



Universidade de Brasília  
Instituto de Ciências Biológicas  
Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia

**TESE**

**"Aspectos epidemiológicos e análise transcriptômica da interação teca (*Tectona grandis*)-*Ceratocystis fimbriata* e caracterização de novos patógenos afetando o cultivo de teca no Brasil"**

**Rafaela Cristina Ferreira Borges**

**Brasília 2018**

**Rafaela Cristina Ferreira Borges**

**"Aspectos epidemiológicos e análise transcriptômica da interação teca (*Tectona grandis*)-*Ceratocystis fimbriata* e caracterização de novos patógenos afetando o cultivo de teca no Brasil"**

Tese apresentada à Universidade de Brasília como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Fitopatologia pelo Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia.

**Orientador**

Dr. Leonardo Silva Boiteux

**Co-orientadora**

Dr. Maria Alves Ferreira

**BRASÍLIA**

**DISTRITO FEDERAL – BRASIL**

**2018**

## AGRADECIMENTOS

Ao grande Pai Oxalá e todos os orixás, pela força, fé e coragem para superar todos os desafios. Axé!

À minha família pelo incentivo constante e o apoio incondicional, que foram o combustível para esta conquista.

À Ita, que quando muito precisava estava disposta a ajudar e encher minha vida de amor.

Agradeço ao meu orientador e a Esther, pela oportunidade de trabalhar na equipe, pelas horas de conversas, ensinamentos e pela oportunidade de vislumbrar um horizonte maior.

Agradeço à Mônica Alves Macedo pela paciência e disposição em ajudar na parte epidemiológica desse trabalho.

Agradeço ao Mauricio Rossato pela paciência e disposição em ajudar nas análises filogenéticas.

Agradeço ao Ailton Reis, pela oportunidade de aprendizado.

Agradeço a toda equipe do Laboratório de Fitopatologia da Embrapa CNPH, em especial a Fabiana e Luana.

Agradeço ao Ronaldo, ao Maciel e a Eva que foram fundamentais ao desenvolvimento desse trabalho pela ajuda e disposição durante as avaliações de campo.

Agradeço a toda equipe do Laboratório de Genômica e Expressão-LGE-IB/ Unicamp, principalmente ao Marcelo, Paulo, Juliana e Antônio, que auxiliaram nas análises de bioinformática.

Agradeço a todos meus colegas do Laboratório de Melhoramento, pela ajuda, troca de experiências e pelos momentos de descontração.

Agradeço aos funcionários do Laboratório de Melhoramento, e do Laboratório de Análise Genômica, em especial ao Chico e Getúlio, por serem sempre prestativos e ajudarem na execução de importantes etapas desse trabalho.

A todos os funcionários da Embrapa Hortaliças que ajudaram direta ou indiretamente na condução dos experimentos e campo e de casa de vegetação.

A todos os professores e funcionários da Fitopatologia da UnB.

A todos os colegas e amigos da fitopatologia da UnB.

À minha querida amiga Maria do Desterro, que sempre esteve pronta para me ajudar.

À TRC por apoiar financeiramente a condução desse trabalho, e toda sua equipe que de alguma forma contribuíram para execução desse trabalho.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia da Universidade de Brasília pela oportunidade.

Agradeço a Capes e ao CNPq pela concessão das bolsas de estudos.

## Sumário

RESUMO GERAL.....	i
ABSTRACT .....	iv
INTRODUÇÃO GERAL .....	1
OBJETIVOS.....	3
CAPÍTULO 1 (Revisão Bibliográfica) .....	4
Cultivo da espécie .....	7
Uso comercial da espécie.....	7
Principais doenças na cultura da teca .....	8
Epidemiologia de doenças de plantas .....	11
Interação de plantas-patógenos.....	14
Referências Bibliográficas .....	20
CAPÍTULO 2 (Dinâmica espaço-temporal da murcha-de- <i>Ceratocystis</i> ) em teca.....	26
RESUMO GERAL.....	26
ABSTRACT .....	27
INTRODUÇÃO .....	31
MATERIAL E MÉTODOS .....	32
RESULTADOS .....	36
DISCUSSÃO .....	51
Referências Bibliográficas .....	59
CAPÍTULO 3 (Dinâmica espaço-temporal do cancro da teca) .....	61
RESUMO GERAL.....	62
ABSTRACT .....	63
INTRODUÇÃO .....	65
MATERIAL E MÉTODOS .....	67
RESULTADOS .....	72
DISCUSSÃO .....	88
CONCLUSÕES .....	95
Referências Bibliográficas .....	96
CAPÍTULO 4 (Análise transcritômica da interação <i>Tectona grandis</i> - <i>Ceratocystis fimbriata</i> )....	100
RESUMO GERAL.....	101
ABSTRACT .....	102
INTRODUÇÃO .....	103

<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>105</b>
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>114</b>
<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>135</b>
<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>143</b>
<b>Referências Bibliográficas</b> .....	<b>145</b>
<b>CAPÍTULO 5 (Caracterização de novos patógenos afetando o cultivo da teca no Brasil)</b> .....	<b>185</b>
<b>RESUMO GERAL</b> .....	<b>186</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>187</b>
<b>Murcha de <i>Fusarium oxysporum</i></b> .....	<b>188</b>
<b>Manchas foliarea causadas por <i>Paramyrothecium roridum</i></b> .....	<b>189</b>
<b>Manchas foliares de <i>Xanthomonas</i></b> .....	<b>190</b>

## RESUMO GERAL

A teca (*Tectona grandis* L. f., família Lamiaceae) é uma espécie arbórea originária da Ásia que apresenta madeira de elevada qualidade. No Brasil, os plantios de teca foram iniciados na década de 1970 no município de Cáceres-MT, onde as condições edafoclimáticas se mostraram adequadas ao desenvolvimento dessa espécie. Embora com excelente adaptação, o cultivo da teca no Brasil tem enfrentado diversos problemas fitossanitários, como a murcha causada por *Ceratocystis fimbriata* e, mais recentemente, o cancro da teca causado por (*Lasiodiplodia theobromae*). Clones de teca com resistência e/ou tolerância a esses e outros patógenos ainda não se encontram disponíveis, dificultando o controle das principais doenças que ameaçam sua produção dessa espécie. Diante da crescente importância que *C. fimbriata* e *L. theobromae* vêm apresentando para o cultivo da teca, o presente trabalho teve como objetivo aprofundar estudos sobre os principais patossistemas e a caracterização de novos patógenos afetando o cultivo da teca no Brasil. O **CAPÍTULO 1** contempla uma revisão de literatura sobre a cultura e dos patossistemas mais importantes no cultivo da teca e dos conceitos básicos de epidemiologia e da interação patógeno-hospedeiro. O **CAPÍTULO 2** descreve estudos sobre a dinâmica espacial e temporal da murcha-de-*Ceratocystis*. A incidência variou em função do material genético, da região estudada e do espaçamento. O progresso temporal e espacial da murcha-de-*Ceratocystis* foi influenciado pelo manejo silvicultural empregado e pelo material genético. As informações obtidas nesse estudo são importantes para elaboração de estratégias de manejo fitotécnico e fitossanitário mais eficientes e mais rígidas dessa doença. Recomenda-se utilizar materiais genéticos resistentes/tolerantes, evitar a implementação de cultivos próximos a áreas úmidas (com má drenagem ou próximas a cursos de água), realizar a detecção precoce (desde a fase de viveiro) de mudas doentes, cumprir com rigor o cronograma silvicultural e remover rapidamente plantas doentes do campo para evitar infecções secundárias. O **CAPÍTULO 3** foi destinado ao estudo espacial e temporal do cancro da teca em condições de campo. A incidência variou em função do material genético e da região estudada. Ao final da última avaliação pode-se observar um padrão espacial predominante ao acaso. O progresso temporal e espacial do cancro foi influenciado pelos métodos de manejo silviculturais, do material genético e da diversidade genética do patógeno. As informações obtidas permitiram refinar a elaboração de estratégias de manejo do cancro da teca, incluindo: o emprego de materiais genéticos tolerantes, a eliminação de plantas doentes no início da epidemia, evitando a desrama em época de chuva (para reduzir a dispersão de inóculo no período de máxima suscetibilidade da

cultura). O **CAPÍTULO 4** envolveu estudos empregando a técnica de RNAseq visando caracterizar o perfil de expressão de genes relacionados com reações de tolerância e suscetibilidade de clones de teca ao ataque de *C. fimbriata*. Para a análise comparativa do perfil de expressão de genes associados com a interação teca-*C. fimbriata*, dois clones com respostas contrastantes para o patógeno foram inoculados com o isolado ‘RB01’. A inoculação foi conduzida usando plantas (obtidas de viveiro) com 180 dias de idade. Os materiais genéticos contrastantes empregados foram denominados como ‘Clone A’ [altamente suscetível (S) ao *C. fimbriata*] e ‘Clone B’ [tolerante (T) ao *C. fimbriata*]. As amostras foram coletadas e ácidos nucleicos foram extraídos (aos 0, 3, 7 e 15 dias após a inoculação – DPI) para RNAseq. De um total de 1440 genes, 1247 (86.6%) foram encontrados no transcriptoma de forma completa. Aos 3 DPI foram identificados 187 genes com expressão diferencial (DEGs) no clone T inoculado quando comparado com o tratamento PMI (= planta *mock*-inoculada). Dentre esses genes, 162 foram reprimidos e 25 foram induzidos. No clone S, foram detectados 24 DEGs aos 3 DPI, dos quais 23 foram reprimidos e um foi induzido. Aos 7 DPI, 11 DEGs foram identificados no clone T (nove induzidos e dois reprimidos), sendo verificada uma redução de 94% no número de genes com expressão diferencial do período 3 DPI aos 7 DPI no clone T. Com relação ao clone S aos 7 DPI foram identificados 113 DEGs quando comparado com PMI, desses genes 108 estavam reprimidos e cinco induzidos (um aumento de 78% no número de DEGs dos período 3 DPI aos 7 DPI). Nove DEGs foram identificados no clone T aos 15 DPI, sendo todos reprimidos. No clone S, foram identificados 782 DEGs aos 15 DPI, dos quais 513 foram reprimidos e 267 foram induzidos. De modo geral foi verificada uma reação inversa entre o clone T e S. Nas etapas iniciais da infecção (3 DPI) o maior número de DEGs foi observado no clone T. No entanto, no decorrer do processo infeccioso (7 DPI e 15 DPI), a modulação de genes foi maior no clone S. Além disso, a maioria dos DEGs foi composta por genes reprimidos (independente do período e do material genético avaliado). Essa informação genética/genômica pode auxiliar no desenvolvimento de clones de teca mais tolerantes via melhoramento clássico (por meio de seleção assistida por marcadores moleculares) bem como em estratégias biotecnológicas (edição e silenciamento gênicos). Finalizando, o **CAPÍTULO 5** envolve o registro de três novos patógenos afetando o cultivo da teca no Brasil e/ou no mundo.



## GENERAL ABSTRACT

Teak (*Tectona grandis* L. f., Family Lamiaceae) is a tree species native to Asia that has high quality wood. In Brazil, teak plantations were started in the 1970s in Cáceres–MT, where edaphoclimatic conditions were adequate for the development of this plant species. Although with excellent adaptation, the cultivation of teak in Brazil has faced several sanitary problems, such as the wilt caused by *Ceratocystis fimbriata* and, more recently, the teak canker caused by *Lasiodiplodia theobromae*. Teak clones with resistance and/or tolerance to these and other pathogens are not yet available, making it difficult to control the main diseases that threaten the production of this species. In view of the growing importance of *C. fimbriata* and *L. theobromae* for teak cultivation, the present work aimed to deepen studies on the main patosystems and the characterization of new pathogens affecting the cultivation of teak in Brazil. **CHAPTER 1** contemplates a literature review on the culture and the most important patosystems in the cultivation of teak and the basic concepts of epidemiology and pathogen-host interaction. **CHAPTER 2** describes studies on the spatial and temporal dynamics of *Ceratocystis* wilt. The incidence varied according to the genetic material, the region studied and the spacing. The temporal and spatial progression of *Ceratocystis* wilt was influenced by the silvicultural management methods employed and by the genetic material. The information obtained in this study is important for the elaboration of more efficient and more rigid disease management strategies. It is recommended to use resistant and/or tolerant genetic materials, to avoid the implantation of crops near wet areas with poor drainage or near water courses, to perform early detection (from the nursery stage) of diseased seedlings, to obey the silvicultural timeline and quickly remove diseased plants from the field to avoid secondary infections. **CHAPTER 3** was a work intended for spatial and temporal study of the teak canker under field conditions. The incidence varied according to the genetic material and geographical region. A predominantly random spatial pattern of the disease was observed among the plots in the last evaluation. The temporal and spatial progression of the teak canker was influenced by the silvicultural management methods, the genetic material and the genetic diversity of the pathogen. The information obtained allowed to refine the elaboration of management strategies of the teak cancer, including: the use of tolerant genetic materials, the elimination of diseased plants at the beginning of the epidemic, to avoid late removal of secondary branches especially during the rainy season (aiming to reduce the dispersion of inoculum in the period of maximum host susceptibility). **CHAPTER 4** involved studies using the RNAseq technique to characterize the expression profile of genes of teak clones related to

tolerance and susceptible reactions to the attack of *C. fimbriata*. For the comparative analysis of the gene expression profile associated with the teak – *C. fimbriata* interaction, two clones were inoculated with the pathogen 'RB01' isolate. The inoculation was conducted using 180-day-old plants (obtained from nursery). The contrasting genetic materials employed were named 'Clone A' [highly susceptible (S) to *C. fimbriata*] and 'Clone B' [tolerant (T) to *C. fimbriata*]. Samples were collected and nucleic acids were extracted (at 0, 3, 7, and 15 days post-inoculation – DPI) for RNAseq. From a total of 1440 genes, 1247 (86.6%) displayed complete sequences in the transcriptome. At 3 DPI, 187 differentially expressed genes (DEGs) were identified in the inoculated clone T when compared to the mock-inoculated plant (MIP) treatment. Among these genes, 162 were repressed and 25 were induced. In the clone S, 24 DEGs were detected at 3 DPI, of which 23 were repressed and one was induced. At 7 DPI, 11 DEGs were identified in the T clone (nine induced and two repressed), with a 94% reduction in the number DEGs from 3 DPI to 7 DPI in the clone T. At 7 DPI, 113 DEGs were identified in comparison with to MIP, of these 108 genes were repressed and five induced (a 78% increase in the number of DEGs from 3 DPI to 7 DPI). Nine DEGs were identified in the T 'Clone A't 15 DPI, all repressed. In clone S, 782 DEGs were identified at 15 DPI, of which 513 were repressed and 267 were induced. In the initial stages of infection (3 DPI) the highest number of DEGs was observed in clone T. However, the highest gene modulation during the progression of the infectious process (7 DPI and 15 DPI) was observed in the clone S. In addition, most DEGs were repressed (independent of the period and the genetic material evaluated). This genetic/genomic information can give support to the development of more tolerant teak clones via classical breeding (e.g. molecular marker assisted selection) as well as via biotech strategies (e.g. genomic editing and silencing). Finally, **CHAPTER 5** is the report and description of three new patosystems affecting the teak crop either in Brazil or in the world.

## INTRODUÇÃO GERAL

*Tectona grandis* L. f. (família Lamiaceae) popularmente conhecida como teca, é uma espécie arbórea que tem como centros de origem do Subcontinente Índico e Sudeste Asiático. Há cerca de 100 anos a teca passou a ser cultivada, devido ao esgotamento das populações naturais, exploradas de forma extrativista intensa. Os plantios de teca começaram a se expandir para outros países e continentes que apresentavam condições climáticas semelhantes às observadas nos seus centros de origem, chegando a novas zonas tropicais, como a África Ocidental, América Latina e o Caribe (**Figueiredo et al. 2005**). No Brasil, a exploração dessa espécie vem sendo particularmente auspiciosa, pela elevada densidade da madeira e ciclo de produção mais curto quando comparado com os países de origem. Os primeiros reflorestamentos no Brasil foram implantados na década de 1970, pela empresa Cáceres Florestal S.A., no município de Cáceres-MT, onde a espécie demonstrou alta adaptabilidade (**Matricardi, 1989**).

A teca apresenta características de durabilidade, estabilidade, resistência natural ao fogo e densidade média de  $0,65 \text{ g/cm}^3$  (**Goh & Galiana, 2000**). Tais atributos incentivaram a demanda no mercado internacional, merecendo com isto fortes estímulos aos investimentos em reflorestamentos de teca no Brasil. Apesar das características favoráveis ao desenvolvimento da teca verificadas na maioria das áreas cultivadas do mundo e da notória resistência da cultura a uma gama de fatores bióticos e abióticos, problemas fitossanitários capazes de comprometer a produção têm sido constatados nas distintas áreas produtoras. Levantamentos preliminares realizados em toda península da Malásia mostraram baixa incidência de doenças de raízes. Entretanto, o cancro da teca e doenças foliares, principalmente a ferrugem causada por (*Olivea tectonae*) tem maior importância (**Maziah & Lee, 1999**). No Brasil as áreas comerciais de teca estão em expansão, porém recentemente tem-se observado perdas de volumetria e qualidade da madeira, induzidas por patógenos

especificamente de solo, tais como *Ceratocystis fimbriata*, *Fusarium oxysporum* e *Lasioidiplodia theobromae*.

A murcha-de-*Ceratocystis*, causada pelo fungo *Ceratocystis fimbriata* Ellis & Halsted, é uma das doenças de maior impacto econômico na cultura do eucalipto no Brasil (**Alfenas et al. 2009; Ferreira et al. 2012**). Para a cultura da teca, essa também é a doença de maior importância, podendo chegar até 40% de incidência ao final do ciclo da cultura, resultando em perda de valor agregado da madeira e na redução de margens de lucros (**Firmino et al. 2012**). O controle da murcha-de-*Ceratocystis* em teca tem sido conduzido por meio de plantios de clones tolerantes. No entanto, a base genética dos clones utilizados no Brasil é extremamente estreita, o que tem dificultado a seleção de materiais com níveis mais elevados de tolerância. Até o momento, não existem pesquisas relacionadas à elucidação dos mecanismos de defesa da planta à doença.

Um dos desafios da fitopatologia é entender detalhadamente como os patógenos são reconhecidos pelos seus hospedeiros e como os mecanismos de resistência e a suscetibilidade são estabelecidos. A biologia molecular, a bioinformática e estudos da expressão gênica em interações patógenos–plantas hospedeiras têm contribuído significativamente neste sentido de elucidar componentes destes cruciais eventos co-evolucionários (**Verhage et al. 2010; Lodha & Basak, 2012; Schenk et al. 2012; Sedano & Carrascal, 2012**).

Com base nos estudos moleculares das interações plantas–patógenos, tem sido possível desenvolver um modelo dos processos evolutivos relacionado com a imunidade das plantas bem como dos mecanismos genéticos envolvidos (**Jones & Dangl, 2006**). De acordo com esse modelo, conhecido como “Zig–Zag”, a primeira fase da resposta de defesa na resistência, conhecida como imunidade mediada por PAMPs (*Pathogen Associated Molecular Patterns*) ou PTI (*PAMP triggered immunity*), consiste no reconhecimento de moléculas conservadas em diferentes micro-organismos, conhecidas como PAMP ou MAMP

(*microbe-associated molecular patterns*). O reconhecimento das PAMPs depende do seu reconhecimento por PRRs (*pathogen recognition receptors*), que são, geralmente, proteínas de reconhecimento localizadas na membrana plasmática das células da planta (**Gómez-Gómez & Boller, 2000; He et al. 2007; Boller & He, 2009; Zipfel, 2009; Thomma et al. 2011**). Esse tipo de imunidade impõe, geralmente, uma barreira à infecção, impedindo e/ou dificultando que os micro-organismos se multipliquem e/ou invadam sistemicamente tecidos da planta. A PTI é suficientemente eficaz contra agentes patogênicos potenciais ainda não adaptados a uma determinada espécie de planta (**Chisholm et al. 2006**). Uma vez que a percepção pela PRR acontece, uma cascata de sinalização (mediada principalmente por MAP quinases) é desencadeada (**Colcombet & Hirt, 2008; Göhre & Robatzek, 2008; Beckers et al. 2009**), levando à ativação de fatores de transcrição e da reprogramação da expressão gênica.

As plantas também podem dispor de um segundo nível da imunidade com base no reconhecimento de proteínas efetoras do patógeno, a ETI (*effector triggered immunity*). A ETI (que é a terceira fase do modelo Zig-Zag) depende da presença de proteínas capazes de reconhecer os efetores, levando à reprogramação da expressão gênica e à reação de incompatibilidade ou de resistência (**Chisholm et al. 2006; Jones & Dangl, 2006; Dodds & Rathjen; 2010**).

O estudo dessa reprogramação da expressão de genes durante os processos de defesa de uma espécie de planta permite a identificação dos mecanismos moleculares associados com essas respostas. Neste sentido, a técnica de RNASeq tem sido uma poderosa ferramenta, permitindo elucidar os componentes genéticos associados com inúmeras interações plantas-patógenos (**Sedano & Carrascal, 2012**). Desta forma, a indução de vários genes importantes para a defesa das plantas tem sido caracterizada por meio da técnica RNA-seq durante as respostas de PTI e ETI. Entre os produtos da expressão desses genes encontram-se as

proteínas PR (*pathogenesis-related proteins*), tais como quitinasas e glucanasas (Loon & Strien, 1999). O ácido salicílico SA (*salicylic acid*) e o etileno desempenham função reguladora e sinérgica na cascata de sinalização que leva à transcrição desses genes. Também tem sido constatado que a ativação de grupos de genes PR pode ser mediada por patógenos, por meio de um mecanismo chamado resistência sistêmica adquirida ou SAR (*systemic acquired resistance*). Esses genes PR têm se convertido em genes marcadores de defesa, e a medição dos seus níveis da expressão é muito utilizada em estudos de interações planta-patógeno (Slaughter *et al.* 2012; Zhang *et al.* 2012; Sedano & Carrascal, 2012).

Por ser uma técnica ainda relativamente nova, ainda são poucas as pesquisas relacionadas com interações planta-patógeno em que a metodologia de RNAseq tenha sido empregada. Por exemplo, estudos relacionados com a interação *Ceratocystis*-teca ainda não estão disponíveis na literatura. Os estudos moleculares envolvendo esse patossistema são desafiadores, especialmente devido à ausência de um genoma de referência para a planta hospedeira, resultando em dificuldades metodológicas em relações as análises de transcrito, sequenciamento em larga escala, anotação de genes e desenho de marcadores moleculares.

O transcrito da interação incompatível pode identificar um subconjunto de genes da hospedeira que são expressos ao longo do processo de restrição da infecção por *C. fimbriata*. Com as informações geradas, é possível desenhar marcadores moleculares potencialmente ligados à tolerância à doença. Uma das hipóteses de trabalho é que dentre os genes fortemente modulados por *C. fimbriata* estão àqueles envolvidos com mecanismos de tolerância/resistência, que representam potenciais alvos biotecnológicos visando à adoção de estratégias de edição gênica para controle do patógeno. Neste contexto, a informação gerada poderá contribuir para um melhor entendimento da interação molecular do patossistema *C. fimbriata*-*T. grandis* e também poderá ajudar no estabelecimento de sistemas de seleção

assistida bem como a identificação de novos genes-alvo para uso em transformação genética/edição gênica, com a finalidade de obter clones de teca com níveis elevados de resistência/tolerância à murcha-de-*Ceratocystis*.

## OBJETIVOS

### Objetivo geral

Estudar os aspectos epidemiológicos da murcha de *Ceratocystis* e do cancro da teca, conduzir análise transcritômica de teca em clones contrastantes (suscetível *versus* tolerante) em relação à infecção com *C. fimbriata* e caracterizar novos patógenos que afetam o cultivo da teca no Brasil.

### Objetivos específicos

- ✓ Estudar a dinâmica e o progresso temporal e espacial da murcha-de-*Ceratocystis*;
- ✓ Estudar a dinâmica e o progresso temporal e espacial do cancro da teca;
- ✓ Caracterizar os genes diferencialmente expressos em teca em resposta a infecção por *C. fimbriata*;
- ✓ Caracterizar morfológicamente e molecularmente novos patógenos que afetam a cultura da teca.

## **Capítulo 1**

### **Revisão bibliográfica**



## CONTEXTUALIZAÇÃO

### CULTIVO DA TECA (*Tectona grandis*)

A teca (nome popular da espécie *Tectona grandis* L. f.) é uma espécie arbórea de grande porte, decídua, diploide ( $2n=36$ ), pertencente à família Lamiaceae. Populações nativas são encontradas em regiões tropicais e subtropicais do Sudeste asiático, em países como Índia, Myanmar, Tailândia, Laos e Indonésia (Ilha de Java) (Gill *et al.* 1983, Kaosa-Ard 1989). Essa espécie possui distribuição natural descontínua entre 10 e 25°N e entre 0 e 10°S, sendo encontrada em altitudes variando entre 0 m a 1300 m, apresentando uma exigência de precipitação anual de 800 a 2500 mm e uma amplitude de temperatura entre 2° a 42° C (Figura 1) (Graudal *et al.* 1999).

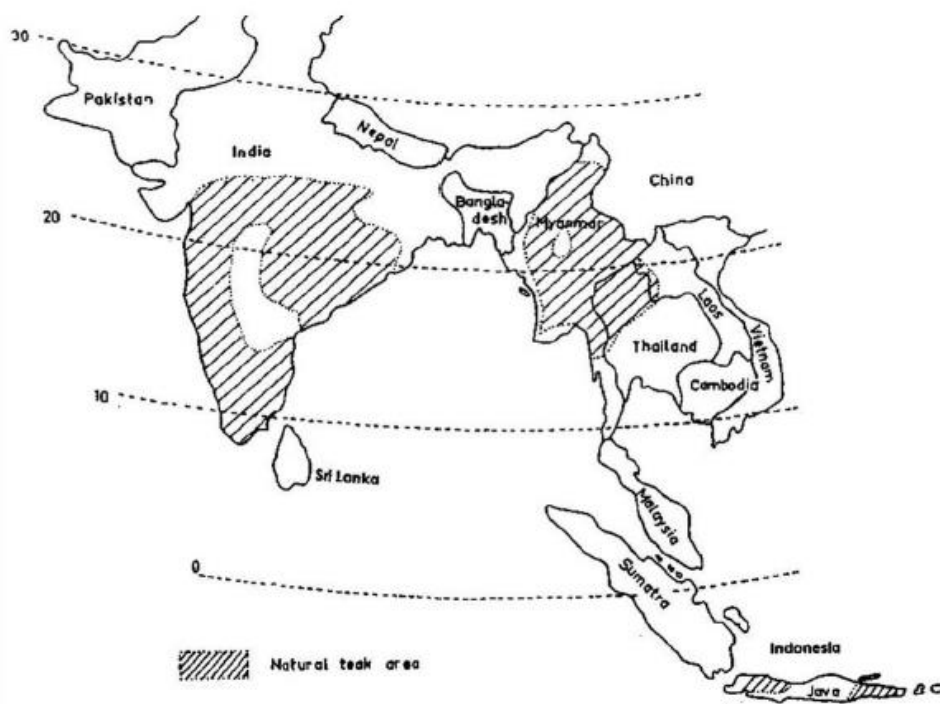


Figura 1 - Áreas de ocorrência natural da teca (*Tectona grandis* L.f.). (Fonte: Gradual *et al.* 1999).

A teca é uma espécie pioneira, heliófita, caducifólia que pode alcançar até 50 metros de altura. O tronco é geralmente cilíndrico, podendo chegar, em condições favoráveis, a 2,5 metros de diâmetro. A casca atinge 15 mm de espessura, característica que confere maior resistência ao fogo. As folhas são de disposição oposta (em pares) e coriácea com

comprimentos de 30 a 60 cm e larguras entre 20 e 35 cm. Os limbos são elípticos, pilosos e verruculosos na face abaxial (**Veit, 2000**).

Com o esgotamento das populações naturais devido à intensa ação extrativista, os plantios começaram a expandir-se para países com características ambientais similares às do centro de origem (**Figueiredo et al. 2005**). **Abdelnour et al. (2005)** relatam o interesse de muitos países de incluir a teca nos programas de reflorestamento devido principalmente a alta demanda de sua madeira, rápido crescimento e alta qualidade madeireira.

A origem dos materiais de teca introduzidos no Brasil ainda é desconhecida. O Jardim Botânico do Rio de Janeiro e Horto Florestal de Rio Claro são os únicos locais que possuem registro da procedência dos materiais teca introduzidos para plantios que vieram da Índia (**Matricardi, 1989**). No Brasil, os plantios de teca foram iniciados na década de 1970, implantados pela empresa Cáceres Florestal S.A., no município de Cáceres-MT, onde as condições edafoclimáticas se mostraram adequadas ao desenvolvimento da espécie (**Matricardi, 1989**). O ciclo de produção da teca por processo seminal nos países de origem varia de 60 a 100 anos, enquanto na região de Cáceres-MT, devido às condições edafoclimáticas mais favoráveis, o ciclo de corte pode ser reduzido para 25 anos (**Ipef, 2003**). Além disso, plantas individuais advindas de desbaste podem ser também utilizadas comercialmente. Fatores ambientais favoráveis (ex. solo mais fértil) em combinação com práticas apropriadas de manejo (ex. tratamentos silviculturais mais adequados e mais intensos) contribuíram de maneira significativa na redução no ciclo produtivo da teca nas condições brasileiras (**Ugalde & Pérez, 2001**). Novos povoamentos de teca se expandiram em direção a Amazônia, concentrando-se nos Estados do Acre, Pará e Rondônia (**Figueiredo, 2001; Vieira et al. 2001**). Recentemente, nos Estados de Minas Gerais e Goiás, pequenos e médios produtores começaram, também, a investir em povoamentos de teca. A área plantada com teca no Brasil apresentou um crescimento muito intenso nas últimas décadas. Até 1996 a área total

era inferior a 11.000 hectares, alcançando 42.496 hectares em 2006 e 58.810 ha já em 2008. No ano de 2015, totalizou 89.081 ha (**Iba, 2015**), sendo o Estado do Mato Grosso responsável por 90% da área cultivada (**Abraf, 2011**).

As áreas ocupadas por florestas naturais de teca estão estimadas em  $\approx 29$  milhões de hectares na Índia, Laos, Myanmar e Tailândia. A área de reflorestamento está distribuída em 38 países, sendo estimada em 4.3 milhões de hectares. Aproximadamente 83% das áreas de reflorestamento de teca estão localizadas na Ásia, 11% na África e 6% na zona Tropical das Américas (**Kollert et al. 2012**). A propagação do cultivo da teca no mundo ocorreu por sementes de várias origens e como resultados muitos plantios resultaram em árvores de baixa qualidade. Essa situação justificou o início dos programas de melhoramento genético da espécie. No entanto, atualmente no Brasil a produção de mudas tem sido feita via propagação vegetativa com a finalidade de produzir mudar clonais de maior qualidade. Protocolos para micropropagação de teca via organogênese direta, mediante o enraizamento de brotos axilares e gemas apicais, foram desenvolvidos por **Monteuuis et al. (1998)**, e têm sido aprimorados por **Tiwari et al. (2002)**. Além da micropropagação, algumas empresas também têm aplicado a técnica de macropropagação.

## DIVERSIDADE GENÉTICA DA TECA

O sistema reprodutivo alógamo observado em teca (**Changtragoon et al. 2000**) possibilita que altas taxas de diversidade genética sejam encontradas dentro das populações desta espécie. Estudos referentes à variabilidade genética de acessos de teca disponíveis para plantio no Brasil ainda são escassos. Alguns estudos de diversidade foram realizados por **Watanabe et al. (2004)**, que usaram marcadores RAPD para identificação de 24 clones de teca. Inicialmente utilizou-se 120 *primers*, mas somente 24 *primers* geraram 26 fragmentos claros e não ambíguos, sendo esses selecionados. Estudo usando marcadores AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) foi conduzido com 28 acessos de teca provenientes da Índia, Indonésia e Tailândia. Observou-se que uma fração importante variância genética ocorria dentro de populações (57%) e que 43% ocorria entre populações. As populações da Índia são claramente separadas das procedências da Tailândia e Indonésia. As populações da Índia apresentaram diversidade genética maior que as populações da Tailândia, como indicado por um estudo conduzido com marcadores RAPD (**Nicodemus et al. 2003**).

Marcadores microssatélites foram desenvolvidos a partir de bibliotecas genômicas enriquecidas. Quinze *primers* microssatélites foram desenvolvidos e empregados para análise de 265 árvores individuais provindas de diferentes populações (Índia, Tailândia-Laos, Indonésia e África). Foi possível identificar uma média de 14,7 alelos por locus e uma heterozigidade de 0,223 a 0,879, mostrando que estes loci constituem uma ótima ferramenta para estimar de fluxo gênico bem como para estudos de dinâmica de populações e diversidade (**Verhaegen et al. 2005**).

## USO COMERCIAL DA TECA

A teca produz madeira de excelente qualidade, resistente ao sol, ao calor e às águas das chuvas e do mar. Por isso é uma espécie muito utilizada na indústria naval, na confecção de móveis finos e peças de uso nobre, inclusive obras de arte (**Rondon Neto et al. 1998**). A planta acumula compostos dos grupos das antraquinonas e tectoquinonas, que possuem propriedades antifúngicas, bactericidas e são repelentes ao ataque de alguns insetos-pragas. A durabilidade natural da madeira da teca, quando exposta a rigores ambientais, tem sido atribuída à acumulação destes compostos (**Rudman, 1958; Thulasidas et al. 2007**). Outras substâncias também foram encontradas na teca, como o iapachol e a tectograndona (uma naftoquinona-antraquinona) que é um corante natural. Desta forma, além dos usos madeireiros, trabalhos têm sido realizados para viabilizar a utilização de produtos não madeireiros da teca tais como extratos de folhas com o objetivo de desenvolver inseticidas para o controle de cupins (**Santos et al. 2009**). O uso de extrato das folhas para tinturas de tecidos é outro aspecto que pode ser economicamente explorado (**Sacchetti, 2009**).

## VALOR DE MERCADO DA TECA

A madeira de teca é muito valorizada no exterior alcançando preços médios, de venda em leilões, acima de US\$ 1.500,00 por metro cúbico. O uso de madeiras de pequenas dimensões permite o aproveitamento daquelas provenientes do desbaste dos plantios, possibilitando que a receita do reflorestamento seja antecipada (**Abraf, 2011**).

