

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

YASMIN FERNANDA NUNES VIANA

Desenvolvimento de protocolo tecnológico para a detecção de
***Ceratocystis fimbriata* em teca a partir de qPCR**

CÁCERES
MATO GROSSO, BRASIL
FEVEREIRO – 2024

YASMIN FERNANDA NUNES VIANA

**Desenvolvimento de protocolo tecnológico para a identificação de
Ceratocystis fimbriata em teca a partir de qPCR**

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

Orientador: Prof. Dr. Thiago Alexandre
Santana Gilio

Coorientadora: Prof.^a. Dr.^a. Sabrina Cassaro

CÁCERES
MATO GROSSO, BRASIL
FEVEREIRO – 2024

V614d VIANA, Yasmin Fernanda Nunes.
Desenvolvimento de Protocolo Tecnológico para a Detecção de Ceratocystis Fimbriata em Teca a Partir de Qpcr / Yasmin Fernanda Nunes Viana - Alta Floresta/Cáceres/Tangará da Serra, 2024.
53 f.; 30 cm.

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, 2024.
Orientador: Thiago Alexandre Santana Gilio
Coorientador: Sabrina Cassaro

1. Diagnóstico Molecular. 2. Murcha de Ceratocystis. 3. Desenvolvimento Biotecnológico. I. Yasmin Fernanda Nunes Viana. II. Desenvolvimento de Protocolo Tecnológico para a Detecção de Ceratocystis Fimbriata em Teca a Partir de Qpcr: .
CDU 631.52

YASMIN FERNANDA NUNES VIANA

**Desenvolvimento de protocolo tecnológico para a detecção de
Ceratocystis fimbriata em teca a partir de qPCR**

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, para obtenção do título de Mestre.

Aprovada em 26 de fevereiro de 2024

Comissão examinadora:

(Orientador) Prof. Dr. Thiago Alexandre Santana Gilio

UFMT – Universidade Federal de Mato Grosso

Prof.^a Dr.^a Sabrina Cassaro

UNEMAT – Universidade do Estado de Mato Grosso

Prof. Dr. Alexander Claro Garcia

UFMT – Universidade Federal de Mato Grosso

À minha família, em especial a minha mãe Silvane, meu esposo Leonardo e meu filho Pietro pelo amor e apoio durante todas as etapas deste trabalho.

DEDICO!

AGRADECIMENTO

À Deus, pelo dom da vida.

A minha família por todo apoio e suporte durante o período que me dediquei ao mestrado, especialmente a minha mãe Silvane Nunes e ao meu esposo Leonardo Casasus. As minhas irmãs Lisandra Conceição Nunes Viana e Mariane Alessandra Nunes Viana.

Aos meus familiares por compreenderem que em muitos momentos eu não pude estar com eles para que eu pudesse obter um aperfeiçoamento e me capacitar melhor para os futuros desafios da vida.

À Universidade do Estado de Mato Grosso que, através do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, oportunizou a realização desta dissertação.

A Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro com a concessão da bolsa de mestrado.

Ao professor Dr. Thiago Alexandre Santana Gilio, pela orientação, compreensão, dedicação e ensinamentos transmitidos para realização desse trabalho. Obrigada por todo esforço, empenho e paciência desde o início da minha pós-graduação.

À Professora Dra. Sabrina Cassaro, pela coorientação, pela paciência, amizade e ensinamentos ao longo da minha pós-graduação.

Aos colegas do Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal – LMGV, Simone Bueno, Thayane Barbosa, Lara Lana, Karen Layane, Thais Oliveira, Gabriela Muniz, Paulo Mamoré, Gabriel Bastos, Vinicius Procópio e Guilherme Campos que tornaram os dias de trabalho mais alegre e menos cansativo.

Agradeço em especial, aos professores doutores Lilian Guimarães Favare, Antonio Marcos Chimello, Kelly Lana Araujo e Maria do Socorro Bezerra de Araujo e aos Engenheiros Agrônomos M.sc. Janaina Barros e M.sc. Jeferson Gonçalves que auxiliaram durante a execução do experimento em campo e em práticas no laboratório.

Biografia

Yasmin Fernanda Nunes Viana, nasceu no dia 29 de setembro de 1989, na cidade de Cáceres-MT. Filha de Manoel Lopes Viana e Silvane Maria Nunes, Pedagoga, apoio administrativo (limpeza) na escola Estadual Ana Maria Noronha, Irmã de Luiz Fernando Nunes Viana, Mariane Alessandra Nunes Viana e Lisandra Conceição Nunes Viana. Concluiu o ensino fundamental e médio na Escola Estadual Prof.^a. Ana Maria das Graças de Souza Noronha, em 2007. No final de 2007 prestou vestibular na UNEMAT e em 2008/1 começou o curso de Licenciatura em Ciências Biológicas pela Universidade do Estado de Mato Grosso – Campus Cáceres, o qual foi concluído no ano de 2015. Durante os seis anos e meio de curso, participou de vários eventos de iniciação científica e começou a gostar da área da pesquisa científica. Em 2009 iniciou o namoro com seu esposo Leonardo Casarus. Após formação em Ciências Biológicas lecionou durante três anos na educação básica com as disciplinas de Biologia, Ciências, Física e Química. Casou-se em 2016 com seu namorado. No ano de 2018 ficou grávida de seu primeiro e único filho Pietro Nunes Casarus Figueiredo, que nasceu em janeiro de 2019. Após o nascimento de seu filho, ficou seus três primeiros anos em dedicação a ele. No ano de 2022 estava fazendo curso no Senai – Cáceres, quando sua irmã repassou uma mensagem de seleção de bolsa para aluno de biologia e agronomia já formados para ingressar como auxiliar técnico no LMGV – Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal com a orientação do Prof. Dr. Thiago Alexandre Santana Gilio e por essa interligação recebeu o convite do professor para ingressar no Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento de Plantas pela UNEMAT no campus de Cáceres, na área de melhoramento vegetal, com a linha de pesquisa melhoramento genético vegetal, através do processo de seleção do mestrado sobre a orientação do mesmo, com o tema Desenvolvimento de um protocolo tecnológico para a identificação de *Ceratocystis fimbriata* em teca a partir de qPCR, tema da dissertação.

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	9
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	11
2.1 Aspectos econômicos de origem e dispersão de <i>Tectona grandis</i>	11
2.2 Aspectos da Murcha de <i>Ceratocystis</i>	13
2.3 Métodos moleculares para diagnose de doenças em plantas.....	15
3. MATERIAL E MÉTODOS	16
3.1 Local e Coleta dos Isolados.....	17
Adaptação do protocolo de	
3.2 Desenvolvimento de iniciadores específicos para identificação de <i>C. fimbriata</i>	17
3.3 Sensibilidade do protocolo para cada iniciador	20
3.4 Validação do protocolo de identificação rápida de <i>C. fimbriata</i>	21
3.4.1 Elaboração do protocolo de maceração para extração de DNA do lenho de teca.....	21
3.4.2 Validação do Protocolo.....	24
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
4.1 Maceração otimizada para extração de DNA do lenho de Teca.....	28
4.2 Amplificação dos iniciadores específicos desenhados.....	29
4.3 Sensibilidade dos conjuntos de iniciadores.....	34
4.4 Validação do protocolo de identificação rápida de <i>C. fimbriata</i>	40
5. CONCLUSÃO	43
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44

RESUMO

VIANA, YASMIN FERNANDA NUNES; M. Sc.; Universidade do Estado de Mato Grosso - Carlos Alberto Reyes Maldonado; fevereiro de 2024; Desenvolvimento de um protocolo tecnológico para a identificação de *Ceratocystis fimbriata* em teca a partir de qPCR; Orientador: Thiago Alexandre Santana Gilio. Conselheiros: Dr^a. Sabrina Cassaro, e Dr. Alexander Claro Garcia.

Tectona grandis L. f é uma espécie florestal de alto valor econômico, utilizada na fabricação de móveis de luxo e na construção naval. Em Mato Grosso, essa espécie exótica foi introduzida em 1960, se adaptou bem ao clima, apresentando um elevado potencial produtivo. Entretanto, a cultura tem sido ameaçada por muitas doenças, incluindo a murcha de *Ceratocystis*, doença fúngica que pode levar à perda total da produção. O objetivo deste trabalho foi desenvolver um protocolo rápido e simples para a detecção de *Ceratocystis fimbriata* em madeira de teca por meio de qPCR. O trabalho foi conduzido entre agosto de 2022 e dezembro de 2023, nos Laboratórios de Melhoramento Genético Vegetal, Resistência Genética – UNEMAT, Laboratório Multiusuário de Genômica e Biotecnologia - UFMT e em parceria com a empresa TRC – *Teak Resources* LTDA. Para a extração de DNA, foram utilizados protocolos com adaptações para o uso do kit de extração de DNA Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega). A confirmação da qualidade do DNA extraído foi realizada por meio da eletroforese em gel de agarose 1% e quantificado com o Fluorímetro Qubit® 4.0 (Invitrogen). Foram utilizados 10 iniciadores específicos para o fungo *C. fimbriata*. Todo o trabalho de bioinformática foi feito utilizando o NCBI, o GenBank, Blast e Primer3 para desenho dos iniciadores. A PCR quantitativa foi realizada com auxílio do CFX 96 da Bio-Rad, utilizando SYBR® Green. Dos 10 iniciadores desenhados, funcionaram adequadamente os Cerato12, 14, 15 e 16 com capacidade de identificação da presença de DNA do fungo *C. fimbriata* em concentrações de até 0,1 pg/μl de DNA. Assim, concluímos que o iniciador Cerato16 e protocolo de maceração nitrogênio com a combinação *Tissuelyser* desenvolvido neste trabalho podem ser utilizados para detecção do fungo *C. fimbriata* em teca. Os demais pares de iniciadores Cerato12, 14 e 15, apesar de promissores, ainda precisam de validação em plantas teca inoculadas com o fungo *C. fimbriata*.

Palavras chaves: Diagnóstico molecular; Murcha de *Ceratocystis*; Desenvolvimento biotecnológico.

ABSTRACT

VIANA, YASMIN FERNANDA NUNES; M. Sc.; State University of Mato Grosso - Carlos Alberto Reyes Maldonado; February 2024; Development of a technological protocol for the identification of *Ceratocystis fimbriata* in teak using qPCR; Advisor: Thiago Alexandre Santana Gilio. Advisors: Dr^a. Sabrina Cassaro and Dr. Alexander Claro Garcia.

Tectona grandis L. f is a forest species of high economic value, used in the manufacturing of luxury furniture and shipbuilding. In Mato Grosso, this exotic species was introduced in 1960, adapting well to the climate and showing high productive potential. However, the crop has been threatened by many diseases, including *Ceratocystis* wilt, a fungal disease that can lead to total production loss. The aim of this work was to develop a rapid and simple protocol for detecting *Ceratocystis fimbriata* in teak wood using qPCR. The work was conducted between August 2022 and December 2023, at the Plant Genetic Improvement Laboratories, Genetic Resistance - UNEMAT, Multi-User Genomics and Biotechnology Laboratory - UFMT, and in partnership with the company TRC – Teak Resources Ltd. For DNA extraction, protocols adapted for the use of the Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega) were used. Confirmation of the extracted DNA quality was performed through 1% agarose gel electrophoresis and quantified with the Qubit® 4.0 Fluorometer (Invitrogen). Ten specific primers were used for the *C. fimbriata* fungus. All bioinformatics work was done using NCBI, GenBank, Blast, and Primer3 for primer design. Quantitative PCR was performed using the Bio-Rad CFX 96, with SYBR® Green. Of the 10 designed primers, Cerato12, 14, 15, and 16 worked properly, with the ability to identify the presence of *C. fimbriata* DNA at concentrations of up to 0.1 pg/μl of DNA. Thus, we conclude that the Cerato16 primer and nitrogen maceration protocol with the *Tissuelyser* combination developed in this work can be used for detecting the *C. fimbriata* fungus in teak. The remaining pairs of primers, Cerato12, 14, and 15, despite being promising, still need validation in teak plants inoculated with the *C. fimbriata* fungus.

Keywords: Molecular diagnosis; *Ceratocystis* wilt; Biotechnological development

1. INTRODUÇÃO

A teca é uma espécie alternativa de alto valor econômico utilizada para a fabricação de móveis luxuosos e na construção naval. Além disso, desde o primeiro desbaste, há a possibilidade de comercialização da produção voltada para a produção de energia (Pelissari et al. 2014). Com as condições edafoclimáticas que o Estado de Mato Grosso apresenta e práticas silviculturais corretas, seu ciclo produtivo passou de 80 anos para 25 anos em média, quando comparado com a sua região de origem, e por isso, é considerada uma opção próspera para a produção de madeira nobre (Rocha, 2015).

No estado de Mato Grosso, as plantações de teca têm crescido devido às condições climáticas favoráveis para o seu desenvolvimento vegetativo e ganho em produção. No entanto, como em toda atividade de plantio em larga escala que se caracteriza pelo monocultivo, ocorre o favorecimento para o surgimento e proliferação de pragas e doenças (Oliveira, 2020).

A murcha da teca ou murcha de *Ceratocystis* é uma das principais doenças da cultura, com potencial para causar prejuízo irreversíveis, devido ao pouco conhecimento em relação ao patógeno e as dificuldades em seu controle. O patógeno sobrevive no solo, potencialmente em resíduos de cultura, É propagado por mudas contaminadas, apresenta uma natureza sistêmica das infecções e pode ser transferido por meio de ferramentas de corte e equipamentos florestais (Mafia et al., 2011).

Uma das características da murcha de *Ceratocystis* é a colonização do xilema. O patógeno coloniza esse vaso condutor de seiva, fazendo com que a planta bloqueie a passagem do fungo nesses vasos e, em consequência, bloqueia também a passagem de nutrientes causando assim a murcha (Firmino et al., 2015).

