(sub)}$) e entre as espécies ($FST_{(esp)}$), mostram há maior diversidade genética entre subgrupos, ou seja, há maior diferenciação genética entre indivíduos resistentes e suscetíveis ao ataque de *C. fimbriata* do que entre as espécies de *Eucalyptus per se*.

Hudson et al. (2014), estudando os padrões genômicos de diversidade e divergência de nove espécies de *Eucalyptus* por meio de marcadores dominantes DArT (*Diversity Arrays Technology*) encontraram valor FST de 0,40 entre *E. nitens* e *E. dunnii*, e uma média para as nove espécies igual a 0,36, valores superior à média para a três espécies encontrada no presente trabalho ($FST_{(Esp)} = 0,15$). No caso do estudo conduzido por Hudson et al. (2014), os elevados valores de FST podem ser atribuídos a um artefato da técnica utilizada, uma vez que os marcadores DArT utilizados foram encontrados mais frequentemente em regiões genômicas com altos valores de FST , bem como foram mais frequentes em regiões gênicas, o que pode viesar os resultados.

Ballesta et al. (2015), avaliando a diversidade genética de populações de diferentes procedências de *Eucalyptus cladocalyx* F. Muell. usando marcadores ISSR, encontraram um valor FST igual a 0,14, similar ao observado no presente estudo (0,15), o que indica uma variabilidade significativa, mas moderada, de acordo com a classificação de Wright (1978) para este índice. Para a interpretação do FST , Wright (1978) propõe que valores inferiores a 0,05 indicam pequena diferenciação genética, valores entre 0,05 e 0,15 indicam diferenciação moderada, valores entre 0,15 e 0,25 equivalem a grande diferenciação e acima de 0,25, muito grande diferenciação genética.

De acordo com os valores das distâncias genéticas obtidas e o dendrograma gerado, os marcadores ISSR utilizados foram efetivos para a distinção em clados e subclados das subpopulações de acordo com a maior ou menor resistência à *C. fimbriata* para as espécies de *E. nitens* e *E. dunnii* e *E. deanei*. Além disso, estudos com base em marcadores do tipo DArT (STEANE et al., 2002; 2007) reforçam que os subgêneros *Symphyomyrtus* de *E. nitens* estão intimamente identificados com espécies de *E. dunnii* em filogenias baseadas em dados de sequência ITS (*Internal transcribed spacer*), e tal aproximação filogenética entre essas duas espécies também foi observada no presente estudo pela separação em um clado diferente do *E. deanei*.

Segundo Gavrillets (2003), a formação de um clado a parte por *E. deanei* pode estar ligada com a distribuição geográfica e a processo de especiação, que é responsável pela origem da diversidade biológica entre essas espécies. Tal processo começa tipicamente com uma barreira, impedindo o fluxo gênico entre elas, promovendo uma maior divergência fenotípica e consequente diferenças na compatibilidade entre patógenos e hospedeiros (NOSIL; FEDER, 2012).

Quanto ao índice de percentual de locos polimórficos (%LP), para Moran e Hopper (1987) as diferenças encontradas dentro de uma população podem variar de acordo com o tamanho, número e tipo de locos analisados. Os valores desse índice no presente estudo variaram entre os subgrupos analisados, indicando heterogeneidade entre espécies para os locos amplificados, principalmente para *E. nitens* e *E. dunnii*. Em trabalho realizado por Arumugasundaram et al. (2011), usando marcadores SSR, foram encontrados valores entre 44 a 93% e entre 36 a 93% para populações de *E. camaldulensis* e *E. tereticornis* Sm., respectivamente. Segundo os mesmos autores, maiores valores de %LP auxiliam a explorar a diversidade genética entre genótipos dentro da espécie.

Seis espécies de *Eucalyptus* (*E. camaldulensis*, *E. citriodora* Hook., *E. grandis*, *E. pellita* F. Muell., *E. tereticornis* e *E. urophylla*) foram avaliadas por Balasaravanan et al. (2005), com o objetivo de determinar as relações genéticas inter e intra-específicas, resultando no mais alto valor de %LP para *E. tereticornis* (47.3%) e o mais baixo para *E. citriodora* (18.6%). Valores mais altos, como os observados para *E. tereticornis* e, no presente estudo, para *E. dunnii* (40.6%), são justificados pelos autores devido ao alto polimorfismo em populações naturais de *Eucalyptus*.