## PRINCIPAIS DOENÇAS DA CULTURA DA TECA

**Ferrugem (*Olivea neotectonae*)** – A doença foi relatada pela primeira vez na Ásia e, até recentemente, estava circunscrita a essa região. O primeiro relato nas Américas foi feito em 2003 em diferentes regiões produtoras da Costa Rica (**Arguedas et al. 2004**) e no Equador (**Belezaca, 2004**). No México, a doença foi reportada nos Estados de Veracruz e Tabasco (**Cibrián et al. 2007**). No Brasil, a doença foi relatada em plantios comerciais em 2010-2011

(Pieri *et al.* 2011). O agente causal da ferrugem da teca é o fungo *Olivea neotectonae* que é um patógeno obrigatório e especializado (Pieri *et al.* 2011). O ataque do patógeno causa desfolha intensa nas plantas e redução na taxa fotossintética resultando em uma sensível redução do índice volumétrico final. A doença se caracteriza pela presença de manchas de coloração marrom com pústulas pulverulentas de coloração amarelada constituída pela massa de urediniósporos do patógeno. Em plantas jovens (com até um ano) os danos são observados nas folhas mais baixas (Arguedas *et al.* 2004). Em plantas adultas, as folhas mais velhas do terço inferior são as mais infectadas.

**Queima dos brotos (*Phomopsis* sp.)** – A queima dos brotos (causada por um fungo do gênero *Phomopsis*) é considerado o principal problema fitossanitário em plantios jovens de teca. A infecção inicia-se no meristema apical, deixando as folhas com uma coloração marrom escuro que evolui para uma necrose que pode levar à queda prematura de folhas. Períodos prolongados de alta umidade e temperatura facilitam a formação de picnídios e liberação de esporos (Macias *et al.* 2002b).

**Mancha de *Colletotrichum*** – A Mancha de *Colletotrichum* é outra doença de ocorrência comum em plantios de teca. Se caracteriza pela presença de manchas em folhas maduras, de coloração marrom escuro, circundadas por uma margem pálida. Com a união dos pontos individuais, os sintomas progridem para manchas maiores e irregulares, o que poderá proporcionar desfolha prematura (Sharma *et al.* 1985).

**Mancha de cercospora (*Cercospora tectonae*)** – *Cercospora* é um dos gêneros mais importantes de fungos patogênicos de plantas, sendo comumente associado a manchas foliares. É um patógeno destrutivo de plantas, causando perdas de produção em uma ampla gama de hospedeiros em todo o mundo. Ocorrem manchas foliares de 2 a 14 mm de diâmetro, angulares, com coloração que varia de marrom a marrom acinzentada ou branca no centro da lesão, com uma margem escura. Possui estroma que pode variar de 8–41 µm de diâmetro,

globoso a subgloboso, com coloração que pode variar de marrom a marrom escura. Os conidióforos  $33\text{--}76 \times 3\text{--}5 \mu\text{m}$ , em fascículo solto, variando de 1 até 5 septos, reto, com coloração castanho claro a castanho médio. As células conidiogênicas são integradas, terminais, holoblásticas, proliferando simpodialmente. Os conídios variam de  $31\text{--}96 \times 2\text{--}3 \mu\text{m}$  são hialinos, tendendo a cilíndricos, 4–13 septos, reto para curvo e truncado (**Meeboon et al. 2007c**). Essa doença afeta o cultivo da teca desde a fase de viveiro minijardim clonal à casa de sombra e mudas em fase de expedição, em condições de campo.

**Mancha de *Paramyrothecium* (*Paramyrothecium roridum*)** – Os sintomas iniciais são circulares a subcirculares, 1–4 mm, com coloração castanha escura ao longo da folha. Exposta a alta umidade, as lesões se expandiram para 6–20 mm com manchas concêntricas distintas com a formação de esporodóquio de coloração preta. Os conidióforos são hialinos com fiálides em forma de bastonete ( $10\text{--}17 \times 1,5\text{--}3,0 \mu\text{m}$ ). Os conídios são hialinos, cilíndricos ( $6\text{--}8 \times 2,0\text{--}2,5 \mu\text{m}$ ) com extremidades arredondadas. Ao longo do ciclo de produção, as lesões vão expandindo ao longo das folhas, promovendo amarelecimento e queda. Como resultado da doença, ocorre a redução da taxa fotossintética e conseqüente redução do desenvolvimento da muda (**Borges et al. 2018**). Esse patógeno já havia sido relatado anteriormente infectando teca em Taiwan (**Doilom et al. 2017**). No Brasil, o primeiro relato da doença sobre teca ocorreu em 2018 (**Borges et al. 2018**). A incidência dessa doença na é de aproximadamente 10% ao longo da fase de produção em viveiro (minijardim clonal, casa de sombra e pleno sol).

**Murcha-de-*Ceratocystis* (causada por *Ceratocystis fimbriata*)** – A murcha de *Ceratocystis* em teca foi relatada no Brasil em 2012. É atualmente uma das principais doenças em plantios comerciais de teca no Brasil. Os principais sintomas causados pela doença são: murcha, escurecimento radial do lenho e morte da planta. Os peritécios são negros, globosos ( $233 \times 278 \mu\text{m}$ ). Os ascósporos possuem um formato típico de um “chapéu” com dimensões de 3,62

× 4,68 µm. Os clamidósporos (11 × 14 µm) e endoconídios cilíndricos (20 × 3 µm). O uso de materiais resistentes é o melhor método de controle, porém a base genética da teca ainda é pouca explorada. A doença pode ser disseminada de várias maneiras, como o contato de raízes, ação de coleobrocas, plantios de mudas infectadas e uso de ferramentas de poda (Firmino *et al.* 2012).

**Cancro da teca (causado por *Lasiodiplodia theobromae*)** – O primeiro registro do cancro da teca no Brasil foi feito em 2015 (Borges *et al.* 2015). O patógeno é disseminado principalmente por ferramentas de poda (em função de desrama). A incidência dessa doença na cultura da teca pode variar de 5% a 10%. Os conídios são imaturos e hialinos, ovoides e unicelulares. Quando maduros as paredes conidiais ficam mais espessas, com coloração marrom escuro e com um septo e estrias longitudinais. Os conídios maduros podem atingir 23–29 × 13–15 µm. O cancro é um dos sintomas típicos dessa doença para a cultura, podendo ser acompanhado da exsudação dos vasos e descoloração do tecido vascular (Borges *et al.* 2015).

**Murcha vascular da teca (*Fusarium oxysporum*)** – Em levantamentos realizados em áreas de produção em 2014, uma nova doença vascular da teca, com um conjunto peculiar de sintomas foi encontrada em áreas comerciais em Mirassol do Oeste–MT (Borges *et al.* 2015, ver **CAPÍTULO 5**). Os principais sintomas causados pela doença são murcha, desprendimento da base da árvore, morte da planta, resultando em impactos negativos no valor agregado do produto madeireiro em função da modificação da coloração radial do lenho. Os microconídios possuem comprimentos de 5 a 10 µm e larguras de 2 a 4 µm são predominantemente ovais a elipsoides, levemente curvos (sem septos), organizados em falsas cabeças produzidas em monofíalides. Os macroconídios (comprimentos de 19 a 45 µm e larguras de 3 a 6 µm) são falcados, moderadamente curvados, e cada um com três a cinco



septos. Os clamidósporos são globulares e formados nas extremidades ou intercalados dentro das hifas, ocorrendo isoladamente, em pares ou em cadeias (**Borges et al. 2018**).

## **EPIDEMIOLOGIA DE DOENÇAS DE PLANTAS**

A epidemiologia de doenças de plantas é determinada por interações do patógeno e do hospedeiro sob o efeito do ambiente (**Harrison, 1983**). As doenças são classificadas como **epidêmicas** quando incidem em grande número de indivíduos dentro de uma população de plantas ou sobre toda a população de plantas em um determinado período de tempo. Uma **pandemia** é definida quando as epidemias ocorrem em grandes extensões geográficas (ex. regiões, países e continentes); **endêmicas**, quando se restringem a uma determinada região, afetando poucos indivíduos dentro de uma população de plantas; ou **politéticas** quando as doenças necessitam, por vezes, de anos para resultar um aumento na intensidade, como exemplo as doenças vasculares (murcha-de-*Ceratocystis* e cancos) (**Bergamin Filho et al. 1996**). A possibilidade de ocorrência de uma **epidemia** está intimamente relacionada com a evolução de determinada doença, a qual envolve diferentes fases do ciclo de vida do patógeno, podendo ser consideradas **monocíclicas** ou **policíclicas**.

**Doenças monocíclicas** caracterizam-se por apresentarem um único ciclo durante a mesma estação de cultivo, ou seja, o inóculo produzido em plantas doentes não irá se dissimular e infectar as plantas vizinhas durante o mesmo período de cultivo. O inóculo produzido nessas plantas servirá como fonte de infecção para novas plantas que se estabelecerem na mesma área em uma estação posterior de cultivo (ex. doenças vasculares). Neste grupo de doenças o número de plantas afetadas dependerá fundamentalmente da quantidade de inóculo inicial. Por sua vez, **doenças policíclicas** são aquelas que o inóculo produzido sobre plantas suscetíveis é capaz de, em uma mesma estação de cultivo, infectar

novas plantas. O inóculo que se forma nessas plantas provoca doenças em outras plantas e assim sucessivamente. Dessa maneira há formação do chamado **inóculo secundário**, encarregado da propagação da doença dentro de um mesmo ciclo de plantio. Esse tipo de inóculo será o responsável pela ocorrência de vários **ciclos secundários da doença**, como é bem tipificado em inúmeras manchas foliares (**Vanderplank, 1963**).

As doenças foram quantificadas por meio da **taxa de progresso** ( $r$ ), **inóculo inicial** ( $y_0$ ), **intensidade máxima e final da doença**, entre outras variáveis (**Vanderplank, 1963**). Os valores dessas variáveis podem ser calculados e analisados estatisticamente, permitindo a comparação de diferentes táticas de manejo (**Vanderplank, 1963**).

Para o estudo do progresso de doenças, tem-se usado principalmente **modelos empíricos**, dos quais descrevem a relação observada entre duas ou mais variáveis epidemiológicas. Esses modelos correlacionam dados observados e não incorporam nenhuma informação previamente conhecida sobre as variáveis dependentes e independentes. Os principais modelos empíricos utilizados são: Exponencial, Logístico e Gompertz. Esses modelos têm em comum a proporcionalidade entre a velocidade do progresso ou o aumento da doença e a sua intensidade. No modelo **Monomolecular**, há a diminuição da velocidade de aumento ao longo do tempo e aproxima-se de zero à medida que o tecido sadio se esgota (**Vale & Zambolim, 2004**).

A escolha do modelo para descrever uma dada doença deve ser bem criteriosa. Falhas no ajuste podem gerar informações e recomendações equivocadas no manejo. Por essa razão, algumas ferramentas estatísticas têm sido utilizadas para permitir uma escolha do modelo mais adequado. Sendo mais comumente empregadas: o coeficiente de determinação ajustado da análise de regressão ( $R^2$ ), o valor do quadrado médio dos desvios (obtido da análise de variância) e o gráfico dos resíduos padronizados (dados observados e esperados) em função da variável dependente (**Campbell & Madden, 1990**).

**Análise espacial** – Os padrões espaciais de doenças originam-se das interações de fatores físicos, químicos e biológicos que influenciam os processos ecológicos de um dado patógeno (exemplos: reprodução, dispersão, competição e sobrevivência). Os **padrões espaciais de doenças** fornecem informações sobre a dinâmica populacional do patógeno e seu padrão de dispersão. Essas informações auxiliam no desenvolvimento de metodologia para o monitoramento do patógeno, auxiliando no processo de tomada de decisão para um manejo mais racional do patossistema (**Vale & Zambolim, 2004**). A disseminação do patógeno e o progresso da doença ao longo do espaço são dependentes do arranjo das plantas, da intensidade da doença na fonte de inóculo e da sua forma de disseminação (**Campbell & Madden, 1990**).

Para o cálculo do progresso da doença no espaço citam-se: as análises estatísticas descritivas de quadrats, testes de run e doublet, índice VM (variância/média) e a Lei de Taylor (**Bergamin Filho et al. 2004, Campbell & Madden, 1990**). Entretanto, esses métodos não levam em consideração a dependência espacial entre a intensidade da doença em um indivíduo e a sua vizinhança, sendo então necessário utilizar metodologias estatísticas capazes de considerar a distância entre as amostras para quantificar e representar a dependência espacial com estimação ótima conforme é preconizado na teoria das variáveis regionalizadas, base dos fundamentos da geoestatística (**Silva et al. 2000**). A geoestatística tem sido aplicada para modelar o padrão espaço temporal e gerar hipóteses sobre aspectos epidemiológicos de doenças de plantas (**Chellemi et al. 1988**). As técnicas geoestatísticas podem ser usadas, entre outras aplicações, para otimizar malhas de amostragem (**Andriotti, 2009**).

## INTERAÇÕES PLANTAS-PATÓGENOS

As plantas constituem uma fonte rica em nutrientes e energia para uma grande variedade de micro-organismos patogênicos. Para estabelecer um processo de infecção e colonização eficiente, os fitopatógenos desenvolveram uma ampla gama de estratégias de ataque incluindo o desenvolvimento de um grande aparato de **efetores**. Estes efetores são moléculas capazes de “contornar” os sistemas de defesa das plantas e assim sustentar uma interação compatível. No entanto, isso contrasta com o que se vê na natureza, onde resistência é a regra e a suscetibilidade a exceção. Desta forma, uma dada espécie de planta se mostra como resistente para a maioria dos patógenos e suscetível a apenas alguns. Isto se dá em função de interações incompatíveis que caracterizam a **resistência do tipo não-hospedeira** (*non-host resistance*) (Dalio *et al.* 2014).

As plantas são inicialmente protegidas contra organismos patogênicos por meio de duas barreiras físicas pré-formadas, a cutícula e a parede celular, em seguida por compostos antimicrobianos constitutivamente produzidos (muitas vezes produzidos com finalidades distintas). O contato inicial entre o patógeno e a planta ocorre inicialmente ao nível da cutícula que recobre as células epidérmicas de folhas, flores, frutos e talos jovens. A cutícula é composta por uma mistura de ceras e um polímero denominado cutina (Yeats & Rose, 2013). Além de reduzir a perda de água e proteger a superfície das plantas contra radiação UV a cutícula também constitui uma barreira natural contra fitopatógenos. No entanto, a maioria dos patógenos fúngicos é capaz de penetrar diretamente a cutícula por força mecânica e secreção de cutinases que hidrolisam componentes da cutina (Longhi & Cambillau, 1999). A parede celular formada por microfibrilas de celulose, pectina, hemiceluloses, proteínas e, em certos casos, lignina também funciona como uma barreira física e de proteção contra estresses bióticos e abióticos (Somerville *et al.* 2004; Hamann, 2012). Além de barreiras físicas, as plantas produzem constantemente compostos antimicrobianos que inibem o crescimento de

fitopatógenos (**Osbourn, 1996**). Os poucos patógenos bem-sucedidos que conseguem vencer as barreiras pré-formadas precisam enfrentar o sistema imune da planta, o qual é constituído de mecanismos sofisticados de reconhecimento e defesa contra agentes patogênicos (**Bigeard et al. 2015**).

Ao longo do processo evolutivo as plantas desenvolveram um sistema imune capaz de proteger as células individuais contra a infecção por vários tipos de agentes patogênicos. Esse processo é chamado de **imunidade inata**, e é fundamental para a sobrevivência das plantas (**Cui et al. 2015**). A percepção de perturbações celulares pelo sistema imune da planta desencadeia respostas locais e sistêmicas, permitindo que uma planta acione suas defesas contra patógenos de maneira rápida e localizada e em uma escala estendida de tempo e espaço. Para isso, as plantas empregam um **sistema imune** formado por **duas linhas de defesa**: a primeira envolve a percepção de patógenos por **receptores de reconhecimento de padrões** (*Pattern recognition receptors – PRRs*) localizados na membrana plasmática e a segunda linha de defesa que emprega receptores intracelulares do tipo **NBS-LRR** (*Nucleotide-Binding Sites–Leucine Rich Repeats*) (**Dangl et al. 2013; Dodds et al. 2010**).

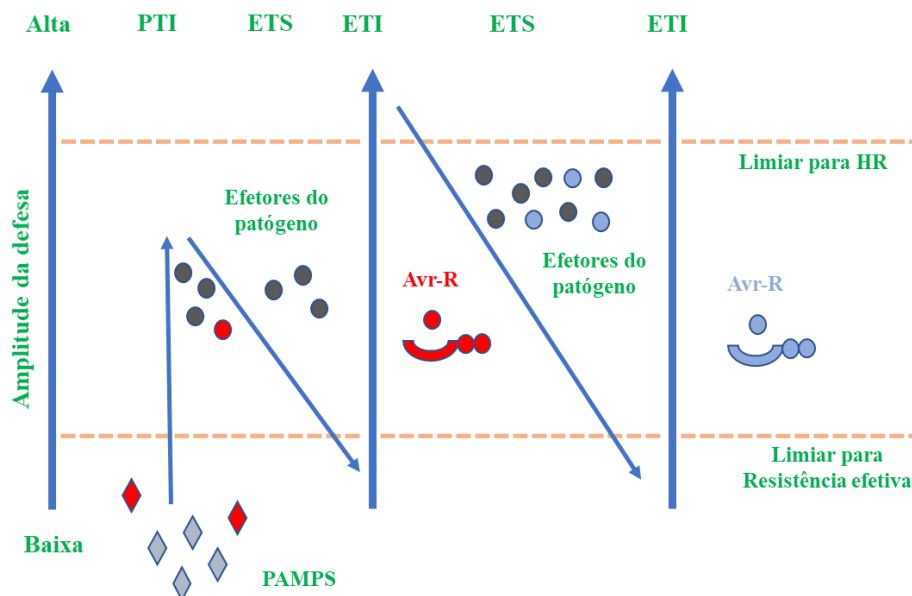
A primeira linha de defesa das plantas corresponde à percepção de patógenos por meio do reconhecimento de padrões moleculares associados aos patógenos (**PAMPs – Pathogen-Associated Molecular Patterns**) realizado pelos PRRs. Os PAMPs também são chamados de padrões moleculares associados a micróbios (**MAMPs**), uma vez que não são restritos a organismos patogênicos (**Zipfel, 2014**). Os PAMPs e os MAMPs são moléculas extremamente conservadas e essenciais para a habilidade parasita de um dado patógeno. Como exemplo de PAMPs/MAMPs pode-se citar a flagelina bacteriana, fator de alongação bacteriano–Tu (EF–Tu), lipopolissacarídeos, peptidoglicana,  $\beta$ -glucanos, ergosterol e quitina de fungos (**Boller & Felix, 2009**). Essas moléculas ao serem reconhecidas pelos PRRs presentes na membrana plasmáticas das células vegetais desencadeiam a primeira linha de

defesa chamada de **imunidade desencadeada por PAMPs** (*PAMP-triggered immunity – PTI*) (Jones & Dangl, 2006).

A imunidade do tipo PTI também pode ser ativada por moléculas endógenas denominadas de **DAMPs** (*Damage-Associated Molecular Patterns*) que são liberadas nas células e tecidos vegetais após a invasão do patógeno, tais como oligômeros de parede celular ou fragmentos cuticulares (Boller & Felix, 2009; Collier *et al.* 2011; Deller *et al.* 2011). Os receptores PRRs envolvidos no reconhecimento dos PAMPs/MAMPs são proteínas transmembranas pertencentes à classe das proteínas *Receptor-like proteins* (RLPs) ou receptores do tipo quinase (*Receptor-like kinase – RLKs*) e apresentam geralmente repetições ricas no aminoácido leucina (LRRs) ou com motivo de lisina (Lysm) no domínio extracelular, o qual está envolvido com o reconhecimento dos sinais (Beck *et al.* 2012). A PTI é efetiva contra múltiplos micro-organismos taxonomicamente não relacionados. Esse amplo espectro de ação se deve à natureza dos PAMPs que são moléculas conservadas em distintas espécies, gêneros, famílias ou classes. Assim, os receptores PRRs podem fornecer resistência contra a maioria dos patógenos não adaptados, bem como contribuir para a resistência basal durante a infecção (Zipfel, 2014).

Patógenos bem-sucedidos adquiriram estratégias para se adaptarem a determinados hospedeiros e desenvolveram um arsenal de fatores de virulência conhecidos como **efetores**, os quais são capazes de interferir com a PTI e atenuar ou desativar as defesas basais, impedindo o reconhecimento e suprimindo as etapas posteriores de sinalização (Raffaele *et al.* 2010; Deslandes & Rivas, 2012; Dangl *et al.* 2013; Karasov *et al.* 2014). Durante processo coevolutivo com os patógenos, algumas plantas desenvolveram proteínas de resistência (proteínas R) capazes de reconhecer esses efetores. Plantas que não são capazes de detectar esses efetores são suscetíveis ao patógeno, resultando na chamada suscetibilidade desencadeada por efector (*Effector-Triggered Susceptibility – ETS*), enquanto plantas que

podem reconhecer os efetores, via proteínas R de resistência podem desencadear uma resposta imune chamada imunidade desencadeada por efector (*Effector-Triggered Immunity* – **ETI**) (**Zipfel, 2008**). A imunidade do tipo ETI corresponde a segunda linha de defesa das plantas e emprega receptores intracelulares pertencentes principalmente a classe de proteínas NBS-LRR, as quais contêm domínios de ligação a nucleotídeos e repetições ricas no aminoácido leucina (que permitem uma percepção direta ou indireta os efetores). Esses efetores foram desenvolvidos inicialmente por patógenos adaptados para reprogramar a fisiologia da planta hospedeira com a finalidade de sustentar a interação compatível. Entretanto, a partir da percepção dos efetores, mediado pelas proteínas NBS-LRR, uma barreira à ação desses patógenos é estabelecida (**Zipfel, 2008**). Aparentemente, um processo dinâmico ainda continua quando alguns patógenos adquirem efetores que interferem com a ETI resultando novamente em suscetibilidade (ETS). Enquanto patógenos desenvolvem novos efetores para manipular os processos de defesa das plantas, estas desenvolvem novas proteínas R, caracterizando uma constante “queda-de-braço” na interação planta-patógeno (**Coll et al. 2011**). Essa dinâmica coevolutiva entre plantas e patógenos é ilustrada pelo modelo ‘Zig-Zag’ proposto por **Jones & Dangl (2006)** (**Figura 2**).



**Figura 2** – Modelo ‘Zig-Zag’ mostrando a dinâmica coevolutiva entre fatores de virulência no patógeno e proteínas de resistência no hospedeiro durante a interação planta-patógeno. Na **Fase #1**, as plantas detectam os PAMPs (*Pathogen Associated Molecular Patterns*) via receptores PRRs (*Pattern recognition receptors* – PRRs), ativando a imunidade PTI (*PAMP-triggered immunity*). Na **Fase #2** os patógenos mobilizam efetores que interferem na PTI, resultando na suscetibilidade desencadeada por efector (*Effector-Triggered Susceptibility* - ETS). As plantas, por sua vez, evoluem em resposta aos efetores e adquirem genes de resistência (R) capazes de reconhecer os efetores (em vermelho), ativando assim a imunidade desencadeada por efector (*Effector-Triggered Immunity* - ETI) (**Fase #3**). A pressão exercida sobre determinado efector estimula os patógenos para aquisição de novos efetores (em azul) que podem suprimir a ETI (**Fase #4**). A seleção natural favorece o surgimento de novas proteínas R de resistência na planta capazes de reconhecer esses novos efetores, resultando novamente em ETI (modificado de **Jones & Dangl, 2006**).

As defesas antimicrobianas estão frequentemente associadas a uma resposta de hipersensibilidade (HR) que é caracterizada por uma rápida morte celular localizada, que restringe o crescimento do patógeno à célula inicialmente infectada (**Jones & Dangl, 2006**). As reações locais de resistência induzem uma imunidade sistêmica mais duradoura (resistência sistêmica adquirida), que estimula os tecidos não infectados contra subsequentes ataques do patógeno (**Fu & Dong, 2013**). Em geral, a PTI contribui para a resistência basal de plantas a diversos patógenos adaptados e não adaptados, enquanto a ETI desempenha um papel central na defesa contra patógenos adaptados, sendo sua ação pode se mostrar extremamente específica funcionando contra espécies ou raças de um dado patógeno (**Spoel & Dong, 2012**).



Após o reconhecimento de um PAMP ou efetor, o sistema imune das plantas é ativado através de vias de sinalização que resultam no acúmulo de espécies reativas de oxigênio (**ROS**) e óxido nítrico (**NO**), alterações nos níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  no citoplasma e ativação da cascata de sinalização **MAPK** (*mitogen activated protein kinases*). A amplificação desses sinais ocorre por meio de hormônios reguladores como ácido salicílico (**SA**), ácido jasmônico (**JA**) e o etileno (**ET**), resultando na ativação de fatores de transcrição, entre eles os genes pertencentes à superfamília **WRKY** bem como genes codificadores de proteínas-PR (*pathogenesis-related proteins*), fitoalexinas, genes responsáveis pela lignificação de tecidos, deposição de calose e outros reforços da parede celular como quitinases, proteinases e glucanases (**He et al. 2007; Resende et al. 2007; Boller & Felix, 2009; Eulgem & Somssich, 2009; Pandey & Somssich, 2009; Dodds & Rathjen, 2010**).

A resposta de imunidade de plantas é, desta forma, controlada por uma complexa rede de sinalização. Embora a via de sinalização de repostas de defesa seja compartilhada entre PTI e ETI, a ativação da produção de ROS, alterações nos níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  e sinalização MAPK é muito mais prolongada em ETI em comparação com PTI (**Tsuda & Katagiri, 2010; Tsuda et al. 2013; Gal et al. 2013**). Estudos recentes sugerem que diferenças quantitativas na ativação e duração dessas vias produzem respostas de resistência, qualitativamente, diferentes em PTI e ETI.

### **ESTUDOS DAS INTERAÇÕES TECA-PATÓGENOS**

O estudo dessa reprogramação da expressão de genes durante os processos de defesa de uma espécie de planta permite a identificação dos mecanismos moleculares associados com essas respostas. Neste sentido, a técnica de RNASeq tem sido uma poderosa ferramenta, permitindo elucidar os componentes genéticos associados com inúmeras interações plantas-patógenos (**Sedano & Carrascal, 2012**). Desta forma, a indução de vários genes importantes para a defesa das plantas tem sido caracterizada por meio da técnica RNA-seq durante as

respostas de PTI e ETI. Por ser uma técnica ainda relativamente nova, ainda são poucas as pesquisas relacionadas com interações planta–patógeno em que a metodologia de RNAseq tenha sido empregada.

Estes estudos ainda não foram conduzidos para os diversos e economicamente importantes patógenos que afetam o cultivo da teca. Por exemplo, estudos relacionados com a interação *Ceratocystis*–teca ainda não estão disponíveis na literatura.

Os estudos moleculares envolvendo esse patossistema são desafiadores, especialmente devido à ausência de um genoma de referência para a planta hospedeira, resultando em dificuldades metodológicas em relações as análises de transcrito, sequenciamento em larga escala, anotação de genes e desenho de marcadores moleculares. Um dos objetos de estudo da presente tese é conduzir um trabalho pioneiro de caracterização de genes expressos por *T. grandis* em resposta a inoculação do fungo *Ceratocystis fimbriata*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELNOUR, A.; MUNOZ, A. **2005**. Micropropagación de teca (*Tectona grandis*). Kurú: Revista Florestal 2: 1-11.

ABRAF. Anuário estatístico da ABRAF 2012 ano base 2011. **2012**. Brasília, Brasil.

ARGUEDAS, M. **2004**. La roya de la teca *Olivea tectonae* (Rac.): consideraciones sobre su presencia en Panamá y Costa Rica. Kurú: Revista Forestal 1:1-16.

BERGAMIN FILHO, A.; LOPES, D.B.; AMORIM, L.; GODOY, C.V & BERGER, R.D.**1995**. Avaliação de danos causados por doenças de plantas. Revisão Anual de Patologia de Plantas 3: 133-84.

BECK, M.; HEARD, W.; MBENGUE, M. & ROBATZEK S. **2012**. The INs and OUTs of pattern recognition receptors at the cell surface. *Current Opinion in Plant Biology* 15: 367–74.

BECKERS, G. J. *et al.* **2009**. Mitogen-activated protein kinases 3 and 6 are required for full priming of stress responses in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 21:944-953.

BORGES, R.C.F.; SANTOS, M.D.M.; MACEDO, M.A.; MARTINS, I.; NASCIMENTO, A.G.; CAFÉ-FILHO, A.C.; BOITEUX, L.S.; FONSECA, M.E.N.; INÁCIO, C.A & MELLO, S.C.M. **2015**. A trunk canker disease of *Tectona grandis* induced by *Lasiodiplodia theobromae* in Brazil. *New Disease Reports* 31: 26.

BORGES, R.C.F.; MACEDO, M. A.; CABRAL, C.S.; ROSSATO, M.; FONTES, M.G.; SANTOS, M.D.M.; FERREIRA, M.A.; FONSECA, M.E.N.; REIS, A & BOITEUX, L.S. **2018**. Vascular wilt of teak (*Tectona grandis*) caused by *Fusarium oxysporum* in Brazil. *Phytopathologia Mediterranea* 57: 209–215.

BOLLER, T.; FELIX, G.A. **2009**. Renaissance of elicitors: Perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annual Review of Plant Biology* 60: 379–406.

BIGEARD, J.; COLCOMBET, J & HIRT, H. **2015**. Signaling mechanisms in pattern-triggered immunity (PTI). *Molecular Plant* 8: 521–539.

CAMPBELL, C.L. & MADDEN, L.V. **1990**. Introduction to Plant Disease 1 Epidemiology. New York, NY, USA, John Wiley and Sons.

CIBRIÁN, T.D.; GARCÍA DÍAZ S.E & ALVARADO ROSALES, D. **2007**. Roya de la teca Teak rust *Olivea tectonae*. Enfermedades Forestales de México/Forest Diseases in Mexico 307-311.

CHISHOLM, S. *et al.* 2006. Host-microbe interactions: Shaping the evolution of the plant immune response. *Cell* 124: 803-814.

COLL, N. S.; EPPLE P & DANGL, J. L. **2011**. Programmed cell death in the plant immune system. *Cell Death and Differentiation* 8: 1247-1256.

COLLIER, S.M.; HAMEL, L.P & MOFFETT. P. **2011**. Cell death mediated by the N-terminal domains of a unique and highly conserved class of NBS-LRR protein. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 24: 918–931.

COLCOMBET, J.; HIRT, H. 2008. Arabidopsis MAPKs: A complex signaling network involved in multiple biological processes. *Biochemical Journal* 413: 217-226.

CUI, H.; TSUDA, K & PARKER, J.E. **2015**. Effector-triggered immunity: From pathogen perception to robust defense. *Annual Review of Plant Biology* 66: 487–511.

DALIO, R.J.D.; MAGALHÃES, D.M.; ATÍLIO, L.B.; RODRIGUES, C.M.; BRETON, M.C.; PICHI, S.; PASCHOLATI, S.F. & MACHADO, M.A. **2014**. Efeitores nas interações planta-patógeno. *Revisão Anual de Patologia de Plantas* 22: 25-68.

DANGL, J.L.; HORVATH, D.M & STASKAWICZ, B.J. **2013**. Pivoting the plant immune system from dissection to deployment. *Science* 341: 746-751.

DELLER, S.; HAMMOND-KOSACK, K.E & RUDD, J.J. **2011**. The complex interactions between host immunity and non-biotrophic fungal pathogens of wheat leaves. *Journal of Plant Physiology* 168: 63–71.

DESLANDES, L & RIVAS, S. **2012**. Catch me if you can: Bacterial effectors and plant targets. *Trends in Plant Science* 17: 644–655.

DODDS, P.N & RATHJEN, J.P. **2010**. Plant immunity: Towards an integrated view of plant–pathogen interactions. *Nature Review Genetics* 11: 539–548.

DOILOM, M.; DISSANAYAKE, A.J.; WANASINGHE, D.N.; BOONMEE, S.; LIU, J.K.; BHAT, D.J.; TAYLOR, J.E.; BAHKALI, A.H.; MCKENZIE, E.H.C & HYDE, K.D. **2017**. Microfungi on *Tectona grandis* (teak) in Northern Thailand. *Fungal Diversity* 82: 107-182.

EULGEM, T & SOMSSICH, I.E. **2009**. Networks of WRKY transcription factors in defense signaling. *Current Opinion in Plant Biology* 10: 366–371.

FIGUEIREDO, E.O.; OLIVEIRA, L.C & BARBOSA, L.K.F. **2005**. Teca (*Tectona grandis* L.f.): Principais Perguntas do Futuro empreendedor Florestal. Embrapa Acre. 87 p.

FIRMINO, A.C.; TOZZE JR, H.J & FURTADO, E.L.**2012**. First report of *Ceratocystis fimbriata* causing wilt in *Tectona grandis* in Brazil. *New Disease Reports* 25: 2044-0588.

FU, Z.Q & DONG, X. **2013**. Systemic acquired resistance: Turning local infection into global defense. *Annual Review of Plant Biology* 64: 839–863.

GRAUDAL, L.; KJAER, E.D.; SUANGTHO, V.; SAARDAVUT, P & KAOSA-ARD, A. **1999**. Conservation of genetic resources of teak (*Tectona grandis*) in Thailand. DFSC Series of Technical Notes. Humlebaek: Danida Forest Seed Centre 1–38.

GRAUDAL, L.; KJAER, E.D.; SUANGTHO, V.; SAARDAVUT, P & KAOSA-ARD, A. **1999**. Conservation of genetic resources of teak (*Tectona grandis*) in Thailand. DFSC Series Of Technical Notes. Humlebaek: Danida Forest Seed Centre 1-38.

GAO, X.; CHEN, X.; LIN, W.; CHEN, S.; LU, D.; NIU, Y.; LI, L.; CHENG, C.; MCCORMACK, M.; SHEEN, J.; SHAN, L & HE, P. **2013**. Bifurcation of Arabidopsis NLR immune signaling via Ca<sup>2+</sup>-dependent protein kinases. *PLOS Pathog* 9: e1003127

GOH, D.K.S. & GALIANA, A. **2000**. Vegetative propagation of teak. Jircas Working Report, Tsukuba 16:35–43.

GÓMEZ-GÓMEZ, L. & BOLLER, T., **2000**. FLS2: An LRR receptor–like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in Arabidopsis. *Molecular Cell* 5: 1003–1011.

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

HAMANN, T. **2012**. Plant cell wall integrity maintenance as an essential component of biotic stress response mechanisms. *Frontiers in Plant Science*. 3: 77.

HE, P., SHAN, L & SHEEN, J. **2007**. Elicitation and suppression of microbe-associated molecular pattern triggered immunity in plant-microbe interactions. *Cell Microbiology* 9: 1385–1396.

INSTITUTO DE PESQUISA FLORESTAL. **2016**. Disponível em: <http://www.ipef.br/identificacao/tectona.grandis.asp>. Consultado em: 08/07/2016.

IBÁ – Indústria Brasileira de Árvores. **2015**. Relatório IBA 2015.

JONES, J.D & DANGL, J.L. **2006**. The plant immune system. *Nature* 444: 323–329.

KAOSA-ARD, A. **1989**. Teak (*Tectona grandis* Linn., f.): Its natural distribution and related factors. *Natural History Bulletin of the Siam Society* 29: 55–74.

KARASOV, T.L.; HORTON, M.W & BERGELSON, J. **2014**. Genomic variability as a driver of plant-pathogen coevolution? *Current Opinion in Plant Biology* 18: 24–30.

