

UNIVERSIDADE DO ESTADO DE MATO GROSSO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA
E MELHORAMENTO DE PLANTAS

JEFERSON GONÇALVES DE JESUS

**Variabilidade genética de isolados de *Ceratocystis fimbriata* em
teca dos estados de Mato Grosso e Pará**

CÁCERES
MATO GROSSO - BRASIL
JANEIRO – 2021

JEFERSON GONÇALVES DE JESUS

**Variabilidade genética de isolados de *Ceratocystis fimbriata* em
teca dos estados de Mato Grosso e Pará**

Dissertação apresentada UNIVERSIDADE DO
ESTADO DE MATO GROSSO - CARLOS
ALBERTO REYES MALDONADO, como parte
das exigências do Programa de Pós-
Graduação em Genética e Melhoramento,
para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof.^a. Dra. Leonarda Grillo Neves

Coorientador: Prof. Dr. Marco Antonio Aparecido Barelli

Coorientador: Prof. Dr. Joaquim Manoel da Silva

CÁCERES
MATO GROSSO - BRASIL
Janeiro – 2021

J58v JESUS, Jeferson Gonçalves De.
Variabilidade Genética de Isolados de Ceratocystis Fimbriata em Teca dos Estados de Mato Grosso e Pará / Jeferson Gonçalves de Jesus - Alta Floresta/Cáceres/Tangará da Serra, 2021.
35 f.; 30 cm. (ilustrações) Il. color. (sim)

Trabalho de Conclusão de Curso
(Dissertação/Mestrado) - Curso de Pós-graduação Stricto Sensu (Mestrado Acadêmico) Genética e Melhoramento de Plantas, Faculdade de Ciências Biológicas e Agrárias, Multicampi, Universidade do Estado de Mato Grosso, 2021.

Orientador: Leonarda Grillo Neves

Coorientador: Marco Antonio Aparecido Barelli e Joaquim Manoel da Silva

1. Tectona Grandis. 2. Murcha de Ceratocystis. 3. Resistência Genética. 4. Diversidade Genética.. I. Jeferson Gonçalves de Jesus. II. Variabilidade Genética de Isolados de Ceratocystis Fimbriata em Teca dos Estados de Mato Grosso e Pará: .

CDU 630*233(817.2)

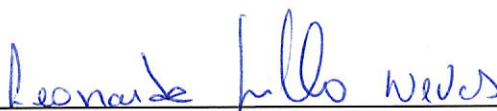
Variabilidade genética de isolados de *Ceratocystis fimbriata* em teca dos estados de Mato Grosso e Pará

JEFERSON GONÇALVES DE JESUS

Dissertação apresentada à UNIVERSIDADE DO ESTADO DE MATO GROSSO Carlos Alberto Reyes Maldonado, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas para a obtenção do título de Mestre.

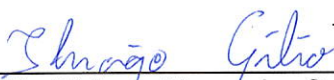
Aprovado em 27 de janeiro de 2021

Comissão Examinadora



Prof. Dra. Leonarda Grillo Neves

Orientadora – UNEMAT- Universidade do Estado de Mato Grosso Carlos Alberto Reyes Maldonado



Prof. Dr. Thiago Alexandre Santana Gilio

UNEMAT- Universidade do Estado de Mato Grosso Carlos Alberto Reyes Maldonado



Prof. Dr. Marco Antonio Aparecido Barelli

UNEMAT- Universidade do Estado de Mato Grosso Carlos Alberto Reyes Maldonado



Prof. Dra. Sandra da Costa Preisigke

UENF- Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro

Dedico principalmente aos meus pais e avós, minha família e a todos que me orientaram nesses anos de academia, pois sempre me apoiaram e nunca mediram esforços para que esse trabalho pudesse realizar-se.

“Aonde fica a saída?”, Perguntou Alice ao gato que ria.

“Depende”, respondeu o gato.

“De quê?”, replicou Alice;

“Depende de para onde você quer ir...”

Alice no país das maravilhas - Lewis Carroll

AGRADECIMENTO

A Deus, pelo dom da vida e o livre arbítrio de fazer dela o que desejarmos.

A Universidade do Estado de Mato Grosso e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas pela oportunidade desta qualificação.

A Capes pela bolsa de estudos concedida;

A minha orientadora Professora Dra. Leonarda Grillo Neves;

Aos meus coorientadores professor Dr. Marco Antonio Aparecido Barelli e professor Dr. Joaquim Manoel da Silva;

A professora Dra. Kelly Lana Araújo, e ao professor Dr. Thiago Alexandre Santana Gilio por terem me auxiliado, acreditado e apoiado durante todo o desenvolvimento da pesquisa, a vocês toda minha gratidão, admiração e respeito.

A todos os bolsistas de iniciação científica e voluntários do Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal (LMGV) da UNEMAT, que participaram e estiveram comigo desde o primeiro dia até a entrega dessa dissertação, vocês foram parte essencial para o desenvolvimento do trabalho.

BIOGRAFIA

Jeferson Gonçalves de Jesus, nasceu no dia 15 de agosto de 1993, na cidade de Araputanga-MT. Filho de Ronaldo de Jesus Santos, produtor rural, 48 anos e Luci Gonçalves Santos, técnica em enfermagem, dona de casa, 44 anos e irmão mais velho de Karla Rafaela Gonçalves de Jesus Santos, mãe, dona de casa e estudante de Letras. Concluiu o ensino fundamental e médio na escola de comunidade rural Professora Cleusa Braga Hortência, extensão da escola estadual João Sato em 2010. Em 2010 prestou vestibular na UNEMAT e em 2011 começou o curso de Bacharelado em Agronomia pela Universidade do Estado de Mato Grosso – Campus Cáceres, o qual foi concluído no ano de 2018. Durante os seis anos e meio de curso, participou de vários eventos de iniciação científica e começou a gostar da área da pesquisa científica. No ano de 2014 entrou como voluntário no Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal – LMGV e em 2015 foi bolsista de iniciação científica do mesmo na área de fitopatologia em pimentas. Em 2017 conseguiu um estágio em um grande grupo produtor de commodities agrícolas, e passou seis meses aprendendo na prática ensinamentos da faculdade e vendo as quais eram as semelhanças e discrepâncias entre a teoria e a realidade na lavoura. No ano de 2019, ingressou no Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento de Plantas pela UNEMAT no *campus* de Cáceres, na área de melhoramento de plantas, onde trabalhou com o melhoramento genético da Teca e seus patógenos, em especial na estimação da variabilidade genética do fungo *Ceratocystis fimbriata*, tema da dissertação.

Sumário

<u>1. INTRODUÇÃO</u>	9
<u>2. REVISÃO DE LITERATURA</u>	10
<u>2.1 A cultura da teca</u>	10
<u>2.2 Murcha de <i>Ceratocystis</i></u>	11
<u>2.3 Variabilidade Genética do fungo <i>Ceratocystis fimbriata</i></u>	13
<u>3. MATERIAL E MÉTODOS</u>	14
<u>3.1 Obtenção dos isolados de <i>C. fimbriata</i></u>	14
<u>3.2 Extração e Quantificação de DNA</u>	18
<u>3.3 Amplificação e genotipagem de loci microssatélites</u>	18
<u>3.4 Análise estatística com base nos marcadores SSR</u>	19
<u>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</u>	20
<u>6. CONCLUSÕES</u>	28
<u>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	28

RESUMO

JESUS; JEFERSON GONÇALVES; M. Sc.; Universidade do Estado de Mato Grosso - Carlos Alberto Reyes Maldonado; janeiro de 2021; VARIABILIDADE GENÉTICA DE ISOLADOS DE *Ceratocystis fimbriata*; Orientadora: Leonarda Grillo Neves. Conselheiros: Dr. Thiago Alexandre Santana Gilio, Dr. Marco Antônio Aparecido Barelli e Dra. Sandra da Costa Preisigke.

No setor florestal o acometimento por pragas e doenças podem ocorrer principalmente via irrigação, tratos culturais, falta de cuidados fitossanitários com as ferramentas, material propagativo contaminado, e outros, dentre as doenças que ocorrem com mais frequência em teca, vale ressaltar a causada pelo fungo *Ceratocystis fimbriata* que causa reduções na produtividade e danos a qualidade da madeira. Para a prevenção ou manejo de doenças em plantas, estudos quanto a variabilidade genética da população do agente causal torna-se de extrema importância, sendo assim o objetivo com esse trabalho foi investigar a diversidade genética de isolados de *Ceratocystis fimbriata* provenientes de teca, utilizando-se marcadores microssatélites. Foram coletados 70 isolados do fungo a partir de coletas nos estados do Mato Grosso e Pará. O fungo foi cultivado em meio MYEA por cerca de 14 dias para posterior extração de DNA, realizada com o kit *Wizard® Genomic DNA Purification Kit* (Promega). O DNA obtido desta extração foi submetido a PCR com primers para 14 *loci* alvos deste estudo. Posterior a PCR, foi realizada a eletroforese em gel de agarose em concentração de 2,5%, para a separação dos produtos oriundos da amplificação via PCR. As imagens obtidas a partir dos géis, foram submetidas à verificação do tamanho em pares de bases de cada amplicom para cada amostra e cada locos microssatélite. Para a análise de estrutura populacional foi realizada estimativa bayesiana pelo método MCMC. foi elaborada a matriz de distância genética foi estimada pelo método de Provesti, e o dendrograma representativo desta variabilidade genética foi elaborado pelo método do vizinho mais próximo (Neighbor-joining Tree) por meio do programa "R". Dos 14 *loci* estudados todos foram polimórficos, e através de análises de estrutura de população foi possível a identificação de duas populações com introgressão gênica entre elas. Já nas análises de variabilidade genética o dendrograma do vizinho mais próximo dividiu os isolados em em três diferentes grupos distintos onde o primeiro grupo foi formado por quatro isolados, o segundo formado por cinco isolados, e o terceiro grupo formado por 61 isolados de *C. fimbriata*. Conclui-se que a variabilidade entre os isolados coletados

em Mato Grosso e Pará é alta, fato este que evidencia a necessidade de estudos quanto a variabilidade patogênica, para definição de melhores estratégias para o controle genético deste patógeno em teca.