O método de isca de cenoura (Alfenas, 2007) é uma técnica utilizada para atrair e detectar a presença do fungo *Ceratocystis*, comumente associado a doenças em plantas. Usando pedaços de cenoura como substrato, o fungo é atraído pela composição nutricional desse vegetal. Ao expor a cenoura em áreas suspeitas de infecção, os esporos ou estruturas fúngicas podem se desenvolver, permitindo a identificação por meio de análises laboratoriais. Essa abordagem é uma técnica convencional para monitoramento e diagnóstico da presença de *Ceratocystis* em amostras ambientais.

Métodos moleculares para detecção de patógenos emergiram como instrumentos valiosos na identificação de doenças em plantas, oferecendo rapidez, especificidade e sensibilidade. Essas técnicas proporcionam a vantagem de identificar diretamente o agente causal de uma doença em plantas a partir de tecidos da planta hospedeira, solo, água ou outros substratos. (Grinbergs et al. 2020; Luchi et al. 2020).

Apesar de os sistemas de PCR quantitativo proporcionarem métodos eficazes e altamente sensíveis para quantificar infecções latentes de patógenos responsáveis pela murcha em tecidos vegetais, observa-se um interesse crescente na identidade e diversidade de espécies de fungos e oomicetos que provocam doenças em árvores (Avenot et al., 2022).

Tendo em vista a importância da murcha por *Ceratocystis* para a cultura da teca, o objetivo deste estudo foi desenvolver e validar um protocolo molecular de qPCR para a detecção rápida e precisa da infecção por *Ceratocystis fimbriata* na madeira de teca.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Aspectos econômicos de origem e dispersão de *Tectona grandis*

Tectona grandis L. f., também conhecida como teca, é uma árvore de grande porte que perde suas folhas sazonalmente. É uma espécie exótica de origem asiática pertencente à família Lamiaceae. Além da *T. grandis*, outras espécies pertencentes a essa família incluem a *Tectona hamiltoniana* Wall., *Tectona philippinensis* Benth. & Hook., *Tectona ternifolia* Buch. - Ham. ex Wall. e *Tectona theka* Lour (Trópicos, 2022).

A teca é natural das florestas tropicais do sudeste da Ásia e sua distribuição está associada ao padrão contínuo dentro dos países como a Índia, Birmânia, Laos e Tailândia (Costa et al., 2012). Em outras partes do mundo, como na África Ocidental, América Central e América do Sul, sobretudo no Brasil e na Costa Rica, a teca começou a ser plantada em novas zonas tropicais. Antes, os plantios eram marcados pela densidade de indivíduos com rotatividades mais curtas, depois os espaçamentos passaram a serem mais amplos visando o crescimento de árvores livres de imperfeições, como os “nós” (Figueiredo, 2015).

No Brasil, a introdução da teca ocorreu na região do Centro-Oeste no final da década de 1960, com início da atividade de plantio em 1971 pela empresa Cáceres Florestal S.A., na região de Cáceres – MT, onde foi introduzido o primeiro material genético: *T. grandis* var. *Tennasserim*, procedente de Myanmar e Birmânia (Figueiredo et al., 2005; Cáceres Florestal S/A, 2006).

É uma espécie que apresenta características marcantes em seu ambiente. Como seu tronco retilíneo, casca áspera e fina, com espessura de aproximadamente entre 1,5 e 1,2 aproximadamente, que se desprende em placas de cor cinza ou marrom. As árvores de teca podem atingir de 1 m a 2,5 m de diâmetro e geralmente atingem altura entre 30 a 50 m. Embora existam algumas exceções em que podem alcançar até 60 metros (Cáceres Florestal, 2002; Pelissari, 2014).

Se caracteriza por sua decíduidade foliar pronunciada, exibindo folhas elípticas, coriáceas e dispostas de forma oposta. Possui pecíolos curtos ou ausentes, com ápices e bases agudos, geralmente medindo em média 30 a 40 cm de comprimento por cerca de

25 cm de largura. Em indivíduos mais jovens, com até três anos, as folhas podem atingir até o dobro desse tamanho. Durante períodos de seca, observa-se a queda das (Cáceres Florestal, 2002; Ferreira et al. 2008; Pelissari, 2014).

Apresenta uma inflorescência caracterizada por uma panícula ramificada, onde flores de tonalidade creme, pequenas e abundantes, são observadas. O ápice da floração ocorre, aproximadamente, um mês após as primeiras chuvas, estendendo-se por mais de 60 dias (Cáceres Florestal, 2002; Figueiredo et al. 2005; Pelissari, 2014). O fruto é uma drupa seca, de aproximadamente 1 a 2 cm de diâmetro, que contém até quatro sementes. As sementes da teca estão protegidas pelo endocarpo, envolvido pelo mesocarpo, e o conjunto destes tecidos está envolto no exocarpo (Cáceres Florestal, 2002; Pelissari, 2014).

É uma espécie que prospera nas condições ideais de climas tropicais quentes e úmidos, caracterizados por um verão chuvoso e um inverno seco de três a cinco meses, com temperaturas mínimas variando entre 13 e 17°C e máximas entre 39 e 43°C. No entanto, é importante ressaltar que a teca não é tolerante a geadas ou climas mais amenos (Rocha et al., 2015; Vendruscolo, 2017).

A árvore pode crescer em diversas formações geológicas e tipos de solo, no entanto, o seu crescimento e desenvolvimento dependem da profundidade em que foi plantada, da porosidade do solo, da drenagem e da capacidade de retenção de água (Figueiredo et al., 2005). O desenvolvimento da teca também pode ser influenciado pelo pH do solo (entre 6,0 e 8,0) e a disponibilidade de nutrientes, principalmente, fósforo e potássio. O potássio tende a influenciar no crescimento da planta, enquanto combinação de fósforo e potássio em concentrações abaixo de 4,5 mg.dm⁻³ e 0,5 mg.dm⁻³, respectivamente, torna necessário a incorporação de fertilizantes no solo. Em relação ao cálcio, a teca tem alta exigência, pois apresenta rápida absorção (Pelissari, 2014).

O cultivo da teca é predominantemente voltado para a produção de madeira, uma vez que essa espécie é valorizada por suas qualidades superiores, incluindo alta qualidade, longa durabilidade, estabilidade notável e resistência excepcional a peso, flexão e tração. Suas propriedades assemelham-se às do mogno brasileiro, consolidando-a como uma escolha significativa para a indústria madeireira. (Ferreira, 2008).

Embora a teca tenha seu cultivo voltado para a produção madeireira, na farmacologia suas folhas são utilizadas como diferentes fármacos. Os quatro compostos

fenólicos como ácido gálico e ácido elágico (ácidos fenólicos), rutina e quercetina (flavonóides) do extrato metanólico presente nas folhas apresentam diferentes propriedades como, atividades antioxidante, anti-inflamatória, analgésica e antimicrobiana (Nayeem et al., 2010).

Algumas doenças fúngicas da teca se destacam pela gravidade dos danos à produtividade e crescimento. Entre elas, pode-se citar: a ferrugem da teca, causada pela *Olivea neotectonae*, afetando folhas de mudas e plantas maduras, independentemente da idade (Marques et al., 2015); a podridão da raiz que contribui para a queda das árvores afetadas e é causada pelo patógeno *Phellinus noxius* (Cannon et al., 2022); a ocorrência de cancro causado por *Lasiodiplodia theobromae* representa uma grave ameaça à indústria comercial, uma vez que as árvores afetadas se tornam inadequadas para uso em atividades madeireiras (Borges et al., 2018) e temos a murcha de *Ceratocystis* desencadeada pelo fungo *Ceratocystis fimbriata* Ellis & Halst.1890, é uma doença vascular fatal causada por esse patógeno que pode sobreviver por longos períodos no solo e apresenta uma ampla distribuição geográfica e variedade de hospedeiros (Ferreira et al., 2005; Mafia et al., 2013; Santiago, 2022).

2.2 Aspectos da Murcha de *Ceratocystis*

A murcha de *Ceratocystis* é causada pelo fungo *Ceratocystis fimbriata* Ellis & Halst, 1890, que pertence à classe *Sordariomycetes*, ordem *Microascales* e família *Ceratocystidaceae* (MycoBank, 2022). A murcha é caracterizada pela colonização da medula das árvores, o que obstrui seu sistema vascular e lenho, isso leva a distúrbios na translocação de água, seiva bruta e elaborada o que pode resultar em murcha, morte das plantas e perda da produção (Oliveira, 2020). Como o patógeno é capaz de infectar uma ampla variedade de plantas, incluindo árvores adultas, mudas e sementes, sua disseminação pode ser rápida e devastadora (Da Silva et al., 2018; Cunha Oliveira et al., 2021).

É uma doença que tem um impacto significativo na produção agrícola e florestal. Algumas das culturas economicamente importantes afetadas incluem o cacauzeiro (*Theobroma cacao* L.), o cafeeiro (*Coffea arabica* L.), a mangueira (*Mangifera indica*

L.), o eucalipto (*Eucalyptus* spp.), a teca (*T. grandis*) e a acácia-negra (*Acácia mearnsii* De Wild.) (Santos, 2004; Harrington et al., 2011). Além disso, estudos recentes demonstraram que o patógeno causou perdas na produção de kiwi (*Actinidia deliciosa*) (Piveta et al., 2016; Ferreira et al., 2017; Oliveira et al., 2021) e erva mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) (Santos et al., 2018; Brito et al., 2021) em diferentes regiões do Brasil. Essas perdas têm um impacto negativo significativo na economia, na segurança alimentar e no sustento de muitas pessoas que dependem dessas culturas para sobreviver.

De acordo com Harrington et al. (2011), a agressividade do patógeno em diferentes hospedeiros cultivados em diferentes regiões do Brasil levanta duas possíveis explicações. Primeiro, é possível que o patógeno não seja especializado em nenhum hospedeiro específico e que isolados tenham o potencial de ser mais agressivos em vários hospedeiros, devido a suas características genéticas quantitativas. Segundo, pode haver uma interação complexa entre o patógeno e o hospedeiro que varia de acordo com a região geográfica e as condições ambientais. Independentemente da causa exata, é importante que sejam tomadas medidas para evitar a disseminação do patógeno, como a implementação de práticas agrícolas sustentáveis, monitoramento regular da saúde das plantas e desenvolvimento de cultivares resistentes.

Embora os vetores específicos do *C. fimbriata* sejam desconhecidos, sabe-se que os insetos estão fortemente associados a esse fungo. As árvores infectadas são frequentemente atacadas por coleobrocas e escotílineos, que perfuraram os troncos para fazer galerias de nidificação, ficando com estruturas do fungo que acabam infectando outras árvores saudáveis (Harrington, 2011; Monteiro, 2017).

O *Ceratocystis* forma um tapete de micélio no hospedeiro doente, com peritécios de coloração escura e pescoços longos que posicionam massas de ascósporos acima desse tapete. Os ascósporos são mantidos juntos em uma matriz hidrofóbica pegajosa, de modo que os esporos não são facilmente separados pela água, e têm afinidade pelo exoesqueleto hidrofóbico dos insetos. Além disso, a espécie libera um odor que atrai os insetos, que depois visitam as feridas em plantas suscetíveis para uma transmissão bem-sucedida de patógenos (Harrington, 2009).

Outro modo de disseminação da murcha de *Ceratocystis* é por meio de ferramentas de manejo contaminadas com as estruturas reprodutivas (conídios) do fungo. Se um instrumento de desbaste, por exemplo, estiver contaminado e for utilizado em uma

área saudável da plantação, as plantas podem ser contaminadas. É importante limpar e desinfestar as ferramentas, roupas e calçados antes de visitar outras plantações ou fazer o manejo da área (Figueiredo et al., 2015).

2.3 Métodos moleculares para diagnose de doenças em plantas

O método de isca de cenoura é um método convencional de detecção de patógeno, embora simples e de baixo custo, apresenta desafios, como o tempo necessário para detecção, limitações de especificidade para certas espécies, dependência de condições ambientais e possíveis interferências de microorganismos. A quantificação precisa dos fungos e a necessidade de confirmação laboratorial também são considerações importantes. Após a detecção inicial, pode ser necessário realizar testes adicionais em laboratório para confirmar a identidade do fungo (Piveta, 2013).

Deste modo, a presença de doenças em plantas tem um impacto significativo e negativo nas atividades agropecuárias e florestais em todo o mundo. Nesse sentido, os métodos moleculares surgem como ferramentas importantes para a identificação de doenças em plantas, possibilitando a detecção precoce e precisa de patógenos. A identificação precisa é crucial para aplicar medidas de controle efetivas. Portanto, torna-se imperativo empregar métodos moleculares no diagnóstico de doenças em plantas (Gonçalves, 2009).

O desenvolvimento de marcadores moleculares específicos e técnicas de diagnóstico de ácidos nucleicos, como PCR em tempo real e LAMP (realiza a amplificação do DNA em uma única temperatura, utilizando uma enzima DNA polimerase com atividade de descolamento de tira, e primers desenhados de modo a formar grampos na fita de DNA), contribui para métodos sensíveis e específicos de detecção. A exploração da tecnologia CRISPR-Cas para detecção de patógenos e o uso de Biossensores Moleculares em campo são avanços que melhoram a precisão, sensibilidade e rapidez no diagnóstico, resultando em estratégias mais eficazes de manejo e controle de doenças em plantas lenhosas (Luchi et al. 2020b).

A descoberta da técnica molecular PCR teve um impacto significativo no meio científico, trazendo muitos avanços, como a expressão de genes em sistemas

recombinantes, a rápida determinação da paternidade, o estudo da genética molecular, o sequenciamento de genomas e o diagnóstico ágil de doenças infecciosas (Novais & Pires-Alves, 2004).

A PCR em Tempo Real (qPCR) é uma evolução da técnica convencional de PCR, que vem se tornando cada vez mais comum em diagnósticos clínicos e nos laboratórios de pesquisa, permitindo o acompanhamento em tempo real da reação e a apresentação dos resultados de forma mais rápida e precisa do que a PCR convencional (Novais & Pires-Alves, 2004).