KEMEN, E & JONES, J.D. **2012** Obligate biotroph parasitism: Can we link genomes to lifestyles? *Trends in Plant Science* 17: 448–457.

KOLLERT, W. & CHERUBINI, L. **2012**. Teak Resources and Market Assessment 2010 (*Tectona grandis*). FAO- planted forests and trees working paper series. Rome 1-42.

LONGHI, S & CAMBILLAU, C. **1999**. Structure-activity of cutinase, a small lipolytic enzyme. *Biochimica et Biophysica Acta* 1441: 185–196.

LODHA, T. & BASAK, J. **2012**. Plant-pathogen interactions: what microarray tells about it? *Molecular Biotechnology* 50: 87–97.

LOON, V.; STRIEN, V. **1999**. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of pr-1 type proteins. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 55: 85–97.

MACÍAS, J.; ARGUEDAS, M.; ZANUNCIO, J.C & HILJE, L. **2002b**. Plagas Forestales Neotropicales (Manejo Integrado de Plagas y Agroecología (Costa Rica). 65:116–117.

MATRICARDI, W.A.T. **1989**. Efeito dos fatores do solo sobre o desenvolvimento da teca (*Tectona grandis*) cultivada em Grande Cáceres–Mato Grosso. Dissertação Mestrado. Escola Superior de Agricultura ‘Luiz de Queiroz’, Universidade de São Paulo, Piracicaba–SP, Brasil.

MAZIAH, Z & LEE, S.S. **1999**. Diseases and Disorders of Teak (*Tectona grandis*) in Peninsular Malaysia. Proceedings of the 5<sup>th</sup> International Conference on Plant Protection in the Tropics. Kuala Lumpur p.158–163.

MEEBOON, J.; HIDAYAT, I & TO-ANUN, C. **2007c**. Diversity and Taxonomy of Cercosporoid Fungi in Thailand. In: (eds. SOYTONG K. & HYDE K.D.) Proceedings of the International Conference on Integration of Science and Technology for Sustainable Development (ICIST) “Biological Diversity, Food and Agricultural Technology”.

MENDGEN, K.; HAHN, M & DEISING, H. **1996**. Morphogenesis and mechanisms of penetration by plant pathogenic fungi. Annual Review of Phytopathology 34: 367–386.

MONTEUUIS, O.; BON, M-C.; GOH, D.K.S. **1998**. Teak propagation by in vitro culture. Bois et Forêts des tropiques. Nogent-sur-Marne 256: 43–53.

NICODEMUS, A.; NAGARAJAN, B.; NARAYANAN, C. **2003**. RAPD variation in Indian teak populations and its implications for breeding and conservation. In: Proceedings of the international conference on quality timber products of teak from sustainable forest management. Peechi 2: 321–330.

OSBOURN, A.E. **1996**. Preformed antimicrobial compounds and plant defense against fungal attack. Plant Cell 8: 1821–1831.

PANDEY, S.P & SOMSSICH, I.E. **2009**. The role of WRKY transcription factors in plant immunity. Plant Physiology 150: 1648–1655.

PIERI, C.; PASSADOR, M.M.; FURTADO, E.L., CARVALHO JUNIOR, A.A. **2011**. Ferrugem da teca (*Olivea neotectonae*): novas ocorrências no Brasil e revisão do nome específico. Summa Phytopathologica 37: 4.

RAFFAELE, S.; FARRER, R.A.; CANO, L.M.; STUDHOLME, D.J.; MACLEAN, D.; THINES, M.; JIANG, R.H.; ZODY, M.C.; KUNJETI, S.G.; DONOFRIO, N.M.; MEYERS, B.C.; NUSBAUM, C & KAMOUN, S. **2010**. Genome evolution following host jumps in the Irish potato famine pathogen lineage. *Science* 330: 1540–1543.

RESENDE, L.V.; BARRETTI, P.B.; MEDEIROS, F.C.L.; SILVA, D.D.; PEREIRA, R.B.; LINS, S.R.O.; PEREIRA, L.M & CAMPOS, M.A. **2007**. Percepção e transdução de sinais para a ativação de respostas de defesa em plantas contra patógenos. *Revisão Anual de Patologia de Plantas* 15: 129–198.

RUDMAN, P & DA COSTA, E.W.B. **1958**. Relationship of tectoquinone to durability in *Tectona grandis*. *Nature* 181(4610): 721.

RONDON NETO, R. M.; MACEDO, R. L. G & TSUKAMOTO FILHO, A. A. **1998**. Formação de povoamentos florestais com *Tectona grandis* L.f. (Teca). Universidade Federal de Lavras, Lavras–MG, Brasil. 29pp.

SEDANO, J. C. S. & CARRASCAL, C. E. L. **2012**. RNA-seq: Herramienta transcriptômica útil para el estudio de interacciones planta-patógeno. *Fitosanidad*, v. 16, n. 2,

SHARMA, J.K.; MOHANAN, C.; Florence, E.J.M. **1985**. Disease survey in nurseries and plantations of forest tree species grown en Kerala. Kerala, IN. Kerala Forest Res. Inst. p275.

SANTOS, M.N.; TEIXEIRA, M.L.F.; PEREIRA, M.B & MENEZES, E.B. **2009**. Potential insecticidal effects of aqueous tree leaf extracts against subterranean termite *Coptotermes gestroi* (Isoptera: Rhinotermitidae) 53: 719–728.

SEDANO, J.C.S.; CARRASCAL, C.E.L. **2012**. RNA-seq: herramienta transcriptômica útil para el estudio de interacciones planta-patógeno. *Fitosanidad* 16: 101–113.

SCHENK, P.; CARVALHAIS, L.; KAZAN, K. **2012**. Unraveling plant-microbe interactions: can multi-species transcriptomics help? *Trends in Biotechnology* 3:177–184.

SLAUGHTER, A. *et al.* **2012**. Descendants of primed arabidopsis plants exhibit resistance to biotic stress. *Plant Physiology* 158: 835–843.

SILVA, E.A.; SILVA, J.F.V.; MONICO, J.F.G.; & HIROMOTO, D.M. Perspectivas no manejo e controle localizado de doenças das culturas: uma abordagem no manejo do nematóide de cisto da soja.



**2000.** In: BORÉM, A., GIÚDICE, M.P., QUEIROZ, D.M., MANTOVANI, E.C., FERREIRA, L.R., VALE, F.X.R. & GOMIDE, R.L. (Eds.) Agricultura de Precisão. p.409–453.

SOMERVILLE, C.; BAUER, S.; BRININSTOOL, G.; FACETTE, M.; HAMANN, T.; MILNE, J.; OSBORNE, E.; PAREDEZ, A.; PERSSON, S.; RAAB, T.; VORWERK, S & YOUNGS, H. **2004.** Toward a systems approach to understanding plant cell walls. *Science* 306: 2206–2211.

SPOEL, S.H & DONG, X. **2012.** How do plants achieve immunity? Defence without specialized immune cells. *Nature Reviews Immunology* 12: 89–100.

TIWARI, S.K.; TIWARI, K.P.; SIRIL, E.A. **2002.** An improved micropropagation protocol for teak. *Plant Cell Tissue and Organ Culture. Ontário* 71:1–6.

THOMMA, B.; NURNBERGER, T.; JOOSTEN, M. 2011. Of PAMPs and effectors: the blurred PTI-ETI dichotomy. *The Plant Cell* 23: 4–15.

TSUDA, K & KATAGIRI F. **2010.** Comparing signaling mechanisms engaged in pattern-triggered and effector-triggered immunity. *Current Opinion in Plant Biology* 13: 459–465.

TSUDA, K.; MINE, A.; BETHKE, G.; IGARASHI, D.; BOTANGA, C.J.; TSUDA, Y.; GLAZEBROOK, J.; SATO, M & KATAGIRI, F. **2013.** Dual regulation of gene expression mediated by extended MAPK activation and salicylic acid contributes to robust innate immunity in *Arabidopsis thaliana*. *PLOS Genetics* 9: e1004015.

THULASIDAS, P.K.; BHAT, K.M & OKUYAMA, T. **2006.** Heartwood colour variation in home garden teak (*Tectona grandis*) from wet and dry localities of Kerala, India. *Journal of Tropical Forest Science* 1: 51–54.

UGALDE, L & PÉREZ, O. **2001.** Mean annual volume increment of selected industrial forest. FAO, working paper FP/1. Disponível: <http://www.fao.org>. Consultado em: 22/12/2013.

VANDERPLANK, J.E. **1963.** Plant Disease: Epidemics and Control. Academic Press, New York 349pp.

VALE, F.X.R.; JESUS JUNIOR, W.C & ZAMBOLIM, L. **2004.** Epidemiologia aplicada ao manejo de doenças de plantas. Viçosa-MG: Editora Perfil, 532 pp.

VEIT, L.F. **2000**. Dinheiro não cresce em árvores. *Revista Silvicultura* 83:38–39.

VERHAEGEN, D.; OFORI, D.; FOFANAA, I.; POITEL, M.; VAILLANT, A. **2005**. Development and characterization of microsatellite markers in *Tectona grandis*. *Molecular Ecology Notes*. 5: 945–947.

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

VIEIRA, A.H.; MARTINS, E.P.; PEQUENOS, P.L.L.; LOCATELLI, M & SOUZA, M.G. **2001**. Técnicas de produção de sementes florestais. Rio Branco: Embrapa p.1-4.

WATANABE, Y.; MASUNAGA, T.; OWUSU-SEKYERE, E.; BURI, M. M.; OLADELE, O. I.; WAKATSUKI, T. **2009**. Evaluation of growth and carbon storage as influenced by soil chemical properties and moisture on teak (*Tectona grandis*) in Ashanti region, *Ghana Journal of Food, Agriculture & Environment* 7:640-650.

YEATS, T.H & AND ROSE, J.K. **2013**. The formation and function of plant cuticles. *Plant Physiology* 163: 5–20.

YAMAGUCHI, Y & HUFFAKER, A. **2011**. Endogenous peptide elicitors in higher plants. *Current Opinion in Plant Biology* 14: 351–357.

ZHANG, Z. *et al.* **2012**. Disruption of PAMP-induced map kinase cascade by a pseudomonas syringae effector activates plant immunity mediated by the NB-LRR protein SUMM2. *Cell Host & Microbe* 1: 253–263.

ZIPFEL, C. **2008**. Pattern-recognition receptors in plant innate immunity. *Current Opinion in Immunology* 20: 10–16.

ZIPFEL, C. Plant pattern-recognition receptors. **2014**. *Trends in Immunology* 35: 345–351.

## **Capítulo 2**

### **Dinâmica espaço-temporal da murcha-de-*Ceratocystis* em teca (*Tectona grandis*)**

## RESUMO

A teca (*Tectona grandis*, família Lamiaceae) é uma espécie arbórea originária do subcontinente Índico e Sudeste Asiático. No Brasil, a exploração dessa espécie vem sendo intensificada devido a uma série de atributos de interesse incluindo obtenção de madeira de elevada densidade e ciclo de produção mais curto. Embora a teca apresente uma ampla adaptação a uma gama de fatores bióticos e abióticos, alguns problemas fitossanitários limitantes estão sendo relatados nessa cultura nas condições brasileiras. Uma das principais preocupações do setor produtivo têm sido as recentes perdas devido a epidemias da murcha de *Ceratocystis fimbriata*. Os trabalhos de epidemiologia dessa doença na cultura da teca ainda são escassos. Neste contexto, o objetivo do presente trabalho foi determinar a dinâmica espaço-temporal da murcha-de-*Ceratocystis* em duas regiões produtoras de teca do Brasil. As parcelas experimentais foram localizadas em áreas de produção comercial de teca. Seis áreas foram selecionadas, sendo três áreas em Redenção (Estado do Pará-PA) e três áreas em Cáceres (Estado do Mato Grosso-MT). O progresso da doença nessas áreas foi avaliado entre agosto de 2014 e julho de 2016. Dezoito parcelas foram demarcadas, sendo nove na região de Cáceres-MT e nove na região de Redenção-PA. Em cada região três talhões foram demarcados. Em cada talhão foram demarcadas três parcelas, contendo 900 plantas (30 x 30) cada. A reação a murcha-de-*Ceratocystis* foi avaliada em três materiais comerciais de teca ('Clone A', 'Clone B' e material seminal). A avaliação da incidência de plantas infectadas foi realizada pela anotação da presença (ou ausência) de sintomas característicos da doença em intervalos de 90 dias. Plantas apresentando sintomas típicos da doença (desprendimento basal, murcha das folhas seca do ponteiro e morte) foram classificadas como infectadas por *C. fimbriata*. As análises sugerem uma distribuição predominantemente agregada (Lei de Taylor modificada) das plantas infectadas por *C. fimbriata*. A incidência variou em função do material genético, da região geográfica estudada e do espaçamento entre plantas. O progresso temporal e espacial da murcha-de-*Ceratocystis* em teca foi muito influenciado em função dos métodos de manejo silviculturais e do material genético. As informações obtidas nesse estudo são importantes para elaboração de estratégias mais eficientes de manejo da murcha-de-*Ceratocystis*. Os dados sugerem que os manejos fitotécnico e fitossanitário devem ser mais rígidos. Recomenda-se utilizar materiais genéticos resistentes e/ou tolerantes, evitar o estabelecimento de cultivos próximos a áreas úmidas (ex. próximas a cursos de água), detectar e eliminar mudas doentes desde a fase de viveiro, seguir de maneira minuciosa o cronograma de manejo silvicultural preconizado e remover plantas doentes do campo a fim de evitar infecções secundárias.

## ABSTRACT

Teak (*Tectona grandis*, family Lamiaceae) is tree species native of the Indian subcontinent and Southeast Asia. In Brazil, the commercial exploitation of this species has been intensified due to a series of agronomic traits of interest, including high wood density and shorter production cycle. Although teak presents a wide adaptation to a range of biotic and abiotic factors, some phytosanitary problems have recently been reported in this crop under Brazilian conditions. One of the major problems is the recent outbreaks of *Ceratocystis fimbriata* wilt, which is causing concerns to the productive sector. Epidemiology works dealing with this disease in the teak are still scarce. In this context, the objective of the present work was an attempt to model the spatio-temporal epidemiology of the *Ceratocystis* wilt in two teak producing regions of Brazil. The experimental plots were located in areas of commercial production of teak. Six areas were selected, being three areas in Redenção (State of Pará-PA) and three areas in Cáceres (State of Mato Grosso-MT). The progress of the disease in these areas was evaluated between August 2014 and July 2016. Eighteen plots were demarcated, nine in the region of Cáceres-MT and nine in the region of Redenção-PA. In each region, three plots were demarcated. Three replicates (containing 900 plants – 30 x 30 each) were demarcated in each plot. The reaction to *Ceratocystis* wilt was evaluated in three commercial teak materials ('Clone A', 'Clone B', and seminal material). The evaluation of the incidence of infected plants was carried out by annotating the presence (or absence) of symptoms characteristic of the disease at 90 days intervals. Plants displaying typical disease symptoms (basal bark detachment, apical wilt and dieback) were classified as being infected by *C. fimbriata*. The analyses suggest that the distribution pattern of plants infected with *C. fimbriata* was predominantly aggregated (modified Taylor Law). The disease incidence varied according to the genetic material, the region studied and the spacing between plants. The temporal and spatial progression of the *Ceratocystis* wilt in teak was greatly influenced by silvicultural management methods and by the genetic material. The information obtained in this study is important for the implementation of more efficient management strategies of the *Ceratocystis* wilt. These data suggest that both cultural and phytosanitary management strategies should be more rigid. Some practices are recommended including: to deploy resistant and/or tolerant genetic materials, to avoid the establishment of crops near wetlands (e.g. nearby water courses), to detect and eliminate diseased seedlings since the nursery stage, to follow a detailed silvicultural management schedule and to remove diseased plants from the field in order to avoid secondary infections.

## INTRODUÇÃO

A teca (*Tectona grandis* L.f., família Lamiaceae) é uma espécie arbórea natural do subcontinente Índico e Sudeste Asiático. Há cerca de 100 anos a teca passou a ser comercialmente cultivada em função do esgotamento das populações naturais, exploradas intensamente de forma extrativista.

A partir do seu centro de origem, os plantios começaram a se expandir para outros países e continentes que apresentavam condições climáticas semelhantes, chegando a novas zonas tropicais, como a África Ocidental, América Latina e o Caribe (**Figueiredo et al. 2005**). No Brasil, a exploração dessa espécie vem sendo particularmente auspiciosa, pela obtenção de madeira de elevada densidade e ciclo de produção mais curto em comparação com os países de origem. Os primeiros reflorestamentos foram implantados na década de 1970, pela empresa Cáceres Florestal S.A., no município de Cáceres–MT, onde a espécie demonstrou alta adaptabilidade (**Fazendas Florestas, 2014**).

Embora, apresente uma ampla adaptação a uma gama de fatores bióticos e abióticos, alguns problemas fitossanitários limitantes estão sendo recentemente relatados no cultivo da teca nas condições brasileiras. Na região de Cáceres–MT, foram relatadas doenças que vêm preocupando o setor produtivo: a murcha causada pelo fungo *Ceratocystis fimbriata* (**Firmino et al. 2012**), cancro da teca, causado pelo fungo *Lasiodiplodia theobromae* (**Borges et al. 2015**) e, mais recentemente, a murcha vascular causada por *Fusarium oxysporum* (**Borges et al. 2018**).

Os trabalhos de epidemiologia tratando da dinâmica das doenças para a cultura da teca, especialmente nas condições brasileiras, ainda são escassos. De fato, a maioria dos trabalhos de epidemiologia em espécies florestais tem sido realizada para a cultura do eucalipto (**Ferreira et al. 2013**). Nesse contexto, o objetivo do presente trabalho foi

determinar a dinâmica espaço-temporal da murcha-de-*Ceratocystis* em duas regiões produtoras de teca do Brasil.

## MATERIAL E MÉTODOS

**Descrição das áreas avaliadas** – As parcelas experimentais foram amostradas em áreas de produção comercial de teca. Seis áreas foram amostradas, sendo três áreas em Redenção no Estado do Pará-PA (08° 01' 43'' ao sul, 50° 01' 53'' a oeste e a 227 metros de altitude) e três áreas em Cáceres no Estado do Mato Grosso-MT (16° 04' 14'' ao sul e 57° 40' 44'' a oeste e altitude de 118 metros de altitude). O progresso da murcha-de-*Ceratocystis* nessas áreas foi avaliado entre agosto de 2014 e julho de 2016.

**Desenho experimental** – Dezoito parcelas foram demarcadas, sendo nove na região de Cáceres-MT e nove na região de Redenção-PA. Em cada região três talhões foram demarcados. Em cada talhão foram demarcadas três parcelas, contendo 900 plantas (30 x 30) cada. Três materiais comerciais de teca (clone A, clone B e material seminal) suscetíveis a murcha-de-*Ceratocystis* foram avaliados. Cada talhão foi composto por apenas um material genético com três repetições (= parcelas). Na região de Cáceres-MT, o clone A, o clone B e material seminal foram conduzidos no espaçamento de 4 x 4 m (linha x entre linhas). Na última avaliação em Cáceres-MT, as plantas apresentavam cinco anos de idade. Os materiais da região de Redenção-PA foram dispostos em espaçamento distintos e apresentavam idades diferentes. O clone A, o clone B e o material seminal foram dispostos em espaçamentos de 4 x 4 m, 6 x 5 m e 4 x 4 m (linha x entre linhas), respectivamente. Na última avaliação em Redenção-PA, esses materiais apresentavam seis, sete e seis anos, respectivamente.

**Critérios de avaliação e métodos diagnósticos da murcha-de-*Ceratocystis*** – A avaliação da incidência de plantas infectadas foi realizada pela anotação da presença (ou ausência) de sintomas característicos da doença em intervalos de 90 dias. Plantas apresentando sintomas

típicos da doença (desprendimento basal, murcha das folhas seca do ponteiro e morte) foram classificadas como infectadas por *C. fimbriata*. Adicionalmente, amostras de plantas sintomáticas em cada parcela (por data de avaliação) foram coletadas e analisadas por métodos moleculares para confirmação do diagnóstico visual. Para isso, fragmentos do caule de cedro com sintomas foram coletados e colocados sobre isca de cenoura em câmara úmida e incubados a  $25 \pm 2^\circ \text{C}$  sob fotoperíodo alternado. Após formação de peritécio, uma porção de massa contendo ascósporos foi transferida para meio MEA (malte, extrato de levedura e ágar) para formação de colônias que foram incubadas sob as mesmas condições anteriormente descritas. Após dez dias de incubação, observou-se a formação das estruturas de reprodução do fungo. A fim de confirmar a identidade do agente causal, em nível de espécie, realizou-se um conjunto de análises usando a informação genômica dos genes do fator de alongação da região parcial 1- $\alpha$  (TEF1- $\alpha$ ) e da região ITS 1 e ITS4 (White *et al.* 1990), com isolados fúngicos representativos das regiões estudadas. O DNA genômico de amostras fúngicas isoladas de teca foi extraído usando o tampão 2X CTAB e solventes orgânicos com pequenas modificações (Boiteux *et al.* 1999). Os ensaios de PCR foram realizados usando DNA genômico total com os primers EF1 e EF2 visando à região TEF-1 e à região ITS sendo ITS1 universal (5'-TCC-GTA-GGT-GAA-CCT-GCG-G-3') e ITS4 (5'-TCC-TCC-GCT-TAT-TGA-TAT-GC-3') (White *et al.* 1990). Os produtos de PCR amplificados foram purificados e sequenciados para confirmação da espécie fúngica.

**Análises Epidemiológicas** – Os dados de incidência da murcha-de-*Ceratocystis* ao longo do tempo e espaço das avaliações em todas as áreas foram utilizados para plotagem cumulativa e não cumulativa da incidência da doença e realização das análises epidemiológicas.

**Análise Temporal** – As curvas de progresso da murcha-de-*Ceratocystis* obtidas foram ajustadas aos modelos estatísticos, exponencial, monomolecular, logístico e Gompertz. As



análises foram realizadas por meio de regressões não-lineares utilizando o programa Statistica® (StatSoft, Tulsa, OK, EUA), de acordo com o método Quase-Newton. A escolha do modelo mais adequado foi realizada com base no coeficiente de determinação ( $R^2$ ), no padrão de distribuição dos resíduos e pela média dos valores do desvio padrão dos parâmetros  $b_1$ ,  $b_2$  e  $b_3$ , estimados pelos modelos (Madden *et al.* 2007).

**Análise Espacial** – Quatro técnicas foram empregadas para estudar o padrão espacial da murcha-de-*Ceratocystis* em todas as parcelas avaliadas: (1) a técnica de sequências ordinárias; (2) o índice de dispersão; (3) a Lei de Taylor modificada e (4) áreas isopatas. Inicialmente, mapas com distribuição binomial (plantas infectadas ou não infectadas por *Ceratocystis*) foram gerados para cada avaliação de cada parcela. Em cada avaliação, novas plantas sintomáticas foram identificadas e essas foram devidamente localizadas nos mapas de cada parcela. Quadrats de 6 x 6 foram escolhidos para determinar parâmetros espaciais da murcha-de-*Ceratocystis*. Para cada quadrat, a incidência de plantas doentes ( $p$ ) foi determinada em cada avaliação por meio da equação:  $p = \Sigma(X_i)/nN$ , onde  $X_i$  é o número total de plantas sintomáticas em cada quadrat,  $n$  é o número de plantas de cada quadrat e  $N$  é o número total de quadrats em cada parcela (Madden & Hughes, 1995).

**Índice de dispersão (D)** – O índice de dispersão (D) foi calculado para todas as parcelas com quadrat (6 x 6) a partir da variância observada (**Vobs**) e binomial (**Vbin**) através da equação (Madden & Hugles, 1995):  $D=Vobs/Vbin$ . Onde:  $Vobs= \Sigma (x_i - n p)^2 / n^2 (N-1)$   $Vbin. = p(p-1) / n$ . A significância do índice de dispersão foi verificada por meio do teste de qui-quadrado ao nível de 5% de probabilidade. Valores de D estatisticamente iguais a um (1) foram considerados como padrão ao acaso (hipótese nula), já valores que diferiram estatisticamente de um (1) foram considerados como agregados.

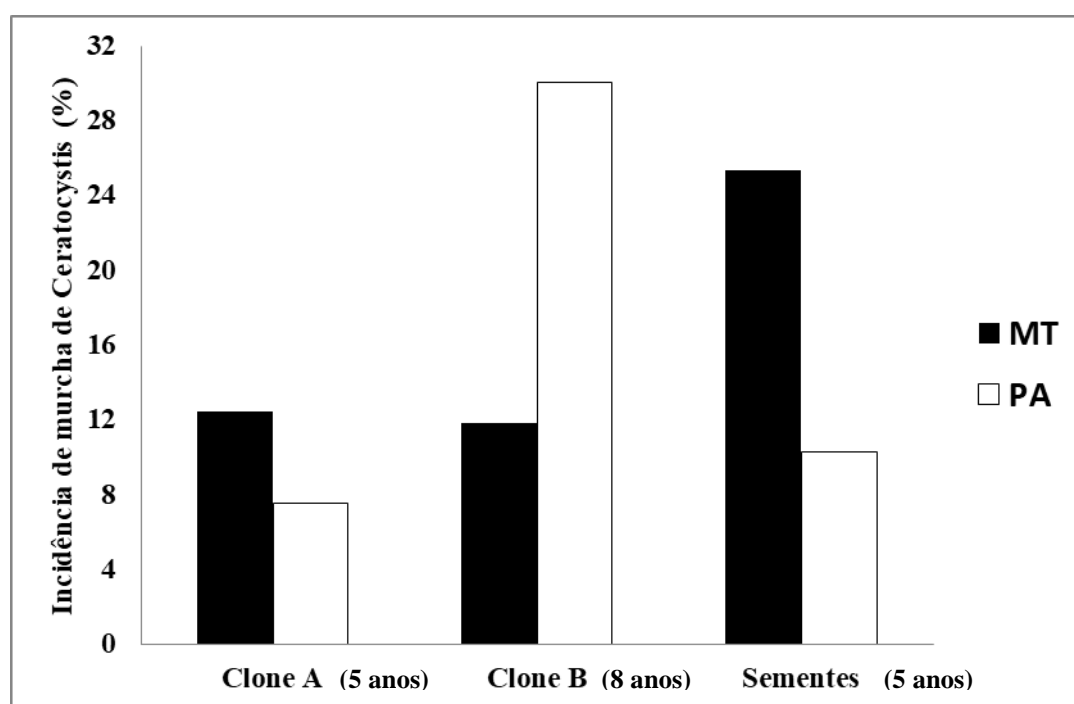
**Aplicação da Lei de Taylor modificada** – A aplicação da Lei de Taylor modificada foi realizada utilizando a relação linear entre o logaritmo da  $V_{bin}$  e o logaritmo da  $V_{obs}$  (**Maddaen & Hugles, 1995**), da seguinte forma:  $\text{Log}(V_{bin}) = \log(A) + b \log(V_{obs})$ , onde  $A$  e  $b$  são parâmetros. As regressões foram realizadas utilizando o programa Statistica<sup>®</sup> 6.0 (Stasoft, Tulsa, OK, EUA). Como variável independente foi considerada o logaritmo das variâncias binomiais e como variável dependente, o logaritmo das variâncias observadas para os mapas de cada parcela, para os dados de todas as parcelas de cada experimento e os dados de todas as mesmas em conjunto. A significância das relações (regressão linear) entre  $\log(V_{bin})$  e  $\log(V_{obs})$  foi determinada pelo teste  $F$  ( $<0,05$ ). Enquanto que a adequação do ajuste do modelo aos dados foi determinada por meio dos valores de coeficiente de determinação ( $R^2$ ) e pelos padrões de distribuição dos resíduos (**Maddaen & Hugles, 1995**). A igualdade dos parâmetros  $b = 1$  e  $\log(A) = 0$  foi avaliada por meio do teste  $t$  ao nível de 5% e 1% de probabilidade (**Maddaen & Hugles, 1995**), utilizando as estimativas destes parâmetros de aleatoriedade e seus erros padrões. Quando  $b = 1$  e  $\log(A) = 0$ , os dados seguem um padrão de distribuição ao acaso. Se  $b = 1$  e  $\log(A) > 0$ , existe um nível de agregação que independe da incidência. Por sua vez, quando  $b > 1$  e  $\log(A) > 0$  a distribuição espacial agregada está presente e esta varia de acordo com a incidência.

**Áreas Isopatas** – Os mapas com a distribuição de plantas afetadas pela *murcha-de-Ceratocystis* obtidos na última avaliação de cada parcela foram utilizados para elaborar uma matriz  $X$ ,  $Y$  e  $Z$ , onde  $X$  e  $Y$  correspondem à posição do quadrat dentro da parcela e  $Z$  aos valores de incidência de plantas infectadas em cada quadrat. As matrizes obtidas foram utilizadas para gerar as áreas isopatas correspondentes a cada parcela de acordo com o método Distance-Weighted Least Squares usando o programa Statistica<sup>®</sup> 6.0 (Stasoft, Tulsa, OK, EUA).

## RESULTADOS

**Isolamento e identificação do patógeno (diagnose molecular) associado com sintomas de murcha** – A região ITS1 e ITS4 dos isolados sequenciados apresentou 98% de similaridade com o isolado de referência de *C. fimbriata* (AY585345), pertencente ao Clado da América Latina.

**Análise temporal** – A incidência média da murcha-de-*Ceratocystis* na última avaliação em todas as parcelas nos dois Estados variou entre 8% a 30% (**Figura 3**).



**Figura 3:** Média final de incidência da murcha induzida pelo fungo *Ceratocystis fimbriata* (média de plantas afetadas em três parcelas por material comercial de teca) nas regiões de Cáceres–MT e Redenção–PA (2016).

A incidência variou em função do material genético, da região geográfica e do espaçamento entre plantas. Na região de Cáceres–MT (cujos talhões possuíam a mesma idade e mesmo espaçamento) as maiores incidências registradas (25,37%) foram para as parcelas que continham os materiais propagados através do método seminal (sementes). O ‘Clone A’ apresentou incidência de 12,44% e o ‘Clone B’ apresentou incidência de 11,81%. Na região de Redenção–PA, a influência do espaçamento entre plantas foi significativa. Apenas as

parcelas dos talhões do ‘Clone B’ que possuíam espaçamento maior (6 x 5 m) apresentaram maior incidência (30%). O ‘Clone A’ e o material seminal apresentaram incidências bem inferiores 8% e 10%, respectivamente (**Tabela 1**). As AACPD em talhões da região de Redenção-PA foram maiores que na região de Cáceres-MT, apresentando valores de 308 a 2035 e 288 a 1493, respectivamente (**Tabela 1**).

**Tabela 1.** Incidência da murcha-de-*Ceratocystis* em sete avaliações conduzidas em cultivos de teca em cada parcela no tempo e os valores do índice de dispersão para o quadrat 6 x 6, análise de sequencias ordinárias e da área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) para cada parcela nas regiões de Cáceres-MT e Redenção-PA.