Palavras-chave: *Tectona grandis*; murcha de *Ceratocystis*; resistência genética; diversidade genética.

ABSTRACT

JESUS; JEFERSON GONÇALVES; M. Sc.; Mato Grosso State University - Carlos Alberto Reyes Maldonado; January 2021; GENETIC VARIABILITY OF *Ceratocystis fimbriata* ISOLATES; Advisor: Leonarda Grillo Neves. Counselors: Dr. Thiago Alexandre Santana Gilio, Dr. Marco Antônio Aparecido Barelli and Dr. Sandra da Costa Preisigke.

In the forestry sector, the attack by pests and diseases can occur mainly via irrigation, crop treatments, lack of phytosanitary cares with tools, contaminated propagating material, and others, among the diseases that occur most frequently in teak, it is worth mentioning the one caused by the fungus *Ceratocystis fimbriata* that reduces productivity and damage to the wood quality. To prevention or disease management in plants, studies of population genetic variability of the causal agent become extremely important, so the objective of this work was to investigate the genetic diversity of *Ceratocystis fimbriata* fungi from teak, using microsatellite markers. Seventy collected of the fungus were collected from collections in the states of Mato Grosso and Pará. The fungus was grown in MYEA medium for about 14 days for subsequent DNA extraction, performed with the Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega). The DNA of this extraction was prepared using PCR with primers for 14 loci targeted in this study. After PCR, 2.5% agarose gel electrophoresis was performed to separate products from PCR amplification. The images made from the gels were subjected to verification of the size in base pairs of each amplicon for each sample and each microsatellite locus. For a population structure analysis carried out by Bayesian encounters using the MCMC method. the genetic distance matrix was elaborated, it was estimated by the Provesti method, and the dendrogram representative of this genetic variability was elaborated by the method of the nearest neighbor (Neighbor-joining Tree) through the "R" program. Of the 14 loci studied, all were polymorphic, and through structure of population analyzes it was possible to identify two populations with gene introgression between them. In the analysis of genetic variability, the dendrogram of the nearest neighbor divided those granted into three distinct groups where the first group was formed by four granted, the second formed by five submitted, and the third group formed by 61 of *C. fimbriata*. It is concluded that the variability among the collected collected in Mato Grosso and Pará is high, a fact that highlights the need for studies regarding the pathogenic variability, in order to define better strategies for the genetic control of this pathogen in teak.

Keywords: *Tectona grandis*; withered; genetic resistance; Genetical diversity.

1. INTRODUÇÃO

As florestas plantadas são uma realidade no Brasil, segundo o último censo realizado em 2018 pelo IBÁ (Indústria Brasileira de Árvores) o país possuía 7,83 milhões de hectares plantados, sendo a maior parte ocupada pela cultura do eucalipto com 5,7 milhões de hectares, porém existem ainda outras espécies florestais que contribuem neste censo como por exemplo: a seringueira, acácia, paricá, araucária, teca dentre outras. Os plantios de teca no país ocupam aproximadamente 93 mil hectares, tornando a teca a quarta espécie mais plantada no Brasil, de acordo com os censos realizados desde o ano de 2010 estes números demonstram um aumento de mais de 28 mil hectares plantados entre os anos de 2010-2018 (IBÁ, 2019).

Tendo em vista esta expansão de área plantada, e aumento de demanda quanto à produção de mudas, e sabe-se que de maneira geral que em plantios florestais são praticadas a monocultura que aliada a um inadequado manejo fitossanitário, pode favorecer a dispersão de doenças no campo (Nascimento, 2019).

No setor florestal o acometimento por pragas e doenças ocorrem principalmente nos viveiros, esta disseminação ocorre via irrigação, tratos culturais sem os cuidados fitossanitários com as ferramentas, alta densidade de plantas no viveiro, material propagativo contaminado, e outros, dentre as doenças que ocorrem com mais frequência em viveiros de mudas florestais, as principais são causadas por fungos (Arco-Verde e Moreira, 1998; Grigoletti Júnior et al., 2001).

Na cultura da teca (*Tectona grandis*), dentre as principais doenças que ocorrem na espécie vale ressaltar a causada pelo gênero *Ceratocystis* (Velasteguí et al., 2010; Caldeira et al., 2014), esta importância deve-se ao fato deste patógeno causar doenças nos fustes das árvores, prejudicando a produtividade e qualidade da madeira, ou causando até mesmo a morte das árvores (Caldeira et al., 2014). No Brasil, o primeiro relato da ocorrência da doença em teca ocorreu no ano de 2009, pelo fungo *Ceratocystis fimbriata* Ell. e Haslt. na região do município de Cáceres-MT (Firmino et al., 2012). Posteriormente a ocorrência deste patógeno em teca, também foi registrada em outras localidades, como no Equador (Belezaca-Pinargote et al., 2018; 2020).

Quando se trata de prevenção ou manejo de doenças em plantas, estudos quanto à variabilidade genética da população do agente causal torna-se de extrema importância, tendo em vista que nestes casos a alternativa viável é a utilização de

genótipos resistentes à determinada espécie (Ferreira et al. 2013). Desta forma, o objetivo deste trabalho foi investigar e estimar a diversidade genética de isolados de *C. fimbriata* de plantios comerciais de teca coletados nos estados de Mato Grosso e Pará.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A cultura da teca

A teca é pertencente ao reino Plantae, ordem Lamiales, família Lamiaceae, gênero *Tectona*, espécie *Tectona grandis* (APG III, 2009) é uma espécie predominantemente alógama, com taxa de cruzamento de até 98% (Kertadikara; Prat, 1995), monoica e diploide ($2n=2x=36$ cromossomos) (Gill, 1983; Mathew et al., 1987).

Originária das regiões sul e sudeste da Ásia, onde ocorre naturalmente em quatro países: Índia, Laos, Mianmar e Tailândia (Kollert e Kleine 2018). Os plantios florestais da espécie existem em pelo menos três continentes, sendo os maiores plantios concentrados na Ásia (83%), África (11%) e Américas (Sul e Central) (6%), estes plantios representam uma área plantada estimada de 4,35 milhões de hectares (Kollert e Kleine, 2018).

As características segundo Lamprech (1990) e Lorenzi et al. (2003) a *Tectona grandis* L. f. pode atingir altura médias entre 25 e 35 m, com variantes capazes de alcançar 45 metros de altura e diâmetro de 2,5 m. O tronco é reto, com variações quanto a posicionamento de ramos, a casca é de cor parda e fissurada longitudinalmente. O sistema vascular é superficial, podendo ou não haver raízes tabulares. O albuno é estreito e claro, bem distinto do cerne, de coloração marrom viva e brilhante.

A madeira dessa espécie possui albuno amarelado a marrom, que uma vez exposta ao ar livre adquire um tom mais escuro. Os anéis de crescimento são nítidos e diferenciados em cortes transversais, textura grosseira, grã reta e de aparência oleosa ao tato (Higuchei, 1979). As folhas são opostas, elípticas, do tipo coriáceas com pecíolos pequenos ou ausentes. A espécie apresenta alta deciduidade foliar, nos períodos de seca e inverno (Figueiredo et al., 2005).

Devido sua qualidade de madeira, aliada a beleza, estabilidade, durabilidade e resistência, é uma espécie muito procurada no mercado internacional. Suas principais utilizações são na construção naval, fabricação de moveis, estruturas, pisos, painéis, postes e dormentes, com aplicações especiais na produção de peças de uso nobre e fino (Gomes 2002; Cruz et al., 2008).

Graças a características como durabilidade, cor suave, e força, é a madeira tropical mais utilizada em aplicações de luxo, como movelaria, construção naval e

decoração, desta forma possui grande importância no setor econômico de florestas, mesmo com uma produção de volume de madeira inferior quando comparada a outras espécies (Pandey e Brown, 2000).

Devido à versatilidade de utilização esta espécie segue crescendo no setor florestal brasileiro, com maiores áreas plantadas nos estados de Mato Grosso, Rondônia e Pará (da Rocha et al., 2015). Segundo os últimos censos realizados pelo IBÁ – Indústria Brasileira de Árvores, o Brasil passou de 87 mil há em 2016 para 93 mil há em 2018, o que representou um crescimento de aproximadamente 7% em área plantada no país (IBÁ, 2019).

2.2 Murcha de *Ceratocystis*

Várias doenças já foram relatadas na cultura da teca, entretanto as que ocorrem no fuste possuem maior importância na cultura da teca, tendo em vista que de maneira geral podem ocasionar mortalidade ou prejudicar a qualidade da madeira (Caldeira et al., 2014). Dentre as preocupações quanto às doenças do fuste a murcha de *Ceratocystis* é a de maior importância (Velasquí et al., 2010; Caldeira et al., 2014).

A murcha de *Ceratocystis* é causada pelo fungo fitopatogênico *Ceratocystis fimbriata*, O gênero *Ceratocystis* inclui 36 espécies, em sua maioria fitopatogênicas (Marin-Felix et al., 2017), infectando espécies florestais e frutíferas (Van Wyk et al., 2013; De Beer et al., 2014), e várias tuberculosas (Wingfield et al., 2013; Harrington et al., 2014). As espécies deste gênero infectam seus hospedeiros através de ferimentos, e após a do xilema, super brotações e morte das plantas em reboleira poderão aparecer (Van Wyk et al., 2013).

O primeiro relato da ocorrência da murcha de *Ceratocystis* causada pelo patógeno *C. fimbriata* em teca no Brasil ocorreu no ano de 2009 em plantios na região do município de Cáceres-MT (Firmino et al., 2012). Este patógeno possui uma ampla gama de hospedeiros, já foi relatado em *Mangifera indica* nos estados de Pernambuco e São Paulo (Viégas, 1960), *Eucalyptus* spp. na Bahia (Ferreira et al., 1999), Minas Gerais, Maranhão e Mato Grosso do Sul (Alfenas et al., 2004).