A qPCR é uma técnica versátil que pode ser utilizada em diversas aplicações, dependendo do tipo de molécula utilizada, como o DNA, RNA, cDNA e proteína. Além disso, as aplicações podem ser classificadas em quantitativas, como a quantificação relativa em estudos de expressão gênica ou quantificação absoluta em relação à carga viral ou ao número de cópias, e qualitativas, como a genotipagem, detecção de diagnósticos de presença e ausência, que estuda o rastreamento de tampões, mutações ou ligantes que afetam a estabilidade térmica da proteína de interesse (Giusti, 2012).

Silva (2016) utilizou métodos moleculares para diferenciar e identificar isolados de *Colletotrichum* spp. associados à antracnose da mandioca. Foram empregadas duas estratégias distintas: a primeira envolveu o agrupamento dos isolados utilizando *primers* específicos para regiões repetitivas BOX e ERIC-PCR, enquanto a segunda técnica utilizou a técnica de PCR-RFLP (Polimorfismo de Comprimento do Fragmento de Restrição), que foi realizada tanto *in sílico* quanto *in gel*. Essas técnicas permitiram a identificação mais precisa e confiável dos isolados de *Colletotrichum* spp., o que é importante para o controle da antracnose da mandioca, uma doença que pode causar grandes prejuízos na produção agrícola.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local e Coleta dos isolados

O trabalho foi desenvolvido entre agosto de 2022 e dezembro de 2023 nos laboratórios de Melhoramento Genético Vegetal (LMGV) e Resistência Genética (LRG) da Universidade do Estado de Mato Grosso (UNEMAT), localizados na Cidade Universitária, em Cáceres - MT, Laboratório Multiusuário de Genômica e Biotecnologia (LMGB) da Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT) na cidade de Sinop – MT e em parceria com a empresa TRC - *Teak Resources Company*.

Para a execução do experimento e detecção de *C. fimbriata* foram utilizados os isolados CF220, CF233, CF283 e CF401 pertencentes a Micoteca.

3.2 Desenvolvimento de iniciadores específicos para identificação de *C. fimbriata*

Foram selecionados dez iniciadores a partir do genoma completo de *C. fimbriata*, acessado por meio de pesquisa realizada no banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI).

Os iniciadores foram desenhados com auxílio do site *Primer3* (“primer3.ut.ee”). As sequências escolhidas (1.000 e 1.350 pb) foram desenhadas com os seguintes parâmetros: escolha o *primer* esquerdo; escolha o *primer* direito (5' para 3' na fita oposta) (Figura 1); tamanho do *primer*: Min.: 18, Ótimo: 20, Máx.: 23; temperatura de fusão do *primer*: 59,0 (Ótimo: 60,0, Máx.: 62,0); Diferença máxima de temperatura de fusão: 3,0; Parâmetros termodinâmicos da tabela de SantaLucia (1998); Faixas de tamanho do produto: 120 – 150pb. Depois de selecionado as modificações os iniciadores foram

escolhidos sem as sequências repetidas de pares de bases e sem as regiões minúsculas, ou seja, as regiões intergênicas.

Primer3web version 4.1.0 - Pick primers from a DNA sequence.

Select the **Task** for primer selection: generic

Template masking before primer design (available species)

Select species: Example: Mus musculus Nucleotides to mask in 5' direction: 1

Primer failure rate cutoff: < 0.1 Nucleotides to mask in 3' direction: 0

Paste source sequence below (5' to 3', string of ACGTNaagtn -- other letters treated as N -- numbers and blanks ignored). FASTA format ok. Please N-out undesirable sequence (vector, ALUs, LINEs, etc.) or use a [Mispriming Library](#) (repeat library): NONE

☒ Pick left primer, or use left primer below ☐ Pick hybridization probe (internal oligo), or use oligo below ☒ Pick right primer, or use right primer below (5' to 3' on opposite strand)

Pick Primers Download Settings Reset Form

Figura 1. Primer3 ("primer3.ut.ee").

Para encontrar as sequências *Forward*, foi utilizado o arquivo do *Microsoft Word* para fazer a cópia do genoma selecionado, a fim de desenhar os iniciadores. Para encontrar o *Reverse*, foi acessado o site "*Reverse Complement*" no seguinte endereço eletrônico: "bioinformatics.org/sms/rev_comp.html". No arquivo do *Microsoft Word*, o amplicon é destacado entre as sequências *Forward* e *Reverse* (Figura 2).

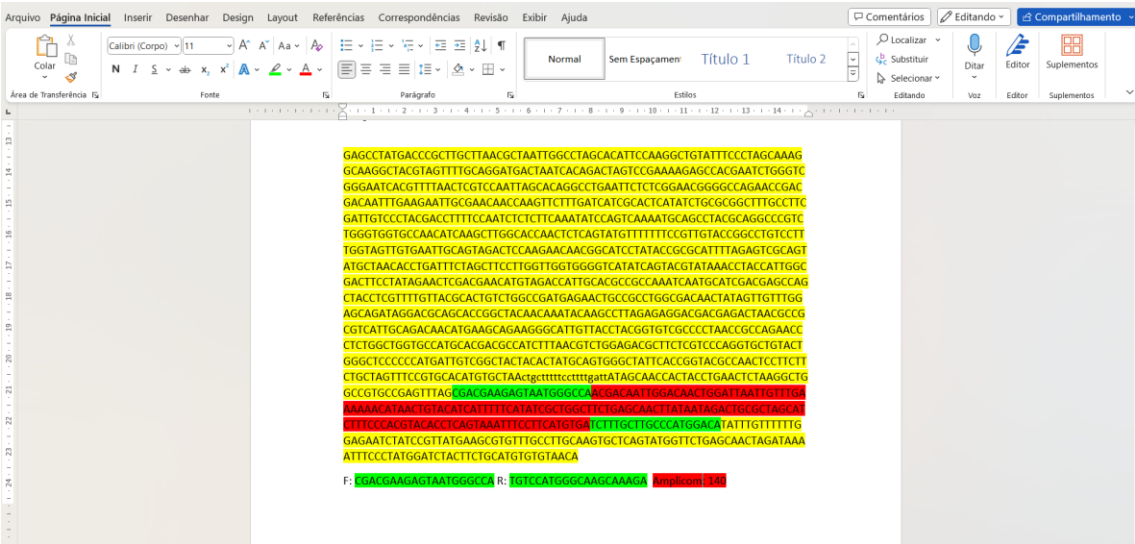


Figura 2. *Forward* e *Reverse* em verde e o Amplicon em vermelho. Em amarelo uma sequência do genoma entre mil e 1.350 pares de bases.

No *website* do NCBI BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), as sequências *Forward* e *Reverse* foram submetidas à análise *in silico* no Nucleotide BLAST (tabela 1). Essa análise teve como objetivo verificar a especificidade das sequências de iniciador, que podem ser de DNA, RNA ou proteínas, em relação às sequências armazenadas em bancos de dados públicos mantidos pelo NCBI.

Para os testes com os iniciadores primeiramente utilizou-se DNA's de *C. fimbriata* armazenado na Micoteca pelo método do *ultra freezer* a -80 °C. O isolado CF233 foi multiplicado em placa de petri contendo o meio MYEA (2% Extrato de Malte – 0,2 % Extrato de levedura – 2 % Agar) (Engelbrecht & Harrington, 2005), as quais foram lacradas com plástico filme PVC e armazenadas em caixa de papelão desinfestado com álcool 70%, na sala de inoculação, com temperatura de aproximadamente 25 °C durante o período de 12 a 15 dias.

Para a extração de DNA as placas de petri com os isolados foram raspadas levemente com espátula de aço inox (autoclavada) e colocados em um almofariz de porcelana. Foi utilizado o nitrogênio líquido para fazer a maceração. Após a maceração o material foi coletado em um microtubo de plástico de 2,0 ml para dar o seguimento da extração conforme o fabricante do kit de extração de DNA *Wizard® Genomic DNA Purification* (Promega Corp., Madison, WI, USA).

As reações da amplificação para os testes de temperatura dos iniciadores, foram realizadas no termociclador *GeneExplorer* da fabricante *Bioer technology* para PCR convencional, com volume final de 20 µl, onde em cada amostra foi utilizada 4 µl de DNA (5 ng/ µl), 2 µl de Tampão de PCR 10x, 1 µl de MgCl² a 50mM, 0,4 µl de dNTPs a 20 mM, 0,5 U de Taq polimerase, 1,25 F µl e 1,25 R µl de cada *iniciador* e 9,6 µl H₂O ultrapura q.s.p. O programa de amplificação foi de um passo de desnaturação inicial a 94 °C por 4 minutos, seguido por 40 ciclos a 94 °C durante 30 segundos, 56 °C - 58 °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.

O tamanho esperado do amplicon foi verificado através do produto de PCR (10 µl distribuído em 3 µl de reação e 7 µl 6X *Loading buffer* – Gel *Red + Blue Juice*) em gel de agarose a 2 % imerso em cuba horizontal com TBE1X e feita eletroforese a 100 V por 115 minutos, comparando com marcador molecular de DNA de 100 pb (LGC Biotecnologia). O resultado da eletroforese foi revelado em luz UV no fotodocumentador em sistema digital L-PIX Image (Loccus Biotecnologia). Posteriormente, os pares de iniciadores com as melhores características para identificação da espécie foram utilizados para amplificar o DNA do *C. fimbriata* e verificar sua especificidade e sensibilidade.

3.3 Sensibilidade do protocolo para cada iniciador

O isolado CF220 de *C. fimbriata* foi extraído de cultura pura e utilizado para extração de DNA seguindo o protocolo de extração do *kit Wizard® Genomic DNA Purification* (Promega Corp., Madison, WI, USA) descrito anteriormente.

A qualidade do DNA foi realizada em gel de agarose 1 % imerso em cuba horizontal com TBE1X e feita em eletroforese a 100 V por 110 minutos com o marcador molecular 1kb *Ladder* RTU (Kasvi), sendo 10 µl distribuído em 3 µl de DNA e 7 µl 6X *Loading buffer* (Gel Red + Blue Juice). O resultado da eletroforese foi revelado em luz UV no fotodocumentador em sistema digital L-PIX Image (Loccus Biotecnologia) e quantificado pelo aparelho Fluorímetro Qubit® 4.0 (Invitrogen).

Os limites de detecção e a concentração ideal para utilizar nos ensaios de qPCR das amostras do DNA de *C. fimbriata* foram, a partir da concentração de 5 ng/µl. As diluições foram realizadas em série de seis vezes com as concentrações de 10, 1, 1x10⁻¹, 1x10⁻², 1x10⁻³, 1x10⁻⁴ ng/µl.

Para gerar uma curva padrão com base em nanogramas de amplicon e calcular o número de cópias, foi empregada a calculadora digital de número de cópias para PCR em tempo real (Staroscik, 2022). Essa ferramenta requer que o usuário informe a quantidade de um modelo presente (em nanogramas) e o comprimento do modelo (em bases ou pares de bases), permitindo assim o cálculo preciso do número de cópias do modelo. A equação para realizar essa conversão é:

$$\text{Número de cópias(moléculas)} = \frac{X \text{ ng} * 6.0221 \times 10^{23} \text{ moléculas/mol}}{(N * 660 \text{ g/mol}) * 1 \times 10^9 \text{ ng/g}}$$

Onde:

X = quantidade de amplicon (ng)

N = comprimento do amplicon dsDNA

660 g/mol = massa média de 1 pb dsDNA

6,022 x 10²³ = constante de Avogadro

1×10^9 = fator de conversão

As reações da amplificação foram conduzidas no termociclador Bio-Rad CFX96 manager 2.1 (C1000 Touch – Thermal Cycler) com volume final de 20 µl, onde em cada amostra foi utilizada 10 µl iTaq Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad), 2 µl de DNA, 1,25 µl de iniciador *forward*, 1,25 µl de iniciador *reverse*, 5,5 µl H₂O ultrapura q.s.p. A programação de amplificação iniciou-se com um estágio de espera (*Hold Stage*), mantendo a temperatura constante a 50 °C por 2 minutos e, em seguida, a 95 °C por 10 minutos. O estágio de PCR (*PCR Stage*) compreendeu as etapas de desnaturação, anelamento e extensão, com temperaturas controladas a 95 °C por 15 segundos e 59 °C por 30 segundos, sendo repetida por 40 ciclos para a amplificação específica do DNA. A curva de fusão (*Melt Curve*) monitorou a fluorescência, determinando a temperatura de dissociação em 95 °C por 10 segundos, 65 °C por 5 segundos e, em seguida, um aumento gradual de temperatura a cada 5 °C até 95 °C. O ciclo de quantificação (Cq) foi determinado manualmente em cada execução (ao redor de 10^2), otimizando assim a eficiência da reação e o coeficiente de determinação (R^2) das curvas padrões.

Os coeficientes de determinação (R^2) foram empregados para avaliar a adequação da curva. As eficiências de amplificação por qPCR (%) foram calculadas mediante análise de regressão utilizando a seguinte fórmula (Pfaffl, 2001):

$$E = [10^{-1/\text{Slope}} - 1] * 100$$

Onde:

E = eficiência

Slope = inclinação da curva de amplificação

3.4 Validação do protocolo de identificação rápida de *C. fimbriata*

3.4.1 Elaboração protocolo de maceração para extração de DNA do lenho de Teca

Primeiramente foram testados cinco protocolos de maceração para a extração de DNA da madeira fresca (alburno) de *T. grandis*. Os protocolos foram adaptados para o

uso do *kit* de extração *Wizard® Genomic DNA Purification* (Promega Corp., Madison, WI, USA), onde essas alterações foram implementadas no início de cada protocolo.

No primeiro protocolo, as modificações foram introduzidas no processo de maceração das lascas de madeira, utilizando o aparelho Homogeneizador EC2019 (LGC - Biotecnologia).