Material vegetativo	Data <sup>1</sup>	DAA <sup>2</sup>	INC (%) <sup>3</sup>	D <sup>4</sup>	Sequencias ordinárias		AACPD <sup>7</sup>
				(6X6)	Linhas <sup>5</sup>	Colunas <sup>6</sup>	
Clone A-P1 MT	06.08.14	0	0,1	1,001*	7/7	0/6	597
	16.12.14	90	8,9	1,138*	11/13	10/12	
	03.03.15	180	1,1	1,213*	11/14	10/14	
	18.07.15	270	4,1	1,413*	11/19	7/19	
	16.12.15	360	4,1	1,413*	7/22	5/21	
	24.03.16	450	13,3	1,579*	1/23	4/27	
	26.07.16	540	16,3	1,349*	0/30	1/30	
Clone A-P2 MT	03.03.15	180	0,3	0,946	3/5	4/5	506
	18.07.15	270	3,6	1,370*	5/9	2/8	
	16.12.15	360	11,7	1,387*	4/12	3/11	
	24.03.16	450	11,7	1,387*	2/12	2/13	
	26.07.16	540	13,0	1,578*	0/30	1/30	
Clone A-P3 MT	06.08.14	0	1,4	1,514*	2/10	1/11	303
	16.12.14	90	1,4	1,514*	4/8	2/11	
	03.03.15	180	2,8	1,273*	2/15	2/19	
	18.07.15	270	2,8	1,273*	2/15	12/17	
	16.12.15	360	3,2	1,108*	3/18	2/19	
	24.03.16	450	5,2	1,146*	3/22	10/24	
	26.07.16	540	8,0	2,344*	4/30	1/30	
Clone B-P1 MT	06.08.14	0	0,3	1,232*	1/3	½	354
	16.12.14	90	1,4	1,675*	1/9	2/8	
	03.03.15	180	1,1	1,675*	1/9	7/9	
	18.07.15	270	1,1	1,353*	1/11	2/12	
	16.12.15	360	6,8	1,933*	3/25	5/25	
	24.03.16	450	7,1	1,874*	0/30	2/30	
	26.07.16	540	11,8	1,697*	0/30	1/30	
Clone B-P2 MT	06.08.14	0	0,2	0,973	0/2	0/2	302
	16.12.14	90	0,7	0,977	2/5	9/6	
	03.03.15	180	0,4	0,918	2/5	11/6	

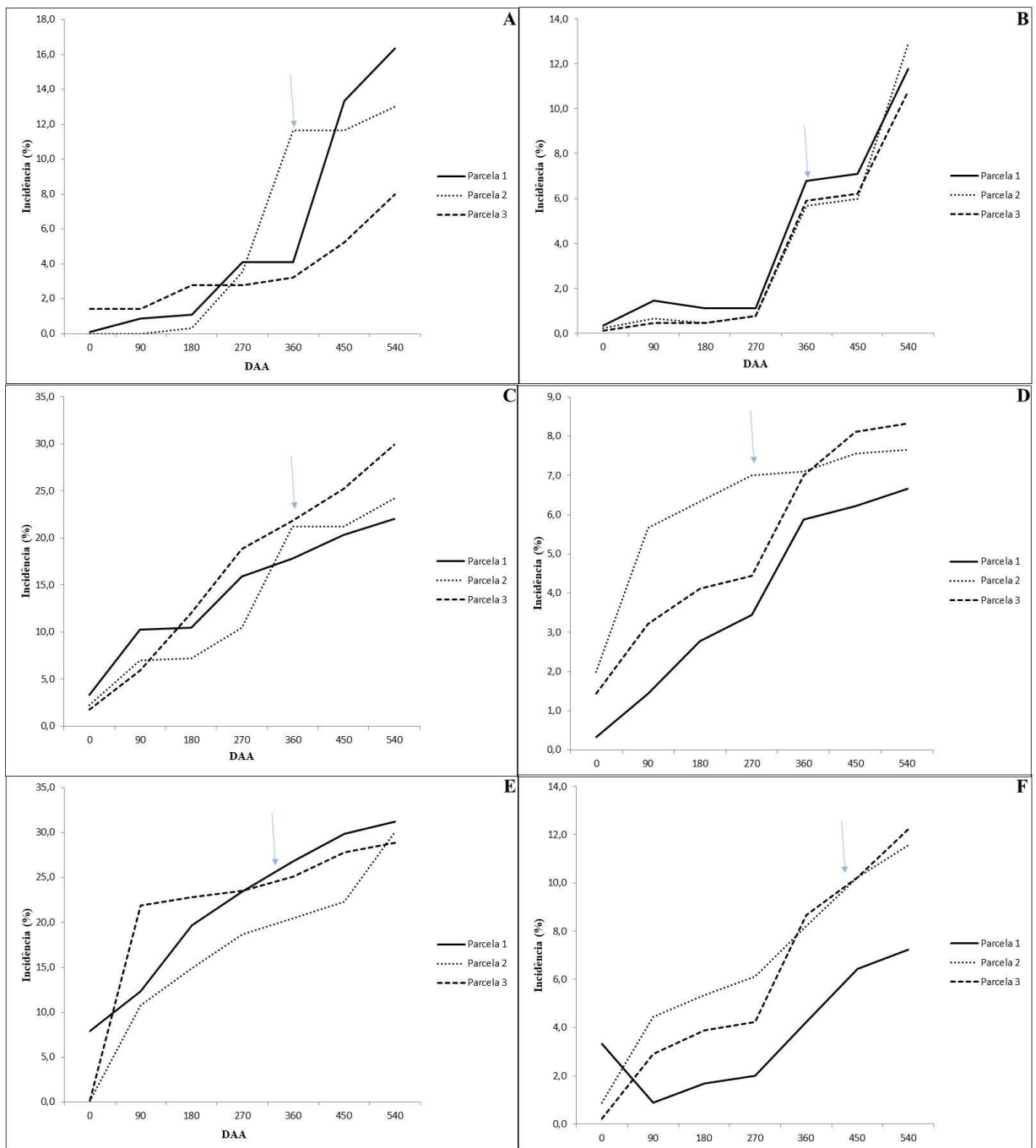
	18.07.15	270	0,8	0,832	2/9	8/9	
	16.12.15	360	5,7	4,662*	4/20	8/18	
	24.03.16	450	6,0	4,275*	3/24	8/20	
	26.07.16	540	12,9	2,973*	4/30	3/30	
<b>Clone B-P3 MT</b>	06.08.14	0	0,1	1,001*	0/1	1/1	
	16.12.14	90	0,4	0,918	1/4	¼	
	03.03.15	180	0,4	0,918	1/4	2/4	<b>288</b>
	18.07.15	270	0,8	0,835	1/5	2/7	
	16.12.15	360	5,9	1,634*	4/24	2/19	
	24.03.16	450	6,2	1,495*	2/30	2/30	
	26.07.16	540	10,8	1,693*	2/30	2/30	
<b>Sementes-P1 MT</b>	06.08.14	0	3,3	1,761*	1/13	0/12	
	16.12.14	90	10,2	2,197*	2/25	1/23	
	03.03.15	180	10,4	2,070*	3/26	11/26	<b>1310</b>
	18.07.15	270	15,9	1,713*	0/30	0/30	
	16.12.15	360	17,8	1,952*	1/30	0/30	
	24.03.16	450	20,3	2,304*	1/30	0/30	
	26.07.16	540	22,0	2,204*	1/30	0/30	
<b>Sementes-P2 MT</b>	06.08.14	0	2,2	1,718*	6/15	1/10	
	16.12.14	90	7,0	1,013*	1/11	2/10	
	03.03.15	180	7,2	1,045*	2/28	7/23	<b>1205</b>
	18.07.15	270	10,4	1,853*	1/28	1/29	
	16.12.15	360	21,2	1,853*	0/30	0/30	
	24.03.16	450	21,2	1,845*	0/30	0/30	
	26.07.16	540	24,2	1,894*	0/30	0/30	
<b>Sementes-P3 MT</b>	06.08.14	0	1,8	1,498*	0/10	3/8	
	16.12.14	90	5,9	1,423*	0/23	6/24	
	03.03.15	180	12,0	2,965*	1/24	10/23	<b>1493</b>
	18.07.15	270	21,8	2,425*	8/26	4/27	
	16.12.15	360	18,8	1,805*	1/29	2/30	
	24.03.16	450	25,2	2,574*	0/30	2/30	
	26.07.16	540	7,2	1,510*	0/30	1/30	
<b>Clone A-P1 PA</b>	06.08.14	0	0,3	1,232*	2/3	0/3	
	16.12.14	90	1,4	1,514*	1/9	2/10	
	03.03.15	180	2,8	1,273*	3/15	11/16	<b>349</b>
	18.07.15	270	3,4	1,423*	3/15	3/20	
	16.12.15	360	5,9	1,423*	3/19	2/26	
	24.03.16	450	6,2	1,495*	2/30	1/30	
	26.07.16	540	6,7	1,622*	3/30	2/30	
<b>Clone A-P2 PA</b>	06.08.14	0	2,0	1,341*	1/12	1/10	
	16.12.14	90	5,7	1,434*	0/21	7/21	
	03.03.15	180	6,3	1,359*	1/21	10/21	<b>578</b>
	18.07.15	270	7,0	1,303*	0/23	8/24	
	16.12.15	360	7,1	1,472*	6/27	2/29	
	24.03.16	450	7,6	1,479*	3/30	3/30	
	26.07.16	540	7,7	1,540*	3/30	1/30	

<b>Clone A-P3 PA</b>	06.08.14	0	1,4	1,148*	1/11	0/10	<b>477</b>
	16.12.14	90	3,2	1,430*	0/16	0/15	
	03.03.15	180	4,1	1,416*	14/19	1/17	
	18.07.15	270	4,4	1,450*	1/21	2/18	
	16.12.15	360	7,0	1,803*	2/27	3/26	
	24.03.16	450	8,1	2,212*	1/30	1/30	
	26.07.16	540	8,3	2,035*	0/30	2/30	
<b>Clone B-P1 PA</b>	06.08.14	0	7,9	1,782*	9/28	5/26	<b>1975</b>
	16.12.14	90	12,3	1,875*	6/30	2/30	
	03.03.15	180	19,7	3,682*	4/30	6/30	
	18.07.15	270	23,4	4,054*	3/30	0/30	
	16.12.15	360	26,8	4,149*	3/30	1/30	
	24.03.16	450	29,9	3,880*	1/30	1/30	
	26.07.16	540	31,2	4,048*	0/30	1/30	
<b>Clone B-P2 PA</b>	06.08.14	0	0,1	1,001*	0/1	0/1	<b>1533</b>
	16.12.14	90	10,8	5,011*	0/30	9/13	
	03.03.15	180	14,9	4,085*	6/30	4/30	
	18.07.15	270	18,7	3,990*	6/30	0/30	
	16.12.15	360	20,4	3,447*	3/30	0/30	
	24.03.16	450	22,3	2,830*	1/30	1/30	
	26.07.16	540	30,1	2,957*	2/30	1/30	
<b>Clone B-P3 PA</b>	06.08.14	0	0,2	0,973	1/1	1/1	<b>2035</b>
	16.12.14	90	21,9	2,289*	3/30	0/30	
	03.03.15	180	22,8	2,203*	3/30	2/30	
	18.07.15	270	23,6	2,199*	2/30	1/30	
	16.12.15	360	25,1	2,056*	1/30	1/30	
	24.03.16	450	27,8	2,108*	0/30	1/30	
	26.07.16	540	28,9	2,018*	0/30	1/30	
<b>Sementes-P1 PA</b>	06.08.14	0	3,3	0,946	1/2	½	<b>308</b>
	16.12.14	90	0,9	1,470*	2/8	2/8	
	03.03.15	180	1,7	2,028*	3/11	9/11	
	18.07.15	270	2,0	1,924*	3/11	0/12	
	16.12.15	360	4,2	1,259*	1/13	3/13	
	24.03.16	450	6,4	1,657*	2/20	2/23	
	26.07.16	540	7,2	1,510*	3/30	1/30	
<b>Sementes-P2 PA</b>	06.08.14	0	0,9	1,513*	1/7	0/3	<b>608</b>
	16.12.14	90	4,4	1,635*	2/20	0/19	
	03.03.15	180	5,3	2,542*	4/24	12/20	
	18.07.15	270	6,1	2,249*	3/26	4/21	
	16.12.15	360	8,2	2,313*	5/26	3/23	
	24.03.16	450	10,2	2,027*	3/28	2/26	
	26.07.16	540	11,6	1,887*	3/30	2/30	
<b>Sementes-P3 PA</b>	06.08.14	0	0,2	0,973	0/2	0/2	<b>542</b>
	16.12.14	90	2,9	2,376*	3/17	0/11	
	03.03.15	180	3,9	2,878*	5/21	11/16	
	18.07.15	270	4,2	2,954*	3/21	1/15	

16.12.15	360	8,7	2,954*	1/25	2/27
24.03.16	450	10,2	2,468*	2/30	2/30
26.07.16	540	12,2	2,082*	1/30	2/30

\*P: Parcela, MT: Parcelas localizadas na região de Cáceres-MT e Redenção-PA. <sup>2</sup>DAA: Dias após avaliação; <sup>3</sup>INC: Incidência de Murcha-de-*Ceratocystis*. <sup>4</sup>D: Índice de dispersão, (\*) valores significativamente maiores que 1 no teste do qui-quadrado ( $p < 0,05$ ). <sup>5</sup>Linhas: número de linhas que apresentam distribuição espacial agregada ( $Z_r < 1,64$ ) pelo número de linhas avaliadas. <sup>6</sup>Coluna: número de colunas (entre linhas) que apresentam distribuição agregada ( $Z_r < 1,64$ ) total de colunas avaliadas. <sup>7</sup>AACPD: área abaixo curva de progresso da doença

**Curva de progresso da doença** – Não foram observadas diferenças entre as curvas de progresso obtidas com os três materiais comerciais avaliados nas duas regiões estudadas. As curvas de progresso não apresentaram uma forma uniforme entre as parcelas (**Figura 4**). Além disso, a maioria das curvas de progresso não apresentou a forma característica dos modelos estatísticos tradicionais, embora o modelo monomolecular tenha apresentado um ajuste satisfatório para a maioria das parcelas localizadas no Pará (**Tabela 2**). Uma característica observada na maioria das curvas de progresso foi a presença de ondas de incidência, essas que podem estar relacionadas com os tratamentos culturais, especialmente o manejo de desrama.



**Figura 4:** Curvas de progresso da murcha-de-*Ceratocystis* linhas contínuas e pontilhadas indicam a evolução da doença em cada parcela. A: parcelas 1, 2 e 3 do Clone A (localizadas em Cáceres-MT); B: parcelas 1, 2 e 3 do Clone b (localizadas em Cáceres-MT) e C: parcelas 1, 2 e 3 do material seminal (localizadas em Cáceres-MT). D: parcelas 1, 2 e 3 do Clone A (localizadas em Redenção-PA); E: parcelas 1, 2 e 3 do Clone B (localizadas em Redenção-PA) e F: parcelas 1, 2 e 3 do material seminal (localizadas em Redenção-PA). \*DAA (Dias após avaliação). A seta indica intervalo da desrama e avaliação após desrama.



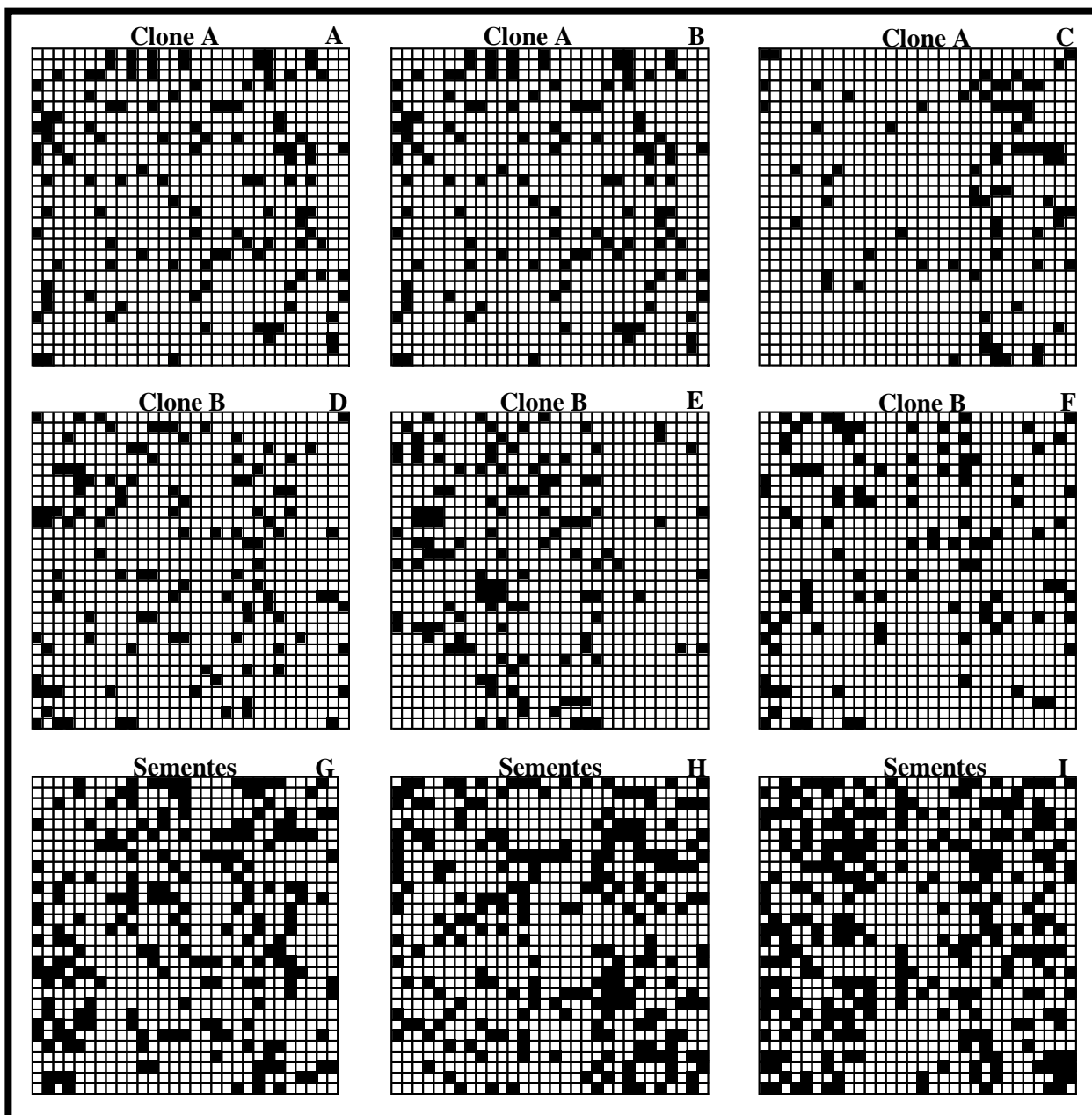
**Tabela 2:** Parâmetros, desvio padrão e coeficiente de determinação ( $R^2$ ) do modelo monomolecular, ajustado por meio de regressão não-linear aos dados de incidência da murcha-de-*Ceratocystis* em cultivos de teca nas regiões de Cáceres–MT e Redenção–PA.

Material vegetativo	Modelo monomolecular					
	INC (%) <sup>1</sup>	AACPD <sup>2</sup>	r <sup>3</sup>	b1 <sup>4</sup>	b2 <sup>5</sup>	R <sup>26</sup>
Clone A-P1 MT	6,9	597	0,74	0,003364	0,000255	0,55
Clone A-P2 MT	9,8	506	0,92	-0,02315	0,00031	0,86
Clone A-P3 MT	3,6	303	0,92	0,005459	0,000115	0,83
Clone B-P1 MT	4,2	354	0,91	-0,013232	0,000212	0,81
Clone B-P2 MT	3,8	302	0,87	-0,0201	0,00022	0,76
Clone B-P3 MT	3,5	288	0,96	0,003897	0,00639	0,92
Sementes-P1 MT	14,3	1310	0,97	0,050029	0,00039	0,95
Sementes-P2 MT	13,4	1205	0,96	0,013361	0,000496	0,92
Sementes-P3 MT	16,5	1493	0,94	0,063257	0,003557	0,95
Clone A-P1 PA	3,8	349	0,98	0,003492	0,00013	0,96
Clone A-P2 PA	6,2	578	0,85	-0,03483	0,000669	0,73
Clone A-P3 PA	5,2	477	0,98	0,016259	0,00014	0,96
Clone B-P1 PA	21,6	1975	0,96	0,117184	0,002523	0,97
Clone B-P2 PA	16,5	2035	0,96	0,033342	0,000574	0,93
Clone B-P3 PA	21,5	1533	0,81	0,098307	0,000529	0,65
Sementes-P1 PA	3,7	308	0,80	0,009306	0,000105	0,65
Sementes-P2 PA	6,7	608	0,98	0,01595	0,0002	0,97
Sementes-P3 PA	6,0	542	0,97	0,000168	0,00023	0,95

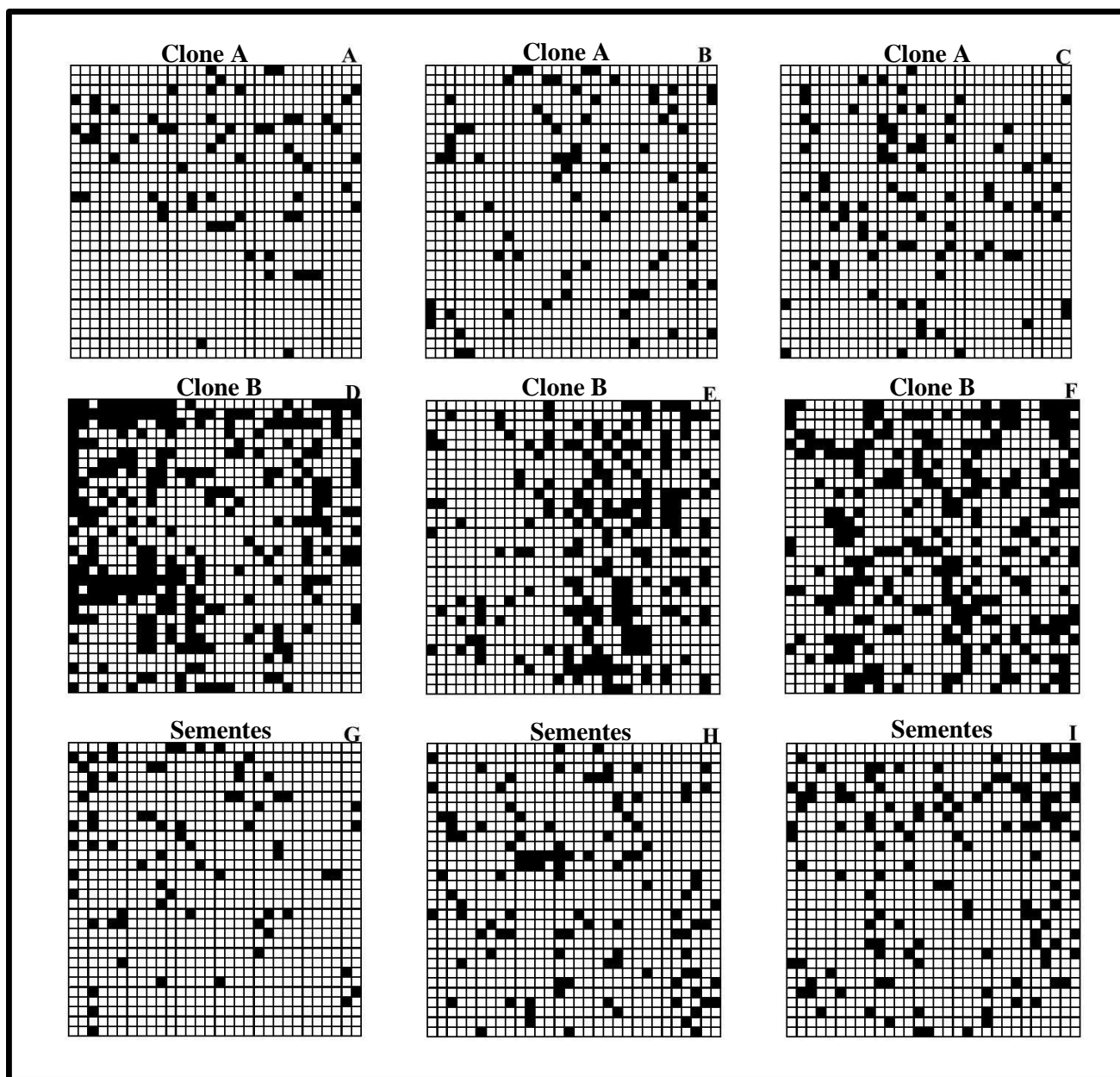
\*P: Parcela, MT: Parcelas localizadas na região de Cáceres-MT e PA: Parcelas localizadas na região de Redenção-PA. <sup>1</sup>INC: Incidência de Murcha-de-*Ceratocystis*. <sup>2</sup>AACPD: área abaixo da curva de progresso da

doença, <sup>3</sup>r: Padrão de resíduo; <sup>4</sup>b1: Assíntota máxima; <sup>5</sup>b2: Inóculo inicial; <sup>6</sup>R<sup>2</sup> Desvio padrão obtido para cada variável.

**Análise Espacial** – Os mapas contendo as plantas sintomáticas na última avaliação foram obtidos para os três materiais comerciais nas duas regiões estudadas. Esses mapas foram gerados para facilitar a visualização da agregação das plantas infectadas em cada parcela (**Figuras 5 e 6**).



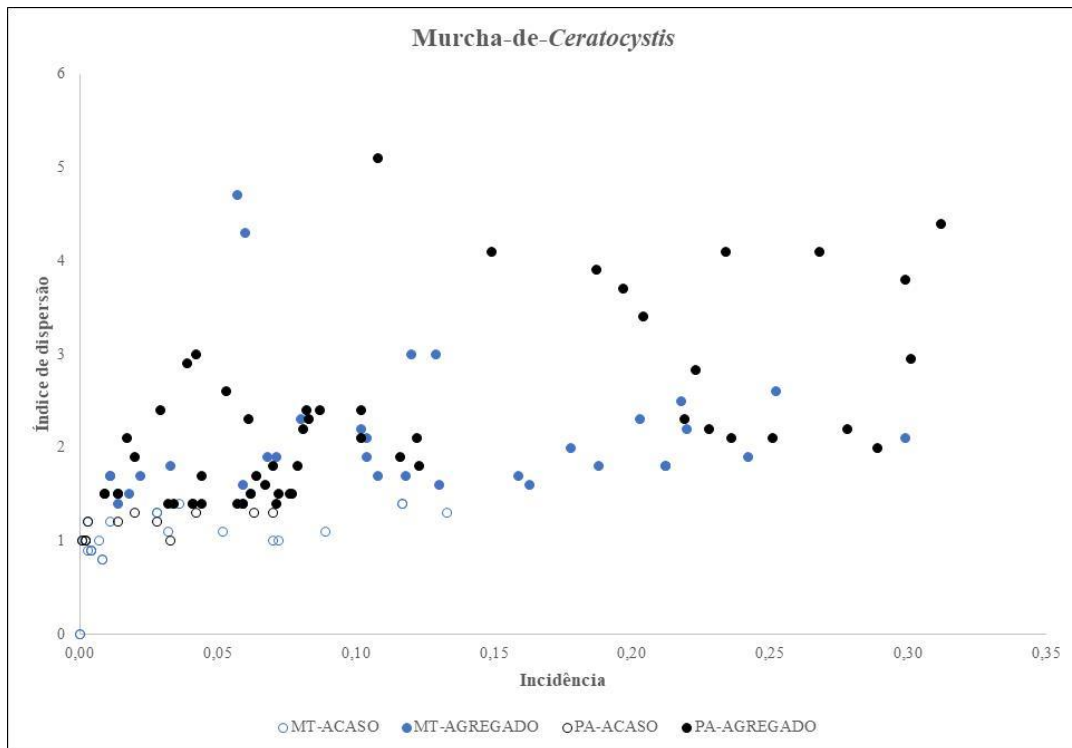
**Figura 5:** Mapa com a distribuição espacial de plantas infectadas com *Ceratocystis fimbriata* de cada parcela para os três materiais avaliados na região de Cáceres-MT na última avaliação. (A) Clone A- Parcela 1, (B) Clone A- Parcela 2, (C) Clone A- Parcela 3, (D) Clone B- Parcela 1, (E) Clone B- Parcela 2, (F) Clone B- Parcela 3, (G) Sementes- Parcela 1, (H) Sementes- Parcela 2, (I) Sementes- Parcela 3. Quadrados de cor preta representam plantas infectadas e os brancos para as plantas sadias.



**Figura 6:** Mapa com a distribuição espacial de plantas infectadas com *Ceratocystis fimbriata* de cada parcela para os três materiais avaliados na região de Redenção-PA na última avaliação. (A) Clone A- Parcela 1, (B) Clone A- Parcela 2, (C) Clone A- Parcela 3, (D) Clone B- Parcela 1, (E) Clone B- Parcela 2, (F) Clone B- Parcela 3, (G) Sementes- Parcela 1, (H) Sementes- Parcela 2, (I) Sementes- Parcela 3. Quadrados de cor preta representam plantas infectadas e os brancos para as plantas sadias.

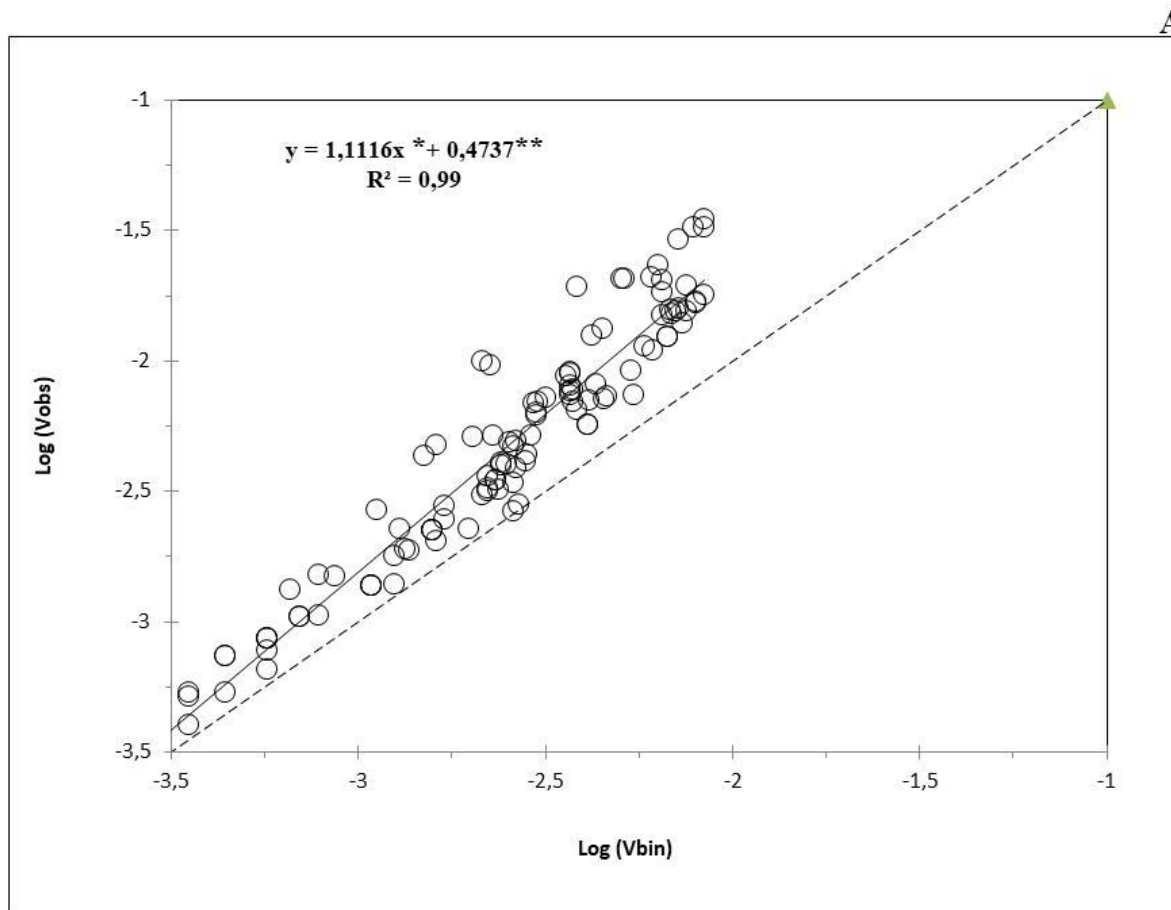
**Análise de sequências ordinárias** – A agregação de plantas com sintomas de murcha-de-*Ceratocystis* foi primeiramente examinada pela proximidade de plantas sintomáticas entre plantas adjacentes (**Tabela 1**). Em um total de 63 mapas de plantas sintomáticas, 52,53% e 73% apresentaram agregação, respectivamente para as avaliações realizadas em Cáceres-MT e Redenção-PA (**Tabela 1**). Em um total de 993 linhas para região de Cáceres-MT e 1381 para Redenção-PA avaliadas, apenas 151 (15,2%) e 150 (10,86%) apresentam agregação de plantas sintomáticas. A porcentagem de agregação de plantas sintomáticas entre linhas foi mais alta que dentro da linha. De um total de 1143 (Cáceres-MT) e 1369 (Redenção-PA) entre linhas avaliadas apenas 215 (18%) e 158 (11,54%) apresentavam plantas sintomáticas distribuídas de forma agregada.

**Índice de dispersão (D)** – Os valores do índice de dispersão (D) variaram de acordo com a parcela (**Tabela 1**). Em geral a maioria das avaliações utilizando quadrat de 6 x 6 apresentaram valores de D estatisticamente maiores que 1 ( $p > 0,05$ ), indicando maior tendência à agregação das plantas sintomáticas dentro da parcela (**Figura 7**). Não foram observadas diferenças significativas de distribuição espacial de plantas infectadas em função do material comercial ou região avaliada.



**Figura 7:** Valores do índice de dispersão (D) para dados de contagem de incidência de murcha-de-*Ceratocystis* em cultivos de teca em sete avaliações realizadas na região de Cáceres-MT e Redenção-PA.

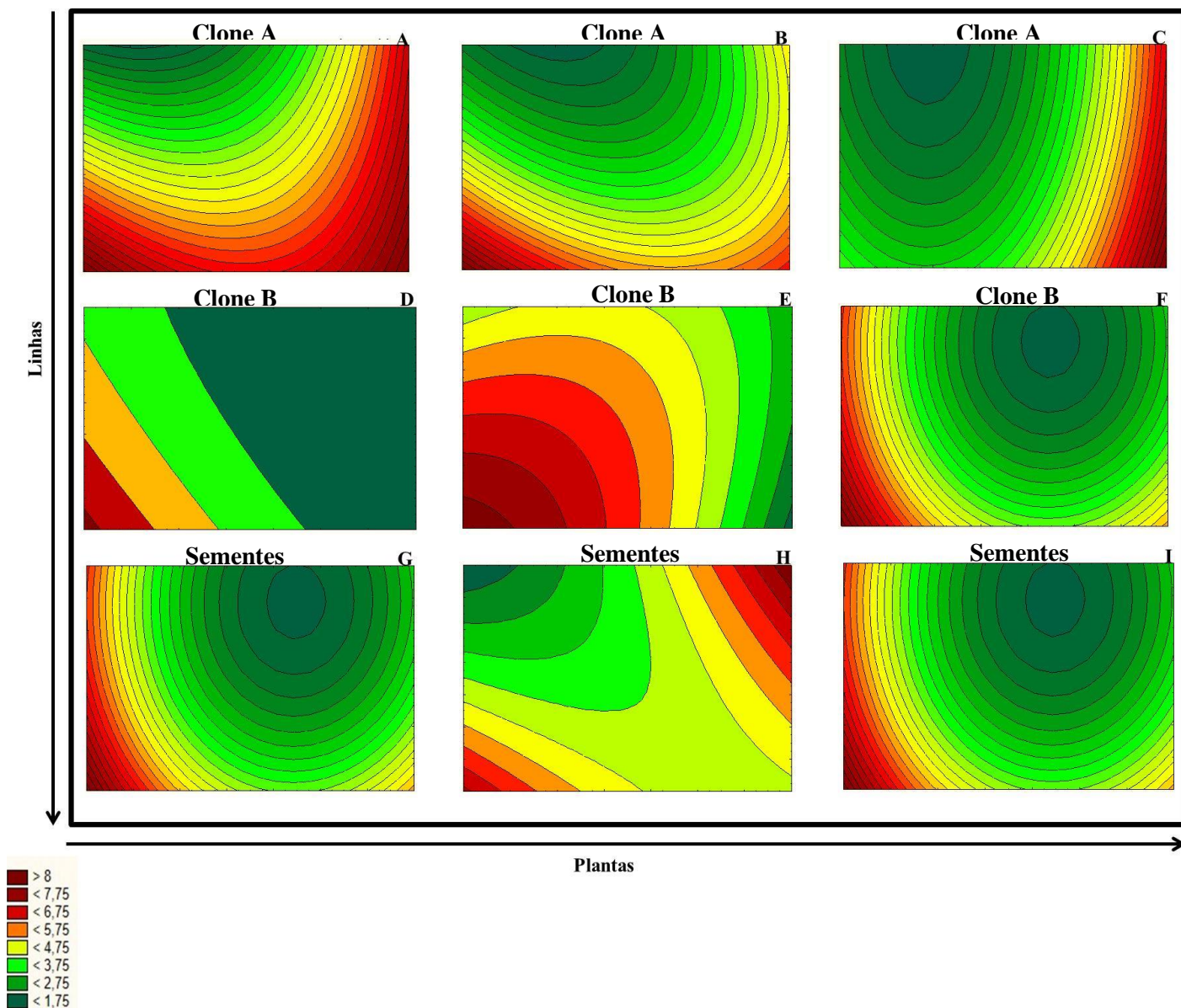
**Aplicação da Lei de Taylor modificada** – O padrão espacial da distribuição espacial da murcha-de-*Ceratocystis* foi analisado em todas as parcelas ao longo das sete avaliações, resumindo-se em 540 dias. Os resultados da aplicação da Lei de Taylor (**Figura 8**) apresentaram uma distribuição predominantemente agregada em todas as parcelas das duas regiões estudadas. Os valores de  $b$  e  $\log(A)$  da murcha-de-*Ceratocystis* para os materiais genéticos localizados na região de Cáceres-MT, para o ‘Clone A’, o ‘Clone B’ e o material seminal foram, respectivamente, 1,09 e 0,40 ( $R^2=0,98$ ), 1,25 e 0,98 ( $R^2=0,96$ ) e 1,15 e 0,65 ( $R^2=0,94$ ). Os valores de  $b$  e  $\log(A)$  dos materiais localizados na região de Redenção-PA, para ‘Clone A’, o ‘Clone B’ e o material seminal foram, respectivamente, 1,11 e 0,48 ( $R^2=0,97$ ), 1,23 e 0,97 ( $R^2=0,96$ ) e 1,21 e 0,89 ( $R^2=0,97$ ). Os materiais também foram analisados em função do material genético, sem considerar a região. Os valores de  $b$  e  $\log(A)$  para todas as parcelas dos ‘Clone A’, ‘Clone B’ e do material seminal foram, respectivamente, 1,11 e 0,47 ( $R^2=0,99$ ), 1,26 e 1,04 ( $R^2=0,98$ ) e 1,24 e 0,95 ( $R^2=0,96$ ).