A infecção dos hospedeiros pelo *C. fimbriata*, podem ocorrer via raízes (Ferreira et al., 2013), outra forma comum de disseminação da doença em novas áreas é através de ferramentas contaminadas e propagação de plantas infectadas

(Harrington, 2000; Baker et al., 2003; Cabi, 2005), ou também via insetos (Harrington, 2009; Ferreira et al., 2010). Após a penetração, o fungo coloniza o xilema, incluindo as células do parênquima radial, eventualmente escurecendo os tecidos infectados e causando murcha e morte de toda a planta ou ramos individuais (Alfenas et al., 2004, Ferreira et al., 2006).

Os sintomas externos da murcha de *Ceratocystis* em espécies lenhosas geralmente são observados iniciando-se pela murcha de galhos e ramos, e por meio de secções no fuste é possível observar lesões que podem ser contínuas ou descontínuas, podendo ocorrer em forma de estrias escuras ou descoloração do lenho (Ferreira et al., 2013). Este escurecimento radial da madeira pode ser observado ao longo do caule infectado, desde as raízes até os ramos superiores e podem ser observados também cancrios no colmo e morte do tecido em forma de coroa nos galhos podados (Laia et al., 2000, Alfenas et al., 2004).

Os estudos existentes na literatura sobre a sintomatologia da infecção por *C. fimbriata* em espécies lenhosas são em sua maioria sobre a ocorrência da doença em eucalipto, sobre a ocorrência em teca o único sintoma relatado por Firmino et al. (2012) foi o da murcha característica da doença e recentemente pelo estudo de Oliveira et al. (2020) foi possível verificar também a ocorrência dos sintomas internos característicos da doença, onde o autor relatou a ocorrência de lesões escuras no tecido vascular da teca.

2.3 Variabilidade Genética do fungo *C. fimbriata*

A espécie denominada *C. fimbriata* e descrita por Ellis & Halsted, pertence à classe Pyrenomycetes, ordem Ophiostomatales, subdivisão Ascomycotina, do gênero *Ceratocystis* (Trindade e Furtado, 1997; Delgado e Suárez, 2003; Valdetaro et al., 2018; Brito et al., 2019). É um ascomiceto, caracterizado por apresentar em sua fase de reprodução sexual ascos e ascósporos, e para reprodução assexuada produzir conídios, estes conídios podem ser cilíndricos, barriliforme e aleuroconídios (Van Wyk et al., 1991; Marincowitz et al., 2020).

Com base em estudos anteriores foi possível dividir o gênero *Ceratocystis* em três complexos de espécies: *C. coerulescens*, *C. fimbriata* e *C. moniliformis* (Marincowitz et al., 2020; Harrington et al., 1996, Johnson et al., 2005). O complexo

C. fimbriata, pode ser dividido em três clados geográficos sendo eles: da América do Norte, América Latina e Ásia (Harrington, 2000; Baker et al., 2003).

Sabe-se que no Brasil existem populações naturais e introduzidas de *C. fimbriata* (Ferreira et al., 2013), segundo a literatura a espécie possui uma variabilidade genética relevante, e a especificação do patógeno quanto a seus hospedeiros pode estar relacionada a variabilidade existente (Baker et al., 2003; Firmino et al., 2015).

Um dos principais desafios da fitopatologia é entender detalhadamente como patógenos são reconhecidos por seus hospedeiros e como a resistência e a suscetibilidade são estabelecidas. Neste campo, a biologia molecular, a bioinformática e o estudo da expressão gênica nos eventos de patogenicidade têm amparado significativamente (Verhage et al., 2010; Lodha e Basak, 2012; Schenk et al., 2012; Sedano e Carrascal, 2012).

Com o aprimoramento tecnológico, as técnicas moleculares têm ganhado destaque em sua utilização em programas de melhoramento, acelerando o desenvolvimento destes, como por exemplo com a utilização de marcadores moleculares. Um fator determinante, que impulsiona a utilização destes em programas de melhoramento, é a possibilidade de uma ampla amostragem do genoma dos indivíduos, capacitando a identificação de origem, e mutações em regiões não codificadoras que podem estar presentes no DNA (Toppa e Jadoski, 2013).

Dentre os marcadores, os marcadores em regiões microssatélites (Simple Sequence Repeat) tem se destacado como uma possibilidade eficiente para caracterização de genomas complexos. Este, foi desenvolvido com o intuito de explorar repetições microssatélites sem a necessidade de utilização do sequenciamento do DNA (Zietkiewicz et al. 1994). O tamanho dos fragmentos amplificados varia de 200 a 2000 pb e apresentam alta reprodutibilidade, devido ao uso de iniciadores longos (16 a 25 pares de bases) que são capazes de reconhecer múltiplos loci no genoma para amplificar em especial as sequências microssatélites de distintos tamanhos (Zietkiewicz et al. 1994). Além do que, de acordo com estudos de Harrington et al. (2011), o gene "tipo de acasalamento" MAT1-2 correspondeu melhor com o host de origem, sendo, portanto, mais apropriada para separar espécies de o complexo *C. fimbriata*.

Além da escolha correta da região gênica, a inclusão de populações naturais do patógeno é imensamente importante para o reconhecimento de espécies. Sem isto, cada população introduzida pode aparecer como uma linhagem distinta e poderia ser descrito como uma nova espécie (Harrington et al., 2014; Oliveira et al., 2015). Contudo, o deslocamento de material vegetal infectado em várias regiões do mundo torna difícil analisar se as populações *C. fimbriata* são nativas ou oriundas de introdução em uma determinada região (CABI, 2005).

Além disso, populações que foram introduzidas recentemente pela atividade humana podem ser altamente diferenciadas de outras populações devido à distância limitada de dispersão e a muita reprodução auto-reprodutiva ou assexuada (Ferreira et al. 2010; Engelbrecht et al. 2004).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção dos isolados de *C. fimbriata*

Foram utilizados 70 isolados de *C. fimbriata* de localidades distintas dos Estados do Mato Grosso e Pará (Tabela 1). Os isolados do fungo foram obtidos a partir de coletas realizadas em áreas de plantios comerciais de teca com variação de idade entre cinco e doze anos de plantio, com ocorrência de sintomas de murcha e seca de plantas em reboleira nos municípios de Barra do Bugres, Cáceres, Gloria d' Oeste, Indiavaí, Porto Esperidião e Rosário Oeste, Pau d'arco e Santana do Araguaia.

Tabela 1. Relação das localidades e quantidade de isolados de *C. fimbriata* utilizados neste estudo.

Estado	Município	Quant. de isolados
Pará	Santana do Araguaia	13
	Pau d'arco	2
Mato Grosso	Barra do Bugres	21
	Cáceres	10
	Gloria d' Oeste	4
	Indiavaí	3
	Porto Esperidião	12
	Rosário d' Oeste	5
Total		70

Para a coleta das amostras era retirado um feixe do lenho da árvore sintomática, a aproximadamente 40 centímetros do solo com auxílio de machado.

Estes feixes coletados eram então armazenados em saco de papel, identificados com o número da coleta, nome da fazenda e número do ponto de GPS (Tabela 2) e posteriormente eram encaminhadas ao Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal (LMGV) da UNEMAT – Campus Cáceres, para isolamento, análise e identificação de fungos presentes.

Tabela 2. Identificação na micoteca da UNEMAT, município de coleta e localização dos isolados de *C. fimbriata*.

Isolado	Município - UF	Localização
UNEMATC007	Cáceres - MT	16°04'59.6"S 58°12'29.7"W
UNEMATC010	Cáceres - MT	16°05'08.4"S 58°12'06.5"W
UNEMATC014	Cáceres - MT	16°04'10.2"N 58°12'18.8"W
UNEMATC015	Cáceres - MT	16°04'09.7"S 58°12'13.4"W
UNEMATC016	Cáceres - MT	16°04'11.8"S 58°11'42.2"W
UNEMATC022	Gloria d' Oeste - MT	15°51'33.7"S 58°12'20.0"W
UNEMATC030	Gloria d' Oeste - MT	15°51'10.4"S 58°12'20.6"W
UNEMATC034	Gloria d' Oeste - MT	15°51'01.1"S 58°13'20.3"W
UNEMATC049	Barra do Bugres - MT	14°57'06.3"S 57°58'16.3"W
UNEMATC053	Barra do Bugres - MT	14°57'03.6"S 57°58'34.2"W
UNEMATC059	Barra do Bugres - MT	14°57'14.9"S 57°59'09.6"W
UNEMATC074	Barra do Bugres - MT	14°52'45.4"S 58°00'00.4"W
UNEMATC076	Barra do Bugres - MT	14°52'58.9"S 57°59'32.8"W
UNEMATC089	Barra do Bugres - MT	14°54'48.9"S 57°59'00.2"W
UNEMATC090	Barra do Bugres - MT	14°54'29.3"S 57°59'12.5"W
UNEMATC092	Barra do Bugres - MT	14°54'15.4"S 57°58'29.0"W
UNEMATC103	Barra do Bugres - MT	14°47'56.6"S 57°58'56.3"W
UNEMATC132	Porto Esperidião - MT	15°49'31.0"S 58°31'53.3"W
UNEMATC134	Porto Esperidião - MT	15°50'19.9"S 58°32'23.1"W
UNEMATC136	Porto Esperidião - MT	15°49'08.2"S 58°32'32.7"W
UNEMATC144	Indiavaí - MT	15°26'23.2"S 58°34'26.8"W
UNEMATC146	Indiavaí - MT	15°26'43.6"S 58°33'24.4"W
UNEMATC150	Indiavaí - MT	15°26'37.2"S 58°34'13.0"W
UNEMATC153	Rosário Oeste - MT	14°49'08.5"S 56°29'49.9"W
UNEMATC173	Pau d'arco - PA	7°52'57.6"S 50°11'12.3"W
UNEMATC176	Santana do Araguaia - PA	8°34'53.3"S 50°34'53.2"W
UNEMATC177	Santana do Araguaia - PA	8°35'13.6"S 50°35'42.6"W
UNEMATC197	Santana do Araguaia - PA	8°57'20.4"S 50°29'31.5"W
UNEMATC210	Cáceres - MT	16°06'54.0"S 58°12'17.1"W
UNEMATC213	Cáceres - MT	16°06'01.6"S 58°10'19.0"W
UNEMATC220	Cáceres - MT	16°04'55.6"S 58°11'52.1"W
UNEMATC221	Cáceres - MT	16°04'50.9"S 58°12'38.1"W
UNEMATC233	Cáceres - MT	16°07'57.7"S 58°30'34.2"W
UNEMATC253	Gloria d' Oeste - MT	15°49'51.5"S 58°13'39.4"W
UNEMATC255	Barra do Bugres - MT	14°58'40.9"S 57°59'29.4"W

*Continua...