Foi adicionado 10 mg de PVP K30 (polivinilpirrolidona) ao material em um microtubo de 2,0 ml, junto com dez esferas 2,0 mm (NOVA biotecnologia). Após a maceração, 600 µL de *Nuclei Lysis Solution* foram incorporados em cada microtubo de 2,0 ml, e duas esferas 5 mm (Qiagen) foram adicionadas. Em seguida, os microtubos foram colocados no aparelho *Tissuelyser* (Qiagen) por um período de 15 minutos. Depois foi incubado a 65 °C por 15 minutos. Após a incubação foi adicionado 3 µL de *RNAse* e os tubos foram invertidos gentilmente para homogeneização.

A incubação foi realizada à 37 °C por 15 minutos. As amostras foram removidas do banho-maria e deixadas para descansar por 5 minutos à temperatura ambiente evitando agitá-la durante esse período. Após descanso, foi realizada centrifugação a 14000 RPM por 5 minutos a uma temperatura de 4 °C. Em seguida transferiu-se o sobrenadante (600 µL) para outro microtubo contendo 600 µL de isopropanol à temperatura ambiente. Misturou-se cuidadosamente a solução até o DNA formar uma massa visível (*pellet*).

Após a transferência do sobrenadante, procedeu-se à centrifugação a 14.000 RPM por 5 minutos à temperatura ambiente (22 °C). O sobrenadante foi descartado e, com cuidado, acrescentou-se 600 µL de etanol à temperatura ambiente ao tubo com DNA. O tubo foi manuseado com delicadeza, sendo invertido várias vezes, a fim de assegurar a lavagem eficaz do material genético. Após essa etapa, o DNA pode ser visto como uma estrutura branca (*pellet*) no interior do tubo. Repetiu esse procedimento 3 vezes, garantindo a obtenção de resultados consistentes.

Realizou a centrifugação a 14.000 RPM por 3 minutos a 22 °C. Descarta se o excesso de etanol, seja por pipetagem ou virando o tubo. Coloca se o tubo de maneira invertida sobre papel absorvente, permitindo que o excesso de líquido fora absorvido por 15 minutos. Em seguida, adiciona se 100 µL da DNA *Rehydration Solution* e deixou em *Over Night* por 12 horas a 4 °C, para obter uma reidratação adequada do material genético.

No segundo protocolo, as modificações foram introduzidas no procedimento de maceração das lascas de madeira, realizado com o auxílio do equipamento *Tissuelyser* (Qiagen). Nessa etapa, as lascas de madeira foram submetidas à maceração em Nitrogênio líquido e misturadas com 10 mg de PVP K30, utilizando um almofariz de porcelana e um pistilo até que as lascas fossem completamente reduzidas a pó e acondicionada em microtubos estéreis de 2,0 ml com duas esferas de 5 mm (Qiagen).

No terceiro protocolo, cada amostra de lascas de madeira foi acondicionada em microtubos estéreis de 2,0 ml, aos quais foram adicionadas duas esferas 5 mm (Qiagen) e 1 mg de PVP K30. Posteriormente, as amostras foram maceradas com o auxílio do equipamento *Tissuelyser*.

O quarto protocolo aderiu à abordagem que utiliza Nitrogênio líquido para a maceração das lascas de madeira, juntamente com a adição de 1 mg de PVP K30. Esse processo envolveu a pulverização das lascas até que se transformassem em um pó fino, utilizando um almofariz de porcelana e um pistilo. O pó resultante foi então transferido para um microtubo de 2,0 ml e combinado com dez esferas 2 mm (NOVA biotecnologia), para ser processado no aparelho Homogeneizador EC2019 (LGC - Biotecnologia).

No quinto protocolo, empregou-se Nitrogênio líquido para a maceração das lascas de madeira, combinado com a adição de 1 mg de PVP K30. Esse procedimento envolveu a trituração das lascas até que se transformassem em pó fino, utilizando um almofariz de porcelana e um pistilo. Posteriormente, o pó resultante foi transferido para um microtubo estéril de 2,0 ml e, em seguida, o protocolo prosseguiu conforme estabelecido. Em seguida, os procedimentos dos cinco protocolos seguiram as diretrizes estabelecidas pelo kit de extração *Wizard® Genomic DNA Purification* (Promega Corp., Madison, WI, EUA).

A qualidade do DNA foi realizada em gel de agarose 1% imerso em cuba horizontal com TBE1X, seguido de eletroforese a 100 V por 110 minutos, com marcador molecular de 1 kb *Ladder* (Kasvi). O resultado da eletroforese foi revelado em luz UV no fotodocumentador em sistema digital L-PIX Image (Loccus Biotecnologia). A quantificação foi feita pelo aparelho Fluorímetro Qubit® 4.0 (Invitrogen).

3.4.2 Validação do protocolo

Para validação do protocolo, foi utilizado o genótipo BT 64, por ser um genótipo suscetível ao *C. fimbriata*. O experimento foi realizado em casa de vegetação, com delineamento inteiramente casualizado, espaçamento entre vasos de 50 cm e 30 cm entre linhas, composto por cinco tratamentos (24h, 15 dias, 30 dias, 45 dias e 60 dias), sendo uma testemunha e seis repetições com parcelas constituídas por uma planta cada, totalizando 35 plantas (Figura 1). Para ter certeza da homogeneidade das condições ambientais e do material experimental, os vasos, foram mudados de posição, de forma inteiramente casual, para evitar influências externas.

Os genótipos de teca foram transplantados com uma semana de aclimação na casa de vegetação. Para a adubação foi utilizado substrato e areia na proporção 2:1, e usados 35 vasos de 2,8 litros para o transplântio. Para cada planta, a adubação foi utilizada 4,3 g de Gesso, 1,17 g de NPK 20 05 20 e 2,844 g de Yorin (P; Ca; Mg; B; Cu; Mn; Si; Zn) no período de 15 em 15 dias até o abate final do experimento. Sendo utilizado o 1,4 g de Sulfato de Magnésio antes do transplântio e um mês antes do abate. Na adubação foliar, foi utilizado o adubo líquido Planton-25 com a medida de 2 ml/L seguindo mesmo período da adubação granular.

Tratamentos					
Repetições	T1 R4	T4 R1	T4 R2	T2 C	T4 R3
	T2 R2	T3 R1	T1 R6	T3 R4	T1 R2
	T3 C	T1 R5	T3 R2	T3 R5	T5 R3
	T5 R1	T5 R4	T4 R6	T2 R6	T4 C
	T3 R3	T5 C	T4 R4	T1 R3	T5 R2
	T2 R3	T1 C	T3 R6	T5 R6	T5 R5
	T1 R1	T4 R5	T2 R4	T2 R1	T2 R5

Figura 3. Croqui do experimento.

A inoculação do patógeno ocorreu no dia 12 de maio de 2023, utilizando a metodologia desenvolvida por Amorim et al. (2023). Após o período de multiplicação do isolado CF233, foi adicionado 10 ml de água destilada esterilizada em duas placas de petri para a coleta dos esporos (conídios e ascósporos), 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 sua concentração foi determinada em câmara de Neubauer (hemacitômetro) para $2,5 \times 10^5$ conídios m^{-1}l (Amorim et al., 2023). Foi realizado um corte de 2 cm no caule, com estilete esterilizado flambado ao rubro, a 10 cm do colo da muda. Em seguida, foi depositada uma gota de 20 μl da suspensão de esporos. O ferimento foi coberto com algodão umedecido em água destilada autoclavada e vedada com plástico filme PVC, fazendo se uma câmara úmida para evitar ressecamento e a entrada de outros microrganismos. Cinco plantas saudáveis receberam apenas água destilada como controle (Figura 4).



Figura 4. Suspensão de esporos e a inoculação dos genótipos.

Os abates iniciaram no dia 14 de julho de 2023, com a temporalidade de 24h (0 dias) para o primeiro tratamento, 15 dias para o segundo tratamento, 30 dias para o terceiro tratamento, 45 dias para o quarto tratamento e 60 dias para o quinto tratamento. Foram abatidas as seis repetições e controle de cada tratamento de acordo com sua temporalidade. Durante o abate foram coletados a região do caule onde se encontrava o ferimento da inoculação e acondicionados em sacos de papel alumínio e sacos “ziplock” desinfestado com álcool 70 %. Esses sacos foram colocados em um isopor com Gelox (GeloTech) para preservar o caule e patógeno.

Após a coleta do caule, a parte do xilema é exposta através do corte longitudinal com o intuito de expor a presença ou ausência da lesão causada pelo *C. fimbriata*. Para esse processo fora utilizado o estilete flambado ao rubro e desinfestado com álcool 70 %.

Em seguida cada repetição foi colocada em uma cabine fotográfica para o registro das lesões. Foram tiradas cinco fotos de cada repetição e o controle com a resolução de 50 megapixels (Figura 5). Todas as partes foram devidamente colocadas de volta nos sacos e armazenados no *Ultrafreezer* a -80 °C para a extração de DNA. As imagens dos caules foram analisadas pelo *software ImageJ* para a análise da área das lesões. Os resultados das variáveis foram submetidos a análise de variância e teste de significância pelo teste F com auxílio do *software Genes* (Cruz, 2013).



Figura 5. Abates e registro das áreas de lesões.

As reações da amplificação foram conduzidas no termociclador Bio-Rad CFX96 manager 2.1 (C1000 *Touch – Thermal Cycler*) com volume final de 20 µl, onde em cada amostra foi utilizada 10 µl *iTaq Universal SYBR Green Supermix* (Bio-Rad), 2 µl de DNA, 1,25 µl de iniciador *forward*, 1,25 µl de iniciador *reverse*, 5,5 µl H₂O ultrapura q.s.p.. A programação de amplificação iniciou-se com um estágio de espera (*Hold Stage*), mantendo a temperatura constante a 50 °C por 2 minutos e, em seguida, a 95 °C por 10 minutos. O estágio de PCR (*PCR Stage*) compreendeu as etapas de desnaturação, anelamento e extensão, com temperaturas controladas a 95 °C por 15 segundos e 59 °C por 30 segundos, sendo repetida por 40 ciclos para a amplificação específica do DNA. A curva de fusão (*Melt Curve*) monitorou a fluorescência, determinando a temperatura de dissociação em 95 °C por 10 segundos, 65 °C por 5 segundos e, em seguida, um aumento gradual de temperatura a cada 5 °C até 95 °C. O C_q (Ciclo de quantificação) foi determinado manualmente em cada execução, otimizando assim a eficiência da reação e o coeficiente de determinação (R²) da curva padrão.

Os coeficientes de determinação (R^2) foram empregados para avaliar a adequação da curva. As eficiências de amplificação por qPCR (%) foram calculadas mediante análise de regressão utilizando a fórmula (Pfaffl, 2001), conforme descrito anteriormente.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Maceração otimizada para extração de DNA do lenho de Teca

Após a extração de DNA por meio dos cinco protocolos, foi realizada a eletroforese em gel de agarose 1% (Figura 6) para verificar a qualidade do DNA extraído, onde apenas dois protocolos tiveram êxito (Tabela 1).

Tabela 1 - Protocolos de maceração para extração de DNA da madeira de teca

PROTOCOLOS	AMOSTRAS	RESULTADOS
H - 1	R1, R2, R3, R4	Nenhuma amostra
NT - 2	R5, R6, R7, R8	Todas viáveis
T - 3	R9, R10, R11, R12	Apenas R11 e R12
NH - 4	R13, R14, R15, R16	Apenas R13 e R15
N - 5	R17, R18, R19, R20	Todas viáveis

Homogeneizador (H), Nitrogênio + *Tissuelyser* (NT), *Tissuelyser* (T), Nitrogênio e Homogeneizador (NH) e Nitrogênio (N).

Ao analisar os resultados, foi possível perceber que o método de maceração utilizando Nitrogênio líquido e Nitrogênio líquido + *Tissuelyser* apresentou maior intensidade das bandas e na quantificação pelo aparelho Fluorímetro Qubit® 4.0 (Invitrogen), obtiveram 40,19 ng/μl e 30,80 ng/μl de DNA, respectivamente, no qual é possível obter-se um material de boa qualidade e integridade.

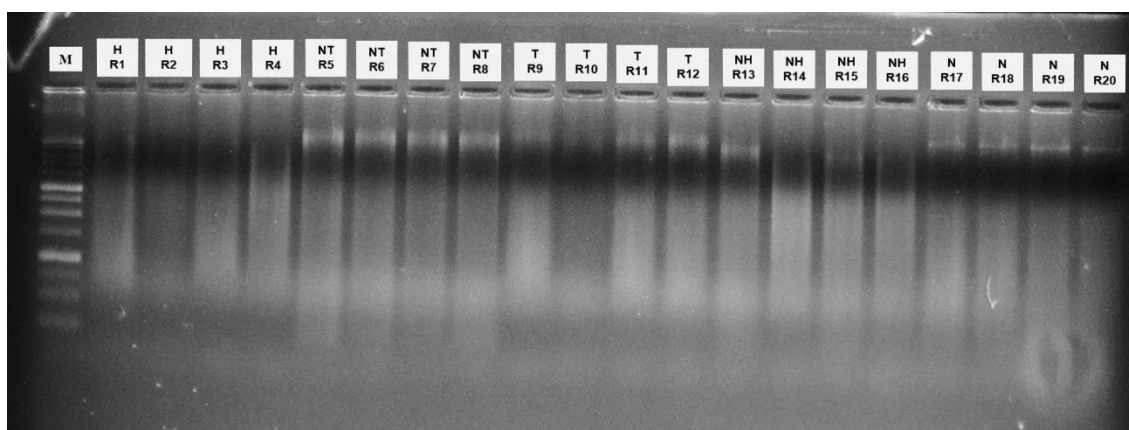


Figura 6. DNA do lenho da teca. Gel de agarose 1%.

No estudo da qualidade e integridade do DNA do estipe de *Butyagrus nabonnandii* (Prosch.) Vorster, ao empregar nitrogênio líquido para maceração, obteve um rendimento reduzido (49,51 ng/μL de DNA extraído). Apesar da quantidade diminuta, foi constatada uma qualidade satisfatória (Oliveira-Neves et al., 2022).