**Figura 8:** Relação entre o logaritmo da variância observada [ $\log (V_{obs})$ ] e o logaritmo da variância binomial [ $\log (V_{bin})$ ] de murcha-de-*Ceratocystis* em teca na região de Cáceres-MT e Redenção-PA. Valores. Todas as avaliações nas suas regiões para todos os materiais genéticos (A). Em todas as avaliações utilizando tamanho de quadrat  $6 \times 6$ . \*= Valores estatisticamente diferentes de 1 e \*\*= Valores estatisticamente diferentes de 0 ( $P < 0,01$ ).

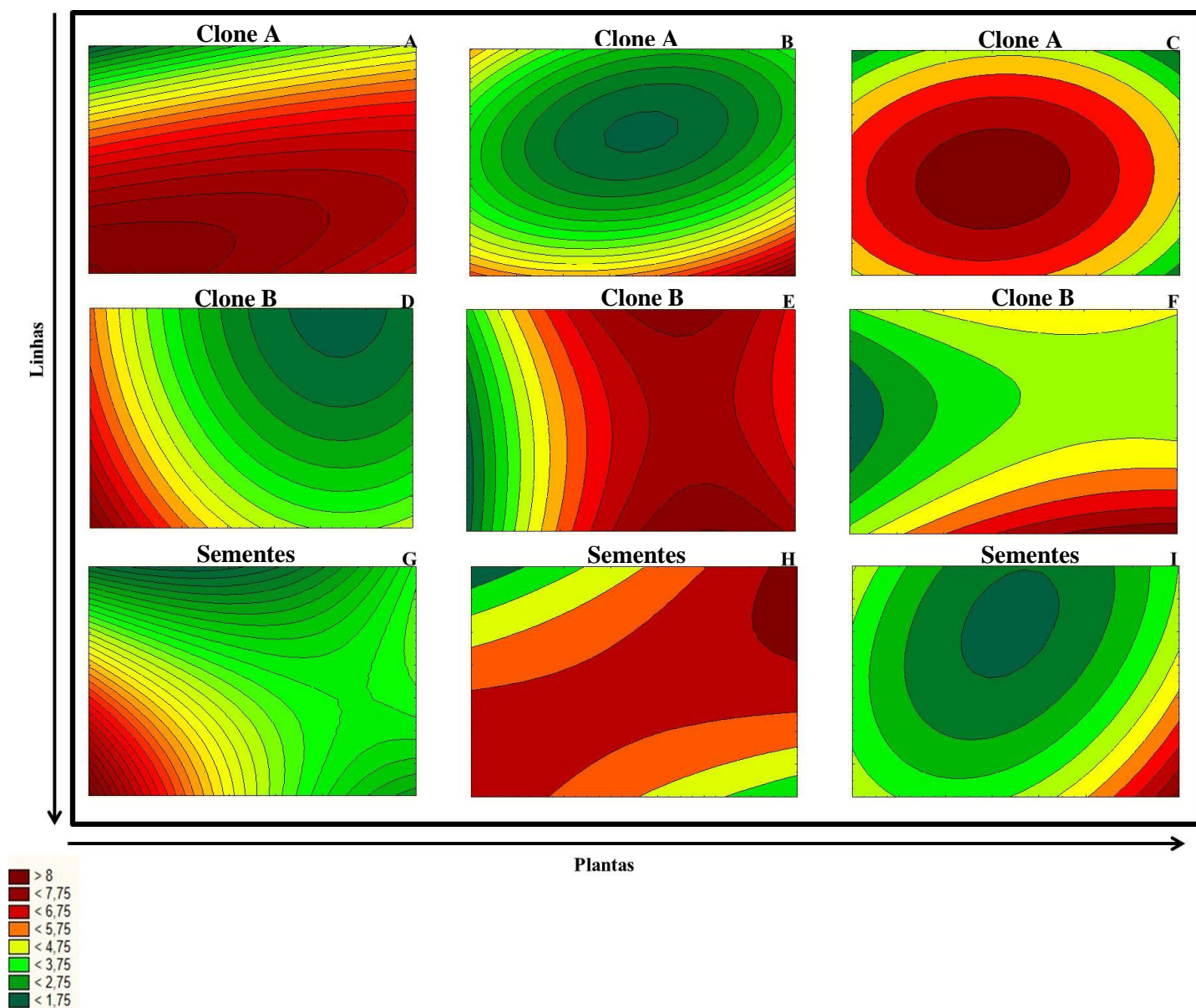
Considerando todas as parcelas (independente do material genético e região) os valores de b e  $\log (A)$  foram respectivamente iguais 1,22 e 0,99 ( $R^2=0,99$ ).

**Áreas Isopatas** – As áreas isópatas foram obtidas com os dados de incidência da última avaliação em todas as parcelas. Os padrões de focos obtidos foram diferentes para cada parcela, no entanto verifica-se um padrão agregado de plantas infectadas (**Figuras 9 e 10**).



**Figura 9:** Áreas isopatas obtidas com a incidência de *Ceratocystis fimbriata* em teca na última avaliação em cada parcela da região de Cáceres–MT. Onde: A, B e C representam respectivamente as parcelas 1,2 e 3 do ‘Clone A’; D, E e F representam respectivamente as parcelas 1,2 e 3 do ‘Clone B’ e G, H e I representam respectivamente as parcelas 1,2 e 3 do material seminal. Os valores arbitrários da escala de cores à direita, representam a variação da intensidade da doença independentemente da incidência real de cada parcela, onde: 7,0 representa a intensidade máxima da doença e 1,5 a ausência de doença. Quadrat 6 x 6.





**Figura 10:** Áreas isopatas obtidas com a incidência de *Ceratocystis fimbriata* em teca na última avaliação em cada parcela da região de Redenção-PA. Onde: A, B e C representam respectivamente as parcelas 1,2 e 3 do 'Clone A'; D, E e F representam respectivamente as parcelas 1,2 e 3 do 'Clone B' e G, H e I representam respectivamente as parcelas 1,2 e 3 do material seminal. Os valores arbitrários da escala de cores à direita, representam a variação da intensidade da doença independentemente da incidência real de cada parcela, onde: 7,0 representa a intensidade máxima da doença e 1,5 a ausência de doença. Quadrat 6 x 6.

## DISCUSSÃO

Taxas de incidências da murcha-de-*Ceratocystis* verificadas nas duas áreas experimentais de teca foram relativamente altas. A incidência variou em função do material genético e a região geográfica. Os métodos moleculares utilizados na detecção de plantas sintomáticas confirmaram a infecção pelo fungo *C. fimbriata* nas plantas assinaladas como sendo afetadas pelo patógeno.

No Brasil, as áreas comerciais de teca estão em expansão. Contudo, recentemente perdas de volumetria e qualidade da madeira, causadas por patógenos de solo têm sido observadas. A murcha-de-*Ceratocystis*, causada pelo fungo *C. fimbriata*, vem ganhando importância em termos de incidências nas regiões já tradicionais de produção e nas novas áreas de expansão de cultivo no Brasil. Um panorama semelhante foi observado na cultura do eucalipto. Com a expansão do cultivo de eucalipto para novas regiões, a murcha-de-*Ceratocystis*, tornou-se a doença mais relevante para a cultura.

A alternativa mais economicamente viável para o controle da murcha-de-*Ceratocystis*, em teca seria o uso de materiais com tolerância e/ou resistência à doença. Todavia, existe uma escassez de informação sobre fontes de resistência/tolerância nessa cultura. Além disso, o germoplasma de teca disponível no Brasil possui uma base genética muito estreita o que dificulta ainda mais a identificação de promissoras fontes de tolerância/resistência.

Nos ensaios descritos no presente trabalho, a incidência variou em função da região estudada, do material genético, do espaçamento entre plantas e do atraso no processo de desrama. Todos os materiais genéticos avaliados na região de Cáceres-MT apresentaram incidências mais elevadas quando comparados aos mesmos materiais da região de Redenção-PA, com exceção do 'Clone B'. Esse clone na região de Redenção-PA, apresentou níveis menores de incidência, sendo, aproximadamente, 2,5X maiores que os níveis observados no MT. Estudos anteriores mostraram que os materiais estudados apresentaram comportamentos

contrastantes em relação à suscetibilidade e à tolerância a *C. fimbriata* (Borges *et al.* 2015). Neste estudo os acessos com maior suscetibilidade ao fungo foram, respectivamente, o material seminal, o ‘Clone A’ e o ‘Clone B’. Os dados obtidos neste trabalho corroboram com esses resultados, especialmente nas parcelas localizadas na região de Cáceres–MT. Porém, na região de Redenção–PA, o ‘Clone B’ apresentou maior incidência que os demais materiais. A maior incidência verificada do ‘Clone B’ no Pará pode ser explicada não por maiores níveis de suscetibilidade, mas como resultado de um maior espaçamento. O espaçamento convencional de condução de floresta de teca é, geralmente, 4 x 3 m ou 4 x 4 m (linha x entre linhas). Entretanto, o ‘Clone B’ na região de Redenção–PA, foi conduzido com maior espaçamento (6 x 5 m), com o objetivo de realizar um menor número de desbastes e reduzir os custos em relação à desrama. Como houve alterações no calendário silvicultural para esse talhão, entende-se que o atraso destas atividades proporcionou condições favoráveis para o desenvolvimento do patógeno, tais como um talhão com uma floresta densa, gerando assim um microambiente com maior umidade. De acordo com o histórico do talhão, pode-se observar que ao longo das atividades de limpeza do talhão com roçadeiras, houve muitos ferimentos da base das mudas realizados por essa ferramenta, gerando aberturas naturais que favorecem a penetração do patógeno. Além disso, esse ‘Clone B’ ficou em um talhão que sofreu incêndio, o que pode ter interferido nos níveis de tolerância da planta, pois o fogo pode causar várias aberturas naturais ao longo do caule. Outro fator que deve ser levado em consideração, é o fato de que esse talhão foi plantado próximo a uma região de área de preservação permanente e reserva legal, áreas que proporcionam alta umidade nas suas cercanias. Sugere-se então que, nessa área, os níveis de inóculo no solo eram maiores em comparação com as demais parcelas. Uma alta correlação entre níveis de inóculo no solo e incidência da doença também foram observados em estudos realizados no estado de Minas Gerais com a murcha-de-*Ceratocystis* na cultura do eucalipto, sendo essas áreas anteriormente

ocupadas por nativas antes do plantio (**Ferreira et al. 2013**). Esses autores também relataram que, a alta incidência da doença nas áreas de coleta de brotos está relacionada à disseminação pelo corte de árvore para formação de broto e por ferramentas de poda utilizadas na coleta de brotações.

O processo de desrama na cultura da teca (de acordo com os padrões adequados do manejo da floresta) deve ser realizado de forma anual. Nas parcelas avaliadas com os acessos que apresentaram maior incidência da doença ('Clone A' e o material seminal), no entanto, foi verificado que houve atraso de quatro anos na desrama. Esse atraso levou ao engrossamento dos galhos laterais, dificultando o processo de cicatrização após a desrama, facilitando a entrada e permitindo que os ferimentos ficassem expostos por um período mais prolongado aos propágulos do patógeno. Na região de Redenção-PA, observa-se também atraso de dois anos na desrama para o 'Clone A' e no material seminal. Para o 'Clone B' (que teve a maior incidência) houve um atraso de três anos na desrama. Esses dados sugerem uma correlação positiva entre o atraso da desrama e a incidência da doença. Uma correlação positiva entre podas e limpezas periódicas nos talhões e o controle da murcha-de-*Ceratocystis* também foi verificado para a cultura da mangueira (**Moraes, 2014**).

As curvas de progresso da murcha-de-*Ceratocystis* obtidas no presente trabalho apresentaram, em geral, um aumento da incidência consistente, porém relativamente lento. O progresso da murcha-de-*Ceratocystis* tornou-se significativo a partir da terceira/quarta avaliação. Este incremento na incidência da murcha-de-*Ceratocystis* pode estar relacionado ao processo de desrama realizado nesses talhões. Sendo que o material seminal na região de Cáceres-MT apresentou incidências elevadas e mais precoces (a partir da segunda avaliação). A explicação mais provável para essa alta incidência no início das avaliações deve ser a alta suscetibilidade do material genético e, atraso de desbaste no talhão que, resultou em uma floresta densa com níveis de umidade mais elevados, proporcionando assim, condições mais

favoráveis para o desenvolvimento do patógeno. Resultados similares com murcha-de-*Ceratocystis* em eucalipto foram obtidos por **Fernandes et al. (2012)**, onde plantas desenvolveram sintomas mais rapidamente e mortalidade mais acentuada até o 2º ano sendo que, posteriormente, o progresso da doença reduziu até a colheita. Os três materiais genéticos avaliados na região de Redenção-PA, apresentaram comportamentos parecidos, porém o ‘Clone B’ apresentou alta incidência desde a primeira avaliação em relação aos outros acessos pelos motivos já mencionados.

Não foi possível realizar nenhum ajuste de modelo para os materiais avaliados na região de Cáceres-MT. Ainda assim, foram observadas ondas de incremento incidência ao longo da curva de progresso, fato esse que pode estar relacionado aos tratos culturais realizados no manejo silvicultural das florestas. Esses tratos, possivelmente podem ter gerado novos sítios de infecção, e desse modo trouxe picos de incidência resultante de cada procedimento de desrama que podem ser visualizados na curva na forma de ondas.

As curvas de progresso obtidas para as parcelas localizadas na região de Redenção-PA, apresentaram um melhor ajuste ao modelo monomolecular. Ondas de incremento de incidência também foram observadas, no entanto, menos marcantes que nas parcelas localizadas na região de Cáceres-MT. **Bergamin & Amorim (1995)** descreveram que o modelo monomolecular é o que melhor se ajusta a doenças tipo murchas vasculares. Esse mesmo modelo também foi selecionado por **Ferreira et al. (2013)** como o modelo de melhor ajuste para o progresso da murcha-de-*Ceratocystis* no cultivo de eucalipto nos Estados de Minas Gerais e da Bahia. Estudos realizados, também com a murcha-de-*Ceratocystis* no cultivo do Eucalipto em diferentes regiões do Estado de Minas Gerais indicaram um bom ajuste ao modelo monomolecular (**Fernandes et al., 2012**).

Os dados do índice de dispersão e Lei de Taylor modificada, demonstraram que a distribuição espacial das plantas de teca exibindo sintomas da murcha-de-*Ceratocystis*, nas

duas regiões estudadas, foi predominantemente agregada. O padrão tipicamente agregado sugere a ocorrência de forte disseminação secundária, seja via infecção radicular em solo infestado, ou devido aos tratos culturais realizados de forma não adequada que ajudam a dispersar os propágulos do patógeno em regiões circunvizinhas das plantas inicialmente infectadas. Não foi ainda confirmada a ocorrência de vetores do agente causal da murcha-de-*Ceratocystis* nas áreas de teca das duas regiões estudadas. O envolvimento de inseto vetor do fungo *C. fimbriata* já foi verificado previamente na cultura da mangueira – *Mangifera indica* (Moraes, 2014). No entanto, diferente do que foi observado por Ferreira *et al.* (2013) em eucalipto, não foram verificados, no presente trabalho, indícios da associação de insetos vetores nos troncos e ramos de plantas afetadas (ex. galerias e orifícios) nas análises cuidadosas foram conduzidas em todas as plantas afetadas. Dessa forma, acredita-se que, no caso do cultivo da teca nas áreas estudadas, os principais mecanismos de disseminação da murcha-de-*Ceratocystis* sejam mediados por outros fatores incluindo: respingos de chuva, plantio em solo contaminado e os tratamentos silviculturais.

De acordo com o observado no presente trabalho, a permanência no solo de ramos infectados após o processo de desrama pode se constituir em um dos mais importantes fatores associados com o aumento de infecções secundárias de *C. fimbriata* nos plantios de teca. O fungo pode permanecer por um longo período na área de cultivo na forma saprofítica em fragmentos de ramos e resíduos de madeira, servindo como uma fonte de produção de novos propágulos que irão infectar árvores sadias nas regiões adjacentes.

No caso das operações de desbaste das árvores durante a transição de planta juvenil para planta adulta, a manutenção de numerosas fontes de propágulos vem acompanhada de um posterior incremento nos níveis de infecção de indivíduos saudáveis, como observado nas duas áreas estudadas. Ferreira *et al.* (2013), estudando a murcha-de *Ceratocystis* em eucalipto obtiveram um padrão de distribuição similar ao reportado no presente estudo.

**Tumura et al. (2012)**, também estudando a murcha-de-*Ceratocystis* em eucalipto, observaram padrão espacial semelhante. Em trabalhos realizados com a murcha-de-*Ceratocystis* na cultura da manga, observou-se um padrão espacial agregado de plantas infectadas (**Moraes, 2014**). Em estudo realizado com *Pinus pinaster*, estudando a podridão de raiz, causada por *Armillaria ostoyae* com objetivo de estudar os efeitos do comprimento de rotação sobre a evolução da virulência, aliado às operações de desbaste, observou-se que rotações curtas em plantios florestais aceleram a evolução de virulência em fungos patogênicos com podridão radicular. Os resultados estão de acordo com a hipótese de que o cenário envolvendo o maior número de operações de corte raso gerou, nas simulações, um aumento de incidência e uma taxa de disseminação mais rápida da doença, sugerindo que a liberação da pressão de seleção em cada corte foi largamente compensada pela redução da (1) deriva genética; (2) dos efeitos de fundador; e (3) da magnitude dos eventos de regulação de densidade (**Soularue et al. 2017**).

Diante do perfil de agregação verificado, acredita-se que a doença ocorre desde a fase de viveiro. De fato, infecções por *C. fimbriata* em viveiro de teca têm sido sistematicamente constatadas em diferentes visitas técnicas. As mudas infectadas que são levadas para campo, tornam-se os focos iniciais da doença. Posteriormente, a propagação da doença ocorre via ferramenta de desrama, propagação através do contato radicular e durante as operações de desbaste fitossanitário via contaminação das ferramentas após contato com árvores doentes sem uma posterior esterilização e/ou limpeza do instrumental para uso subsequente em outras árvores. **Ferreira et al. (2013)**, analisaram o padrão espacial da murcha-de-*Ceratocystis* em Eucalipto e concluíram que houve uma predominância de agregação de plantas. Um estudo da dinâmica espaço-temporal da murcha-de-*Ceratocystis* em *M. indica*, observou-se que a poda e limpeza periódica nos talhões contribuem para redução de fontes de inóculos (**Moraes, 2014**). Além disso, **Blaedow & Juzwik (2010)** e **Wu et al. (2011)** salientaram que o contato

entre as raízes de plantas saudáveis e doentes é um importante mecanismo de dispersão de espécies do gênero *Ceratocystis* em condições de cultivo.

O progresso temporal e espacial da murcha-de-*Ceratocystis* em teca foi muito influenciado pelos métodos de manejo silviculturais bem como pelo material genético. As informações obtidas nesse estudo são importantes para a elaboração de estratégias de manejo mais eficientes da murcha-de-*Ceratocystis*. Os dados sugerem que o manejo fitotécnico e fitossanitário devem ser mais rígidos. Neste contexto, recomenda-se então a utilizar materiais genéticos resistentes ou tolerantes, evitar implementação de cultivos próximos a áreas úmidas (ex. áreas próximas a cursos de água), realizar a detecção precoce de mudas doentes desde a fase de viveiro (evitando levar a campo materiais já infectados), obedecer de maneira rígida o cronograma silvicultural e remover plantas doentes do campo a fim de evitar infecções secundárias.



## CONCLUSÕES

- ✓ A incidência da murcha-de-*Ceratocystis* variou em função dos materiais comerciais, da idade das plantas e da região avaliadas;
- ✓ As curvas de progressos apresentaram ondas de incremento de incidência que devem estar relacionadas com a adoção de tratamentos culturais e manejo inadequado do cultivo;
- ✓ O padrão de distribuição espacial de plantas infectadas com *C. fimbriata* foi predominantemente agregado;
- ✓ A disseminação secundária por desrama artificial é a principal responsável pela fonte secundária de propágulos da murcha-de-*Ceratocystis* em teca em condições de campo;
- ✓ O manejo fitotécnico e manejo fitossanitário devem ser melhorados e realizados desde a fase de viveiro e prosseguir em condições de campo até o ciclo final da cultura;
- ✓ As operações silviculturais têm um impacto substancial em relação à disseminação do patógeno.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFENAS, A. C. **2009**. Clonagem e Doenças do Eucalipto, 2<sup>nd</sup> ed. Viçosa, Minas Gerais, Brazil: Editora UFV, 500 p.
- BLAEDOW, R.A & JUZWIK, J. **2010**. Spatial and temporal distribution of *Ceratocystis fagacearum* in roots and root grafts of oak wilt affected red oaks. *Journal of Arboriculture* 36: 28–34.
- BORGES, R.C.F.; SANTOS, M.D.M.; MACEDO, M.A.; MARTINS, I.; NASCIMENTO, A.G.; CAFÉ-FILHO, A.C.; BOITEUX, L.S.; FONSECA, M.E.N.; INÁCIO, C.A & MELLO, S.C.M. **2015**. A trunk canker disease of *Tectona grandis* induced by *Lasiodiplodia theobromae* in Brazil. *New Disease Reports* 31: 26.
- BORGES, R.C.F.; MACEDO, M. A.; CABRAL, C.S.; ROSSATO, M.; FONTES, M.G.; SANTOS, M.D.M.; FERREIRA, M.A.; FONSECA, M.E.N.; REIS, A & BOITEUX, L.S. **2018**. Vascular wilt of teak (*Tectona grandis*) caused by *Fusarium oxysporum* in Brazil. *Phytopathologia Mediterranea* 57: 115-121.
- BORGES, R.C.F.; MACEDO, M. A.; FERREIRA, M.A.; FONSECA, M.E.N.; & BOITEUX, L.S. **2015**. Reação de acessos de teca (*Tectona grandis*) a *Ceratocystis fimbriata*. **2015**. Anais do Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas. Goiânia-GO, Brasil.
- FERREIRA, M.A.; HARRINGTON, T.C.; GONGORA-CANUL, C.C.; MAFIA, R.G.; ZAUZA, E.A.V & ALFENAS, A.C. **2013**. Spatial–temporal patterns of *Ceratocystis* wilt in *Eucalyptus* plantations in Brazil. *Forest Pathology* 43: 153–164.
- FERNANDES, B. V. **2012**. Dinâmica espaço-temporal e quantificação dos danos e perdas da murcharde-*Ceratocystis* em eucalipto na produção de carvão vegetal. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP. 77 p
- FIGUEIREDO, E.O.; OLIVEIRA, L.C & BARBOSA, L.K.F. **2005**. Teca (*Tectona grandis* L.f.): Principais Perguntas do Futuro Empreendedor Florestal. Embrapa Acre. 87 p.
- FIRMINO, A.C.; TOZZE JR, H.J & FURTADO, E.L. **2012**. First report of *Ceratocystis fimbriata* causing wilt in *Tectona grandis* in Brazil. *New Disease Reports* 25: 24.
- MADDEN, L. V. & HUGLES, G. **1995**. Plant disease incidence: Distribution, heterogeneity, and temporal analysis. *Annual Review of Phytopathology* 33: 529–564.

MORAES, W. B. **2014**. Dinâmica espaço-temporal da murcha de *Ceratocystis* em *Mangifera indica* e associação da doença a potenciais vetores. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG. 89 p.

SOULARUE, J. P.; ROBIN, C.; DESPREZ-LOUSTAU, M.L & DUTECH, C. **2017**. Short rotations in forest plantations accelerate virulence evolution in root-rot pathogenic fungi. *Forests* 8: 205

TUMURA, K.G.; DE PIERI, C & FURTADO, E.L. **2012**. *Ceratocystis* wilt in eucalyptus: Evaluation of resistance and epidemiological analysis. *Summa Phytopathologica* 38: 54–60.

WHITE, T.J.; BRUNS, T.; LEE, S & TAYLOR, J. **1990**. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ and White TJ (eds) PCR protocols. A guide to Methods and Applications. Academic Press, San Diego 315–322.

WU, C.P.; CHEN, G.Y.; LI, B.; SU, H.; AN, Y.L.; ZHEN, S.Z.; YE, J.R. **2011**. Rapid and accurate detection of *Ceratocystis fagacearum* from stained wood and soil by nested and real time PCR. *Forest Pathology* 41: 15–21.

## **Capítulo 3**

**Dinâmica espaço-temporal do cancro da teca (*Lasiodiplodia theobromae*)**

## RESUMO

A teca (*Tectona grandis* L. f., família Lamiaceae) é uma espécie arbórea originária da Ásia que apresenta madeira de elevada qualidade. Embora com excelente adaptação, o cultivo da teca no Brasil tem enfrentado diversos problemas fitossanitários incluindo, mais recentemente, o cancro da teca (*Lasiodiplodia theobromae*). Os estudos sobre aspectos epidemiológicos do cancro da teca no Brasil ainda são escassos. Neste contexto, o objetivo do presente trabalho foi caracterizar o padrão espaço-temporal do cancro da teca em duas regiões produtoras do Brasil. As parcelas experimentais foram localizadas em áreas de produção comercial de teca. Seis áreas foram selecionadas, sendo três áreas em Redenção (Estado do Pará-PA) e três áreas em Cáceres (Estado do Mato Grosso-MT). O progresso da doença nessas áreas foi avaliado entre agosto de 2014 e julho de 2016. Dezoito parcelas foram demarcadas, sendo nove na região de Cáceres-MT e nove na região de Redenção-PA. Em cada região três talhões foram demarcados. Em cada talhão foram demarcadas três parcelas, contendo 900 plantas (30 x 30) cada. Três genótipos comerciais de teca ('Clone A', 'Clone B' e material seminal) suscetíveis ao cancro foram avaliados. Cada talhão foi composto por apenas um material genético com três repetições (= parcelas). A avaliação da incidência de plantas infectadas foi realizada pela anotação da presença (ou ausência) de sintomas característicos da doença em intervalos de 90 dias. Plantas apresentando formação de cancro no caule e nos ramos associadas à exsudação de goma, murcha, queda prematura de folhas foram consideradas como plantas infectadas por *L. theobromae*. Adicionalmente, amostras de plantas sintomáticas em cada parcela em cada data de avaliação foram coletadas e analisadas por métodos moleculares para confirmação do diagnóstico visual. No presente estudo, os dados combinados da sequência ITS e TEF-1 $\alpha$  permitiram melhor caracterizar espécies crípticas dentro do complexo de espécies *L. theobromae* para teca, descrita aqui como *L. euohorbicola* e *L. parva*. Na região de Cáceres-MT apresentou a ocorrência das três espécies agrupadas na árvore filogenética. Por sua vez, apenas duas espécies (*L. euphorbicola* e *L. theobromae*) foram identificadas na região de Redenção-PA. Incidências baixas a médias foram verificadas nas duas áreas de produção. As diferenças de incidências em relação aos materiais genéticos e as regiões estudadas podem estar intimamente relacionadas às questões genéticas dos materiais vegetais, variabilidade genética do patógeno, além das condições silviculturais de cada talhão. O progresso temporal e espacial do cancro foi influenciado pelos métodos de manejo silviculturais, pelo material genético empregado no plantio e pela diversidade genética do patógeno. As informações obtidas permitirão refinar a elaboração de estratégias de manejo do cancro da teca, incluindo: a utilização de materiais genéticos

tolerantes, a eliminação de plantas doentes no início da epidemia, evitando a desrama em época de chuva (para reduzir a dispersão de inóculo no período de máxima suscetibilidade da cultura).

## ABSTRACT

Teak (*Tectona grandis* L. f., family Lamiaceae) is a tree species native to Asia with increasing economic importance in Brazil. Although with excellent adaptation, the cultivation of teak in Brazil has faced several phytosanitary problems including, more recently, the teak canker caused by *Lasiodiplodia theobromae*. Studies on the epidemiological aspects of teak canker in Brazil are still scarce. In this context, the objective of the present study was to characterize the spatio-temporal pattern of teak canker in two producing regions of Brazil. The experimental plots were located in areas of commercial production of teak. Six areas were selected, being three areas in Redenção (State of Pará–PA) and three areas in Cáceres (State of Mato Grosso–MT). The progress of the disease in these areas was evaluated between August 2014 and July 2016. Eighteen plots were demarcated, nine in the region of Cáceres–MT and nine in the region of Redenção–PA. In each region, three plots were demarcated. Three replicates (containing 900 plants each) were demarcated in each plot. Three commercial teak genotypes (‘Clone A’, ‘Clone B’, and seminal material) susceptible to cancer were evaluated. Each plot was composed of only one material with three replicates (= plots). The evaluation of the incidence of infected plants was carried out by annotating the presence (or absence) of symptoms characteristic of the disease at intervals of 90 days. Plants exhibiting cancer formation in the stem and branches associated with gum exudation, wilting, premature leaf fall were considered as *L. theobromae* infected plants. In addition, samples of symptomatic plants in each plot at each evaluation date were collected and analyzed by molecular methods to confirm the visual diagnosis. In the present study, combined data from the ITS and TEF-1 $\alpha$  sequence allowed better characterization of cryptic species within the *L. theobromae* species complex for teak, described here as *L. euohorbicola* and *L. parva*. In the region of Cáceres–MT presented the occurrence of three species grouped in the phylogenetic tree. In turn, only two species (*L. euphorbicola* and *L. theobromae*) were identified in the region of Redenção–PA. Low to medium incidences were observed in the two production areas. The temporal and spatial progression of canker was influenced by the silvicultural management methods, the genetic material used in planting as well as the genetic diversity of the pathogen. The information obtained will enable further development of strategies for the management of teak canker, including: the use of tolerant genetic materials, the elimination of diseased plants at the beginning of the epidemic, avoiding the removal of branches during the rainy season (aiming to reduce the dispersion of inoculum in the period of maximum susceptibility of the plant).

## INTRODUÇÃO

*Tectona grandis* L.f. (comumente denominada teca) é uma espécie arbórea exótica, de origem asiática. Após 100 anos de cultivo restrito a alguns países da Ásia, os plantios da teca começaram a se expandir para distintas regiões com condições climáticas semelhantes, como a África Ocidental, América Latina e o Caribe (**Figueiredo et al. 2005**). No Brasil, os primeiros plantios foram realizados no município de Cáceres–MT na década de 1970. A implantação da cultura da teca no Brasil tem se mostrado promissora e observa-se uma consistente expansão nos últimos anos devido a sua excelente adaptação e também ao seu alto valor econômico comparado com espécies arbóreas (**IPEF, 2003**). De fato, o cultivo da teca nas condições brasileiras vem sendo particularmente vantajoso devido à possibilidade de obtenção de madeira de elevada densidade e pela redução observada no ciclo de produção quando comparado aos países de origem da espécie.

Embora com excelente adaptação, o cultivo da teca no Brasil tem enfrentado diversos problemas fitossanitários (**Firmino et al. 2012; Borges et al. 2015 e 2018**). O primeiro registro formal do cancro da teca (causado pelo fungo *Lasiodiplodia theobromae*) no Brasil foi realizado por **Borges et al. (2015)**. Essa doença passou a ganhar relevância apenas recentemente em função do aumento constante da sua incidência nas principais regiões produtoras. Atualmente o cancro é considerado sendo a segunda principal doença para a cultura nas regiões de maior produção, causando sintomas como escurecimento, rachadura da casca, formação de cancro no caule e nos ramos, exsudação de goma, murcha, queda das folhas e até a morte da planta ao final do ciclo de produção (**Borges et al. 2015**).

O controle químico do cancro da teca não oferece proteção preventiva e/ou curativa efetiva da cultura (**Tavares, 1995**). Além disso, a enorme gama de hospedeiros alternativos do fungo *L. theobromae* dificulta o controle e o manejo da doença em condições naturais. O controle do cancro da teca exige, portanto, um leque de estratégias de manejo.



O desenvolvimento de estratégias eficientes e adequadas para manejo de doenças exige a compreensão dos mecanismos envolvidos e dos fatores que determinam a taxa de progresso de surtos epidêmicos (**Bergamin Filho & Amorim, 1996**). No caso particular do cancro da teca, os estudos sobre aspectos epidemiológicos dessa doença no Brasil ainda são escassos. Nesse contexto, o presente trabalho teve como intuito de contribuir para a compreensão dos aspectos epidemiológicos do cancro da teca no Brasil. O principal objetivo do presente trabalho foi estudar o padrão espaço-temporal do cancro da teca em duas regiões produtoras de teca do Brasil.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

**Descrição das áreas avaliadas** – As parcelas experimentais foram localizadas em áreas de produção comercial de teca. Foram selecionadas seis áreas, sendo três em Redenção no Estado do Pará, (localizadas a 08° 01' 43" ao sul, 50° 01' 53" a oeste e a 227 metros de altitude) e três em Cáceres no Estado do Mato Grosso (16° 04' 14" ao sul e 57° 40' 44" a oeste e altitude de 118 metros de altitude). O progresso do cancro da teca nessas áreas foi avaliado durante período compreendido entre agosto de 2014 e julho de 2016.

**Desenho experimental** – Dezoito parcelas foram demarcadas, sendo nove em cada estado. Em cada estado três talhões foram demarcados, sendo três parcelas por talhão, contendo 900 plantas (30 x 30) cada. Três acessos comerciais de teca ('Clone A', 'Clone B' e material seminal) foram avaliados nas duas regiões, sendo todos previamente identificados como suscetíveis ao cancro (*L. theobromae*). Os talhões dos três materiais genéticos avaliados na região de Cáceres–MT foram conduzidos no espaçamento 4 x 4 m (linha x entre linhas) e na última avaliação apresentavam cinco anos de idade. Os materiais da região de Redenção–PA foram dispostos em espaçamento distintos e apresentavam idades diferentes. O 'Clone A' e seminal foram conduzidos no espaçamento 4 x 4 m (linha x entre linhas), tendo seis anos de

idade na última avaliação. O ‘Clone B’ foi conduzido no espaçamento 6 x 5 m (linha x entre linhas) e apresentava sete anos de idade na última avaliação.

**Crítérios de avaliação do cancro da teca** – A avaliação da incidência de plantas infectadas foi realizada pela anotação da presença (ou ausência) de sintomas característicos da doença em intervalos de 90 dias. Plantas apresentando formação de cancro no caule e nos ramos associadas à exsudação de goma, murcha, queda de folhas foram consideradas como plantas infectadas por *L. theobromae*.