Os índices apresentados estão fortemente ligados a diferenciação genética existente entre as espécies estudadas; tal variabilidade é importante para a seleção de genótipos que possuam características de interesse, como a resistência a uma doença, por exemplo (FRANKHAM et al., 2008). Avaliações baseadas em marcadores moleculares passam ser importantes para o planejamento e escolha de materiais de cruzamento em programas de melhoramento (BALLESTA et al., 2015). Esses dados, aliados a informações de produtividade, permitem ao melhorista conhecer quais indivíduos são resistentes, quais são suscetíveis e assim determinar a melhor estratégia para recomendação e desenvolvimento de materiais genéticos superiores.

CONCLUSÃO

A severidade da doença foi maior para *E. nitens* inoculada com os isolados de *C. fimbriata*.

Os marcadores ISSR foram capazes de diferenciar os indivíduos de acordo com o grau de severidade observado para cada espécie, o que pode viabilizar a seleção assistida por marcadores.

AGRADECIMENTOS

Nós agradecemos à Empresa Suzano Papel e Celulose pelo apoio nesta pesquisa. O Prof. Evandro V. Tambarussi é Bolsista Produtividade da Fundação Araucária.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFENAS, A. C.; ZAUZA, E. A. V.; MAFIA, R. G. **Clonagem e doenças do eucalipto**. Viçosa: Editora UFV, 2009. 500 p.
- ARUMUGASUNDARAM, S.; GHOSH, M.; VEERASAMY, S.; RAMASAMY, Y. Species discrimination, population structure and linkage disequilibrium in *Eucalyptus camaldulensis* and *Eucalyptus tereticornis* using SSR markers. **PLoS One**, v. 6, n. 1, p. 1295-1302, 2011.
- 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. 1274-1284, 2003.
- BALASARAVANAN, T.; CHEZHIAN, P.; KAMALAKANNAN, R.; GHOSH, M.; YASODHA, R.; VARGHESE, M.; GURUMURTHI, K. Determination of inter- and intra-species genetic relationships among six *Eucalyptus* species based on inter-simple sequence repeats (ISSR). **Tree Physiology**, v. 25, n. 10, p. 1295-1302, 2005.
- BALLESTA, P.; MORA, F.; CONTRERAS-SOTO, R. I.; RUIZ, E.; PERRET S. Analysis of the genetic diversity of *Eucalyptus cladocalyx* (sugar gum) using ISSR markers. **Acta Scientiarum**, v. 37, n. 2, p. 133-140. 2015.