A extração e a purificação de ácidos nucleicos a partir de várias amostras experimentais, como fungos, bactérias, tecidos vegetais e animais, desempenham um papel altamente fundamental e eficiente na obtenção de uma amplificação nos protocolos que utilizam técnicas subsequentes da biologia molecular, tais como quantificação, reação em cadeia da polimerase (PCR), diagnósticos de doenças e sequenciamento (Moredjo, 2016).

4.2 Amplificação dos iniciadores específicos desenhados

O NCBI BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) foi empregado como ferramenta para examinar diversos aspectos relacionados aos iniciadores, incluindo especificidade para o alvo desejado, estabilidade da estrutura secundária, similaridade e significância dos iniciadores, entre outras propriedades cruciais.

Vale ressaltar que, embora existam poucos métodos moleculares de diagnóstico de fungos baseados em qPCR, a análise *in silico* (Tabela 2) forneceu uma abordagem abrangente para garantir a eficácia e a seletividade dos iniciadores. Essa análise também permitiu avaliar a similaridade ou significância dos iniciadores para outras espécies, contribuindo para a seleção criteriosa no contexto de diagnóstico molecular.

Tabela 2. Lista de espécies fúngicas e seus acessos de sequência NCBI, com os quais a especificidade dos conjuntos de iniciadores de *C. fimbriata* foram obtidos e testada *in silico*

Espécie	Identificação dos iniciadores/Número de Acesso NCBI									
	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
<i>Ceratocystis adiposa</i>	NES	NES	NES	NES	NES	NS	NS	NS	NS	NS
<i>Ceratocystis albifundus</i>	MAOA020000 33.1									
	MANZ010011 75.1									
	MANY010002 39.1									
	MANX010005 54.1	NS	NS	MAOA02000034.1 MANZ01001466.1 MANY01000295.1 MANX01000027.1 MANW01000002.1 JSSU01001399.1 JAAUVK010000030.1	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	MANW01000 450.1									
	JSSU0100114 7.1									
	JAAUVK0100 00036.1									
	PEJQ0100005 5.1	NS	NS	NS	PEJQ01000017.1	PEJQ01000045.1	NS	NS	PEJQ01000008.1	NS
	JAOSLS01000 0130.1	NS	JAOSLS01000003 4.1	JAOSLS010000034.1	NS	JAOSLS0100001 04.1	NS	JAOSLS01000 0485.1	JAOSLS0100001 99.1	NS
<i>Ceratocystis cacaofunesta</i>										
<i>Ceratocystis colombiana</i>										
<i>Ceratocystis eucalypticola</i>	LJOA0100003 2.1	LJOA01000171. 1	LJOA01000171.1	LJOA01000171.1	LJOA01000169.1	LJOA01000008. 1	LJOA0100044 7.1	LJOA0100060 3.1	LJOA01000411. 1	LJOA01000 286.1

Tabela 2. Cont...

<i>Ceratocystis fimbriata</i>	VNIJ0100000 1.1 MTCU010000 17.1 JAVSIP01000 0001.1 JAJQWW0100 00004.1 JAJLQU01000 4713.1 JAAVJK0100 00975.1 APWK030001 06.1	VNIJ01000001.1 MTCU01000217 .1 JAJQWW01000 0003.1 JAAVJK010000 155.1 APWK03000075 .1	VNIJ01000001.1 MTCU01000219.1 JAJQWW0100000 03.1 JAJLQU01000188 4.1 JAVSIP010000004 .1 JAAVJK01000020 5.1 APWK03000075.1	VNIJ01000001.1 MTCU01000405.1 JAVSIP010000004.1 JAJQWW010000003.1 JAJLQU010001884.1 JAAVJK010000205.1 APWK03000075.1	JAJQWW0100000 04.1 JAAVJK01000114 9.1 VNIJ01000103.1 MTCU01000471.1 JAVSIP010000001 .1 JAJLQU01000220 1.1 APWK03000070.1	VNIJ01000145.1 MTCU01000136 .1 JAVSIP0100000 01.1 JAJQWW01000 0014.1 APWK03000099 .1 JAJLQU0100017 88.1 JAAVJK010000 891.1	VNIJ0100014 6.1 JAVSIP01000 0005.1 JAJLQU01000 2854.1 JAJQWW0100 00012.1	JAJLQU01000 0631.1 VNIJ0100017 2.1 JAVSIP01000 0009.1 JAJQWW0100 00007.1 JAAVJK0100 01719.1 APWK030000 61.1	VNIJ01000002.1 MTCU01000194 .1 JAVSIP0100000 04.1 JAJQWW01000 0003.1 JAJLQU0100019 50.1 JAAVJK010001 845.1 APWK03000135 .1	VNIJ010002 03.1
<i>Ceratocystis harringtonii</i>	MKGM01000 231.1	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
<i>Ceratocystis lukuohia</i>	JALGWS0100 00283.1	NS	JALGWS01000002 4.1	JALGWS010000024.1	NS	JALGWS010000 152.1	NS	JALGWS0100 00181.1	JALGWS010000 167.1	NS
<i>Ceratocystis manginecans</i>	VIFZ0100001 2.1 SGIO0100003 0.1 JJRZ01000141 .1 JANZMI0100 00119.1	JANZMI010000 126.1	VIFZ01000046.1 SGIO01000025.1 JJRZ01000030.1 JANZMI01000012 6.1	VIFZ01000046.1 SGIO01000025.1 JJRZ01000030.1 JANZMI010000092.1	JJRZ01000074.1 JANZMI01000006 7.1 VIFZ01000089.1 SGIO01000004.1	JANZMI010000 188.1 VIFZ01000016.1 SGIO01000026. 1 JJRZ01000068.1	JANZMI0100 00002.1	VIFZ0100006 5.1 SGIO0100003 4.1 JJRZ01000035 .1 JANZMI0100 00050.1	VIFZ01000181.1 SGIO01000013. 1 JJRZ01000173.1 JANZMI010000 206.1	NS
<i>Ceratocystis platani</i>	LBBL0100026 9.1	NS	LBBL01000020.1	LBBL01000013.1	NS	LBBL01000166. 1	NS	NS	LBBL01000159. 1	NS
<i>Ceratocystis smalleyi</i>	NETT0100030 1.1	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
<i>Colletotrichum gloesporioides</i>	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
<i>Fusarium oxysporum</i>	NS	NS	NS	NS	NESE	NESE	NESE	NESE	NESE	NS

Tabela 2. Cont...

<i>Fusarium solani</i>	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
<i>Kretzschmaria zonata</i>	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
<i>Phellinus noxius</i>	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
<i>Ralstonia solanacearum</i>	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
<i>Thielaviopsis basicola</i>	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS

NS: *E Value* - Não Significativo (NCBI BLAST)

NES: Não Encontrado Similaridade para a espécie

No trabalho conduzido por Magaña-Alvarez (2022), a especificidade das sequências iniciadoras foi validada *in silico* antes de sua síntese. Para essa avaliação, foram pesquisadas sequências da região ITS de treze espécies de fungos pertencentes ao gênero *Kretzschmaria*, bem como outras onze espécies de fungos, utilizando o banco de dados do NCBI.

Para a detecção de patógenos lenhosos em amendoeiras por meio de amplificações por PCR, foram empregadas sequências de regiões parciais do fator de alongamento da tradução 1- α (TEF-1 α), do espaçador transcrito interno (ITS) do DNA ribossômico nuclear, compreendendo ITS1, 5.8S, ITS2, e da β -tubulina (BT2), obtidas de outras espécies selecionadas, incluindo membros da família Ceratocystidaceae, por meio de análise *in silico* do banco de dados NCBI GenBank (Avenot et al., 2022).

Os *iniciadores* e sondas específicos dos tipos G3 e G14 foram projetados utilizando regiões conservadas dos genes G3 VP7 e G14 VP7 com o auxílio da ferramenta *PrimerQuest*. A especificidade dessas sequências foi confirmada (*in silico*) pelo NCBI BLAST, enquanto a análise de auto-hibridização, formação de *loop hairpin* e complementaridade 3' foi realizada com a ferramenta IDT *OligoAnalyzer*. Essa abordagem minuciosa, conforme detalhada por Carossino et al. (2019), assegura a eficácia e seletividade do ensaio TaqMan® RT-qPCR multiplex, proporcionando uma detecção precisa e genotipagem confiável dos rotavírus equinos G3 e G14 em amostras fecais.

No desenho de iniciadores a análise *in silico* é fundamental para assegurar a especificidade e eficácia dos iniciadores, economizando tempo e reagentes, além de prever primers mais robustos em regiões genômicas mais favoráveis (Kalendar et al., 2017).

Após o design dos iniciadores e análises *in silico*, foram desenvolvidos dez conjuntos (Tabela 3) destinados a amplificar sequências específicas dentro da região do genoma de *C. fimbriata*. A especificidade desses iniciadores para o patógeno foi confirmada por meio da amplificação por PCR utilizando DNA extraído dos isolados de *C. fimbriata* provenientes da micoteca.

Tabela 3. Conjunto de iniciadores específicos para detecção de *C. fimbriata*

ID Iniciador	Sequência	Amplicon (pb)
Cerato11-F	5'-ACAAATCCCGGCTGTGATGT-3'	148
Cerato11-R	3'-CGTATCTGTCCTTCGCCACA-5'	
Cerato12-F	5'-CGACGAAGAGTAATGGGCCA-3'	140
Cerato12-R	3'-TGTCCATGGGCAAGCAAAGA-5'	
Cerato13-F	5'-TCCGACTCACACAGCTCAAC-3'	121
Cerato13-R	3'-TCTCTACCATGTGCAGCCTG-5'	
Cerato14-F	5'-GAAGCCGGCAATGTTGTAGC-3'	126
Cerato14-R	3'-TATGGCCGCGTCTATCCCTA-5'	
Cerato15-F	5'-GCCGCTACATCTCGCCATAT-3'	145
Cerato15-R	3'-TGGCGTATCGAGATCCTGGA-5'	
Cerato16-F	5'-TGGTGGCCATGGAGATGTTG-3'	139
Cerato16-R	3'-GCTCCGGGTCGATATCCTTG-5'	
Cerato17-F	5'-CACACCCGGCTGTTAAGACA-3'	121
Cerato17-R	3'-TCCCTCAACCTCTCAGCGTA-5'	
Cerato18-F	5'-GCTGAACGCGGACTTTTCTG-3'	141
Cerato18-R	3'-ACACAGGGCCCTTAAATCCG-5'	
Cerato19-F	5'-TCGACATCTCCCCATCCTGA-3'	128
Cerato19-R	3'-CTCTGGAAAAGGGCGACAGT-5'	
Cerato20-F	5'-GATGCTTCTTCCACTGGCCT-3'	137
Cerato20-R	3'-TGCACCATAAGAACCGAGCG-5'	

pb: pares de base

4.3 Sensibilidade dos conjuntos de iniciadores

A sensibilidade dos conjuntos de iniciadores foi verificada via diluições seriadas nas concentrações de 10 ng, 1 ng, 0,1ng, 0,01ng, 0,001ng e 0,0001ng. Os valores de Cq para os iniciadores 11 e 15 na segunda repetição variaram de 16,07 e 19,11 com o menor número de ciclos até 28,83 e 34,42 com o maior número de ciclos, respectivamente, conforme esperado para as diluições. Além disso, na primeira repetição do iniciador 12, observou-se uma amplificação esperada, iniciando no ciclo 17,17 e terminando no ciclo

33,04. Por outro lado, o iniciador 13 apresentou amplificação demorada para a diluição de 10 ng com 21.83 ciclos para a primeira repetição e 10 ng e 1 ng com 25.58.17 e 23.79 ciclos para a segunda repetição. Já o iniciador 15 em sua primeira repetição apresentou na diluição de 0,001 ng amplificação demorada de 34,84 ciclo. Quanto ao iniciador 14, ambas as repetições demonstraram amplificação das diluições em todos os ciclos, conforme esperado (Tabela 4).

O iniciador 16 apresentou valores de Cq de 17,30 para a primeira repetição no ciclo mais baixo e 28,75 para o ciclo mais alto. Na segunda repetição, apenas a diluição de 10 ng mostrou amplificação demorada, ocorrendo no ciclo 23,87. Notavelmente, amplificações demoradas foram observadas nas duas repetições dos iniciadores 17, 18 e 20, assim como na segunda repetição do iniciador 19, abrangendo as diluições de 10 ng, 0,1 ng, 0,01 ng e 0,001 ng. Na primeira repetição do iniciador 19, não houve amplificação em todas as diluições, e na segunda repetição do iniciador 12 não houve amplificação na diluição de 10 ng de DNA (Tabela 4).

Tabela 4. Resultados dos valores de Cq dos iniciadores em diluições seriadas de 6 vezes de DNA de cultura pura do patógeno em qPCR

Par de iniciadores	Repetições	Diluição seriada (Cq)					
		10 ng	1ng	0,1 ng	0,01 ng	0,001 ng	0,0001 ng
Cerato11	1	19.03	20.52	24.12	28.64	28.38	29.83
	2	16.07	19.75	23.74	27.35	27.40	28.83
Cerato12	1	17.17	20.45	23.76	31.28	32.40	33.04
	2	-	18.75	22.88	31.07	32.48	32.25
Cerato13	1	21.83	17.71	21.61	29.53	30.11	30.43
	2	25.58	23.79	21.38	29.23	30.25	30.67
Cerato14	1	16.75	18.59	23.23	31.39	33.04	34.00
	2	17.31	20.21	23.62	31.66	33.04	39.58
Cerato15	1	19.20	20.04	23.47	31.70	34.84	34.09
	2	19.11	20.21	23.45	31.10	33.30	34.42
Cerato16	1	17.30	19.42	22.34	28.15	28.27	28.75
	2	23.87	21.13	23.17	28.22	29.11	29.28
Cerato17	1	22.89	31.80	37.87	38.24	36.62	32.83
	2	16.25	19.79	22.04	35.54	25.47	24.29

Tabela 4. Cont...