**Diagnose molecular e diversidade dos agentes causais associados com o cancro da teca em Redenção-PA e Cáceres-MT** – Para confirmação do diagnóstico visual, amostras de plantas sintomáticas foram coletadas em cada parcela em cada data de avaliação (nos dois locais de avaliação) contendo estruturas fúngicas, visando ao isolamento e posteriores análises por métodos moleculares. Discos de troncos de cerne e alburno com lesões foram coletados e submetidos à desinfecção com álcool a 70% por 1 minuto, seguido de submersão dos tecidos vegetais em 2% de hipoclorito de sódio por 1 minuto e finalmente lavagem em água destilada por 1 minuto. Os fragmentos de tronco desinfetados foram então transferidos para placas de Petri contendo 2% de ágar-água e mantidos a 25 ° C ( $\pm 1$  ° C) com um fotoperíodo de 12 horas durante três dias. Os tampões de ágar (0,5 mm de diâmetro) contendo estruturas fúngicas foram então transferidos para placas de Petri contendo meio Ágar de Águas Salgadas Nutrientes (SNA). A fim de confirmar a identidade do agente causal em nível de espécie, realizou-se um conjunto de análises usando a informação genômica dos genes do fator de alongação da região parcial 1- $\alpha$  (TEF1- $\alpha$ ) e da região ITS1 e ITS4 (**White et al. 1990**), com isolados fúngicos representativos das regiões estudadas. O DNA genômico de amostras fúngicas isoladas de teca foi extraído usando o tampão 2X CTAB e solventes orgânicos (**Boiteux et al. 1999**). Os ensaios de PCR foram realizados usando DNA genômico total com

os primers EF1 e EF2 visando a região TEF-1 e com a região ITS sendo ITS1 universal (5'-TCC-GTA-GGT-GAA-CCT-GCG-G-3 ') e ITS4 (5'-TCC-TCC -GCT-TAT-TGA-TAT-GC-3 ') (White *et al.* 1990). Os amplicons de TEF-1 $\alpha$  e RPB2 foram purificados em gel e sequenciados diretamente em ambas as direções. As identidades das sequências foram confirmadas para corresponder as regiões ITS e TEF-1 $\alpha$  via BLAST, e os alinhamentos foram conduzidos utilizando o software MAFFT (Kato *et al.* 2013) como um plugin do Geneious R8 (Kearse *et al.* 2012). Uma árvore filogenética foi construída usando o método de inferência Bayesiana, usando sequências concatenadas de ITS parcial (alinhamentos de 420 pares de base) e TEF-1 $\alpha$  (298 alinhamentos pares de base) de cinco isolados *L. theobromae* de teca ('RC63', 'Sementes A1', 'Sementes A8', 'Sementes A16' e 'Sementes P2'), bem como 27 sequências de referência de isolados de *L. theobromae* disponíveis no GenBank. *Lasiodiplodia margaritaceae* foi empregado como grupo externo nas análises. As análises empregaram modelo GTR (Tavaré, 1986) com taxa de variação distribuída gama em todos os sites escolhidos pelo Mega 7.0 (Kumar *et al.* 2016).

**Análises Epidemiológicas** – Os dados de incidência do cancro no tempo e espaço ao longo das avaliações em todas as áreas foram utilizados para plotagem cumulativa e não cumulativa da incidência da doença e na realização das análises epidemiológicas.

**Análise Temporal** – As curvas de progresso obtidas foram tentativamente ajustadas aos modelos estatísticos, exponencial, monomolecular, logístico e Gompertz. As análises foram realizadas por meio de regressões não-lineares utilizando o programa Statistica® (StatSoft, Tulsa, OK, EUA), de acordo com o método Quase-Newton. A escolha do modelo mais adequado foi realizada com base no coeficiente de determinação ( $R^2$ ), no padrão de distribuição dos resíduos e pela média dos valores do desvio padrão dos parâmetros  $b_1$ ,  $b_2$  e  $b_3$ , estimados pelos modelos (Madden *et al.* 2007).

**Análise Espacial** – Quatro técnicas foram utilizadas para estudar o padrão espacial das doenças em todas as parcelas avaliadas: as sequências ordinárias, o índice de dispersão, a lei de Taylor modificada e as áreas isopatas. Inicialmente, mapas com distribuição binomial (plantas infectadas ou não infectadas) foram gerados para cada avaliação de cada parcela. A cada avaliação novas plantas sintomáticas foram anotadas e estas devidamente localizadas nos mapas de cada parcela. Quadrats de 6 x 6 foram escolhidos para determinar parâmetros espaciais das doenças. Para cada quadrat, a incidência de plantas doentes ( $p$ ) foi determinada em cada avaliação por meio da equação:  $p = \Sigma(X_i)/nN$ , onde  $X_i$  é o número total de plantas sintomáticas em cada quadrat,  $n$  é o número de plantas de cada quadrat e  $N$  é o número total de quadrats em cada parcela (Madden & Hughes, 1995).

**Índice de dispersão (D)** – O índice de dispersão (D) foi calculado para todas as parcelas com quadrat (6x6) a partir da variância observada ( $V_{obs}$ ) e binomial ( $V_{bin}$ ) através da equação (Madden & Hughes, 1995):  $D = V_{obs}/V_{bin}$ . Onde:  $V_{obs} = \Sigma (x_i - n p)^2 / n^2 (N-1)$   $V_{bin} = p(p-1) / n$  A significância do índice de dispersão foi verificada por meio do teste de qui quadrado ao nível de 5% de probabilidade. Valores de D estatisticamente iguais a 1 foram considerados como padrão ao acaso (hipótese nula), já valores que diferiram estatisticamente de 1 foram considerados como agregados.

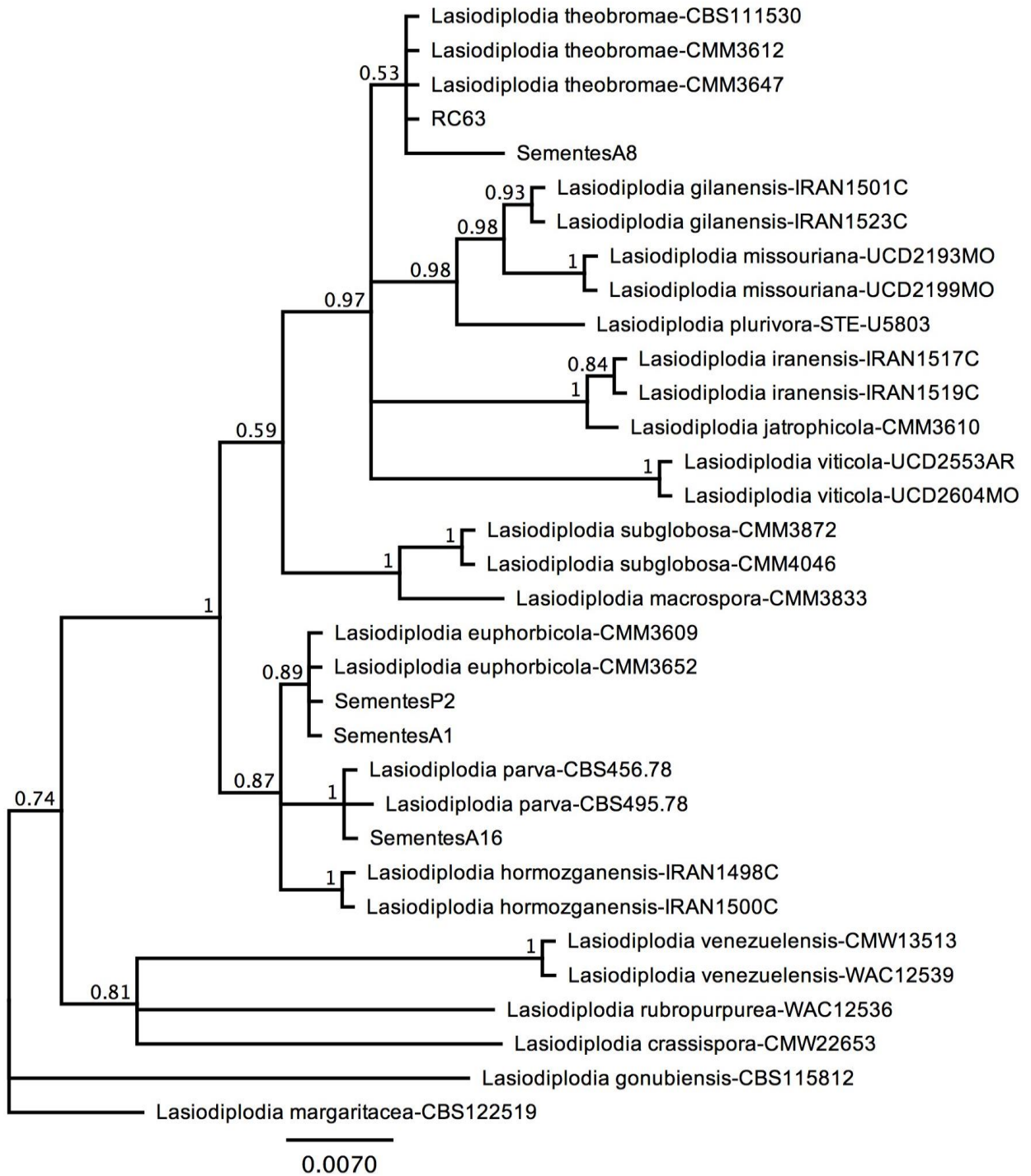
**Aplicação da Lei de Taylor modificada** – A aplicação da Lei de Taylor modificada foi realizada utilizando a relação linear entre o logaritmo da  $V_{bin}$  e o logaritmo da  $V_{obs}$  (Madden & Hughes, 1995), da seguinte forma:  $\text{Log}(V_{bin}) = \log(A) + b \log(V_{obs})$ , onde A e b são parâmetros. As regressões foram realizadas utilizando o programa Statistica® 6.0 (Statsoft, Tulsa, OK, EUA). Como variável independente foi considerada o logaritmo das variâncias binomiais e como variável dependente o logaritmo das variâncias observadas para os mapas de cada parcela, para os dados de todas as parcelas de cada experimento e os dados

de todas as mesmas em conjunto. A significância das relações (regressão linear) entre  $\log(V_{bin})$  e  $\log(V_{obs})$  foi determinada pelo teste F ( $<0,05$ ). Enquanto que a adequação do ajuste do modelo aos dados foi determinada por meio dos valores de coeficiente de determinação ( $R^2$ ) e pelos padrões de distribuição dos resíduos (**Madden & Hugles, 1995**). A igualdade dos parâmetros  $b = 1$  e  $\log(A) = 0$  foi avaliada através do teste t ao nível de 5% e 1% de probabilidade (**Madden & Hugles, 1995**), utilizando as estimativas destes parâmetros de aleatoriedade e seus erros padrões. Quando  $b = 1$  e  $\log(A) = 0$ , os dados seguem um padrão de distribuição ao acaso. Se  $b = 1$  e  $\log(A) > 0$ , existe um nível de agregação que independe da incidência. Enquanto que quando  $b > 1$  e  $\log(A) > 0$ , existe agregação e esta varia de acordo com a incidência.

**Áreas Isopatas** – Os mapas com a distribuição de plantas infectadas obtidos na última avaliação de cada parcela foram utilizados para elaborar uma matriz X, Y e Z, onde X e Y correspondem à posição do quadrat dentro da parcela e Z aos valores de incidência de plantas infectadas em cada quadrat. As matrizes obtidas foram utilizadas para gerar as áreas isopatas correspondentes a cada parcela de acordo com o método Distance-Weighted Least Squares usando o programa Statistica<sup>®</sup> 6.0 (Stasoft, Tulsa, OK, EUA).

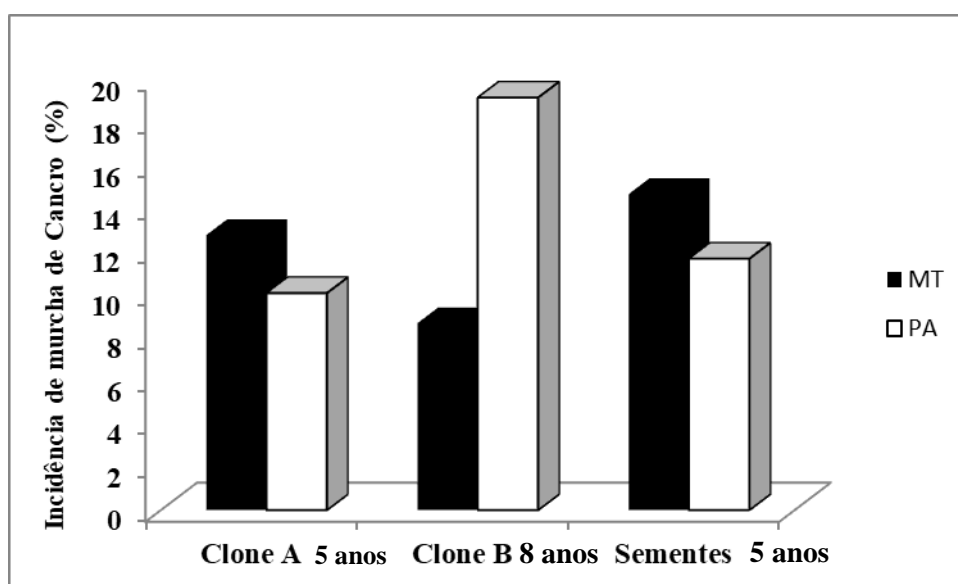
## RESULTADOS

**Isolamento e identificação do patógeno** – Foram obtidos cinco isolados dos materiais coletados. Para os isolados, amplicons de aproximadamente 579 pb foram gerados para região ITS utilizando pares de primers ITS4-5 e 500pb para TEF-1 $\alpha$  utilizando pares de primers EF1-F e EF2-R. As regiões foram concatenadas por possuírem a mesma topologia separadamente. Os isolados ‘RC63’, ‘Sementes A1’, ‘Sementes A8’, ‘Sementes A16’ e ‘Sementes P2’ se agruparam em diferentes clados de espécies com valores máximos de probabilidade posterior (**Figura 11**). Os isolados ‘RC63’ e ‘Sementes A8’ se agruparam com *L. theobromae*, os isolados ‘Sementes A1’ e ‘P2’ agruparam com *L. euphorbicola* e o isolado ‘Sementes A16’ agrupou com a espécie *L. parva*.



**Figura 11.** Árvore filogenética obtida por inferência bayesiana (modelo GTR + G) das sequências de genes de subunidade de segunda subunidade (ITS) da segunda maior subunidade da RNA (TEF1- $\alpha$ ) e RNA polimerase disponíveis junto ao GenBank. *Lasiodiplodia margaritaceae* foi utilizada como outgroup.

**Análise temporal** – A incidência média do cancro na última avaliação em todas as parcelas nos dois estados variou de 9% a 15% (**Figura 12**). A incidência variou em função do material genético e da região estudada. Na região de Cáceres-MT, as maiores incidências registradas foram para as parcelas que continham os materiais propagados através do método seminal (sementes), com incidência de 15%, seguido do clone A com incidência de 13% e clone B com incidência de 9%. Na região de Redenção-PA, as maiores incidências foram registradas nas parcelas compostas pelo clone B (19%), seguido do material seminal (12%). As menores incidências foram observadas no clone A (10%).



**Figura 12:** Incidência do cancro da teca (*Lasiodiplodia theobromae*) em plantas de teca (média de 3 parcelas por material comercial) na avaliação final (aos 540 dias) nas regiões de Cáceres-MT e Redenção-PA, no ano de 2016.

No geral a região de Cáceres-MT apresentou as maiores AACPD, variando de 159 a 598, com exceção do Clone B na região de Redenção-PA que apresentou as maiores AACPD, variando de 546 a 798 (**Tabela 3**).



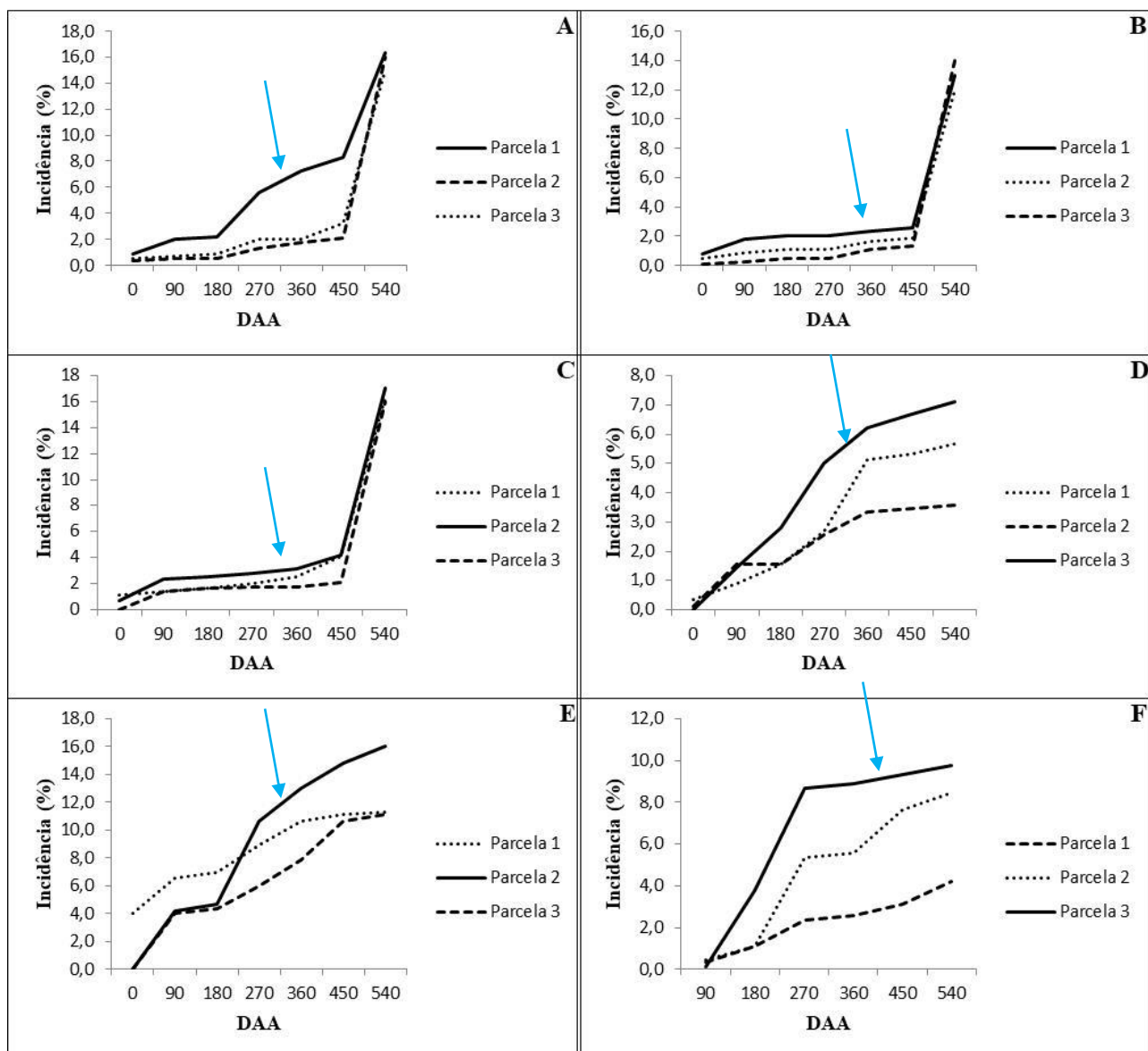
**Tabela 3.** Incidência do cancro da teca em cada parcela e no tempo e os valores do ‘índice de dispersão para o quadrat 6 x 6, análise de sequencias ordinárias e AACPD para cada parcela nas regiões de Cáceres-MT e Redenção-PA.

Material vegetativo <sup>1</sup>	Data <sup>2</sup>	DAA <sup>3</sup>	INC (%) <sup>4</sup>	D	Sequencias ordinárias		ACPD <sup>7</sup>
				(6X6)	Linhas <sup>5</sup>	Colunas <sup>6</sup>	
<b>Clone A-P1 MT</b>	06.08.14	0	0,9	1,326	0	27	<b>509,2</b>
	16.12.14	90	2,0	1,457*	2	10	
	03.03.15	180	2,2	1,612*	2	10	
	18.07.15	270	5,6	3,719*	1	7	
	16.12.15	360	7,2	3,407*	1	5	
	24.03.16	450	8,3	2,856*	0	4	
	26.07.16	540	16,3	1,349	0	1	
<b>Clone A-P2 MT</b>	06.08.14	0	0,3	2,207*	2	2	<b>217,5</b>
	16.12.14	90	0,6	1,603*	2	2	
	03.03.15	180	0,6	1,603*	2	2	
	18.07.15	270	1,3	1,592*	5	2	
	16.12.15	360	1,8	1,374	4	2	
	24.03.16	450	2,1	1,599*	2	2	
	26.07.16	540	16,0	1,349	0	1	
<b>Clone A-P3 MT</b>	06.08.14	0	0,6	1,304	0	1	<b>248,3</b>
	16.12.14	90	0,7	1,208	0	1	
	03.03.15	180	0,9	1,326	0	1	
	18.07.15	270	2,0	1,457*	2	2	
	16.12.15	360	2,0	1,457*	2	2	
	24.03.16	450	3,2	1,752*	2	2	
	26.07.16	540	15,0	1,340	0	1	
<b>Clone B-P1 MT</b>	06.08.14	0	0,8	1,311	0	0	<b>263,3</b>
	16.12.14	90	1,8	1,105	0	0	
	03.03.15	180	2,0	0,991	1	1	
	18.07.15	270	2,0	0,991	1	0	
	16.12.15	360	2,3	0,931	1	0	
	24.03.16	450	2,6	1,011	1	0	
	26.07.16	540	13,0	1,349	0	1	
<b>Clone B-P2 MT</b>	06.08.14	0	0,4	0,918	0	1	<b>193,3</b>
	16.12.14	90	0,9	1,060	0	27	
	03.03.15	180	1,1	0,959	0	27	
	18.07.15	270	1,1	0,959	0	27	
	16.12.15	360	1,7	1,168	1	26	
	24.03.16	450	1,9	1,416*	1	25	
	26.07.16	540	12,0	1,349	0	1	
<b>Clone B-P3 MT</b>	06.08.14	0	0,1	1,001	0	0	<b>159,2</b>
	16.12.14	90	0,2	0,973	0	0	
	03.03.15	180	0,4	0,918	0	0	
	18.07.15	270	0,4	0,918	0	0	

	16.12.15	360	1,1	1,999*	0	2	
	24.03.16	450	1,3	1,911*	0	1	
	26.07.16	540	14,0	1,349	0	1	
<b>Sementes-P1 MT</b>	06.08.14	0	1,1	1,210	0	0	
	16.12.14	90	1,4	1,170	0	0	
	03.03.15	180	1,7	1,179	0	0	
	18.07.15	270	2,0	0,991	2	0	<b>307,5</b>
	16.12.15	360	2,6	1,143	3	0	
	24.03.16	450	4,1	1,092	5	1	
	26.07.16	540	16,3	1,349	5	1	
<b>Sementes-P2 MT</b>	06.08.14	0	0,7	0,862	2	1	
	16.12.14	90	2,3	1,550*	1	2	
	03.03.15	180	2,6	1,403	1	2	
	18.07.15	270	2,8	1,440*	1	2	<b>357,5</b>
	16.12.15	360	3,1	1,318	2	3	
	24.03.16	450	4,2	1,102	2	4	
	26.07.16	540	17,0	1,349	0	1	
<b>Sementes-P3 MT</b>	16.12.14	90	1,4	0,599	0	0	
	03.03.15	180	1,7	0,714	0	0	
	18.07.15	270	1,8	0,690	0	0	
	16.12.15	360	1,8	0,690	0	0	
	24.03.16	450	2,1	1,050	1	0	
	26.07.16	540	16,0	1,349	0	1	<b>598,3</b>
<b>Clone A-P1 PA</b>	06.08.14	0	0,3	0,946	0	0	
	16.12.14	90	0,9	0,807	7	0	
	03.03.15	180	1,6	2,214*	1	0	
	18.07.15	270	2,7	1,775*	2	0	<b>278,3</b>
	16.12.15	360	5,1	2,704*	8	0	
	24.03.16	450	5,3	2,550*	7	0	
26.07.16	540	5,7	2,692*	1	0		
<b>Clone A-P2 PA</b>	06.08.14	0	0,1	1,001	0	0	
	16.12.14	90	1,6	0,903	7	0	
	03.03.15	180	1,6	0,903	0	0	
	18.07.15	270	2,6	0,773	0	0	<b>214,2</b>
	16.12.15	360	3,3	1,075	11	1	
	24.03.16	450	3,4	1,134	11	1	
26.07.16	540	3,6	1,277	1	1		
<b>Clone A-P3 PA</b>	16.12.14	90	1,4	0,782	6	0	
	03.03.15	180	2,8	1,103	0	1	
	18.07.15	270	5,0	1,040	1	2	
	16.12.15	360	6,2	1,179	2	3	<b>374,2</b>
	24.03.16	450	6,7	0,997	7	1	
	26.07.16	540	7,1	1,122	0	1	
<b>Clone B-P1 PA</b>	06.08.14	0	4,0	1,517*	2	4	
	16.12.14	90	6,6	1,348	12	4	<b>778,3</b>

	03.03.15	180	7,0	1,198	4	3	
	18.07.15	270	8,9	1,168	3	1	
	16.12.15	360	10,7	1,160	7	4	
	24.03.16	450	11,1	1,140	7	3	
	26.07.16	540	11,3	1,146	1	2	
<b>Clone B-P2 PA</b>	16.12.14	90	4,2	2,144*	10	12	<b>798,3</b>
	03.03.15	180	4,7	1,926*	1	14	
	18.07.15	270	10,7	1,579*	2	18	
	16.12.15	360	13,0	3,352*	7	23	
	24.03.16	450	14,8	3,332*	5	23	
	26.07.16	540	16,0	3,265*	1	24	
<b>Clone B-P3 PA</b>	16.12.14	90	4,0	1,428*	10	17	<b>546,7</b>
	03.03.15	180	4,3	1,343	2	18	
	18.07.15	270	6,0	2,006*	2	19	
	16.12.15	360	7,9	1,667*	7	23	
	24.03.16	450	10,7	2,074*	8	27	
	26.07.16	540	11,1	2,019*	29	27	
<b>Sementes-P1 PA</b>	16.12.14	90	0,3	0,946	3	2	<b>170,8</b>
	03.03.15	180	1,1	1,160	0	7	
	18.07.15	270	2,3	1,341	0	11	
	16.12.15	360	2,6	1,299	11	11	
	24.03.16	450	3,1	1,091*	13	15	
	26.07.16	540	4,2	1,284*	4	19	
<b>Sementes-P2 PA</b>	16.12.14	90	0,4	1,434*	3	4	<b>361,7</b>
	03.03.15	180	1,1	1,791*	1	8	
	18.07.15	270	5,3	2,406*	3	19	
	16.12.15	360	5,6	2,238*	13	20	
	24.03.16	450	7,7	2,350*	13	24	
	26.07.16	540	8,4	2,133*	5	25	
<b>Sementes-P3 PA</b>	16.12.14	90	0,1	1,001	1	1	<b>534,2</b>
	03.03.15	180	3,8	2,902*	4	13	
	18.07.15	270	8,7	1,949*	6	26	
	16.12.15	360	8,9	1,856*	6	27	
	24.03.16	450	9,3	1,814*	6	28	
	26.07.16	540	9,8	1,835*	3	28	

\*P: Parcela, MT: Parcelas localizadas na região de Cáceres-MT e PA: Parcelas localizadas na região de Redenção-PA. <sup>2</sup>DAA: Dias após avaliação; <sup>4</sup>INC: Incidência do cancro da teca. <sup>5</sup>D: Índice de dispersão, (\*) valores significativamente maiores que 1 no teste do qui-quadrado (p <0,05). <sup>6</sup>Linhas: número de linhas que apresentam distribuição espacial agregada ( $Z_r < 1,64$ ) pelo número de linhas avaliadas. <sup>7</sup>Coluna: número de colunas (entre linhas) que apresentam distribuição agregada ( $Z_r < 1,64$ ) total de colunas avaliadas. <sup>8</sup>AACPD: área abaixo curva de progresso da doença.



**Figura 13:** Curvas de progresso do cancro da teca (*L. theobromae*). A: parcelas 1, 2 e 3 do clone A (localizadas em Cáceres-MT); B: parcelas 1, 2 e 3 do clone b (localizadas em Cáceres-MT) e C: parcelas 1, 2 e 3 do material seminal (localizadas em Cáceres-MT). D: parcelas 1, 2 e 3 do clone A (localizadas em Redenção-PA); E: parcelas 1, 2 e 3 do clone B (localizadas em Redenção-PA) e F: parcelas 1, 2 e 3 do material seminal (localizadas em Redenção-PA). \*DAA (Dias após avaliação).

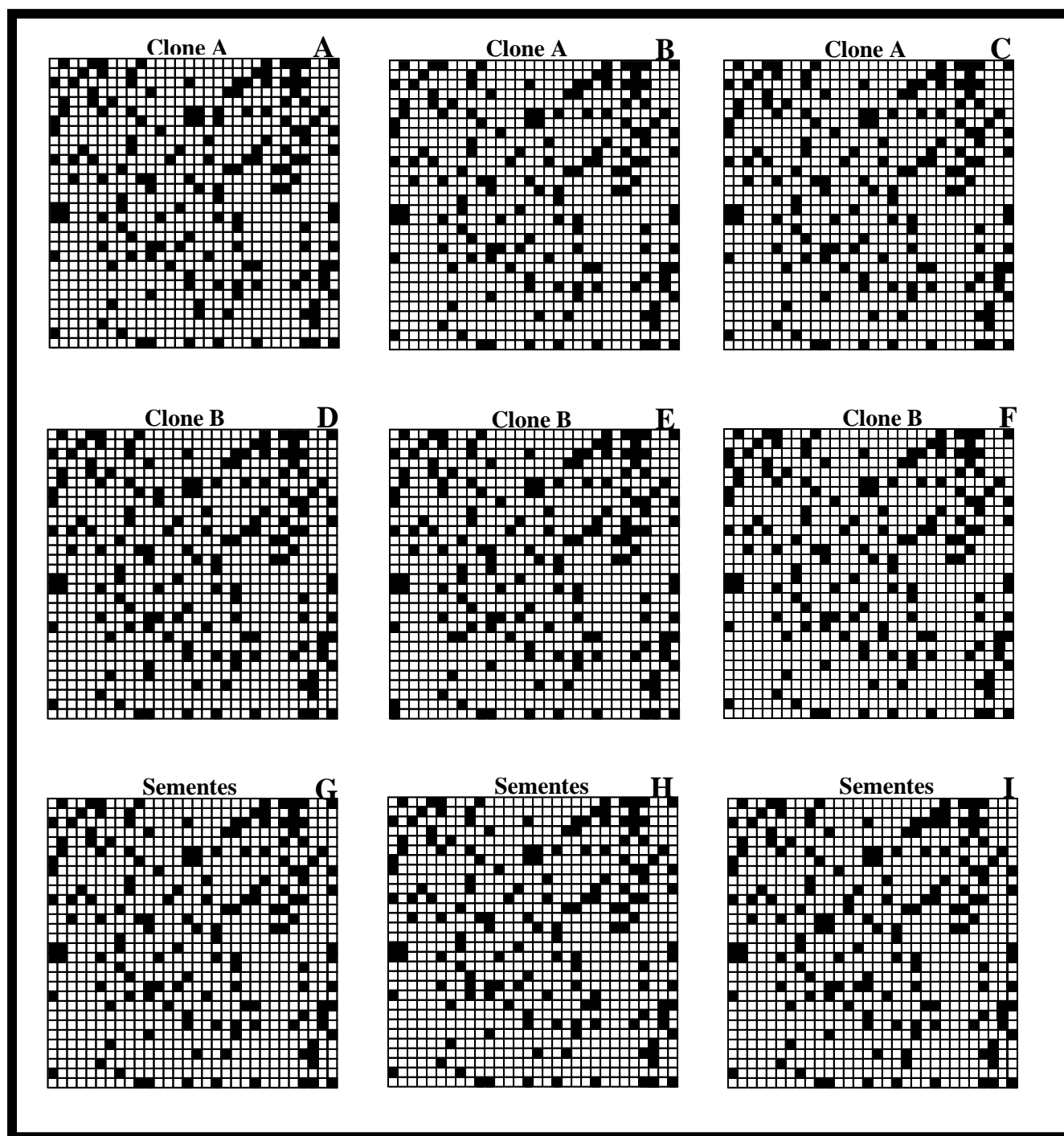
As curvas de progresso não apresentaram uma forma uniforme entre as parcelas, porém o modelo o monomolecular apresentou os melhores ajustes para os materiais e parcelas das duas regiões (**Tabela 4**).

**Tabela 4.** Parâmetros, desvio padrão e coeficiente de determinação ( $R^2$ ) do modelo monomolecular, ajustado por meio de regressão não-linear aos dados de incidência da doença nas regiões de Cáceres-MT e Redenção-PA.