Continuação da Tabela 2. Identificação na micoteca da UNEMAT, município de coleta e localização dos isolados de *C. fimbriata*.

Isolado	Município - UF	Localização
UNEMATC256	Barra do Bugres - MT	14°58'45.7"S 57°59'06.0"W
UNEMATC261	Barra do Bugres - MT	14°58'45.7"S 57°59'06.0"W
UNEMATC264	Barra do Bugres - MT	14°57'47.4"S 57°59'07.4"W
UNEMATC266	Barra do Bugres - MT	14°57'13.9"S 57°58'26.3"W
Isolado	Município - UF	Localização
UNEMATC269	Barra do Bugres - MT	14°55'54.1"S 57°58'17.9"W
UNEMATC270	Barra do Bugres - MT	14°55'39.0"S 57°58'12.0"W
UNEMATC271	Barra do Bugres - MT	14°55'14.0"S 57°58'10.8"W
UNEMATC278	Barra do Bugres - MT	14°53'58.7"S 57°58'30.0"W
UNEMATC279	Barra do Bugres - MT	14°53'55.5"S 57°58'39.6"W
UNEMATC282	Barra do Bugres - MT	14°54'16.1"S 57°58'57.0"W
UNEMATC283	Barra do Bugres - MT	14°54'42.5"S 57°59'10.7"W
UNEMATC292	Rosário Oeste - MT	15°06'11.0"S 56°43'46.4"W
UNEMATC297	Rosário Oeste - MT	15°07'23.9"S 56°44'38.1"W
UNEMATC299	Rosário Oeste - MT	15°07'42.3"S 56°45'03.1"W
UNEMATC305	Rosário Oeste - MT	15°04'39.8"S 56°33'23.1"W
UNEMATC335	Santana do Araguaia - PA	8°57'32.2"S 50°31'44.5"W
UNEMATC336	Santana do Araguaia - PA	8°56'26.0"S 50°31'03.7"W
UNEMATC338	Santana do Araguaia - PA	8°56'48.0"S 50°29'53.7"W
UNEMATC345	Santana do Araguaia - PA	8°55'59.8"S 50°29'08.6"W
UNEMATC348	Santana do Araguaia - PA	8°56'17.9"S 50°20'35.1"W
UNEMATC350	Santana do Araguaia - PA	8°36'18.6"S 50°28'44.5"W
UNEMATC351	Santana do Araguaia - PA	8°51'53.6"S 50°26'25.9"W
UNEMATC354	Santana do Araguaia - PA	8°53'01.7"S 50°26'15.6"W
UNEMATC361	Santana do Araguaia - PA	8°37'45.4"S 50°38'02.5"W
UNEMATC362	Santana do Araguaia - PA	8°37'53.5"S 50°38'14.4"W
UNEMATC371	Pau d'arco - PA	8°56'15.2"S 50°29'52.0"W
UNEMATC653	Porto Esperidião - MT	15°46'42.4"S 58°35'47.6"W
UNEMATC659	Porto Esperidião - MT	15°46'31.6"S 58°35'30.8"W
UNEMATC660	Porto Esperidião - MT	15°46'32.4"S 58°35'25.3"W
UNEMATC662	Porto Esperidião - MT	15°46'39.1"S 58°35'26.9"W
UNEMATC666	Porto Esperidião - MT	15°46'24.2"S 58°35'31.4"W
UNEMATC667	Porto Esperidião - MT	15°46'21.9"S 58°35'31.9"W
UNEMATC669	Porto Esperidião - MT	15°46'32.8"S 58°35'38.5"W
UNEMATC672	Porto Esperidião - MT	15°46'55.6"S 58°35'49.2"W
UNEMATC673	Porto Esperidião - MT	15°47'00.2"S 58°35'41.3"W

O isolamento do *fungo C. fimbriata* foi realizado conforme proposto por Moller e Dêvay (1968) com modificações. As amostras coletadas foram fragmentadas em pequenos filetes onde o escurecimento dos vasos era mais nítido, estes fragmentos foram então posicionados entre discos de cenoura com cerca de 4-5 mm

de espessura e colocados em câmara úmida a uma temperatura de $\pm 25^{\circ}\text{C}$ com fotoperíodo de 12 horas durante todo o período de avaliação, a primeira avaliação deu-se no quinto dia após deposição em câmara úmida e posteriormente todas as amostras foram avaliadas diariamente para verificação da ocorrência das estruturas do patógeno.

Com a formação do peritécio, estrutura característica de *C. fimbriata*, foi coletado uma porção da massa de ascósporos presente no ápice da estrutura com auxílio de uma agulha devidamente esterilizada fixada em um cabo de kolle. Os ascósporos coletados foram então transferidos para placas de Petri contendo meio MYEA (2% de Malte, 0,2% de extrato de levedura e 2% de Agar) e colocadas em B.O.D e incubados em condições controladas a $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ sob 24 horas de escuro. Os isolados de *C. fimbriata* coletados foram identificados morfológicamente, através de características específicas da espécie, considerando características como: coloração da colônia, formato e tamanho dos ascósporos, clamidósporos e endoconídios e endoconidióforos (Engelbrechte e Harrington, 2001; Johnson et al. 2005).

Os isolados obtidos foram armazenados em três tipos de preservação, papel de filtro, água destilada esterilizada (Catellani) e Congelamento a -80°C na Micoteca do Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal da Universidade do Estado de Mato Grosso (UNEMAT), campus Cáceres.

3.2 Extração e Quantificação de DNA

Esta etapa foi realizada no Laboratório de Recursos Genéticos & Biotecnologia (LRG&B) da UNEMAT – Cáceres, e para a extração de cada isolado, foi utilizado uma placa de Petri de 60mm toda ocupada pela colônia do fungo. Esta colônia foi cultivada em MYEA (Malt Yeast Extract Agar) e incubado a $\pm 25^{\circ}\text{C}$ por cerca de 10-14 dias antes da extração do DNA usando o Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega Corp., Madison, WI, USA) seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante, com algumas modificações para uso em TissueLyser LT (QIAGEN).

A confirmação da qualidade e quantidade do DNA extraído foi realizada por meio da eletroforese em gel de agarose 1%. O DNA extraído foi comparado com DNA padrão (λ), com um fluorômetro Qubit® 2.0 (Invitrogen) e foram obtidas amplitudes de variação entre 10 e 300 ng/ μL . O DNA quantificado foi diluído e ajustado para a obtenção das soluções de trabalho para 5 ng μL^{-1} .

3.3 Amplificação e genotipagem de loci microssatélites

Foram utilizados 14 iniciadores microssatélites (SSR), para as amplificações iniciais, desenvolvidos por (Steimel et al. 2004) estes, (Tabela 2), foram selecionados com base em padrões de bandamento como: intensidade, polimorfismo e repetitividade

As reações de amplificação foram conduzidas em termociclador *Amplitherm Thermalcycles* com volume final de 25µl, onde em cada amostra utilizou-se 25 ng de DNA total (5 µL), 2,5 µL de tampão de PCR 10x, 0,75µL de MgCl₂ a 50mM, 0,31µL de dNTP a 20 mM, 1,25U de taq polimerase, 2,5 µL de cada primer e 13,68 µL H₂O ultrapura q.s.p. O programa de amplificação foi proposto por Harrington (2001) sendo um passo de desnaturação inicial a 94°C por 4 minutos, seguido por 35 ciclos a 94°C durante 30 segundos, 56-62°C (dependendo do iniciador) por 60 segundos, e 72°C por 45 segundos, e um ciclo de extensão final por 72°C durante 5 minutos.

Tabela 3. Relação das sequências (F: forward; R: reverse) e temperatura de anelamento para os 14 iniciadores utilizados neste estudo.

Primers	Sequências (5'- 3')	Temperatura de Anelamento (°C)
AAG91F	5'-CCTGAACTGACAGAGACACTT-3'	58
AAG91R	5'-GCACCAGCTGTTCTAATCGT-3'	
CCAA9F	5'-GGCTGGTTTCATCATGATGTT-3'	58
CCAA9R	5'-CTATGGCACCTAAGCAATCT-3'	
CCAA10F	5'-TGACACGCGCTTCACTAACAG-3'	56
CCAA10R	5'-TGCACCATACCCAGGGGACA-3'	
CCAA15F	5'-GCTACAGCAGCCGCAGTG-3'	59,8
CCAA15R	5'-GATTGGCGTTAGTGTAGGT-3'	
CAA381F	5'-AATTCGGGAGCTGCTGTGAG-3'	59,8
CAA381R	5'-GAGCCCCAGCCTCAAACCTCA-3'	
CCAA80F	5'-ACCCGTCTCGTATTGGCTAT-3'	58
CCAA80R	5'-AATCGTTTCGCATTCAGGTGG-3'	
DBVCAT11F	5'-CCCAATTTCCCATTCTGATTC-3'	59,8
WCAT11R	5'-AGTACAGGATCAACTATGGCATTTCAA-3'	
WCAT3K1F	5'-AGGTGCCCTACACTTTTTTGAA-3'	58
WCAT3K1R	5'-GTTTTGCTTCTGGCTACTTTGGTACTG-3'	
CAT9X1F	5'-CCTCGCCTTAAGTTGAAGAAG-3'	58
CAT9X2R	5'-GCGGTTGAGGTTGAAGTGTAGAGTGGT-3'	
CAT12X1F	5'-ACAAAAGACGGCACGCATACA-3'	58
CAT12X1R	5'-TGGGGAGAAGTCTGAGTAGAGGGACAA-3'	
CAGDL251F	5'-AAGCCCGGTTACAGAAGCAAG-3'	62
CAGDL251R	5'-GTGCTTGAGTTTGTCCAGGGTTCGGTA-3'	

*Continua...