Cerato18	1	25.09	21.43	29.80	38.53	32.62	37.95
	2	21.24	22.06	24.99	27.92	26.47	25.33
Cerato19	1	-	-	-	-	-	-
	2	22.10	25.48	33.26	29.02	27.15	26.72
Cerato20	1	22.97	22.19	32.30	29.11	39.78	32.47
	2	15.72	20.22	24.20	24.21	23.00	23.16

Cq: Ciclo de quantificação

Posteriormente, foi confirmado que essa amplificação do iniciador 19 demorada resultou da formação de dímeros, evidenciada pela análise da curva de fusão e pela eletroforese em gel dos produtos da qPCR. Os iniciadores Cerato11, 13, 17, 18, 19 e 20, todos apresentaram picos de melting indicando a presença de produtos como dímeros, constados pela curva de dissociação e, posteriormente, em gel de agarose e methafor a 3%.

Em estudos de detecção de *Litylenchus crenatae* em folhas de faia, foi observada amplificação demorada, conforme relatado por Burke et al. (2023). A amplificação ocorreu por volta do ciclo 35, com o mesmo padrão observado nos controles, indicando a possível formação de dímeros de iniciador, conforme confirmado pela análise da curva de fusão. Os valores de Cq variaram de 10,17 a 31,3, enquanto a eficiência da reação foi de 91,5% e o coeficiente de determinação R^2 da curva padrão alcançou 0,998.

A sensibilidade é um aspecto crucial. Quanto maior a sensibilidade dos iniciadores, menor a quantidade do patógeno necessária para detecção no tecido, possibilitando uma identificação mais eficaz nas fases iniciais da infecção (Magaña-Álvarez et al., 2022). Nesse contexto, o conjunto de iniciador Cerato16 destacou-se como o mais eficiente, demonstrando maior sensibilidade a 1×10^4 ng/ μ l de DNA de *C. fimbriata* na reação de qPCR.

De acordo com Langlois et al. (2021), é esperado que as reações contendo DNA alvo demonstrem uma amplificação robusta e exponencial ao longo de 40-50 ciclos, com um único pico forte na curva de fusão correspondente ao T_m previsto para o amplicon. Além disso, ao analisar os produtos da reação em um gel de agarose, espera-se observar uma única banda correspondente ao comprimento previsto do amplicon nas reações

contendo o DNA alvo modelo. O iniciador 16 foi o único a apresentar esses resultados consistentes (Figura 4).

Os limites de detecção do ensaio qPCR, conforme delineado por Luchi et al. (2013), para identificar um inóculo aéreo de *Ceratocystis platani*, foram estabelecidos em 0,05 pg/μl e 2 fg/μl de DNA para as combinações iniciador-sonda CP e ITS, respectivamente, coletados em ambiente urbano. A detecção direta de patógenos a partir de Amostras de Inóculo de Tecidos (AITs) destacou a especificidade e alta sensibilidade para *C. platani*, conseguindo identificar concentrações de DNA tão baixas quanto $1,2 \times 10^{-2}$ a $1,4 \times 10^{-2}$ pg/μl.

Diversos outros elementos poderiam justificar essas disparidades na quantificação do DNA, como os métodos de extração do DNA, e a sensibilidade distinta da qPCR, destacando a diferença entre as abordagens com SYBR Green e TaqMan (Chen et al., 2015).

Quanto à eficiência dos iniciadores, os resultados revelaram baixa eficiência para os iniciadores 11, 13, 17, 18, 19 e 20 (Tabela 5). Eficiências abaixo de 90% podem sugerir inibição, ou seja, redução na eficiência ou na precisão da reação de amplificação. Isso pode acontecer devido à presença de substâncias ou compostos nas amostras de DNA que interferem com a reação de PCR, ou outros problemas. Enquanto eficiências acima de 110% podem indicar problemas como formação de dímeros de iniciador (Bustin et al., 2010).

No estudo conduzido por Fruehwirth et al. (2020), acerca dos falsos negativos no diagnóstico molecular do SARS-CoV-2 em amostras contendo inibidores de amplificação, a eficiência foi consideravelmente baixa, alcançando apenas 29,8% com a diluição em relação aos casos de falsos negativos na detecção do SARS-CoV-2.

Tabela 5. Resultados da eficiência, coeficiente de determinação R^2 e slope dos iniciadores em diluições seriadas de 6 vezes de DNA de cultura pura do patógeno em qPCR

Iniciador	Eficiência (%)	R^2	Slope
Cerato11-F	157	0.900	-2.463
Cerato12-F	90,5	0.894	-3.530
Cerato13-F	216	0.613	-2.011
Cerato14-F	72,1	0.942	-4.223
Cerato15-F	91,4	0.919	-3.579

Tabela 5. Cont...

Cerato16-F	156	0.777	-2.473
Cerato17-F	23,5	0.200	-1.933
Cerato18-F	201	0.380	-2.045
Cerato19-F	2,784	0.118	-0.683
Cerato20-F	209	0.311	-2.037

No que se refere ao iniciador 14, observou-se uma eficiência considerada razoável, embora não tenha atingido a faixa ideal de 90% - 100% (Figura 2). Isso sugere que, em cada ciclo de amplificação, o DNA alvo duplica aproximadamente 1,72 vezes.

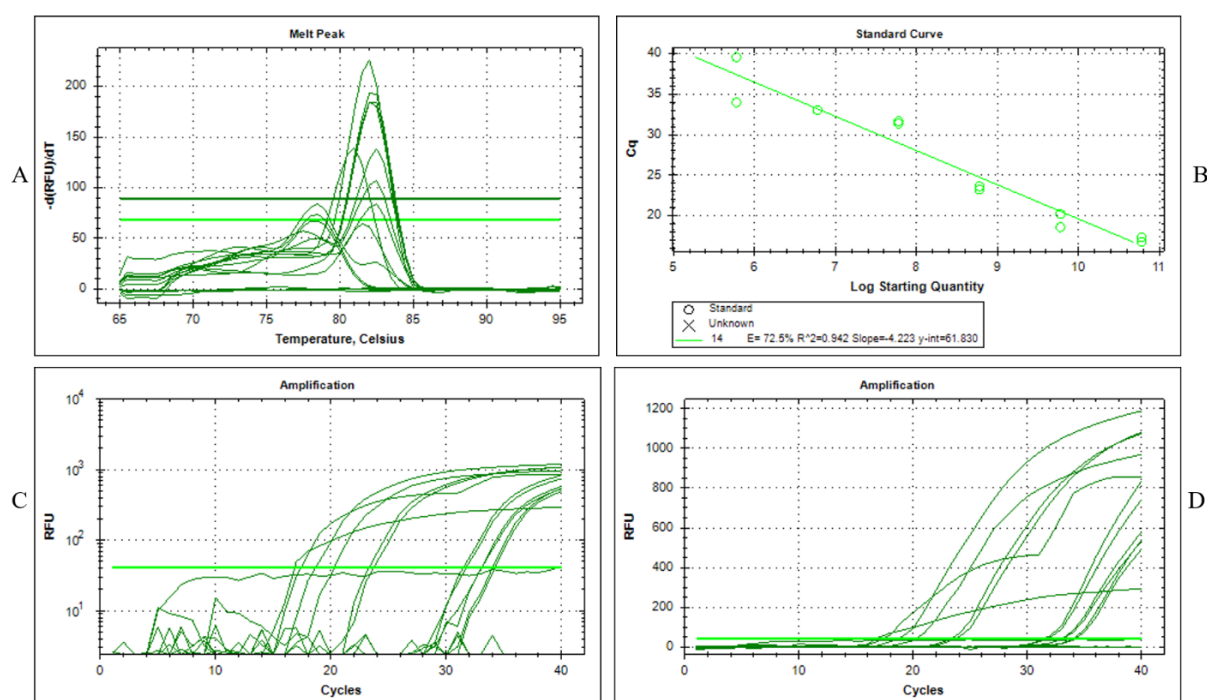


Figura 2. Amplificação do iniciador Cerato14 via qPCR. **A)** Pico de fusão apresentando um único pico acima da *threshold*. **B)** Regressão linear representando o coeficiente de determinação (R^2) da curva padrão 0.942. **C)** Amplificação do iniciador na escala Logarítmica, atingiu a 10^3 cópias a quantidade inicial durante esse ciclo. **D)** Amplificação do iniciador sem escala Logarítmica com início do ciclo e número de cópias.

Os iniciadores 12 e 15 demonstraram uma eficiência acima de 90%, indicando que, em cada ciclo de amplificação, o DNA alvo está duplicando aproximadamente 1,9 e 1,91 vezes, respectivamente. Essa eficiência sugere uma amplificação apropriada do DNA alvo durante o processo de qPCR, sendo que quanto mais próximo de 100%, mais eficaz é a duplicação consistente do DNA alvo a cada ciclo (Figura 3).

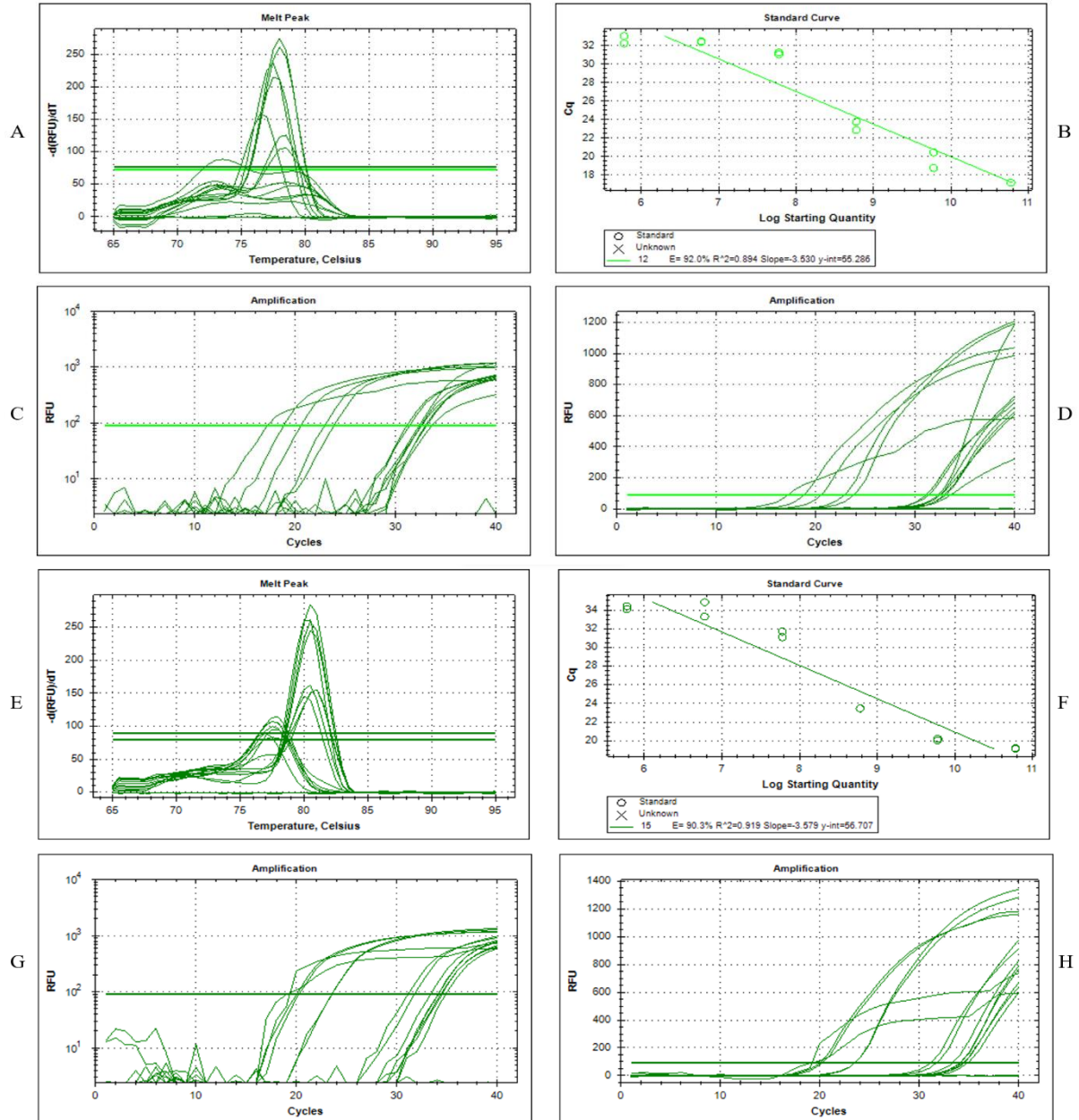


Figura 3. Amplificação do iniciador Cerato12 e Cerato15 via qPCR. **A - E)** Pico de fusão apresentando um pequeno pico de dímeros de iniciador acima da *threshold*. **B - F)** Regressão linear representando o coeficiente de determinação (R^2) da curva padrão de 0.894 e 0.919. **C - G)** Amplificação dos iniciadores na escala Logarítmica, atingiu a 10^3 cópias a quantidade inicial durante esse ciclo. **D - H)** Amplificação do iniciador sem escala Logarítmica, com início do ciclo e número de cópias.

Apesar do iniciador Cerato16 apresentar um coeficiente de determinação (R^2) abaixo de 0,999, foi observado apenas um pico de fusão, sem a presença de dímeros. Além disso, na escala logarítmica, foi identificado um valor de 10^3 cópias (Figura 4). Devido a essa sensibilidade e especificidade única, o iniciador Cerato16 foi selecionado durante a validação do protocolo.