<b>Material vegetativo<sup>1</sup></b>	<b>Modelos<sup>1</sup></b>	<b>INC (%)<sup>2</sup></b>	<b>AUCPD<sup>3</sup></b>	<b>r<sup>4</sup></b>	<b>b1<sup>5</sup></b>	<b>b2<sup>6</sup></b>	<b>R<sup>27</sup></b>
<b>Clone A-P1 MT</b>	<b>Monomolecular</b>	6,1	<b>509,2</b>	0,74	0,003364	0,00255	0,55
<b>Clone A-P2 MT</b>	<b>Monomolecular</b>	3,2	<b>217,5</b>	0,92	-0,02315	0,0031	0,92
<b>Clone A-P3 MT</b>	<b>Monomolecular</b>	3,5	<b>248,3</b>	0,91	0,005459	0,000115	0,82
<b>Clone B-P1 MT</b>	<b>Monomolecular</b>	3,5	<b>263,3</b>	0,90	-0,013233	0,00212	0,81
<b>Clone B-P2 MT</b>	<b>Monomolecular</b>	2,7	<b>193,3</b>	0,87	-0,0201	0,00022	0,76
<b>Clone B-P3 MT</b>	<b>Monomolecular</b>	2,5	<b>159,2</b>	0,90	-0,01782	0,000201	0,90
<b>Sementes-P1 MT</b>	<b>Monomolecular</b>	4,2	<b>307,5</b>	0,97	0,050029	0,00039	0,97
<b>Sementes-P2 MT</b>	<b>Monomolecular</b>	4,7	<b>357,5</b>	0,96	0,013361	0,000496	0,92
<b>Sementes-P3 MT</b>	<b>Monomolecular</b>	6,0	<b>598,3</b>	0,98	0,0181346	0,0006233	0,94
<b>Clone A-P1 PA</b>	<b>Monomolecular</b>	3,1	<b>278,3</b>	0,98	0,003492	0,00013	0,96
<b>Clone A-P2 PA</b>	<b>Monomolecular</b>	2,3	<b>214,2</b>	0,85	-0,03483	0,000669	0,72
<b>Clone A-P3 PA</b>	<b>Monomolecular</b>	4,7	<b>374,2</b>	0,98	0,016259	0,00014	0,96
<b>Clone B-P1 PA</b>	<b>Monomolecular</b>	8,5	<b>778,3</b>	0,95	0,117184	0,002523	0,90
<b>Clone B-P2 PA</b>	<b>Monomolecular</b>	10,7	<b>798,3</b>	0,96	0,033342	0,000574	0,93
<b>Clone B-P3 PA</b>	<b>Monomolecular</b>	8,6	<b>546,7</b>	0,81	0,008307	0,000529	0,65
<b>Sementes-P1 PA</b>	<b>Monomolecular</b>	2,3	<b>170,8</b>	0,80	0,009306	0,000105	0,65
<b>Sementes-P2 PA</b>	<b>Monomolecular</b>	4,7	<b>361,7</b>	0,98	0,01595	0,0002	0,97
<b>Sementes-P3 PA</b>	<b>Monomolecular</b>	7,0	<b>534,2</b>	0,97	0,000168	0,00023	0,95

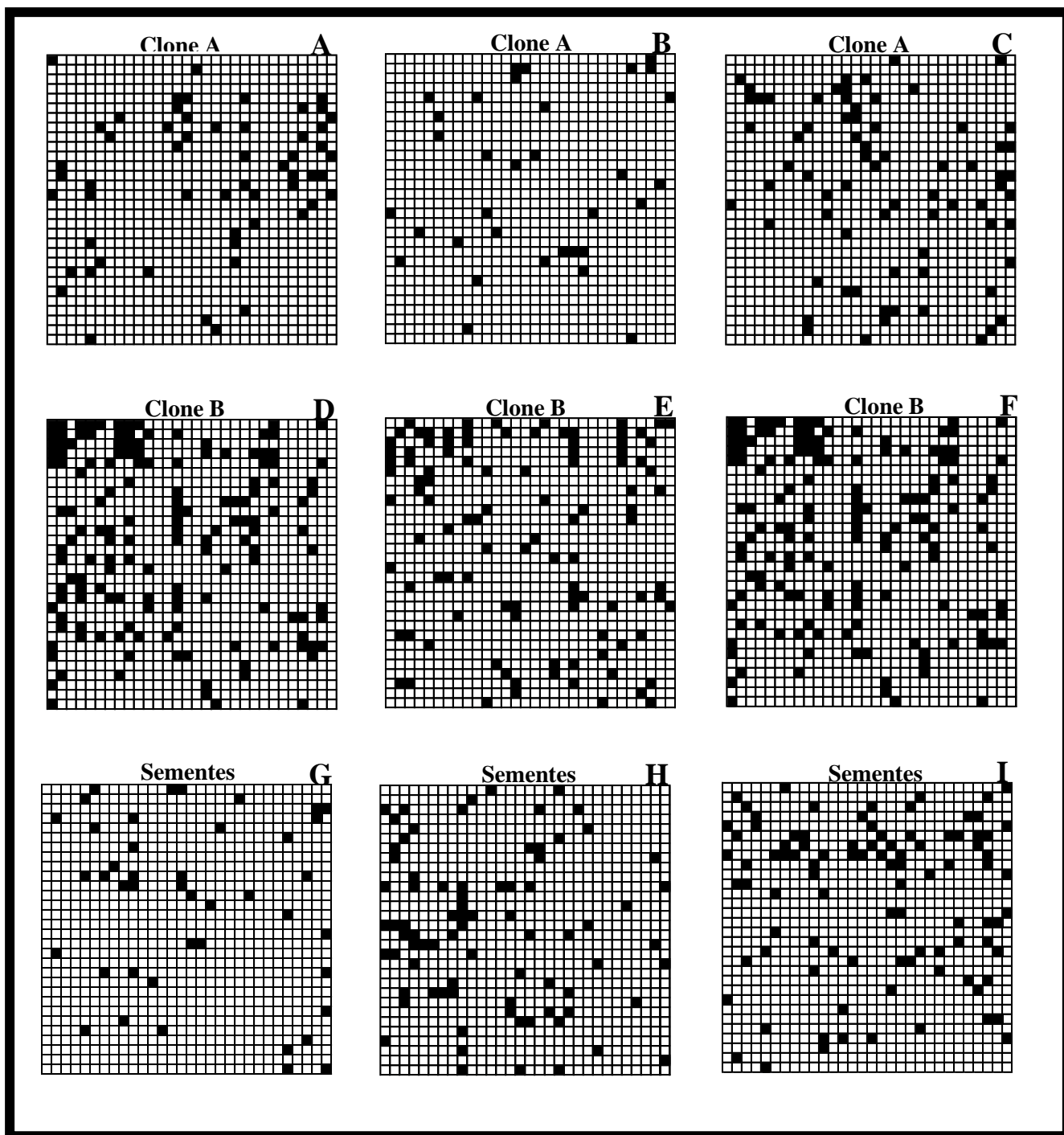
\*P: Parcela, MT: Parcelas localizadas na região de Cáceres-MT e PA: Parcelas localizadas na região de Redenção-PA. <sup>1</sup>INC: Incidência de cancro da teca. <sup>2</sup>AACPD: área abaixo da curva de progresso da doença, <sup>3</sup>r: Resíduo; <sup>4</sup>b1: Valores do desvio padrão estimado pelo modelo; <sup>5</sup>b2: Valores do desvio padrão estimado pelo modelo; <sup>6</sup>R<sup>2</sup> Coeficiente de determinação.

**Análise Espacial** – Ao final da última avaliação pode-se observar um predominante padrão espacial ao acaso. Os mapas de distribuição de plantas infectadas em todas as parcelas na última avaliação encontram-se na **Figura 14** (dados de Cáceres-MT) e na **Figura 15** (dados de Redenção-PA).



**Figura 14:** Mapa com a distribuição espacial de plantas infectadas com *Lasiodiplodia* spp. de cada parcela para os três materiais avaliados na região de Cáceres-MT na última avaliação. (A) Clone A- Parcela 1, (B) Clone A-

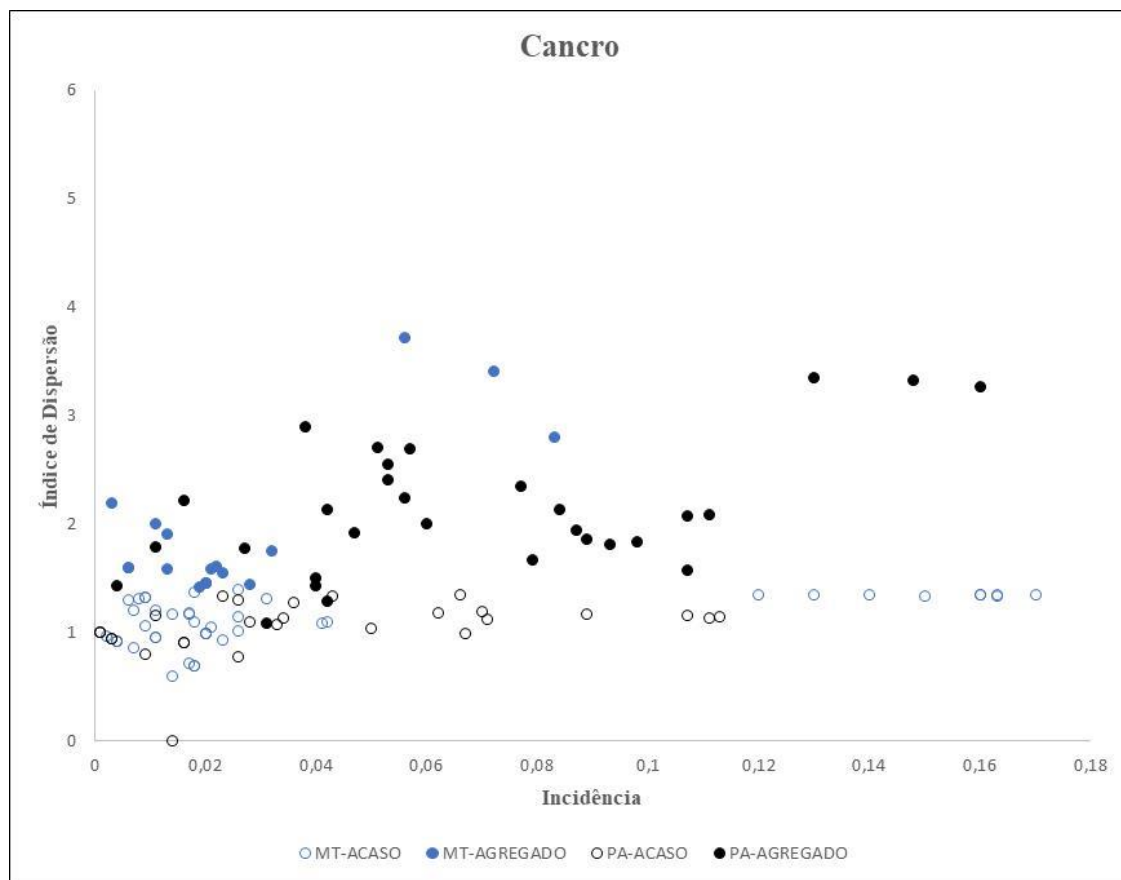
Parcela 2, (C) Clone A- Parcela 3, (D) Clone B- Parcela 1, (E) Clone B- Parcela 2, (F) Clone B- Parcela 3, (G) Sementes- Parcela 1, (H) Sementes- Parcela 2, (I) Sementes- Parcela 3. Quadrados pretos representam plantas infectadas e os brancos para as plantas sadias.



**Figura 15:** Mapa com a distribuição espacial de plantas infectadas com *Lasiodiplodia theobromae* de cada parcela para os três materiais avaliados na região de Redenção-PA na última avaliação. (A) Clone A- Parcela 1, (B) Clone A- Parcela 2, (C) Clone A- Parcela 3, (D) Clone B- Parcela 1, (E) Clone B- Parcela 2, (F) Clone B- Parcela 3, (G) Sementes- Parcela 1, (H) Sementes- Parcela 2, (I) Sementes- Parcela 3. Quadrados negros representam plantas infectadas e os brancos plantas sadias.



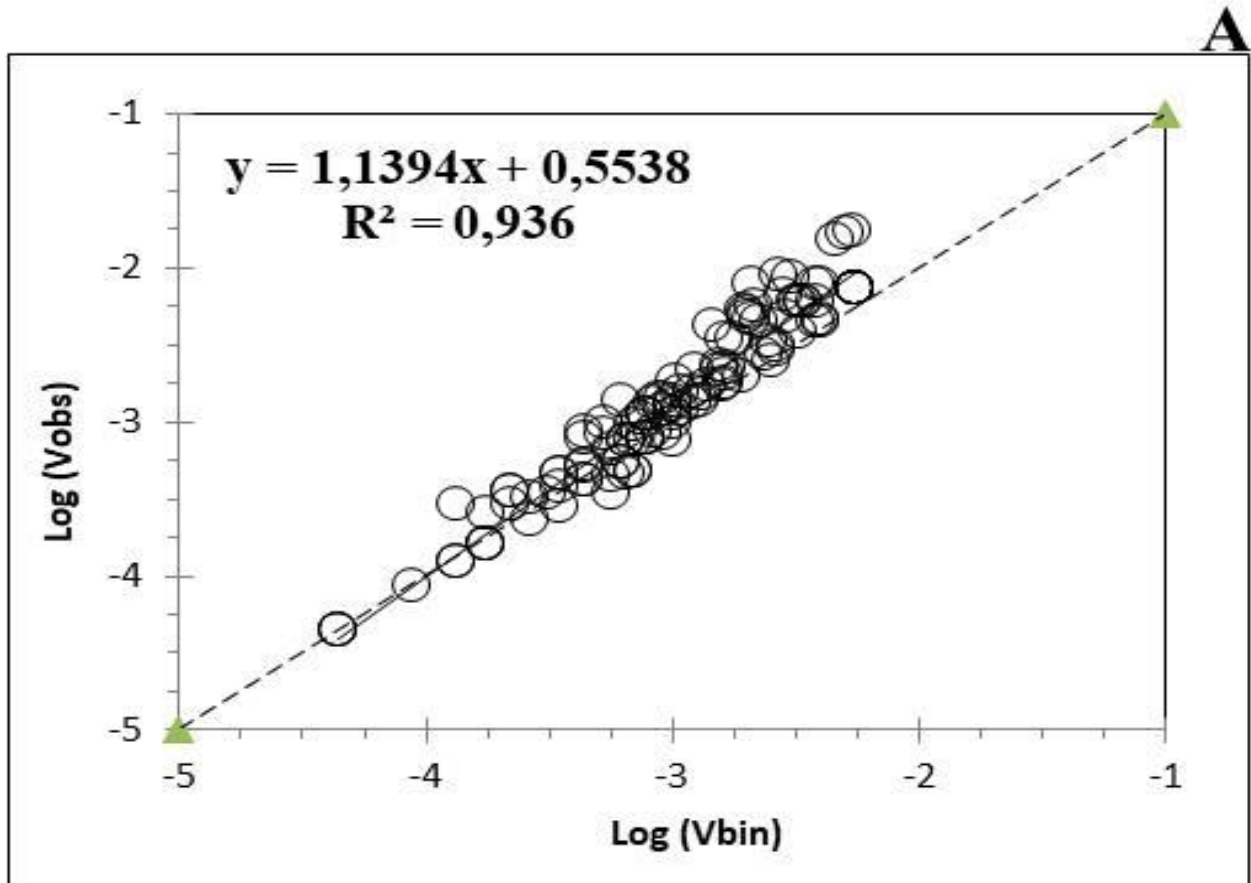
**Índice de dispersão** – Os valores do índice de dispersão (D) variaram de acordo com a parcela e material vegetal (**Tabela 3**). Em geral a maioria dos materiais avaliados na região de Cáceres-MT apresentou valores de D menores que 1 ( $p>0,05$ ), indicando aleatoriedade da distribuição de plantas doentes dentro da parcela. Na região de Redenção-PA na maioria das avaliações os valores de D foram maiores que 1 ( $p>0,05$ ), indicando agregação da distribuição de plantas infectadas por *L. theobromae* dentro da parcela (**Figura 16**).



**Figura 16:** Valores do índice de dispersão (D) para dados de contagem de incidência do cancro da teca em sete avaliações realizadas na região de Cáceres-MT e Redenção-PA.

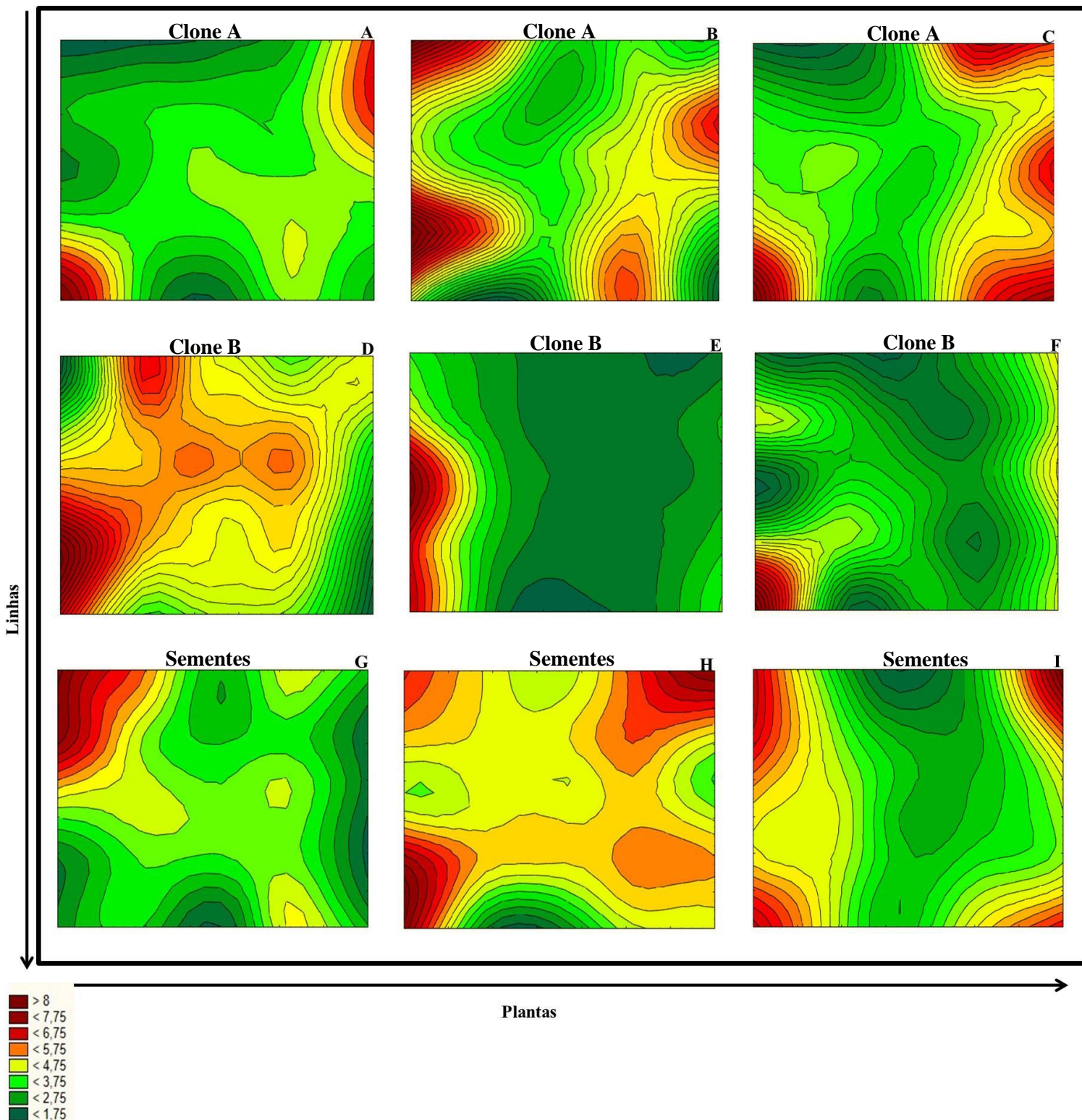
**Aplicação da Lei de Taylor modificada** – Aplicando a Lei de Taylor modificada verificou-se, em geral, uma tendência de distribuição ao acaso de plantas infectadas. Embora, uma tendência de agregação para os materiais estudados na região de Cáceres-MT, tenha sido verificada. Os gráficos ilustrando a aplicação da Lei de Taylor modificada para cada parcela e

de todos os materiais avaliados encontram-se na **Figura 17**. Os valores de  $b$  e  $\log (A)$  do cancro da teca para os materiais genéticos localizados na região de Cáceres–MT, o ‘Clone A’, o ‘Clone B’ e o material seminal foram, respectivamente, 1,07 e 0,43 ( $R^2=0,94$ ), 1,07 e 0,29 ( $R^2=0,97$ ) e 1,16 e 0,52 ( $R^2=0,94$ ). Os valores de  $b$  e  $\log (A)$  dos materiais localizados na região de Redenção-PA, para o ‘Clone A’, o ‘Clone B’ e o material seminal foram, respectivamente, 1,14 e 0,54 ( $R^2=0,90$ ), 1,28 e 0,96 ( $R^2=0,71$ ) e 1,17 e 0,72 ( $R^2=0,97$ ). Os materiais também foram analisados em função do material genético, sem considerar a região. Os valores de  $b$  e  $\log (A)$  para todas as parcelas do ‘Clone A’, do ‘Clone B’ e do material seminal foram, respectivamente, 1,09 e 0,45 ( $R^2=0,90$ ), 1,16 e 0,61 ( $R^2=0,95$ ) e 1,16 e 0,60 ( $R^2=0,93$ ). Considerando todas as parcelas, independente do material genético e região, os valores de  $b$  e  $\log (A)$  foram respectivamente iguais a 1,13 e 0,55 ( $R^2=0,93$ ).

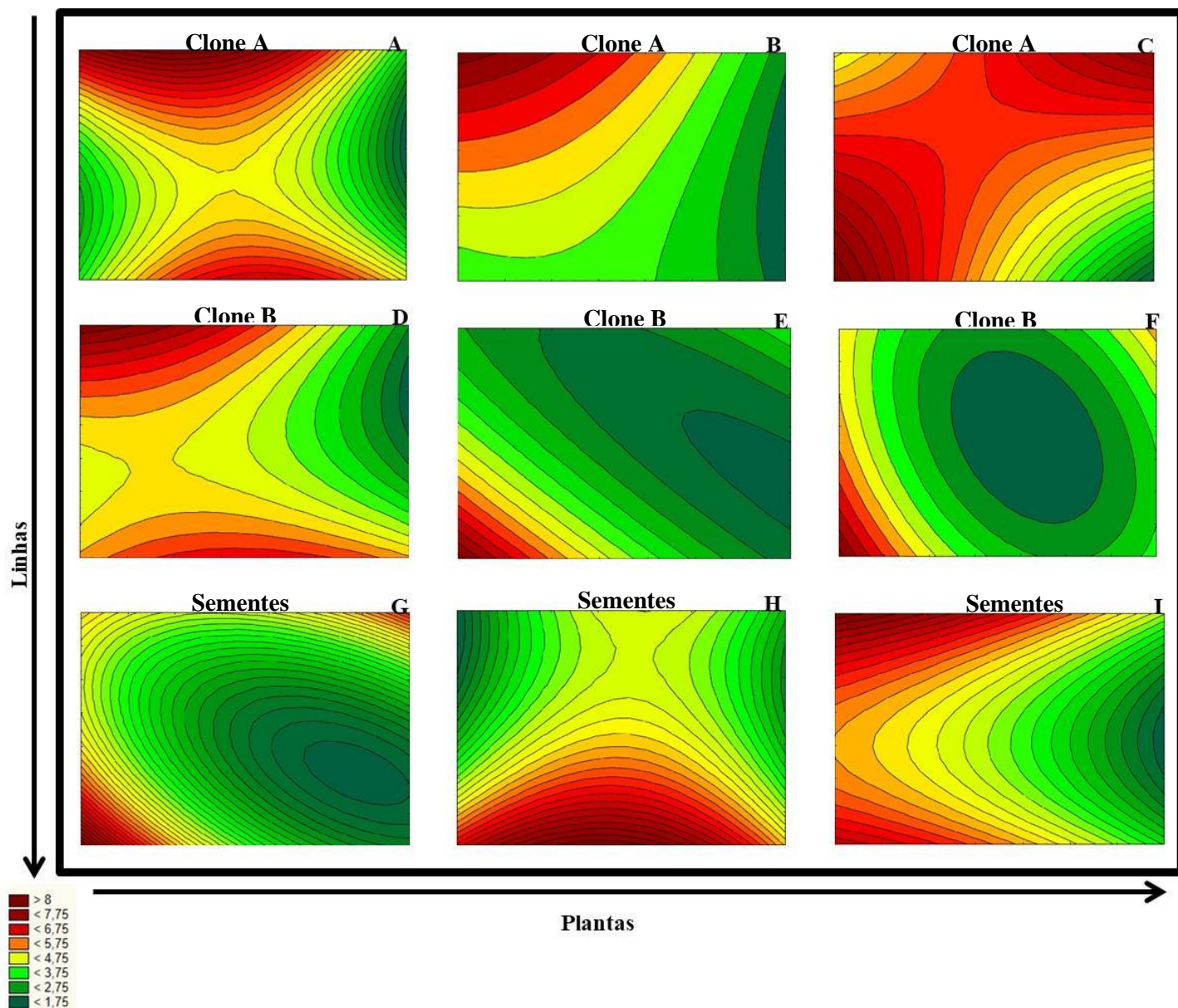


**Figura 17:** Relação entre o logaritmo da variância observada [ $\log (V_{obs})$ ] e o logaritmo da variância binomial [ $\log (V_{bin})$ ] de cancro na região de Cáceres-MT e Redenção-PA. Valores. Todas as avaliações nas suas regiões para todos os materiais genéticos (A). Em Todas as avaliações utilizando tamanho de quadrat 6 x 6. \*Valores estatisticamente diferentes de 1 e \*\* valores estatisticamente diferentes de 0 ( $P < 0,01$ ).

**Áreas isópatas** – As áreas isópatas foram obtidas com os dados de incidência da última avaliação em todas as parcelas. Os padrões de focos obtidos foram diferentes em cada parcela, verificando-se em geral uma distribuição mais ao acaso de plantas infectadas (**Figuras 18 e 19**).



**Figura 18:** Áreas isopatas obtidas com a incidência do cancro da teca na última avaliação em cada parcela da região de Cáceres-MT. Onde: A, B e C representam respectivamente as parcelas 1,2 e 3 do clone A; D, E e F representam respectivamente as parcelas 1,2 e 3 do clone B e G, H e I representam respectivamente as parcelas 1,2 e 3 seminais. Os valores arbitrários da escala de cores à direita, representam a variação da intensidade da doença independentemente da incidência real de cada parcela, onde: 8,0 representa a intensidade máxima da doença e 1,75 a ausência de doença. Quadrat 6x6.



**Figura 19:** Áreas isopatas obtidas com a incidência do cancro da teca na última avaliação em cada parcela da região de Redenção-PA. Onde: A, B e C representam respectivamente as parcelas 1,2 e 3 do clone A; D, E e F representam respectivamente as parcelas 1,2 e 3 do clone B e G, H e I representam respectivamente as parcelas 1,2 e 3 seminais. Os valores arbitrários da escala de cores à direita, representam a variação da intensidade da doença independentemente da incidência real de cada parcela, onde: 8,0 representa a intensidade máxima da doença e 1,75 a ausência de doença. Quadrat 6x6.

## DISCUSSÃO

As inferências filogenéticas baseadas em múltiplas sequências gênicas têm desempenhado importante papel na delimitação de espécies do gênero *Lasiodiplodia*. No presente estudo, os dados combinados da sequência ITS e TEF-1 $\alpha$  permitiram identificar o cultivo de teca como sendo um hospedeiro de novas espécies crípticas dentro do complexo de espécies *L. theobromae*, descritas aqui como *L. euohorbicola* e *L. parva*. A região de Cáceres-MT apresenta a ocorrência das três espécies agrupadas na árvore filogenética, já a região de Redenção-PA ocorre apenas duas espécies, sendo *L. euphorbicola* e *L. theobromae*.

No Brasil as áreas comerciais de teca estão em expansão, em função da sua ampla adaptabilidade bem como das características edafoclimáticas proporcionarem um bom desempenho volumétrico para a cultura. Contudo, recentemente tem-se observado perdas volumétricas e de qualidade da madeira, sendo causadas especificamente por patógenos de solo. Até final de 2014, as empresas preocupavam-se exclusivamente com a murcha-de-*Ceratocystis*. Entretanto, em 2015, foi diagnosticado o cancro da teca, causado pelo fungo *L. theobromae* nas principais áreas de cultivo (**Borges *et al.* 2015**). A partir de então iniciaram-se estudos epidemiológicos a fim de entender o padrão de disseminação do patógeno e para quantificar as perdas causadas por essa doença.

Incidências baixas a médias do cancro foram verificadas nas duas áreas de produção. As diferenças de incidências em relação aos materiais genéticos e as regiões estudadas podem estar intimamente relacionadas às questões genéticas e/ou idade dos materiais vegetais, variabilidade genética do patógeno, além das condições silviculturais de cada talhão. Resultados anteriores (em ambiente controlado) demonstraram que a suscetibilidade desses materiais ao cancro é maior no material seminal, seguido dos clones A e B (**dados não publicados**). Os resultados obtidos no presente trabalho, em condições de campo, especialmente os dados da região Cáceres-MT corroboram com as reações desses genótipos ao cancro em ambiente controlado. Na região de Redenção-PA, a mesma tendência foi

constatada, com exceção do ‘Clone B’ que apresentou a maior incidência. A maior incidência observadas nas parcelas com o ‘Clone B’ não está, aparentemente, relacionada a maior suscetibilidade, mas sim, ao maior espaçamento nos talhões desse material. O maior espaçamento foi adotado visando a reduzir os custos com operações silviculturais (exemplo desbaste e desrama) uma vez que o cronograma silvicultural ocorre em função do espaçamento adotado. Mesmo sendo um talhão em que um espaçamento maior tenha sido adotado (que é um fator desfavorável ao patógeno), as plantas neste setor sofreram muitos ferimentos na base provocada por roçadeiras no início das operações de manutenção do talhão, além de deixar as raízes expostas ao solo abrindo inúmeros sítios de potencial infecção pelo patógeno. Vale ressaltar que esse talhão foi um dos que apresentou vários históricos de incêndios ao longo do ciclo, ocorrendo então, um nível de estresse para as plantas, facilitando ainda mais a entrada de patógenos. Outro fator importante foi a localização do talhão próximo a áreas de preservação permanente e reserva legal, favorecendo uma maior umidade dentro do experimento. Portanto, a incidência mais elevada de cancro no ‘Clone B’ na região de Redenção-PA pode ser explicada por esse conjunto de fatores de estresses desfavorável à planta e favorável à invasão do patógeno e progresso da doença.

A família Botryosphaeriaceae (que compõe o complexo de espécies fúngicas desse estudo) possui duas principais estratégias para infecção de plantas hospedeiras. A primeira envolve infecção por meio de aberturas naturais e persistência endofítica em tecidos assintomáticos (**Flowers et al. 2003; Bihon et al. 2011a**). Outras aberturas naturais tais como estômatos em folhas e brotos, lenticelas em caules, também podem fornecer vias de infecção para esse grupo de patógenos (**Weaver, 1979; Michailides, 1991; Johnson et al. 1994; Kim et al. 1999; Ploetz, 2003**). A segunda estratégia para a infecção das plantas é por ferimentos. Feridas associadas a doenças causadas por este fungo incluem as resultantes de atividades humanas, tais como poda, desrama, desbaste ou enxerto (**Michailides, 1991; Johnson, 1994;**

**Pusey et al. 1995; Menge & Ploetz, 2003**). Finalmente, feridas naturalmente formadas durante o crescimento da raiz também podem permitir a infecção a partir do inóculo presente no solo (**Whitelaw-Weckert et al. 2006**). Assim, a alta incidência verificada no talhão do ‘Clone B’ em Redenção-PA pode estar diretamente relacionada a todos os fatores acima mencionados. Esses dados sugerem então que, mesmo com a utilização de material genético com tolerância ao cancro da teca, altas incidências da doença podem ser verificadas caso o manejo silvicultural ou as condições ambientais no cultivo não sejam adequados.

Outro fator que pode ter levado ao aumento da incidência de cancro nas áreas avaliadas foi o atraso na execução do processo de desrama. A desrama em condições silviculturais normais deve ocorrer anualmente, porém em função de custo esse procedimento não é executado, fazendo que os galhos aumentem em diâmetro dificultando assim sua cicatrização e favorecendo a invasão e desenvolvimento do patógeno. Nesse trabalho foi possível observar que, na maioria das áreas em que a desrama foi realizada de forma atrasada, houve posteriormente o aumento da incidência. **Hodges et al. (1976)** trabalhando com o cancro do eucalipto causado por *Diaporthe cubensis* (atualmente *Chrysosporthe cubensis*), sugerem que os sítios de infecção são, principalmente, os ferimentos e rachaduras na casca bem como cicatrizes nodais em galhos desramados.

**Picos-Muñoz et al. (2015)**, estudando *L. theobromae* em cultivos agrícolas no México, afirmam que a principal rota de entrada do fungo é através de feridas produzidas por ferramentas de podas, insetos e causas naturais. Outro fator que está intimamente relacionado ao aumento da incidência, é a realização da desrama em épocas chuvosas. Como observado, nesse estudo, a desrama em época chuvosa, favoreceu ao aumento da incidência, além de o tempo de cicatrização do local onde a desrama foi realizada foi mais prolongado, proporcionando várias condições favoráveis ao patógeno.



Em estudo realizado em *Melaleuca quinquenervia* com o objetivo de estudar a histopatologia da hospedeira em resposta a infecção de *Botryosphaeria ribis*, observaram-se que os maiores índices de infecção ocorreram na presença de água livre (**Rayachhetry et al. 1996**). Durante os períodos de alta umidade relativa, a mucilagem que circunda os conídios nos corpos de frutificação aumenta em volume para produzir o cirro. Este, quando molhado dissolve-se, liberando os conídios para germinar (**Fitt et al. 1986**). Assim, a dispersão hídrica favorece o rompimento dessa massa de esporos que pode causar auto-infecções ou, no máximo, infecções em árvores vizinhas por meio do impacto de gotas de chuvas ou via vento (**Krugner & Auer, 2005; Hodges et al. 1979**). Um trabalho foi realizado com doenças de frutas tropicais confirma a hipótese citada, pois observou-se que durante os períodos de chuva, há uma maior produção de esporos (**Ploetz, 2003**).

As curvas de progresso inicialmente apresentaram um desenvolvimento lento nos primeiros estágios. Essa observação coincide com um período durante o cultivo onde reduzidas ações silviculturais foram implementadas resultando em menores ocorrências de infecções nesse período. Ainda favorecendo essa hipótese, foi observada uma rápida aceleração na incidência do cancro no início das intervenções silviculturais na floresta que favoreceram a infecção e dispersão dos propágulos do patógeno(s).

No presente trabalho, o modelo monomolecular foi o que apresentou melhor ajuste das curvas de progresso do cancro obtidas nas duas regiões de cultivo. Alguns estudos mostraram um melhor ajuste das curvas de progresso de doenças causadas por espécies de *Lasiodiplodia* com modelo Gompertz. Em estudo realizado com a resinose do cajueiro (causado por *L. theobromae*) em pomares comerciais no Semi-árido Nordestino, o modelo Gompertz foi o que apresentou melhor ajuste (**Cysne et al. 2010**). Outro trabalho realizado com *L. theobromae* em plantios de pinhão-manso no México apresentou também um melhor ajuste das curvas de progresso obtidas ao modelo Gompertz. Esses dados estão em contraste com os obtidos no

presente trabalho, sugerindo que as curvas de progresso de doenças causadas por complexo de espécies *L. theobromae* não apresentam um consenso quanto ao ajuste aos modelos epidemiológicos e que os ajustes estão, muito provavelmente, relacionados às condições ambientais favoráveis (ou não) à produção de inóculo secundário.

O índice de dispersão apresentou uma tendência de aleatoriedade das plantas infectadas para a maioria das avaliações. No entanto, a análise de Taylor modificada apresentou uma maior tendência de agregação de plantas infectadas. Esses resultados contrastantes podem ser explicados devido à abordagem metodológica de cada análise. O índice de dispersão analisa a distribuição das plantas doentes numa parcela num dado tempo, já a lei de Taylor analisa a mesma parcela durante todo o período avaliado. Neste caso, o modo mais adequado para caracterizar a distribuição de cancro seria um processo de duas fases: uma com distribuição aleatória no início do plantio (incidências baixas) tendo uma tendência de agregação ao longo do cultivo.