Continuação da Tabela 3. Relação das sequências (F: forward; R: reverse) e temperatura de anelamento para os 14 iniciadores utilizados neste estudo.

Primers	Sequências (5'- 3')	Temperatura de Anelamento (°C)
CAG9001F	5'-CTTTGCTAGTCCCCAGTTCCA-3'	58
CAG9002R	5'-GCGGACATGGGATTGTAAGAGCCTGAG-3'	
GACA601F	5'-GGCGACGGCAAATAGCAAAAT-3'	58
GACA601R	5'-GATGTGTGGTGTGCTGTGGTATGCTGCTG-3'	
GACA6K1F	5'-AAACATCTCGGCAGAACAGC-3'	59,8
GACA6X2R	5'-TGCCGCTTTTGCTTTGTAGTGTTCTTG-3'	

3.4 Análise estatística com base nos marcadores SSR

As imagens obtidas a partir dos géis com os fragmentos de DNA, amplificados e separados, foram submetidas à verificação de pesos moleculares para obtenção de dados sobre os alelos, por meio da comparação entre as bandas e o padrão (Ladder) de 100 pares de bases (pb). Esta avaliação foi realizada por meio do programa de fotodocumentação LABIMAGE 1D, versão 2.3 (Loccus Biotecnologia).

Na análise de estrutura populacional dos 70 isolados em estudo, foi utilizado o Programa Structure 2.3.4. Esta análise foi realizada com 10.000 repetições em burn-in e 100.000 repetições na Cadeia de Markov-Monte Carlo – MCMV (Evanno et al., 2005). Com base nos parâmetros padrão do programa e mantendo o modelo de mistura populacional (admixture model), foram efetuadas 100 simulações de agrupamento, com o fator K (número de grupos ou populações) variando de 1 a 10, sendo avaliadas, no arquivo de saída, as probabilidades P(K) dos indivíduos pertencerem ao k-ésimo grupo, tanto numericamente como na forma gráfica (bar plot) gerada pelo programa.

A análise de Variância Molecular foi realizada (Peakall e Smouse, 2006; 2012). Foi calculada a matriz de distância Provesti, determinado pelas frequências alélicas em cada loco avaliado. Com base na matriz de distâncias obtida, foi elaborada a árvore do vizinho mais próximo (Neighbor-joining Tree). Todas as análises foram realizadas utilizando o pacote Poppr (Kamvar et al., 2015), por meio do programa R.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 14 *loci* microssatélites testados nos 70 isolados, todos foram polimórficos (Tabela 4) com a variação de ao menos dois alelos. O marcador microssatélite com maior número de variação alélica foi o CAA381 com sete alelos, seguido pelo CCAA9 com seis alelos. Para os marcadores CCAA10, CCAA15 e GACA6K1 foi observado um total de cinco alelos. Já para o marcador WCAT3K1 foi observado quatro alelos, seguido pelos marcadores CCAA80, DBVCAT11, CAT12X1 e CAGDL251 com três alelos para cada locus. Os marcadores AAG91, CAT9X1, CAG9001 e GACA601 foram bi-alélicos para essa população de 70 isolados de *C. fimbriata*.

Tabela 4. Marcadores moleculares microssatélites, número de alelos e tamanho dos amplicons em pares de bases (pb) de *C. fimbriata*.

Locus	(Número) e tamanho
AAG91	(2) 385-400
CCAA9	(6) 190, 210, 220, 230, 235, 240
CCAA10	(5) 130, 140, 150, 160, 180
CCAA15	(5) 230, 250, 260, 270, 290
CAA381	(7) 160, 170, 180, 190, 200, 210, 240
CCAA80	(3) 380, 400, 420
DBVCAT11	(3) 250, 270, 290
WCAT3K1	(4) 320, 330, 340, 350
CAT9X1	(2) 300, 310
CAT12X1	(3) 390, 400, 410
CAGDL251	(3) 320, 330, 350
CAG9001	(2) 210, 225
GACA601	(2) 200, 210
GACA6K1	(5) 230, 240, 250, 270, 300
Total	(52) 130-420

O programa Structure fornece um gráfico em barras, que permite visualizar a alocação de cada indivíduo à sua provável população. Cada indivíduo é representado por uma barra vertical e cada população é identificada por cores distintas. A representação do número de populações definido pelo Structure é indicada pelo valor de K. Observa-se a partir da análise dos resultados obtidos pelo Structure Harvester (Earl & vonHoldt, 2012), que implementa o método de Evanno (Evanno et al., 2005), que o valor de K com maior valor de ΔK associado foi igual a 2 (Figura 1). Sugerindo que a análise genética dos 70 isolados permitiu a identificação de duas populações.

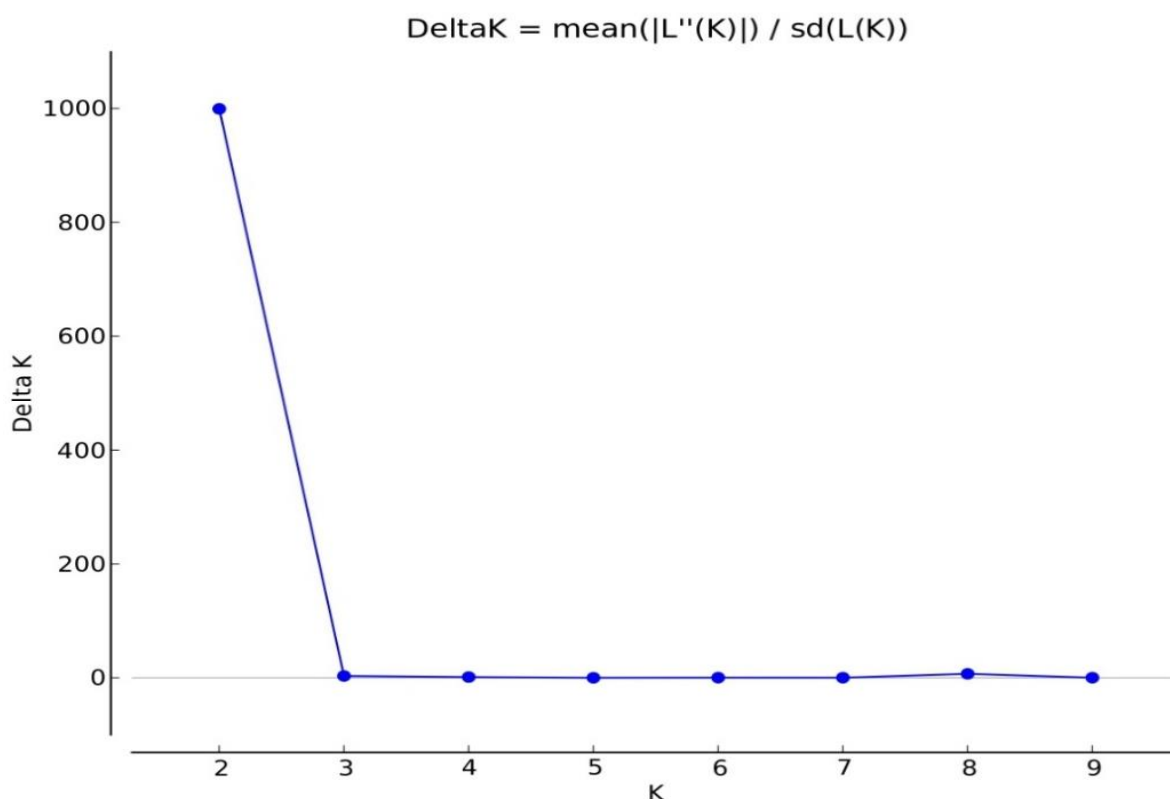


Figura 1. Gráfico gerado a partir do software Structure Harvester. No eixo x, tem-se o número de subgrupos avaliados (K). No eixo y, a estatística ΔK , obtida de acordo com o método de Evanno et al. (2005).

Na Figura 2 é apresentado os resultados obtidos pelo Structure admitindo-se o valor detectado de $K=2$ onde foi discriminado os 70 isolados em duas populações (vermelho e verde) e as possíveis introgressões gênicas em ambas as direções. Na população 1 foram agrupados os isolados 53, 59, 74, 76, 92, 132, 144, 153, 210, 213, 220, 233, 253, 255, 256, 261, 270, 271, 278, 282, 283, 297, 299, 338, 348, 351, 354, 361, 653, 659, 660, 662, 666, 667, 669, 672 e 673, totalizando 37 isolados pertencentes a este grupo. A população 2 em verde foi composta pelos isolados 7, 10, 14, 15, 16, 22, 30, 34, 49, 89, 90, 103, 134, 136, 146, 150, 173, 176, 177, 197, 221, 264, 266, 269, 279, 292, 305, 335, 336, 345, 350, 362 e 371 (Figura 2).

Houve introgressão gênica da população 2 na população 1 para os isolados 253, 255, 256, 270 e 348, sendo os isolados 255 e 270, com maior nível de introgressão. Já as introgressões da população 1 em isolados da população 2 estão presentes nos isolado 7, 22, 30, 34, 49, 89, 90, 103, 134, 136, 150, 173, 176, 197, 266, 269, 305, 335, 336, 345, 350, 362 e 371, sendo os isolados 34, 136, 345 e 362,

os isolados com maiores níveis de introgressão da população 1 na população 2 (Figura 2).

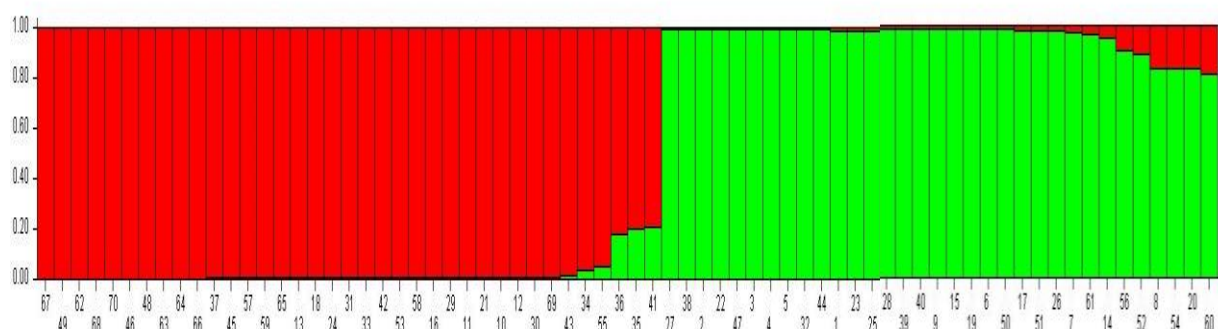


Figura 2. Alocação dos 70 isolados avaliados às duas populações detectadas na análise dos genótipos dos marcadores microssatélites. Os comprimentos relativos das barras em verde e vermelho, em cada coluna (isolado) representam as probabilidades de alocação dos indivíduos a cada uma das populações detectadas.