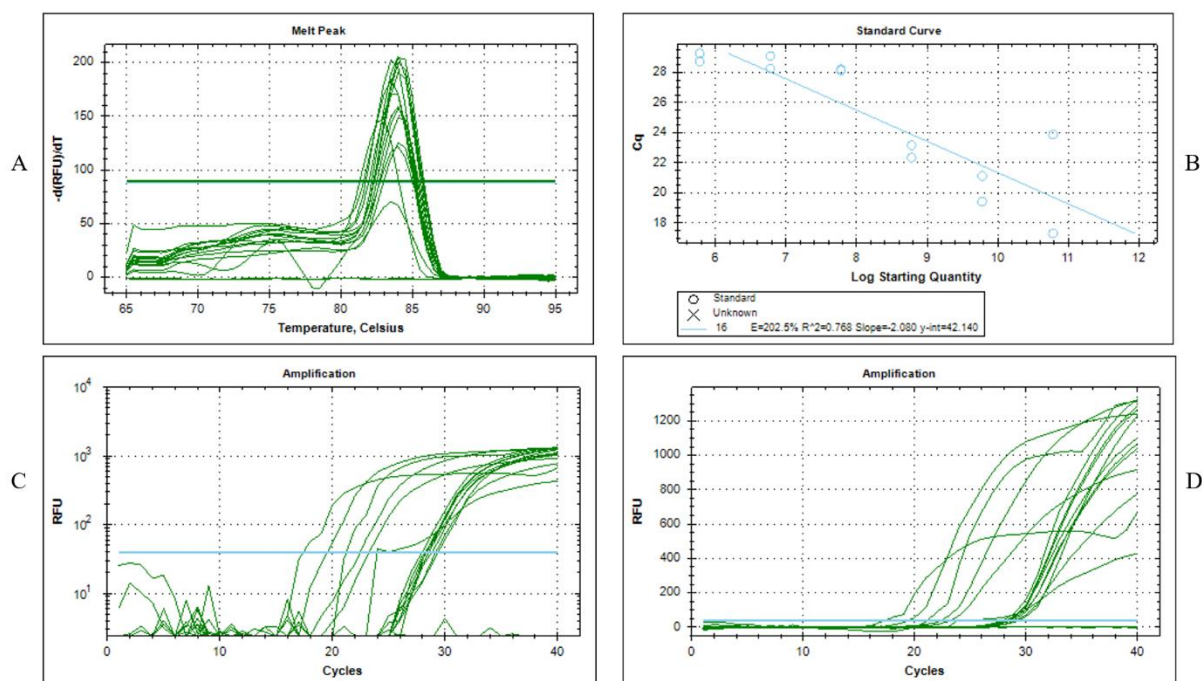


Figura 4. Amplificação do iniciador Cerato16 via qPCR. A) Pico de fusão apresentando um único pico acima da *threshold*. B) Regressão linear representando o coeficiente de determinação (R^2) da curva padrão de 0.768. C) Amplificação do iniciador na escala Logarítmica, atingiu a 10^3 cópias a quantidade inicial durante esse ciclo. D) Amplificação do iniciador sem escala Logarítmica com início do ciclo e número de cópias.

4.4 Validação do protocolo de identificação rápida de *C. fimbriata*

Para a validação dos iniciadores via qPCR foi instalado um experimento com plantas de teca inoculadas com o patógeno *C. fimbriata*. Este experimento foi constituído de plantas abatidas e coletadas para extração de DNA em diferentes períodos de inoculação (24 horas, 15 dias, 30 dias, 45 dias e 60 dias após a inoculação). O coeficiente de variação (CV) do experimento foi de 60,04% classificado como muito alto (Pimentel Gomes, 2009) (Tabela 6), pois a ocorrência de parcelas perdidas afetou a precisão experimental na avaliação do experimento e na obtenção dos dados.

Tabela 6 – Análise de variância para a variável área da lesão (AL) em genótipo de teca inoculado com o isolado 233 de *Ceratocystis fimbriata* utilizando 5 tratamentos

Média dos Quadrados				
FV	GL	QM	F	Probabilidade
Tratamento	4	88.194372	13.5938	.0**
Resíduo	30	6.48786		
CV (%)	60.04			

(**) significativo a 5% de probabilidade pelo teste F.

Ao examinar o efeito do tempo de inoculação das plantas em relação a área da lesão, constatou-se que as médias da área de lesão causada pela doença foram consideravelmente superiores para tratamento de 60 dias, totalizando em média 9,4664 cm², em comparação com aquelas de 45 dias (5.6326 cm²), 30 dias (3.4804 cm²), 15 dias (2.6314 cm²) e 24 horas (0 cm²) (Tabela 7).

Tabela 7 - Comparativo de médias pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade para a variável área da lesão em cm² (AL)

Tratamentos	Médias (cm ²)
5 (60 dias)	9,4664 a*
4 (45 dias)	5,63 ab
3 (30 dias)	3,48 bc
2 (15 dias)	2,63 bc
1 (24 horas)	0 c

*As médias seguidas de letras diferentes, diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Com o par de iniciador Cerato16 foi realizada qPCR com a diluição seriada do DNA padrão de *C. fimbriata*, nas concentrações de 10ng, 1ng, 0,1ng, 0,01ng, 0,001ng e 0,0001ng de DNA com duas repetições. Também foram inseridas uma amostra de cada repetição do experimento de plantas inoculadas totalizando 35 plantas avaliadas via qPCR com o iniciador 16 (Tabela 8). O corte da *threshold* foi a 10², com um R² de 77,50 e um fator slope de -2,472, assim a eficiência foi de 153%.

Conforme apresentado na Tabela 8, todas as plantas coletadas aos 45 dias e 60 dias após a inoculação, foram positivas para a presença de *C. fimbriata* com Cq variando de 26,25 a 35,05 para os genótipos com 45 dias após a inoculação e 26,21 a 30,30 para

genótipos com 60 dias após a inoculação respectivamente. Para as plantas com 30 dias após a inoculação somente a repetição três foi considerada positiva com Cq de 28,28. Plantas com 24 horas e 15 dias após a inoculação não tiveram amplificação significativa para o par de iniciador Cerato16. Nenhum dos genótipos controles apresentaram amplificações significativas considerando uma *threshold* de corte a 10^2 , com um R² de 77,50%.

Tabela 8. Resultados de PCR quantitativa utilizando o par de iniciador Cerato16 para no DNA de cada planta inoculada com DNA extraído 24 horas, 15 dias, 30 dias, 45 dias e 60 dias após a inoculação.

Tratamentos	Repetições						C
	1	2	3	4	5	6	
5 (60 dias)	Cq 29,52	Cq 29,66	Cq 26,21	Cq 29,54	Cq 30,21	Cq 30,30	-
4 (45 dias)	Cq 27,13	Cq 27,26	Cq 29,57	Cq 35,05	Cq 26,25	Cq 28,28	-
3 (30 dias)	-	-	Cq 28,28	-	-	-	-
2 (15 dias)	-	-	-	-	-	-	-
1 (24 horas)	-	-	-	-	-	-	-

Cq: Ciclo de quantificação

Os resultados apresentados sugerem que as ferramentas apresentadas neste trabalho podem ser utilizadas para a identificação da presença do fungo *C. fimbriata* em plantas de teca, no entanto, é preciso destacar que o iniciador Cerato12 e Cerato14 ainda precisam ser testados em plantas inoculadas. O iniciador Cerato16 se mostrou eficiente em plantas de teca inoculadas com *C. fimbriata* após 45 dias e 60 dias. Isso pode ter ocorrido devido a menor presença ao menor desenvolvimento na planta, ou seja, menos fungo menos DNA.

5. CONCLUSÃO

- Dos dez conjuntos de iniciadores desenvolvidos para amplificar seletivamente *C. fimbriata*, os pares Cerato12, Cerato14, Cerato15 e Cerato16 destacaram-se pela maior sensibilidade e ausência de formação de dímeros ou fragmentos inespecíficos.
- O conjunto de iniciadores Cerato16 mostrou-se o mais sensível para a identificação do fungo *C. fimbriata*.
- Recomenda-se o uso do iniciador Cerato16 para o diagnóstico da murcha de *Ceratocystis* em plantações de teca com base nos resultados deste estudo.
- No entanto, devido ao uso de apenas um isolado do fungo no estudo, é importante considerar os resultados com cautela e utilizar diluições seriadas como parâmetros iniciais de identificação.
- Mais pesquisas devem ser realizadas para validar o uso do iniciador Cerato16 em uma variedade mais ampla de isolados e condições, a fim de garantir a precisão e a confiabilidade do diagnóstico em diferentes contextos.
- Os iniciadores Cerato12, Cerato14 e Cerato15 ainda necessitam dessa validação em plantas inoculadas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, F. R. M.; VIANELLO, R. P.; BRONDANI, C. Identificação e validação de genes de referência para análise de RT-qPCR em arroz. **Embrapa**. 7º Seminário Jovens Talentos. p. 94, 2013.
- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; MORGAN, D.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Biologia molecular da célula**. In: Analisando células, moléculas e sistemas: Análise e Manipulação de DNA. 6ª. ed. – Porto Alegre: Artmed, p. 1428, 2017. Disponível em: https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/4618964/mod_resource/content/1/Bruce%20Alberts%20et%20al.-Biologia%20Molecular%20da%20C%C3%A9lula-Artmed%20%282017%29.pdf set de 2022
- ALFENAS, A. C. **Isolamento de fungos fitopatogênicos**. In: ALFENAS, A. C.; MAFIA, R.G. Métodos em fitopatologia. Editora: UFV, Viçosa, 382 p. 2007.
- AMORIM, A. F., ANJOS, I. V., PASSOS, J. C., JESUS, J. B., JESUS, J. G., CHIMELLO, A. M., ARAUJO, K. L., GILIO, T. A. S., & NEVES, L. G. (2023). Protocolo para seleção de mudas de teca resistentes à murcha de *Ceratocystis*. **Scientia Forestalis**, 51, e3949. <https://doi.org/10.18671/scifor.v51.11>
- AVENOT, H. F., JAIME-FRIAS, R., TRAVADON, R., HOLLAND, L. A., LAWRENCE, D. P., & TROUILLAS, F. P. Development of PCR-Based Assays for Rapid and Reliable Detection and Identification of Canker-Causing Pathogens from Symptomatic Almond Trees. **Phytopathology**, 112(8), 1710–1722, 2022. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-08-21-0351-R>
- BORGES, R. C. F. **Aspectos epidemiológicos e análise transcriptômica da interação teca (*Tectona grandis*) -*Ceratocystis fimbriata* e caracterização de novos patógenos afetando o cultivo de teca no Brasil**. 217f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia da Universidade de Brasília. Brasília - Distrito Federal. 2018.
- BORGES, R. C. F., MARQUES, E., MACEDO, M. A., MARTINS, I., GETULIO DA, J., FILHO, S., CORREA, S., & DE MELLO, M. Biocontrol of teak canker caused. *Lasiodiplodia theobromae*. **Revista Árvore**, 42 (3), 420304. 2018. <https://doi.org/10.1590/1806-90882018000300004>

BURKE, D. J., HOKE, A. J., REED, S., MARTIN, D., CARRINO-KYKER, S. R., PITTS, M. C., & BATTAGIN, S. (2023). Development of Primers Specific for Detection of *Litylenchus crenatae*, the Causal Agent of Beech Leaf. Disease, in Plant Tissue. **Plant Disease**, 107(11), 3354–3361. <https://doi.org/10.1094/PDIS-12-22-2911-SR>

BUSTIN, S. A., BEAULIEU, J. F., HUGGETT, J., JAGGI, R., KIBENG, F. S. B., OLSVIK, P. A., PENNING, L. C., & TOEGEL, S. MIQE précis: Practical implementation of minimum standard guidelines for fluorescence-based quantitative real-time PCR experiments. **BMC Molecular Biology**. 11: 74, p. 1-5, 2010. <https://doi.org/10.1186/1471-2199-11-74>

BRITO, Nicolás Manarim de et al. Aggressiveness and screening for host responses in yerba mate (*Ilex paraguariensis*) clones to a wilt disease caused by *Ceratocystis fimbriata*. **Forest Pathology**, v. 51, n. 3, p. e12682, 2021.

CÁCERES FLORESTAL S/A. **Manual do Cultivo da Teca**. Cáceres: 2006. 32p. Disponível em: http://www.caceresflorestal.com.br/Manual_do_cultivo_da_teca-Caceres_Florestal.pdf Acesso em: 10 jun. de 2022

CANNON, P. G., KLOPFENSTEIN, N. B., KIM, M.-S., STEWART, J. E., & CHUNG, C.-L. (2022). Brown Root Rot Disease Caused by *Phellinus noxius* on U.S.-**Affiliated Pacific Islands**. http://www.ascr.usda.gov/complaint_filing_cust.

CASTELLANI, A. Maintenance and cultivation of common pathogenic fungi of man in sterile water. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. Cleveland, v. 70, n. 8, p. 181-184, 1967.

CHEN, Z; TONG, Y; LI, Y; GAO, Q, WANG, Q; FU, C; XIA, Z. Development and validation of a 3-Plex RT-qPCR assay for the simultaneous detection and quantitation of the three PML-RARa fusion transcripts in acute *Promyelocytic leukemia*. **PLoS One**. 2015 doi: 10.1371/journal.pone.0122530. PMID: 25815789; PMCID: PMC4376893.

COSTA, B. R.; RESENDE, M. D. V. Melhoramento genético de teca como alternativa de desenvolvimento rural. **Multitemas**. Campo Grande - MS, n. 42, p. 87-99, jul./dez. 2012.

COSTA, R. B. DA.; RESENDE, M. D. V. DE; SILVA, V. S. DE M. Experimentation and selection in teak (*Tectona grandis* L.f.) genetic improvement. **FLORAM**. vol.14, n.1, p.76-92, 2007.

CRUZ, C.D. GENES - a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. **Acta Scientiarum**. v.35, n.3, p.271-276, 2013.