- BARNES, I.; ROUX, J.; WINGFIELD, B.D.; DUDZINSKI, M.J.; OLD, K. M.; WINGFIELD. *Ceratocystis pirilliformis*, a new species from *Eucalyptus nitens* in Australia. **Mycologia**, v. 95, n. 5, p. 865-871, 2003.
- FERREIRA, F. A.; MAFFIA, L. A.; BARRETO, R. W.; DEMUNER, N. L.; PIGATOO, S. Sintomatologia da murcha de *Ceratocystis fimbriata* em eucalipto. **Revista Árvore**, v. 30, n. 2, p. 155-162, 2006.
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed. Brasília: Embrapa Cenargen, 1998. 220 p.
- FIRMINO, A. C.; TOZZE JUNIOR, H. J.; SOUZA, I. C. G.; FURTADO, E. L. Resistência de genótipos de Eucalipto a *Ceratocystis* spp. **Scientia Forestalis**, v. 41, n. 98, p. 165-173, 2013.
- FRANKHAM, R.; BALLOU, J. D.; BRISCOE, D. A. **Fundamentos de Genética da Conservação**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2008. 280 p.
- FUGANTI, R.; BENEVEI, M. A.; SILVA, J. F. V.; ARRABALARIASI, C. A.; MARIN, S. R. R.; BINNECK, E.; NEPOMUCENO, A. L. Identificação de Marcadores Moleculares de Microssatélites para Seleção de Genótipos de Soja Resistentes a *Meloidogyne javanica*. **Nematologia Brasileira**, v. 28, n. 2, p.125-130, 2004.
- GAVRILETS, S. Models of speciation: what have we learned in 40 years? **Evolution**, v. 57, p. 2197-2215. 2003.
- HARRINGTON, T. C.; THORPE, D. J.; MARINHO, V. L. A.; FURTADO, E. L. First report of black rot of *Colocasia esculenta* caused by *Ceratocystis fimbriata* in Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, n. 1, p. 88-89, 2005.
- HUDSON, C. J.; FREEMAN, J. S.; MYBURG A. A.; POTTS, B. M.; VAILLANCOURT, R. E. Genomic patterns of species diversity and divergence in *Eucalyptus*. **New Phytologist**, v. 206, n. 4, p.1378-1390, 2015.
- KÖPPEN, W.; GEIGER, R. **Das Geographische System der Klimate. Handb. der Klimatologie**. Berlin: Verlag von Gebrüder Borntraeger, 1936. 44 p.
- LAIA, M. L.; ALFENAS, A. C.; HARRINGTON, T. C. Isolation, detection in soil, and inoculation of *Ceratocystis fimbriata* causal agent of wilting die-back and canker in *Eucalyptus*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 25, p. 384, 2000.
- MILLER, M. P. **Tools for population genetic analyses (TFPGA) 1.3**: A Windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. 1997. Disponível em < <http://www.public.asu.edu> >. Acesso em 20 mar. 2018.
- MORAN, G. F.; S. D. HOPPER. Conservation of the genetic resources of rare and widespread eucalypts in remnant vegetation. In: SAUNDERS, D. A.; ARNOLD, G. W.; BURBIDG, A. A.; HOPKINS, A.J.M. (Eds.). **Nature conservation: the role of remnants of native vegetation**. Surrey BeaCty: Chipping Norton, 1987, p. 151-162.
- NOSIL, P.; FEDER, J. L. Genomic divergence during speciation: causes and consequences. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 367, n. 1587, p. 332-342, 2012.
- OLIVEIRA, L. S. S. **Agressividade de isolados de *Ceratocystis fimbriata* em clones de *Eucalyptus* spp.** 2010. 26 p. Dissertação (Mestrado em Etiologia; Epidemiologia; Controle) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2010.
- PINHEIRO, J.; BATES, D.; DEBROY, S.; SARKAR, D.; **nlme - Linear and Nonlinear Mixed Effects Models**. R package version 3.1-137. 2018. Disponível em < <https://CRAN.R-project.org/package=nlme> >. Acesso em 20 mar. 2018.
- PIVETA, G. **Morfologia, caracterização molecular e patogenicidade de *Ceratocystis fimbriata***. 2013. 67 p. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal). Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2013.
- R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R: a language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical, 2018. Disponível em < <https://www.R-project.org> > Acesso em 20 mar. 2018.
- STEANE, D. A.; NICOLLE, D.; POTTS, B. M. Phylogenetic positioning of anomalous eucalypts by using ITS sequence data. **Australian Systematic Botany**, v. 20, p. 402-408, 2007.
- STEANE, D. A.; NICOLLE, D.; MCKINNON, G. E.; VAILLANCOURT, R. E.; POTTS, B. M. Higher level relationships among the eucalypts are resolved by ITS-sequence data. **Australian Systematic Botany**, v.15, p. 49-62, 2002.

TRINDADE, D. R.; FURTADO, E. L. Doenças da seringueira. In: KIMATI, H.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A.; REZENDE, J. A. M. (Eds.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 3 ed. São Paulo: Ceres, 1997. V. 2, p. 628-641.

TUMURA, K. G.; PIERI, C.; FURTADO, E. L. Murcha por *Ceratocystis* em eucalipto: avaliação de resistência e análise epidemiológica. **Summa Phytopathologica**, v. 38, n. 1, p. 54-60, 2012.

VALARINI, P. J.; TOKESHI, H. *Ceratocystis fimbriata* causal agent of fig dieback and its control. **Summa Phytopathologica**, v. 6, p.102-106, 1980.

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

WRIGHT, S. **Evolution and Genetics of Populations: Variability within and among Natural Populations**. Chicago: University of Chicago Press, 1978. 465 p.

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.

Recebido em: 06/07/2018

Aceito em: 12/02/2019