As estimativas de introgressões e trocas gênicas podem ser importantes para o entendimento da geração de virulência. A pelo menos dois cenários pelo qual essas trocas gênicas podem influenciar de forma evolucionária na virulência. A primeira é que agentes causadores de doenças podem fazer trocas gênicas, e assim interagir para adaptar ou ainda transmitir a capacidade de virulência (Coyne e Orr 2004; Arnold 2006). Em um segundo cenário, se espécies em comum divergem devido suas estratégias de virulência, híbridos interespecíficos podem se formar gerando variantes com fatores de virulência das duas espécies (Kasuga et al 2003; Sepúlveda et al., 2017).

O gênero *Ceratocystis* abrange 36 espécies até o momento, que a maioria delas são patogênicas (De Beer et al., 2014; Marin-Felix et al., 2017), e são patogênicas a vários hospedeiros com plantas florestais, frutíferas e várias tuberculosas (Van Wyk et al., 2013; De Beer et al., 2014; Harrington et al., 2014; Valdetaro et al., 2018). Devido à proximidade estas espécies podem gerar híbridos interespecíficos, gerando introgressões, que a vezes geram variabilidade quanto a virulência (Molano et al., 2018). Daí a importância de se verificar o número de populações de um determinado fitopatógeno e a quantidade de introgressões entre estas populações, para assim definir as melhores estratégias para o controle genético da murcha de *Ceratocystis* na teca.

A diversidade genética de Nei (H) e a diversidade genotípica de Stoddart e Taylor (G) foram estimadas considerando todos os isolado de *C. fimbriata*, considerando a estrutura genética populacional pelo método de método de Evanno e por fim considerando as regiões de coleta (Tabela 5). Considerando todos os isolados as estimativas de quanto a diversidade genética de Nei foi de 4,17 e a diversidade genotípica foi de 62,8. Já considerando a estrutura genética populacional a população 1 apresentou maior diversidade genética e genotípica (H = 3,50; G = 33,0) do que a população 2 (H = 3,46; G = 30,4) (Tabela 5).

Tabela 5. Estimativas de diversidade genética de Nei (H) e a diversidade genotípica de Stoddart e Taylor (G) para população geral, para populações subdividas por estrutura genética de população e para as regiões de coleta dos isolados de *C. fimbriata*.

Populações	Nº de isolados	H	G
População 1	37	3,50	33,0
População 2	33	3,46	30,4
Populações de coleta			
Barra do Bugres	21	17,60	2,9
Cáceres	10	2,30	10,0
Gloria d' Oeste	04	1,38	4,0
Indiavaí	03	1,01	3,0
Pau d'arco	02	0,69	2,0
Porto Esperidião	12	2,48	12,0
Rosário d' Oeste	05	1,61	5,0
Santana do Araguaia	13	2,56	13,0
Geral	70	4,169	62,8

Também foi estimada a diversidade genética e a diversidade genotípica por região de coleta, sendo as maiores estimativas de diversidade Genéticas em Barra do Bugres (H = 17,60), Santana do Araguaia (H = 2,56) e Porto Esperidião (H=2,48). As maiores estimativas de diversidade genotípica foram observadas em Santana do Araguaia (G = 13,0), seguida de Porto Esperidião (G = 12,0) e Cáceres (G = 10,0).

Valdetaro et al. (2018) também trabalhando com 14 marcadores microsatélites em população de 13 isolados de teca teve estimativas de H e G (1,74 e 0,09, respectivamente), inferiores às encontradas neste trabalho. Os mesmos autores trabalharam com isolados de *C. fimbriata* isolados de outras espécies hospedeiras *Carapa guianensis*, *Colocassia esculenta*, *Mangifera indica* e *Eucalyptus*

spp., em que nestas populações as maiores estimativas de G e H foram de 8,23 e 0,38, respectivamente, estimativas estas inferiores as deste trabalho.

Em outro trabalho com 60 isolados de *C. fimbriata*, obtidos de genótipos de Kiwi, *Eucalyptus* e de espécies da Mata Atlântica, Ferreira et al. (2017), observaram valores de G que variaram de 2,84 a 3,52, próximos aos encontrados neste trabalho, o que indica que a variabilidade deste patógeno como hospedeiro na Teca é enorme.

A partir das frequências alélicas das populações foi estimada a distância genética de Provesti, e o dendrograma foi gerado pelo método do vizinho mais próximo (Figura 3). Com alto suporte de bootstrap (100%), os isolados foram divididos em três grupos distintos

O primeiro grupo foi formado por quatro isolados, sendo três coletados no município de Cáceres-MT (213, 220 e 233) e um coletado no município de Barra do Bugres-MT (59). O segundo grupo foi formado por cinco isolados, sendo dois (297 e 299) coletados em e Rosário Oeste, outros dois em Barra do Bugres (283 e 278) e um no município de Porto Esperidião (669).

O terceiro grupo foi formado por 61 isolados de *C. fimbriata*, sendo este subdivididos em dois subgrupos claros. O primeiro subgrupo foi formado pelos isolados 361, 338, 354, 351, 653, 253, 270, 667, 673, 672, 666, 662, 660, 659, 92, 282, 271, 261, 132, 76, 153, 74, 53, 144 e 210, com quatro isolados de Santana do Araguaia- PA, nove isolados coletados de Porto Esperidião - MT, dois isolados de Indiavaí – MT, oito isolados de Barra do Bugres – MT, um isolado de Gloria d' Oeste – MT e um Isolado de Indiavaí.

No segundo subgrupo do terceiro grupo foram agrupados 36 isolados, sendo este subgrupo composto por metade dos isolados deste estudo. Este subgrupo foi composto pelos isolados 256, 348, 255, 136, 34, 336, 350, 362, 345, 371, 7, 134, 103, 305, 335, 269, 266, 177, 264, 292, 221, 279, 176, 197, 173, 89, 49, 22, 90, 150, 30, 146, 10, 15, 16 e 14, sendo dois isolados coletado de Pau d'arco – PA, dez isolados de Barra do Bugres – MT, nove isolados de Santana do Araguaia – PA, dois isolados de Porto Esperidião – MT, três isolados de Gloria d' Oeste, seis isolados de Cáceres – MT, dois isolados de Indiavaí – MT e dois isolados de Rosário Oeste – MT.

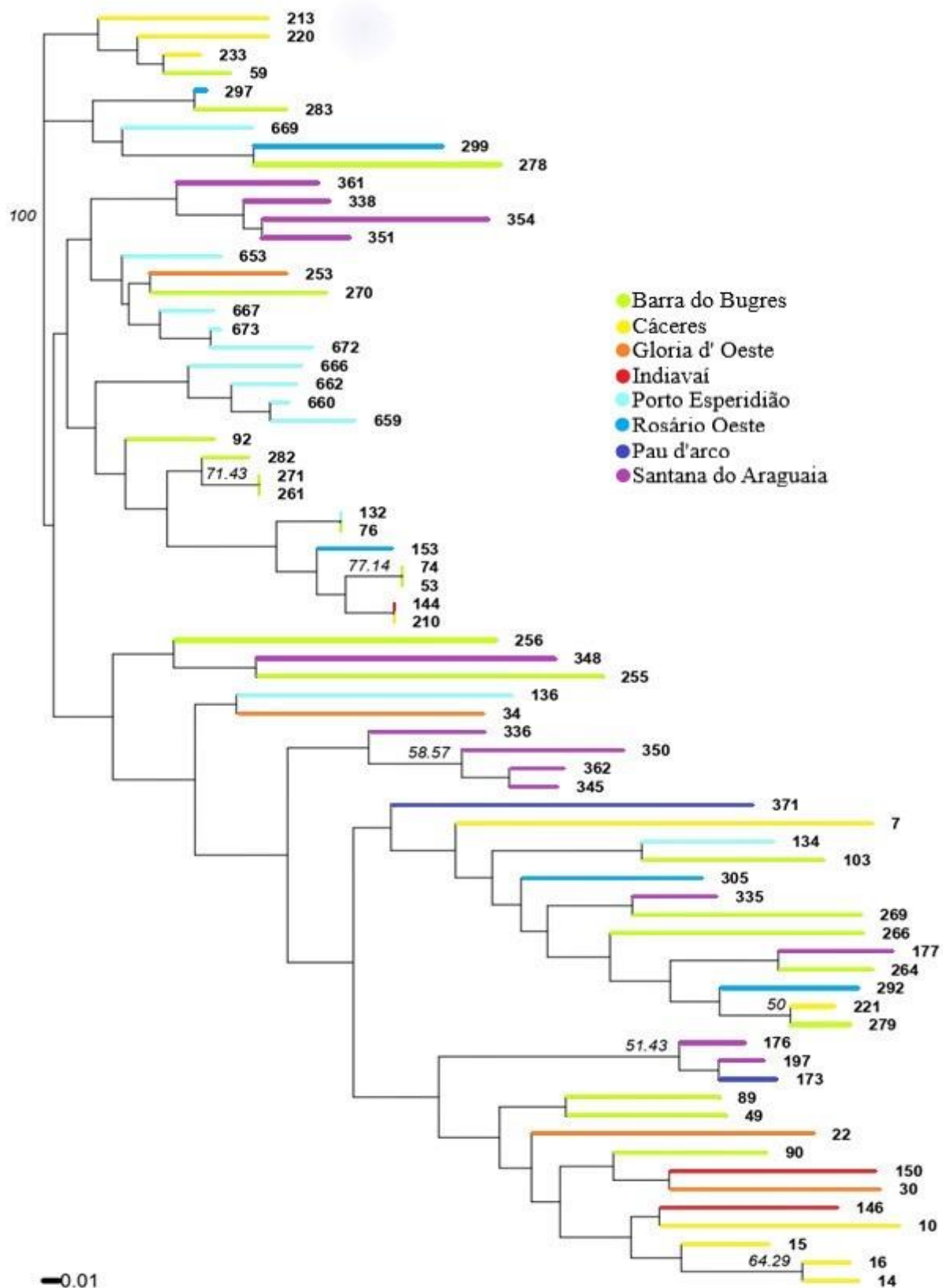


Figura 3: Dendrograma pelo método de Vizinho mais Próximo a partir das estimativas de distância genética de Provesti obtidas por meio de 14 marcadores microsatélites em 70 isolados de *C. fimbriata*.