DA CUNHA OLIVEIRA, C. A., DE JESUS MARTINS, G. M., SILVA SANTOS, F. A., DOS ANJOS, I. V., SILVA AMORIM, A. F., DA COSTA PREISIGKE, S., SANTANA GILIO, T. A., ARAÚJO, K. L., & NEVES, L. G. (2021). Selection of teak clones resistant to the fungus *Ceratocystis fimbriata*. **Scientia Forestalis/Forest Sciences**, 49 (130), 2021. <https://doi.org/10.18671/SCIFOR.V49N130.21>

DA SILVA, A. C.; SILVA, F. M. DE O.; MILAGRE, J. C.; OMENA-GARCIA, R. P.; ABREU, M. C.; MAFIA, R. G.; NUNES-NESI, A.; ALFENAS, A. C. Eucalypt plants are physiologically and metabolically affected by infection with *Ceratocystis fimbriata*. **Plant Physiology and Biochemistry**. v. 123, p. 170–179, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2017.12.002>

ENGELBRECHT, C. J. B.; HARRINGTON, T.C. Intersterility, morphology and taxonomy of *Ceratocystis fimbriata* on sweet potato, cacao and sycamore. **Mycologia**, 97:1, 57-69, 2005 DOI: 10.1080/15572536.2006.11832839

FERREIRA, F. A.; MAFIA, L. A.; FERREIRA, E. A. Detecção rápida de *Ceratocystis fimbriata* em lenho infectado de eucalipto, mangueira e outros hospedeiros lenhosos. **Fitopatologia Brasileira**. v. 30, n. 5, p. 543–545, 2005.

FERREIRA, R. A.; TOSTA, W. F. G.; GIACOMETTI, V. G.; SOUZA, G. O.; SILVA, J. M. S. Entomofauna observada na cultura da Teca (*Tectona grandis* L.f), no campo. **Revista Científica Eletrônica de Engenharia Florestal**. Ano VII, N. 12, 23 p, 2008.

FERREIRA, MARIA A. et al. Genetic variability suggests that three populations of *Ceratocystis fimbriata* are responsible for the Ceratocystis wilt epidemic on kiwi fruit in Brazil. **Tropical Plant Pathology**, v. 42, p. 86-95, 2017.

FIGUEIREDO, E. O. et al. Silvicultura e manejo de povoamentos de Teca (*Tectona grandis* Lf). Embrapa Acre. **Documentos (INFOTECA-E)**, 2015.

FIGUEIREDO, E. O.; OLIVEIRA, L. C.; de BARBOSA, L. K. F. Teca (*Tectona grandis* L. f.): principais perguntas do futuro empreendedor florestal. **Infoteca-e Documentos**. Rio Branco: Embrapa Acre. Rio Branco - Acre. 88f, 2005.

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**. Botucatu, v. 41, n. 2, p. 138-143, 2015.

FRUEHWIRTH, M., RIVAS, A. V., FITZ, A. F. R., BATISTA, A. C. C. A., SILVEIRA, C. V., & DELAI, R. M. False-negative result in molecular diagnosis of SARS-CoV-2 in samples with amplification inhibitors. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. 56, p.1-8, 2020. <https://doi.org/10.5935/1676-2444.20200060>

GIUSTI, J. Introdução a PCR em Tempo Real. **Life Science Research**. 1-71, 2012. Disponível em: http://labs.icb.ufmg.br/multidbiq/wp-content/uploads/2017/05/qPCR_MAIO_2017.pdf Acesso em: 08 de set de 2022.

GONÇALVES, R. C. Biologia Molecular Aplicada à Diagnose de Doenças de Plantas. In: GONÇALVES, R. C.; OLIVEIRA, L. C. de (Ed.). **Embrapa Acre: ciência e tecnologia para o desenvolvimento sustentável do Sudoeste da Amazônia**. Rio Branco, AC: Embrapa Acre, cap 16, p. 317-338, 2009.

GRINBERGS, D., CHILIAN, J., CARRASCO-FERNÁNDEZ, J., FRANCE, A., MOYA-ELIZONDO, E., & GERDING, M. A PCR-based method for the rapid detection of *chondrostereum purpureum* in apple. **Plant Disease**, 104(3), 702–707, 2020. <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-19-2086-RE>

HARRINGTON, T. C. The genus *Ceratocystis*. Where does the oak wilt fungus fit? In: Billings, R.F. and Appel, D.N. (eds) Proceedings of the National Oak Wilt Symposium, **Texas Forest Service Publication**, 166, College Station, Texas, p. 21–35, (2009).

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

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**. 101: p. 555-566, 2011.

HIGUCHI, R.; DOLLINGER, G.; WALSH, S. P.; GRIFFITH, R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. **Nat Biotechnol**. vol. 10, p. 413-417, 1992. <https://doi.org/10.1038/nbt0492-413>, 1992.

IBGE – **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. 2014. Disponível em: <http://cidades.ibge.gov.br>. Acesso em: 10 de jun. 2022.

KALENDAR, R., KHASSENNOV, B., RAMANKULOV, Y., SAMUILOVA, O., & IVANOV, K. I. Fast PCR: An *in silico* tool for fast primer and probe design and advanced sequence analysis. **Genomics**, 109 (3-4), p. 312-319, 2017.

LANGLOIS VS, ALLISON MJ, BERGMAN LC, TO TA, HELBING CC. The need for robust qPCR-based eDNA detection assays in environmental monitoring and species inventories. **Environmental DNA**. 2021; 3:519–527. <https://doi.org/10.1002/edn3.164>

LUCHI, N., GHELARDINI, L., BELBAHRI, L., QUARTIER, M., & SANTINI, A. (2013). Rapid Detection of *Ceratocystis platani* Inoculum by Quantitative Real-Time PCR Assay. **Appl Ambiente Microbiol.** 79 (17): 5394 – 5404. <https://doi.org/10.1128/AEM.01484-13>

MAFIA, R. G.; ALFENAS, A. C.; FERREIRA, E. M.; BINOTI, D. H. B. Método de seleção e identificação de fontes de resistência à murcha do Eucalipto causada por *Ceratocystis fimbriata*. **Revista Árvore**. Viçosa - MG, v.35, n.4, p.817-824, 2011. <https://doi.org/10.1590/S0100-67622011000500007>

MAGAÑA-ÁLVAREZ, A., QUIJANO-RAMAYO, A., NEXTICAPAN-GARCÉZ, A., CIBRIÁN-TOVAR, J., GUARDIA-CHALÉ, S., SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ, Y., CORTÉS-VELÁZQUEZ, A., VALENCIA-YAH, T., MARTÍN-MEX, R., ORTEGA-RAMÍREZ, M. E., & PÉREZ-BRITO, D. (2022). Design of species-specific primers for early detection of *kretzschmaria zonata*, the causal agent of root and neck rot of teak (*Tectona grandis*). **Forests**, 13(8). <https://doi.org/10.3390/f13081175>

MARQUES, M. L. S., JESUS, J. M. I., VIRTUOSO, M. C. S., MARQUES, V. S., & SANTOS, G. R. Relato de ocorrência da ferrugem da teca, causada por *Olivea neotectonae* no Estado de Goiás. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, 10(5), 21, 2015. <https://doi.org/10.18378/rvads.v10i5.3689>

Mezzomo, R.; Piveta, G.; Lazarotto, M.; Walker, C.; Maciel, C. G.; Muniz, M. F.; Araujo, M. M. Biological control of *Ceratocystis fimbriata* by *Bacillus subtilis* on *Acacia mearnsii* Seedlings. **Floresta e Ambiente**. 2019; 26(4): e20160195.

MONTEIRO, M.; CARVALHO, C. C.; GARLET, J. Escolitíneos (Curculionidae: Scolytinae) associados a plantio de *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis* na

Amazônia meridional em Alta Floresta, Mato Grosso. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 28, n. 3, p. 913-923, jul.- set., 2018

MOREDJO, P. N.; BORGES, K. C. A. S.; MENDONÇA, G. E.; ABREU, H. S. **Otimização de protocolos para a extração de DNA genômico de Madeira de *Caryocar glabrum* (Aubl.) Pers.** Universidade Federal do Rio de Janeiro. 2016 Disponível em: <https://eventos.ufrj.br/raic/files/2016/06/2864-10116-1-SM.pdf> Acesso em: 18 de agosto de 2022.

MULLIS, K. B. Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction. **Ann Biol Clin.** v. 48, n. 8, p. 579-82, 1990. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2288446/> Acesso em: 18 jul. 2022.

MYCO BANK. **International Code of Botanical Nomenclature.** Disponível em: <https://www.mycobank.org/page/Simple%20names%20search> Acesso em: 18 jul. 2022.

NAYEEM, N.; KARVEKKAR, M.D. Isolation of phenolic compounds from the methanolic extract of *Tectona grandis*. Res. J. **Pharm.** Biol. Chem. Sci. 2010, 1, 221–225.

NETO, S. P. M. Compilação de alguns estudos sobre *Tectona grandis* (Teca): Ênfase para plantio no domínio do Cerrado brasileiro. **Documentos.** Embrapa Cerrados. Planaltina - DF, 57 p, 2021.

NOVAIS, C. M.; PIRES-ALVES, M. PCR em tempo real. Uma Inovação tecnológica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento.** Ed. nº 33, p. 10-13, 2004.

OLIVEIRA-NEVES, P. DE, PEREIRA, A. B., CAÑEDO, A. D., SOUZA, V. Q. DE, LAINDORF, B. L., AZAMBUJA, M. B., & ROSA, L. Z. DA. Análise quali-quantitativa do DNA genômico extraído de folha e estipe de x *Butyagrus nabonnandii* (Prosch.) Vorster. **Research, Society and Development**, 11(10) 2022, e572111033005. <https://doi.org/10.33448/rsd-v11i10.33005>

PELISSARI, A. L.; GUIMARÃES, P. P.; BEHILING A.; EBLING A. A. Cultivo da teca: Características da espécie para implantação e condução de povoamentos florestais. **Agrarian Academy**, Centro Científico Conhecer. Goiânia-GO. v. 1, n. 1, 128 p. 2014.

PFAFFL MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Res.** 2001 May 1;29(9):e45. doi: 10.1093/nar/29.9.e45. PMID: 11328886; PMCID: PMC55695.

PIMENTEL-GOMES, F. **Curso de estatística experimental**. 15. ed. Piracicaba: Fealq, p. 240, 2009.

PINARGOTE, C. B.; APUNTES, E. S.; TOBAR, R. L.; JIMÉNEZ, M. C.; CASTRO, F. B; NAVARRETE, P. D. *Ceratocystis fimbriata* agente causal de la enfermedad de marchitez vascular de *Tectona grandis* L.f. (teca) en Ecuador. **Boletín Micológico**, [S. l.], v. 35, n. 1, 2020. doi: 10.22370/bolmicol.2020.35.1.2401.

PIVETA, G. **Morfologia, caracterização molecular e patogenicidade de *Ceratocystis fimbriata* no Rio Grande do Sul**. 66 p. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2013.

PIVETA, G. et al. *Ceratocystis fimbriata* on kiwi fruit (*Actinidia* spp.) in Brazil. **New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science**, v. 44, n. 1, p. 13-24, 2016.

ROCHA, H. F.; LEONARDO, F. V. S.; OLIVEIRA, A. C. Commercial plantations of *Tectona grandis* L.f. on Brazil. **Multitemas**, Campo Grande, MS, n. 48, p. 9-28, jul./dez. 2015.

RODRIGUEZ, M. T. F. **Análise da expressão gênica global da bactéria *Xylella fastidiosa* em laranja doce por microarranjos de DNA**. 169 f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agropecuária) Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, Jaboticabal – São Paulo, 2011.

SANTIAGO, M. I. L. **Deteção precoce da murcha-de-*Ceratocystis* em eucalipto por meio da espectroscopia foliar**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2022. 55p. Dissertação – Mestrado em Fitopatologia). DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2023.005>

SANTOS, A. F. Murcha de *Ceratocystis* em Acácia-Negra. **Comunicado técnico**. Embrapa Colombo-PR. 2004.

SANTOS, A. F. dos; FERREIRA, M. A.; AUER, C. G.; BUHRER, C. B.; BRITO, N. M.; SCREMIN, R. M.; MIRESKI, M. C. First report of Yerba Mate wilt caused by *Ceratocystis fimbriata* in Brazil. **Plant Disease**. v. 102, n. 11, p. 2381, 2018.

STEIMEL J, ENGELBRECHT CJB, HARRINGTON TC, Development and characterization of microsatellite markers for the fungus *Ceratocystis fimbriata*. **Molecular Ecology Notes**. v. 4, p. 215-218, 2004. doi: 10.1111/j.1471-8286.2004.00621.x.

SILVA, L. L. **Ferramentas moleculares para a caracterização de *Colletotrichum* spp. associados à antracnose da mandioca**. 93 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. Cruz das Almas - Bahia, 2016.

SOUSA, L.J. **Identificação de espécies de *Fusarium* patogênicas ao grão de bico e indução de genes relacionados a defesa com o uso de extrato de *Rhizobium tropici***. 79 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia). Programa de Pós-graduação em Fitopatologia, Universidade de Brasília – UnB. Brasília - Distrito Federal, 2020.

SUWANDI, S., IRSAN, C., HAMIDSON, H., UMayAH, A., & ASRIYANI, K. D. (2021). Identification and characterization of *Ceratocystis fimbriata* causing lethal wilt on the *lansium* tree in Indonesia. **Plant Pathology Journal**, 37(2), 124–136. <https://doi.org/10.5423/PPJ.OA.08.2020.0147>

TROPICOS. Conectando o mundo da botânica desde 1982. ***Tectona grandis* L. f.** Disponível em: <https://www.tropicos.org/name/Search?name=Tectona%20grandis> Acesso em: 10 de jun. 2022

VENDRUSCOLO, D. G. S. **Modelagem aplicada ao manejo de povoamentos de *Tectona grandis* L.f em Mato Grosso**. 87f. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais e Ambientais). Programa de Pós-Graduação em Ciências Florestais e Ambientais, Faculdade de Engenharia Florestal Universidade Federal de Mato Grosso. Cuiabá - MT. 2017.