Nos trabalhos conduzidos por Valdetaro et al. (2018), ao utilizar 14 loci microssatélites em isolados de *C. fimbriata* isolados de teca coletados somente no estado de Mato Grosso, obtiveram estes isolado agrupados em um mesmo grupo. O mesmo ocorreu nos trabalhos conduzidos por Oliveira et al. (2015) com *Eucalyptus* spp. e Oliveira et al. (2016) com *Mangifera indica* em que a variabilidade observada entre os isolados de *C. fimbriata* foi baixa. Estes resultados são diferentes dos encontrados neste trabalho, que a principal diferença está no número e abrangência geográfica dos isolados coletados e estudados no Mato Grosso pertencem ao clado latino-americano (LAC – *Latin America Clade*) (Harrington et al., 2015; Oliveira et al., 2015; Li et al., 2016), sugerindo de acordo com os autores Valdetaro et al. (2018), que os isolados de *C. fimbriata* coletados em Mato Grosso não sejam de origem natural. Sendo assim nesta população de 70 isolados de *C. fimbriata* torna-se necessário estudo filogenéticos por meio de sequenciamento de regiões genômicas específicas, para comparar estes isolados a nível de espécie e clado com outros trabalhos já realizados por Harrington et al. (2014), Harrington et al. (2015), Li et al. (2016) e Valdetaro et al. (2018).

6. CONCLUSÕES

Foi identificado a formação de duas populações genéticas dentre os 70 isolados de *Ceratocystis fimbriata* estudados, sendo essas podendo ser de clados diferentes. Dentre esses isolados foram formados três grupos distintos quanto ao tamanho dos seus amplicons, mostrando assim alguma similaridade entre eles.

Com o resultado desse trabalho conclui-se que a variabilidade não é tão estreita com já citado em outros trabalhos com populações menores, fato este que evidencia a necessidade de estudos quanto a variabilidade patogênica, para definição de melhores estratégias para o controle genético deste patógeno em teca. Também evidencia que são necessários mais estudos de filogenia para determinar se todos os isolados deste trabalho pertencem ao mesmo clado, bem como a mesma espécie.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALFENAS, A. C.; ZAUZA, E. A. V.; MAFIA, R. G.; ASSIS, T. F. **Clonagem e doenças do eucalipto**. Viçosa, MG: UFV, 2004. 442 p.

ARCO-VERDE, M. F.; MOREIRA, M. A. B. **Viveiros Florestais: construção, custos, cuidados e atividades desenvolvidas para a produção de mudas**. Boa Vista: Embrapa CPAF-Roraima, 1998. 18p. (Embrapa-CPAF-Roraima. Documentos,3).

ARNOLD, M. L. **Evolution through genetic exchange**. Oxford University Press, 2006.

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** 93,74-84. 2003.

BELEZACA, P. C.; SOLANO, A. E.; LÓPEZ, T. C.; BAQUE, M. R.; ÁVILA, L. A.; CÓNDOR, J. M.; BOHÓRQUEZ, B. T.; DUEÑAS, A. D. H. Fitopatógenos asociados a la enfermedad de marchitez vascular y muerte regresiva en plantaciones de *Tectona grandis* L.f. (teca) en el Trópico Húmedo Ecuatoriano. **Boletín Micológico**; 33(2):17-29. 2018.

BELEZACA, P. C.; SOLANO, A. E.; LÓPEZ, T. C.; CÓNDOR, J. M.; BELTRÁN, C. F.; DÍAZ, N. P. *Ceratocystis fimbriata* causative agent of vascular wilt disease of *Tectona grandis* Lf (teak) in Ecuador. **Boletín Micológico**, 35(1), 17-25. 2020.

BRITO, R. A. S.; CAVALCANTE, G. P.; BOREL, F.C. Detection and isolation of *Ceratocystis fimbriata* in mango trees on semi-selective medium. **European Journal of Plant Pathology**, v. 155, n. 2, p. 667-669, 2019.

CAB INTERNATIONAL. *Ceratocystis fimbriata* (original text prepared by T.C. HARRINGTON). In: **Crop Protection Compendium**. CAB International, Wallingford, UK. 2005.

CALDEIRA S. F.; SANTOS A. F.; AUER, C. G.; GASPAROTTO, L.; BENTES, J. L. S.; PEREIRA, J. C. R. **Doenças de espécies florestais arbóreas nativas e exóticas na Amazônia**. Brasília: Embrapa Florestas, p. 171-194, 2014.

COYNE, J. A.; ORR, H. A. **Speciation Sinauer Associates**. Sunderland, MA, v. 276, p. 281, 2004.

CRUZ, J. P. D.; LEITE, H. G.; SOARES, C. P. B.; CAMPOS, J. C. C.; SMIT, L.; NOGUEIRA, G. S. Curvas de crescimento e de índice de local para povoamentos de *Tectona grandis* em Tangará da Serra, Mato Grosso. **Revista Árvore**, 32(4), 679-685. 2008.

DA ROCHA, H. F.; LEONARDO, F. V. S.; OLIVEIRA, A. C. Plantios comerciais de *Tectona grandis* Lf no Brasil. **Multitemas**, 2015.

DE BEER, Z. W.; DUONG, T. A.; BARNES, I.; WINGFIELD, B. D.; WINGFIELD, M. J. Redefining *Ceratocystis*, and allied genera. **Studies in Mycology**. 79. 187-219. 2014.

DELGADO, R.; SUÁREZ, C. Diferencias em agressividade entre aislamientos de *Ceratocystis fimbriata* de Ecuador y Brasil em cacao **XII Seminário Nacional de Sanidad Vegetal**, v. 12, 2003.

EARL, D. A.; VONHOLDT B. M. Structure harvester: a website and program for visualizing structure output and implementing the evanno method. **conservation genetics resources** vol. 4 (2) pp. 359-361, 2012.

ENGELBRECHT, C. J. B.; HARRINGTON, T. C.; STEIMEL, J.; CAPRETTI, P. Genetic variation in eastern North American and putatively introduced populations of *Ceratocystis fimbriata* f. *platani*. **Molecular Ecology** 13, 2995-3005. 2004.

ENGELBRECHT, C. J. B.; HARRINGTON, T. C. Intersterility morphology and taxonomy of *Ceratocystis fimbriata* on sweet potato cacao and sycamore. **Mycologia**, New York, v. 97, p.57-69, 2001.

EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software Structure: a simulation study. **Molecular Ecology**, 14:2611-2620, 2005.

FERREIRA, F. A.; MAFFIA, L. A.; BARRETO, R. W.; DEMUNER, N. L.; PIGATTO, S. Sintomatologia da murcha de *Ceratocystis fimbriata* em eucalipto. **Revista árvore** 30, 155-62. 2006.

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

FERREIRA, E. M.; HARRINGTON, T. C.; THORPE, D. J.; ALFENAS, A. C. Genetic diversity and interfertility among highly differentiated populations of *Ceratocystis fimbriata* in Brazil. **Plant Pathol** 59:721-735. 2010.

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

FERREIRA, M. A.; ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. *Ceratocystis fimbriata* em espécies florestais e agronômicas no Brasil. In: NEFIT. **Patologia florestal: Desafios e perspectivas**. 1. São Carlos, SP: Suprema Gráfica e Editora, 2013.

FIGUEIREDO, E. O.; OLIVEIRA, L. C. de; BARBOSA, L. K. F. **Teca (*Tectona grandis* L. f.): principais perguntas do futuro empreendedor florestal**. In: Série Embrapa Acre, Documentos, 97 Rio Branco: Embrapa Acre, p. 87. 2005.

FIRMINO, A. C.; TOZZE, JÚNIOR, H. J.; FURTADO, E. L. First report of *Ceratocystis fimbriata* causing wilt in *Tectona grandis* in Brazil. New Disease Reports, **Reading**, v. 25, n. 24, p. 2044-0588. 2012.

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. isolados de diferentes hospedeiros. **Summa Phytopathologica**, 41(2), 138-143. 2015.

GILL, B. S.; BEDI, Y. S.; BIR, S. S. Cytopalynological studies in woody members of family Verbenaceae from north-west and central India. **Journal of the Indian Botanical Society**, v. 62, n. 3, p. 235-244, 1983.

GOMES, J. E. **Desenvolvimento inicial de *Tectona grandis* L.f. (Teca) em área de cerrado sobre diferentes espaçamentos**. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2002. 76 p. (Dissertação - Mestrado em Engenharia Florestal).

DOS SANTOS, A. F.; AUER, C. G.; GRIGOLETTI JÚNIOR, A. **Doenças do eucalipto no sul do Brasil: identificação e controle**. Embrapa Florestas-Circular Técnica (INFOTECA-E), 2001.

HARRINGTON, T. C., STEIMEL, J. P., WINGFIELD, M. J.; KILE, G. A. Isozyme variation and species delimitation in the *Ceratocystis coerulescens* complex. **Mycologia**, 88(1), 104-113. 1996.

HARRINGTON, T. C. Host specialization and speciation in the American wilt pathogen *Ceratocystis fimbriata*. **Fitopatologia Brasileira** 25S, 262-3. 2000.

HARRINGTON, T. C. The genus *Ceratocystis*. Where does the oak wilt fungus fit. In: Proceedings of the 2nd national Oak Wilt symposium. **USDA Forest Service**, Forest Health Protection, Austin, Texas, p. 21e35. 2009.

HARRINGTON, T. C., KAZMI, 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**. 2014.

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** 99, 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**, v. 101, n. 5, p. 555-566, 2011.

HIGUCHI, N. **Informações básicas para o manejo florestal da *Tectona grandis* (Teca) introduzida no Alto Jauru**. Cuiabá: FUFMT, 1979.

IBÁ. INDUSTRIA BRASILEIRA DE ÁRVORES: **Relatório Ibá. 2017**.Disponível em: <<http://iba.org/images/shared/iba>> Acesso em 20 agosto de 2019.

JOHNSON, J. A.; HARRINGTON, T. C.; ENGELBREWCHT, C. J. B. Phylogeny and taxonomy of the North American clade of the *Ceratocystis fimbriata* complex. **Mycologia**, New York, v. 97, n. 5, p.1067-1092, 2005.

KAMVAR, Z. N.; TABIMA, J. F.; GRÜNWALD, N. J. Poppr: An R package for genetic analysis of populations with clonal, partially clonal, and/or sexual reproduction. **PeerJ** 2:e281. 2014.

KASUGA, T.; WHITE T. J.; KOENIG G.; MCEWEN J.; RESTREPO A.; CASTAÑEDA E. Phylogeography of the fungal pathogen *Histoplasma capsulatum*. **Molecular Ecology**. 12. 3383–3401. 2003.

KERTADIKARA, A. W. S.; PRAT, D. Isozyme variation among teak (*Tectona grandis* L.f.) provenances. **Theoret. Appl. Genetics** 90, 803–810 1995.

KOLLERT, W.; KLEINE, M. **global teak study: analysis, evaluation and future potential of teak resources**. IUFRO, 2018.

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** 25, 384. 2000.

LAMPRECHT, H. Silvicultura nos trópicos: ecossistemas florestais e respectivas espécies arbóreas, possibilidades e métodos de aproveitamento sustentado. **Eschborn: GTZ**, 343p. 1990.

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 promegranete in China. **Plant Disease**. 2016.

LODHA, T.; BASAK, J. Plant-pathogen interactions: what microarray tells about it. **Molecular Biotechnology**, v. 50 (1), p: 87-97, India, 2012.

LORENZI, H.; SOUZA, H. M. de; TORRES, M. A. V.; BACHER, L. B. Árvores exóticas no Brasil: madeireiras, ornamentais e aromáticas. Embrapa Florestas; Embrapa Pecuária Sul. **Nova Odessa: Instituto Plantarum**. v1. 384p. 2003.

MARINCOWITZ, S.; BARNES, I.; DE BEER, Z. W.; WINGFIELD, M. J. Epitipificação de *Ceratocystis fimbriata*. **Sistemática e evolução fúngica**. 6, 289-298. 2020.

MARIN-FELIX, Y.; GROENEWALD, J. Z.; CAI, L.; CHEN, Q.; MARINCOWITZ, S.; BARNES, I.; BENSCH, K.; BRAUN, U.; CAMPORESI, E.; DAMM, U.; DE BEER, Z.W.; DISSANAYAKE, A.; EDWARDS, J.; GIRALDO, A.; HERNANDEZ-RESTREPO, M.; HYDE, K. D.; JAYAWARDENA, R. S.; LOMBARD, L.; LUANGSA-ARD, J.; MCTAGGART, A. R.; ROSSMAN, A.Y.; SANDOVAL-DENIS, M.; SHEN, M.; SHIVAS, R.G.; TAN, Y.P.; VAN DER LINDE, E.J.; WINGFIELD, M.J.; WOOD, A.R.; ZHANG, J.Q.; ZHANG, Y.; CROUS, P.W. Genera of phytopathogenic fungi: GOPHY 1. **Studies in Mycology**. 86, 99 - 216. 2017.

MATHEW, G.; KOSHY, M. P.; MOHANADAS, K. Estudos preliminares em visitantes de insetos da inflorescência de teca (*Tectona grandis* Linn. F.) Em Kerala, Índia. **Indian Forester**, v. 113, n. 1. 61-64, 1987.

MOLANO, E. P. L.; CABRERA, O. G.; JOSE, J.; DO NASCIMENTO, L. C.; CARAZZOLLE, M. F.; TEIXEIRA, P. J. P. L.; ALVAREZ, J. C.; TIBURCIO, R. A.; TOKIMATU FILHO, P. M.; DE LIMA, G. M. A.; GUIDO, R. V. C.; CORREA, T. L. R.; LEME, A. F. P.; MIECZKOWSKI, P.; PEREIRA, G. A. G.; *Ceratocystis cacaofunesta* genome analysis reveals a large expansion of extracellular phosphatidylinositol-specific phospholipase-C genes (PI-PLC). **BMC Genom**. 19, 58. 2018.

MOLLER, W. J.; DEVAY, J. E. Carrot as a species selective isolation medium for *Ceratocystis fimbriata*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 58, n. 1, p.123-124, 1968.

NASCIMENTO, JORDANA BRAGA DO. **Levantamento de doenças em espécies frutíferas e florestais em sistemas agroflorestais no Estado do Amazonas**. Itacoatiara: Universidade do Estado do Amazonas. 2019. 54p. (Monografia – Trabalho de Conclusão de Curso).

OLIVEIRA, L. S. S.; HARRINGTON, T. C.; FERREIRA, M. A. Species or genotypes? Reassessment of four recently described species of the *Ceratocystis* wilt pathogen, *C. fimbriata*, on *Mangifera indica*. **Phytopathology**. 105, 1229–44. 2015.

OLIVEIRA, C. A. C. **Identificação de genótipos de teca resistentes à Murcha de ceratocystis**, Alta Floresta/Cáceres/Tangará da Serra: Universidade do Estado de Mato Grosso. 2020. 45 f. (Dissertação - Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas).

OLIVEIRA, L. S. S.; DAMACENA, M. B.; GUIMARÃES, L. M. S.; SIQUEIRA, D. L.; ALFENAS, A. C.: *Ceratocystis fimbriata* isolates on *Mangifera indica* have different levels of aggressiveness. European Journal, **Plant Pathology** 145(4), 847-856. 2016.

PANDEY, D., BROWN, C., **Teak: a global overview**, Unasylyva 201 2000.

PEAKALL, R.; SMOUSE, P. E. GenAEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. **Bioinformatics**, v. 28, p. 2537-2539, 2012.

PEAKALL, R.; SMOUSSE, P. E. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. **Molecular Ecology Notes**, 6:288-295, 2006.

SCHENK, P.; CARVALHAIS, L.; KAZAN, K. Unraveling plant-microbe interactions: can multi-species transcriptomics help. **Trends in Biotechnology**, v. 3, p. 177-84, Australia, 2012.

SEDANO, J. C. S.; CARRASCAL, C. E. L. RNA-seq: herramienta transcriptómica útil para el estudio de interacciones planta-patógeno. **Fitosanidad**, v. 16(2), p. 101-113. 2012.

SEPÚLVEDA, V. E.; MÁRQUEZ, R.; TURISSINI, D. A.; GOLDMAN W. E.; MATUTE D. R. Genome sequences reveal cryptic speciation in the human pathogen *Histoplasma capsulatum*. **mBio**, 8: e01339–17. 2017.

STEIMEL, J.; ENGELBRECHT, C. J. B.; HARRINGTON, T. C. Development and characterization of microsatellite markers for the fungus *Ceratocystis fimbriata*. **Molecular Ecology Notes** 4, 215-218. 2004.

TOPPA, E. V. B.; JADOSKI, C. J. O uso de marcadores moleculares no melhoramento genético de plantas. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 12, n. 1, p. 1-5, 2013.

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

VALDETARO, D. C. O. F.; HARRINGTON, T. C.; OLIVEIRA, L. S. S.; GUIMARÃES L. M. S.; MCNEW D. L.; PIMENTA, L. V. A.; GONÇALVES, R. C.; SCHURT, D. A.; ALFENAS, A. C. A host specialized form of *Ceratocystis fimbriata* causes seed and seedling blight on native *Carapa guianensis* (andiroba) in Amazonian rainforests, **Fungal Biology**, 123, 2, 170-182, 2018.

VAN WYK, M.; WINGFIELD, B.; WINGFIELD, M. *Ceratocystis* species in the *Ceratocystis fimbriata* complex. IN: SEIFERT, K. A.; DE BEER, Z. W.; WINGFIELD, M. J. The Ophiostomatoid Fungi: Expanding Frontiers, 12 Ed. CBS Biodiversity Series. CBS-KNAW **Fungal Biodiversity Centre**. Utrecht, The Netherlands, p. 65e73. 2013.

VAN WYK, P. W. J.; WINGFIELD, M. J.; VAN WYK, P. S. Ascospore development in *Ceratocystis moniliformis*. **Mycological Research**, 95(1), 96-103. 1991.

VELASTEGUÍ, T. F.; GUTIÉRREZ, R. C.; GUERRERO, F. C. Plagas y enfermedades en plantaciones de Teca (*Tectona grandis* LF) en la zona de Balzar, Provincia del Guayas. **Revista Ciencia y Tecnología**, v. 3, n. 1, p. 15-22, 2010.

VERHAGE, A.; VAN WEES, S. C. M.; PIETERSE, C. M. J. Plant immunity: it's the hormones talking, but what do they say? **Plant Physiology**, v. 154, p. 536-540, 2010.

VIÉGAS AP, **Seca da Mangueira**. Bragantina 19,163-82. 1960.

WINGFIELD, B. D.; VAN WYK, M.; ROOS, H.; WINGFIELD, M. J. *Ceratocystis*: emerging evidence for discrete generic boundaries. In: The Ophiostomatoid Fungi: expanding frontiers (KA Seifert, ZW de Beer, MJ Wingfield, eds): 57–64. CBS Biodiversity Series no. 12. Utrecht: CBS-KNAW **Fungal Biodiversity Centre**. 2013.

ZIETKIEWICZ, E.; RAJALSKI, A.; LABUDA, D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) – anchored polymerase chain reaction amplification. **Genomics**, San Diego, v. 20, p. 176-183, 1994.