Embora vetores do fungo *L. theobromae* já tenham sido relatados em outras culturas, como mangueira (**Lopes et al. 2009**), no presente trabalho não foi verificado indícios que sugerissem a presença de vetores nas áreas avaliadas. É importante ressaltar que esforços consideráveis foram realizados, como a observação do caule em busca de orifícios, instalação de armadilhas distribuídas dentro das áreas experimentais visando a capturar prováveis vetores. Portanto, essa ausência de vetores na área sugere que mudas infectadas sejam realmente a principal fonte de inóculo primário de *L. theobromae* no cultivo e que a disseminação secundária existente é resultante, principalmente, da implementação de tratamentos silviculturais inadequados (especialmente devido a desramas tardias) em combinação com condições ambientais favoráveis ao patógeno.

O padrão aleatório verificado no início das avaliações pode ser resultado da introdução randômica de plantas infectadas provenientes dos viveiros. Essas plantas servem como fonte

de inóculo inicial e para uma posterior disseminação secundária especialmente após implementação de desramas tardias. Um agravante para o cultivo é fato de que essa prática silvicultural é muitas vezes realizada em épocas de chuva, em que existe a presença do inóculo (composto de ascósporos) que necessita de água para liberação e transporte pelo vento, além das ferramentas de desrama servirem também como mecanismos de dispersão da doença, em função de não adoção de métodos de desinfestação desses equipamentos. Resultados similares foram obtidos em um trabalho realizado com podridão branca da maçã (*Botryosphaeria dothidea*) em que os autores afirmam que a principal fonte de inóculo do patógeno são os ramos de poda da macieira que permanecem no pomar, local onde picnídios e pseudotécios do patógeno desenvolvem-se (Drake, 1971; Sutton & Boyne, 1983). No mesmo trabalho os autores sugerem que a dispersão aleatória é o modelo mais adequado, mesmo considerando o índice de dispersão (Cysne *et al.* 2010). O mesmo padrão de agregação foi observado em trabalho realizado com cancro basal em *Eucaliptus grandis*, em que apresentou, nos quadrats  $2 \times 2$ ,  $2 \times 4$  um padrão de agregação em percentuais reduzidos de 5,4% em 22,2%, respectivamente. No entanto, no quadrat  $5 \times 10$  foi observada uma tendência de aleatoriedade. Esses dados indicam que os focos da doença podem envolver um número de duas a dez árvores de forma agregada e podem não existir focos acima de vinte árvores, o que sugere, portanto, que a maioria das árvores com cancro esteja distribuída em focos individuais (Souza, 2007). Em trabalho realizado com podridão branca da maçã, analisando o padrão de distribuição espacial da doença, feita a partir de dados coletados em 17 grupos com seis plantas, em duas datas, mostrou que as árvores doentes estavam distribuídas de forma agregada (Valdebenito-Sanhueza *et al.* 2005).

Em resumo, o progresso temporal e espacial do cancro da teca foi muito influenciado em função dos métodos de manejo silviculturais e do material genético empregado. As informações obtidas nesse estudo são importantes para a melhor compreensão do

comportamento e para elaboração de estratégias de manejo do cancro da teca. Esses dados sugerem que o manejo fitossanitário deve ser mais rígido. Recomenda-se utilizar materiais genéticos resistentes ou tolerantes, eliminar plantas doentes no início da epidemia e não realizar desrama no período chuvoso (visando a reduzir a concentração de inóculo no período de máxima suscetibilidade da cultura).

## CONCLUSÕES

- ✓ A incidência do cancro da teca variou em função dos materiais comerciais e regiões das avaliadas;
- ✓ O padrão espacial de plantas infectadas com *Lasiodiplodia theobromae* é tipicamente agregado;
- ✓ A disseminação secundária é a principal responsável pelo aumento da incidência do cancro nas florestas de teca;
- ✓ O manejo deve ser realizado desde a fase de viveiro e no campo até o ciclo final da cultura;
- ✓ A desrama não deve ser realizada em época chuvosa;
- ✓ A desrama deve ser realizada anualmente para evitar a ocorrência de galhos com maior diâmetro.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BERGAMIN FILHO A. & AMORIN, L. **1996**. Doenças de Plantas Tropicais: Epidemiologia e Controle Econômico. Editora Agronômica Ceres Ltda.

BORGES, R.C.F.; SANTOS, M.D.M.; MACEDO, M.A.; MARTINS, I.; NASCIMENTO, A.G.; CAFÉ-FILHO, A.C.; BOITEUX, L.S.; FONSECA, M.E.N.; INÁCIO, C.A & MELLO, S.C.M. **2015**. A trunk canker disease of *Tectona grandis* induced by *Lasiodiplodia theobromae* in Brazil. New Disease Reports 31: 26.

BIHON, W.; BURGESS, T.I.; SLIPPERS, B.; WINGFIELD, M.J & WINGFIELD, B.D. **2011a**. Distribution of *Diplodia pinea* and its genotypic diversity within asymptomatic *Pinus patula* trees. Australasian Plant Pathology 40: 540–548.

BIHON, W.; SLIPPERS, B.; BURGESS, T.I.; WINGFIELD, M.J & WINGFIELD, B.D. **2011b**. Sources of *Diplodia pinea* endophytic infections in *Pinus patula* and *P. radiata* seedlings in South Africa. Forest Pathology 41: 370–375.

CYSNE, A. Q.; CARDOSO, J. E.; & FARIAS, F. C. **2010**. Spatial-temporal analysis of gummosis in three cashew clones at northeastern Brazil. Journal of Phytopathology 158: 676–682.

DRAKE, C.R. **1971**. Source and longevity of apple fruit rot inoculum of *Botryosphaeria ribis* and *Physalospora obtusa* under orchard condition. Plant Disease Reporter 55: 122–126.

FIGUEIREDO, E.O.; OLIVEIRA, L.C.; BARBOSA, L.K.F. **2005**. Teca (*Tectona grandis* L.f.): Principais Perguntas do Futuro empreendedor Florestal. Embrapa Acre. 87 p.

FIRMINO, A.C.; TOZZE JR., H.J.; FURTADO, E.L. **2012**. First report of *Ceratocystis fimbriata* causing wilt in *Tectona grandis* in Brazil. New Disease Reports 25: 24.

FLOWERS, J.L.; HARTMAN, J.R & VAILLANCOURT, L.J. **2003**. Detection of latent *Sphaeropsis sapinea* infections in Austrian pine tissues using nested-polymerase chain reaction. Phytopathology 93: 1471–1523.

JOHNSON, G.I. **1994**. *Dothiorella* stem canker and fruit rot. In: PLOETZ, R.C.; ZENTMYER, G.A.; NISHIJIMA, W.T.; ROHRBACH, K.G & OHR, H.D. Compendium of Tropical Fruit Diseases. APS Press, St Paul, Minnesota, p. 76.

HODGES, C.S.; REIS, M.S.; FERREIRA, F.A & HENFLING, J.D.M. **1976**. O cancro do eucalipto causado por *Diaporthe cubensis*. Fitopatologia Brasileira 1: 129–170.

KATOH, K & STANDLEY, D.M. **2013**. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. Molecular Biology and Evolution 30: 772–780.

KEARSE, M.; MOIR, R.; WILSON, A.; STONES-HAVAS, S.; CHEUNG, M.; STURROCK, S.; BUXTON, S.; COOPER, A.; MARKOWITZ, S.; DURAN, C.; THIERER, T.; ASHTON, B.; MEINTJES, P & DRUMMOND, A. **2012**. Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. Bioinformatics 28: 1647–1649.

KUMAR, S.; STECHER, G & TAMURA, K. **2016**. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. Molecular Biology and Evolution 33: 1870–1874.

KIM, K.W.; PARK, E.W & AHN, K.K. **1999**. Pre-penetration behavior of *Botryosphaeria dothidea* on apple fruits. Plant Pathology Journal 15: 223–227.

LOPES, E.B.; DE BRITO, C.H.; ARAÚJO, L.H.A.; NASCIMENTO, L.C & BATISTA, J.L. **2009**. Etiologia e inseto vetor da morte-descendente-da-mangueira (*Mangifera indica*) no Estado da Paraíba. Tecnologia & Ciência Agropecuária 3: 37–40.

MADDEN, L. V. & HUGLES, G. **1995**. Plant disease incidence: Distribution, heterogeneity, and temporal analysis. Annual Review of Phytopathology 33: 529–564.

MAZIAH, Z & LEE, S.S. **1999**. Diseases and Disorders of Teak (*Tectona grandis*) in Peninsular Malaysia. Proceedings of the 5<sup>th</sup> International Conference on Plant Protection in the Tropics. Kuala Lumpur 158 - 163.

MICHAILIDES, T.J. **1991**. Pathogenicity, distribution, sources of inoculum, and infection courts of *Botryosphaeria dothidea* on pistachio. Phytopathology 81: 566–573.

MENGE, J.A. & PLOETZ, R.C. **2003**. Diseases of avocado. In: PLOETZ, R.C. (ed.) Diseases of Tropical Fruit Crops. CAB International, Wallingford, UK, pp. 35–71.

PLOETZ, R.C. **2003**. Diseases of mango. In: Ploetz, R.C. (ed.) Diseases of Tropical Fruit Crops. CAB International, Wallingford, UK, pp. 327–363.

PICOS-MUÑOZ, P. A.; GARCÍA-ESTRADA, R. S.; LEÓN-FÉLIX, J.; SAÑUDOBARAJAS, A., & ALLENDE-MOLAR, R. **2015**. *Lasiodiplodia theobromae* en cultivos agrícolas de México: taxonomía, hospedantes, diversidad y control. *Revista Mexicana de Fitopatología* 3: 54–74.

PUSEY, P.L.; KITAJIMA, H & Wu, Y. **1995**. Fungal gummosis. In: OGAWA, J.M., ZEHR, E.I., BIRD, G.W., RITCHIE, D.F., URIU, K. & UYEMOTO, J.K. *Compendium of Stone Fruit Diseases*. APS Press, St Paul, Minnesota, p. 33–34.

INSTITUTO DE PESQUISAS E ESTUDOS FLORESTAIS (IPEF) *Tectona grandis*. **2003**. Disponível em: <<http://www.ipef.br/identificacao/tectona.grandis.asp>> Acesso em: 06 de junho 2018.

RAYACHHETRY, M.B.; BLAKESLEE, G.M & Miller, T. **1996**. Histopathology of *Botryosphaeria ribis* in *Melaleuca quinquenervia*: pathogen invasion and host response. *International Journal of Plant Sciences* 157: 219–227.

SOUZA, S. E. **2007**. Dinâmica espaço-temporal e danos do cancro basal em *Eucalyptus grandis*. Tese (Doutorado em Agronomia-Proteção de Plantas). Faculdade de Ciências Agrônomicas da UNESP–Campus de Botucatu. Botucatu 160 p.

SUTTON, T.B. & BOYNE, J.V. **1983**. Inoculum availability and pathogenic variation of *Physalospora obtusa* and *Botryosphaeria dothidea* in apple production in North Carolina. *Plant Disease* 67: 503–506.

TAVARES, S.C.C.H. **2002**. Epidemiologia e manejo integrado de *Botryodiplodia theobromae* situação atual no Brasil e no mundo. *Fitopatologia Brasileira* 27: 46–52.

TAVARÉ, S. **1986**. Some probabilistic and statistical problems in the analysis of DNA sequences. *Lectures on Mathematics in the Life Sciences* 17: 57–86.

VALDEBENITO-SANHUEZA, R.M., DUARTE, V., AMORIM, L. & PORTO, M.D.M. **2005**. Detecção e epidemiologia da podridão branca da maçã. *Fitopatologia Brasileira* 30: 217–223.

WHITE, T.J.; BRUNS, T.; LEE, S & TAYLOR, J. **1990**. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS M.A., GELFAND D.H., SNINSKY J.J. & WHITE T.J. (eds) *PCR protocols. A guide to methods and applications*. Academic Press, San Diego 315-322.



WEAVER, D.J. **1979**. Role of conidia of *Botryosphaeria dothidea* in the natural spread of peach tree gummosis. *Phytopathology* 69: 330–334.

WHITELAW-WECKERT, M.A.; SERGEEVA, V & Priest, M.J. **2006**. *Botryosphaeria stevensii* infection of Pinot Noir grapevines by soil–root transmission. *Australasian Plant Pathology* 35: 369–371.

## **Capítulo 4**

**Análise transcritômica da interação *Tectona grandis* - *Ceratocystis fimbriata*.**

## RESUMO

A murcha causada pelo fungo *Ceratocystis fimbriata* é uma das doenças de maior impacto na cultura da teca (*Tectona grandis*) no Brasil, causando significativas perdas econômicas. Até o presente momento, não existem pesquisas relacionadas à elucidação dos mecanismos de defesa de *T. grandis* ao ataque de *C. fimbriata*. Neste contexto, o principal objetivo do presente trabalho foi investigar (por meio da análise transcritômica) os mecanismos de defesa de teca em resposta à infecção por *C. fimbriata*. A análise da expressão gênica diferencial durante a interação *T. grandis*–*C. fimbriata* foi realizada pela análise comparativa entre materiais genéticos contrastantes. O ‘Clone A’ (suscetível) e do ‘Clone B’ (tolerante) foram inoculados com o isolado *C. fimbriata* ‘RB01’ e analisados comparativamente com seus respectivos controles não-inoculados em diferentes períodos (3, 7 e 15 dias após a inoculação – DPI). Um transcriptoma formado por 123.213 potenciais genes e 241.656 isoformas ( $\approx 1.96$  isoforma por gene) foi obtido após montagem. Dentre estes 27.642 genes e 102.060 isoformas representavam ORFs (*open reading frames*) reais e potencialmente traduzidas. Aplicando um filtro de *folding change* de  $\pm 2$  vezes e *p-value* ajustado menor que 0.01 foi obtido um catálogo de genes que se mostraram diferencialmente expressos entre as plantas dos clones contrastantes (suscetível e tolerante) nos mesmos períodos de tempo (considerando suas respectivas réplicas biológicas). Os genes exclusivos e comumente expressos no ‘Clone A’ (suscetível) e no ‘Clone B’ (tolerante) em cada DPI foram identificados. Nenhum gene foi comumente expresso no ‘Clone B’ (tolerante) nos diferentes DPIs avaliados, indicando uma modulação específica de genes para cada período de avaliação. Um modelo teórico de resposta da teca à infecção por *C. fimbriata* foi elaborado com base no perfil de genes candidatos diferencialmente expressos nos clones contrastes e nos controles. Esse estudo pioneiro possibilitou identificar e catalogar subgrupos de genes modulados na interação *T. grandis*–*C. fimbriata*, incluindo potenciais fatores de resistência e de suscetibilidade. Essa informação genética/genômica pode auxiliar no desenvolvimento de clones resistentes/tolerantes via melhoramento clássico (através de seleção assistida por marcadores moleculares), bem como em estratégias biotecnológicas (edição e silenciamento gênicos).

## ABSTRACT

The wilt caused by the fungus *Ceratocystis fimbriata* is one of most important the diseases of teak (*Tectona grandis*) crop in Brazil, causing significant economic losses. So far there is no research work related to the elucidation of the defense mechanisms of *T. grandis* to the attack of *C. fimbriata*. In this context, the main objective of the present work was to investigate (via transcriptomic analysis) the mechanisms of defense of teak after infection by *C. fimbriata*. The analysis of the differential gene expression in the interaction *T. grandis*-*C. fimbriata* was carried out using the tolerant (T) 'Clone B' and the susceptible (S) 'Clone A', inoculated with *C. fimbriata* 'RB01' isolate in comparison with their respective mock-inoculated controls at different time points (3, 7 and 15 days after inoculation – DPI). The objective of this study was to identify genes significant modulated in both compatible and incompatible interactions. A transcriptome consisting of 123,213 genes and 241,656 isoforms ( $\approx$  1.96 isoform per gene) was obtained after assembly. A total of 27,642 genes and 102,060 isoforms presented evidence of real ORFs (open reading frames). A catalog of differentially expressed genes between the contrasting (susceptible and tolerant) clones at the same time periods (considering their respective biological replicates) was obtained after applying a 2-fold folding change filter and adjusted p-value lower than 0.01. Both unique and commonly expressed genes in the T and S clones in each DPI were identified. No gene was commonly expressed in the T clone in the different DPIs evaluated, indicating a specific gene modulation for each evaluation period. A theoretical model of the teak response to *C. fimbriata* infection was elaborated based upon the profiles of candidate genes differentially expressed in the contrasting clones and controls. This pioneering study allowed the identification of a catalog of modulated genes in the interaction *T. grandis*-*C. fimbriata*, including potential factors of tolerance and susceptibility. This genetic/genomic information may aid in the development of more tolerant clones via classical breeding (through marker assisted selection) as well as in biotechnology strategies (gene editing and silencing).

## INTRODUÇÃO

A teca (*Tectona grandis* L. f., família Lamiaceae) é uma espécie arbórea nativa do Subcontinente Índico e Sudeste Asiático cuja madeira de elevada qualidade que tem sido utilizada para confecção de móveis finos e na construção naval. Há cerca de 100 anos, cultivos comerciais de teca passaram a ser implementados nas regiões de origem da espécie devido ao esgotamento das populações endêmicas que foram intensamente exploradas de forma extrativista. Desde então, os plantios comerciais de teca começaram a se expandir-se para outros países e continentes que apresentavam condições climáticas semelhantes, alcançando novas zonas tropicais, como a África Ocidental, América Latina e o Caribe (Figueiredo *et al.* 2005).

As florestas naturais estão estimadas em 29.039 milhões de hectares na Índia, Laos, Myanmar e Tailândia. A área de reflorestamento está distribuída em 38 países, e é estimada em 4.356 milhões de hectares, das quais 83% estão localizadas na Ásia, 11% na África, e 6% na zona Tropical da América (Kollert *et al.*, 2012). A área plantada com teca no Brasil tem apresentado um crescimento muito intenso. Até 1996 a área total era inferior a 11.000 hectares, alcançando 42.496 hectares em 2006 e 58.810 ha em 2008. No ano de 2015, totalizou 89.081 ha (Iba, 2015), sendo o Estado do Mato Grosso responsável por 90% da área cultivada (Abraf, 2011).

Embora com excelente adaptação, o cultivo da teca no Brasil tem enfrentado diversos problemas fitossanitários (Firmino *et al.* 2012; Borges *et al.* 2015 e 2018) tais como a murcha causada por *Ceratocystis fimbriata* Ellis & Halsted. A murcha-de-*Ceratocystis* é uma das doenças de maior impacto negativo em teca, em função da elevada incidência e perdas significativas e volumetria e qualidade da madeira. Perdas podem atingir até 40% ao final do ciclo da cultura, causando redução do valor agregado da madeira e, conseqüentemente, das margens de lucros (Firmino *et al.* 2012).

A murcha causada por *C. fimbriata* tem sido também reportada como uma das doenças de maior impacto econômico na cultura do eucalipto no Brasil (**Alfenas et al. 2009; Ferreira et al. 2012**). *Ceratocystis fimbriata* é um fungo que coloniza o xilema induzindo sintomas de murcha e seca tanto no eucalipto (**Firmino et al. 2015**) quanto em plantas de teca (**Borges et al. 2015**). Plantas infectadas por *C. fimbriata* apresentam um quadro sintomatológico característico que inclui o escurecimento do feixe do xilema (em geral da periferia para a medula). Este escurecimento é decorrente do colapso dos vasos do xilema causado pela invasão e colonização do fungo (**Firmino et al. 2015**).

A maneira mais adequada e sustentável de manejo dessa doença é o plantio de clones resistentes ou tolerantes. No entanto, a base genética na cultura ainda é extremamente estreita, o que tem dificultado a seleção de novos materiais resistentes e/ou tolerantes. Até o presente momento, não existem pesquisas relacionadas à elucidação dos mecanismos de defesa de *T. grandis* ao ataque de *C. fimbriata*. Neste capítulo este tema é investigado utilizando ferramentas de análise transcritômica. Este estudo visou a identificar e catalogar grupos de genes modulados na interação planta-patógeno, incluindo potenciais fatores de resistência e de suscetibilidade. Essa informação genética/genômica pode auxiliar no desenvolvimento de clones resistentes/tolerantes via melhoramento clássico (através de seleção assistida por marcadores moleculares) bem como em estratégias biotecnológicas (edição e silenciamento gênicos).

## MATERIAL E MÉTODOS

**Local de realização dos bioensaios-** Os ensaios foram realizados em casa de vegetação e nos Laboratórios de Biologia Molecular e Melhoramento Genético da Embrapa Hortaliças em Brasília, DF. A construção e o sequenciamento das bibliotecas de RNAseq foram realizados no Laboratório de Biotecnologia Animal da ESALQ/USP.

**Material vegetal-** Para a análise comparativa do perfil de expressão de genes associados com a resistência foram utilizados dois clones contrastantes, sendo estes denominados como ‘Clone A’ (altamente suscetível ao *C. fimbriata*) e ‘Clone B’ (tolerante ao *C. fimbriata*). Estudos anteriores mostraram que os materiais estudados apresentaram comportamentos diferentes em relação à suscetibilidade e tolerância a *C. fimbriata* (Borges *et al.* 2015).

**Inoculação do patógeno** – Isolado do patógeno identificado como ‘RB01’ foi obtido em plantios de teca naturalmente atacados pelo patógeno. O isolado ‘RB01’ foi inoculado em plantas sadias (com idade de 180 dias) obtidas em condições de viveiro. O inóculo foi depositado entre a casca e o lenho através de uma incisão (de aproximadamente 2 cm de comprimento) feita no caule com o auxílio de um estilete, 5 cm acima do coleto das plantas. Em cada orifício foi depositado um disco (2 mm de diâmetro) de meio Batata Dextrose Agar (BDA) contendo micélio do fungo. O ferimento foi coberto com uma camada de algodão umedecido e vedado com filme de PVC. Para as plantas testemunhas (“mock inoculated”) foi colocado apenas um disco de (2 mm de diâmetro) de BDA, seguindo a mesma metodologia acima, mas sem micélio fúngico. Desta forma, o bioensaio foi composto por quatro tratamentos: (1) clone suscetível A inoculado com *C. fimbriata* isolado ‘RB01’, (2) clone suscetível A (*mock*-inoculado = controle); (3) clone tolerante B inoculado com *C. fimbriata* isolado ‘RB01’ e clone tolerante B (*mock*-inoculado = controle). As plantas foram incubadas em casa de vegetação com temperatura mínima de 27 °C e máxima de 30 °C.

**Comprovação da infecção por *C. fimbriata*** – Antes da coleta a infecção pelo fungo foi comprovada por análises de PCR após extração do DNA a 10 cm da região de inóculo e utilizando os *primers* específicos para *C. fimbriata*.

**Coletas de amostras para análise transcritômica-** A coleta do material vegetal para análise via transcritômica foi realizada por meio do corte da planta na base do caule 10 cm acima do coleto, utilizando tesoura esterilizada em álcool 70%. Amostras do clone suscetível A, do clone tolerante B e de seus respectivos controles foram coletadas aos 0, 3, 7 e 15 dias após a inoculação (DPI). Para cada amostra foram coletadas cinco plantas inoculadas com o fungo e cinco plantas controle por clone. Imediatamente após a coleta, as plantas foram colocadas em tubos Falcon® submerso em nitrogênio líquido e posteriormente armazenadas em freezer - 80°C até o processamento realizado na mesma semana da coleta. Para a extração de RNA, cada tubo Falcon® (contendo um *pool* de amostras de cinco plantas) foi corretamente identificado quanto ao tempo de coleta e o clone correspondente. Inicialmente, apenas os tratamentos dos períodos 3, 5, 7 e 15 DPI foram utilizados para construção das bibliotecas de cDNA. O tempo zero foi reservado para análises posteriores via qPCR. Após a extração do RNA, análises da concentração e de qualidade foram estabelecidas com os seguintes '*pools*': Clone suscetível A inoculado aos 3 DPI (repetição 1-2), (repetição 3-4), aos 7 DPI (repetição 1-2), (repetição 3-4), aos 15 DPI (repetição 1-2), (repetição 3-4) e Clone suscetível A não inoculado aos 3 DPI (repetição 1-2-3 e 4), aos 7 DPI (repetição 1-2-3 e 4) e aos 15 DPI (repetição 1-2-3 e 4). Foram ainda estabelecidos os seguintes '*pools*': clone tolerante B inoculado aos 3 DPI (repetição 1-2), (repetição 3-4), aos 7 DPI (repetição 1-2), (repetição 3-4), ao 15 DPI (repetição 1-2), (repetição 3-4) e Clone tolerante B não inoculado 3 DPI (repetição 1-2-3 e 4), aos 7 DPI (repetição 1-2-3 e 4) e aos 15 DPI (repetições 1-2-3 e 4). O estabelecimento desses *pools* apresenta a finalidade de reduzir o número de bibliotecas.



**Extração e análise do RNA** – As amostras de tecido de caule foram maceradas em nitrogênio líquido e 0,1 a 5 gramas do macerado foram transferidas para microtubos (2 mL), que foram armazenados em ultrafreezer a -80°C. Para obtenção de RNA total foi utilizado o reagente *Concert™ Plant RNA* (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), seguindo essencialmente a metodologia sugerida pelo fabricante, mas implementada com algumas modificações. Ao microtubo contendo o macerado foram adicionados 500 µL do reagente *Concert™ Plant RNA* frio por 1 grama do tecido. Após homogeneizar em vórtex, as amostras foram incubadas à temperatura ambiente, por 5 minutos mantendo os tubos dispostos horizontalmente. O lisado foi então transferido para um tubo QIAshredder (QIAGEN, Texas, USA) e centrifugado a 12.000 x g (4° C por 2 minutos). O sobrenadante foi transferido para novos microtubos (2 mL), onde foram adicionados 100 µL de NaCl 5M, misturando por pipetagem e inversão durante 2 minutos. Em seguida, foram adicionados 300 µL de clorofórmio frio, misturando novamente por pipetagem e inversão. As amostras foram centrifugadas a 12.000 x g a 4°C, por 10 minutos, e a fase aquosa foi transferida para novo microtubo (2 mL), ao qual foi adicionado um volume igual de álcool isopropílico frio, misturando por pipetagem e inversão. As amostras foram mantidas em geladeira por 30 minutos e, então, centrifugadas a 12.000 x g a 4°C, por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e ao precipitado foram adicionados 1.000 µL de etanol 75% frio. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 12.000 x g à temperatura ambiente, por 1 minuto. O líquido foi descartado e os tubos deixados abertos em estufa a 37°C, por 10 minutos, para secagem. Após a secagem, o *pellet* foi ressuscitado em 30 µL de água livre de RNases (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). As amostras foram armazenadas a -80° C. A concentração e a qualidade das amostras de RNA total foram estimadas por espectrofotometria, no equipamento NanoDrop 2000 (Thermo), nos comprimentos de ondas 260 nm e 280 nm. Foram consideradas como amostras de boa qualidade apenas aquelas que apresentaram valores da razão de absorbância (A260/A280)

>1,6. Além disso, a integridade das amostras foi confirmada por eletroforese (3 V/cm) em gel de agarose 1,5% com a adição de água sanitária 2% em tampão TAE 1x. O resultado da eletroforese foi visualizado sob luz UV e digitalizado utilizando-se o equipamento de fotodocumentação Multi Doc-It Digital Imaging System (UVP). Este gel de agarose com adição de água sanitária substitui o gel com formaldeído comumente utilizado para verificar a integridade de RNAs. O hipoclorito de sódio (6%) presente em alvejantes comerciais ao mesmo tempo desnaturam estruturas secundárias de RNA pela ruptura de pontes de hidrogênio e elimina RNases presentes no gel (Aranda *et al.* 2012). Após a análise da concentração e da qualidade do RNA as amostras foram encaminhadas para o Laboratório de Biotecnologia Animal da ESALQ/USP, São Paulo, onde a qualidade do RNA foi novamente testada e foi realizada a construção de livrarias e sequenciamento do transcrito.

**Purificação e fragmentação do mRNA** – As bibliotecas de cDNA foram preparadas a partir de RNA total de cada amostra. A qualidade do RNA foi verificada de forma adicional utilizando o equipamento 2100 Bioanalyser (Agilent) e o protocolo Agilent RNA 6000 Nano Assay. As etapas de síntese de cDNA e construção das bibliotecas de RNAseq paired-end foram realizadas usando o kit 85 TruSeq RNA Sample Prep v2 LS Protocol (Illumina), de acordo com os procedimentos recomendados pelo fabricante e resumidamente descritos a seguir. O mRNA foi purificado a partir da preparação obtida de RNA total a (500 ng/  $\mu$ L), empregando *beads* magnéticas ligadas a moléculas poli-T complementares à cauda poli-A, presente no mRNA. Primeiramente, as *beads* foram ressuspensas em vórtex e em seguida foram adicionados 50  $\mu$ L da solução a cada amostra. As amostras contendo RNA total e as *beads* foram homogeneizadas por pipetagem e submetidas à desnaturação em termociclador (65 °C por 5 minutos, com finalização a 4 °C). Posteriormente, as amostras foram incubadas à temperatura ambiente (5 minutos), permitindo a ligação das *beads* à cauda poli-A do mRNA.

A placa contendo o complexo *beads*-mRNA foi colocada sobre um suporte magnético para separá-lo do restante da solução. Nesta etapa os *beads*-mRNA permaneceram aderidos à lateral da placa, enquanto o volume total da solução foi removido por pipetagem. Em seguida, realizou-se a limpeza das amostras usando o *Bead Washing Buffer* (200  $\mu$ L). As amostras foram homogeneizadas por pipetagem e novamente colocadas no suporte magnético (5 minutos) para separação da solução de limpeza, moléculas de rRNA e demais contaminantes. Após a limpeza foi feita a separação do mRNA das *beads* pela adição de 50  $\mu$ L de *Elution Buffer* às amostras, com posterior incubação no termociclador a 80°C por 2 minutos. O mRNA purificado foi novamente ligado a *beads* magnéticas, pela adição de 50  $\mu$ L de *Bead Binding Buffer* às amostras e posterior incubação à temperatura ambiente (5 minutos). A placa de amostras foi então colocada sobre o suporte magnético, todo o sobrenadante foi descartado, e o complexo *beads*-mRNA foi lavado utilizando *Bead Washing Buffer* (200  $\mu$ L). Posteriormente, a placa foi colocada sobre o suporte magnético (5 min) e o sobrenadante descartado. Em cada amostra foram adicionados 19,5  $\mu$ L de *Elute, Prime, Fragment Mix*. Realizou-se a homogeneização por pipetagem e estas foram levadas ao termociclador (94°C por 8 minutos, com finalização a 4°C) para a eluição, fragmentação e preparo do mRNA para a síntese de cDNA.

**Síntese do cDNA** – Após eluição, as amostras de mRNA foram retiradas do termociclador e colocadas sobre o suporte magnético por 5 minutos. Em seguida, 17  $\mu$ L do sobrenadante foram transferidos para uma nova placa de PCR. A primeira fita do cDNA foi sintetizada por meio da adição de 1  $\mu$ L da transcriptase reversa Super Script II e 7  $\mu$ L de First Strand Master Mix às amostras. A segunda fita foi sintetizada utilizando o *Second Strand Master Mix* (25  $\mu$ L). O cDNA foi sintetizado à temperatura de 16°C por 60 minutos em termociclador.

Posteriormente, procedeu-se com as etapas de limpeza do cDNA utilizando AMPure XP beads.

**Sequenciamento das bibliotecas de cDNA** – Foi realizada a ligação de adaptadores com múltiplos index às extremidades do cDNA, possibilitando sua hibridização à 87 *flowcells* de sequenciamento. Foi adicionado, de acordo com cada amostra a ser sequenciada, um adaptador diferente (*RNA Adapter Index AR001-AR012*). Após a ligação dos adaptadores foi feita uma amplificação para selecionar e aumentar o número de cópias dos fragmentos de cDNA que possuem adaptadores ligados às duas extremidades. Para isso, foi utilizado na PCR um coquetel de primers (*Primer Cocktail*) complementares aos adaptadores utilizados. Posteriormente, foi realizada a avaliação de qualidade das bibliotecas usando o equipamento 2100 Bioanalyser (Agilent). Em seguida, procedeu-se a quantificação por PCR quantitativa (qPCR), usando a metodologia descrita em *Sequencing Library qPCR Quantification Guide* (Illumina) e o termociclador StepOne (Applied Biosystems®). Após a quantificação das bibliotecas, o sequenciamento se deu no aparato HiSeq2500 (Illumina). Foram sequenciadas 18 bibliotecas por *lane* da *flowcell*, em uma concentração inicial de 17 pM de DNA por *lane*.

**Análise de bioinformática dos dados de RNAseq**– As análises de bioinformática das sequências das 18 bibliotecas, foram realizadas no Laboratório de Genômica e Expressão da Unicamp.

**Análise de qualidade das bibliotecas** – As bibliotecas provenientes da plataforma Illumina foram previamente submetidas a uma seleção de qualidade, o que foi evidenciado pela variação do tamanho (de 99.79 +/- 0.06 pares de bases) e da alta qualidade média (nota *phred* em torno de 36.10) dos *reads* recebidos. Desta forma, não foi necessária nenhuma etapa adicional de limpeza, tais como triagem de bases de baixa qualidade ou remoção de *reads* duplicados ou qualidade média baixa. O sequenciamento de RNA pode apresentar uma

quantidade alta de *reads* provenientes de RNA ribossomal, especialmente caso tenha ocorrido algum problema na preparação das bibliotecas, o que não seria desejável para um projeto de transcriptoma. Desta forma utilizou-se o software *SortMeRNA* (Kopylova *et al.* 2012) para quantificar o RNA ribossomal nas bibliotecas. Para todas as bibliotecas o resultado foi de que menos de 5% dos *reads* correspondiam ao RNA ribossomal, o que está dentro dos parâmetros considerados adequado para este estudo.

**Análise *in silico* das bibliotecas** – Foi necessário adicionar uma etapa de montagem *De Novo* dos transcritos a partir dos *reads* sequenciados uma vez que não está ainda disponível um genoma referência disponível para *T. grandis*. Para isto, foi realizado o concatenamento dos *reads* de todas as 18 bibliotecas em um único arquivo fasta, utilizado como entrada para o software Trinity (Grabherr *et al.* 2011). Este *software* é baseado em gráficos de Bruijn que permite também a montagem de isoformas geradas por *splicing* alternativo. Foi utilizada a opção `normalize_reads` a fim de diminuir o custo computacional de uso de memória, e `SS_lib_type` como RF, para utilizar as informações da direção do transcrito obtidas a partir do protocolo de sequenciamento utilizado (*stranded reads*).

**Busca de *reads* oriundos do genoma do patógeno** – Foi incluída uma etapa de avaliação da quantidade de sequências do patógeno uma vez que as bibliotecas foram amostradas de uma região da planta próxima aos sítios de inoculação. Para tal, alinhou-se os *reads* totais contra o genoma referência de *C. fimbriata* (Wilken *et al.* 2013), utilizando o alinhador Hisat2 (Kim, 2015). O resultado dos alinhamentos mostrou uma quantidade extremamente baixa (menor que 0.01%) de *reads* do patógeno presentes nessas bibliotecas, com números dentro dos valores de ruído causados por regiões de *repeats*, indicando não ser necessária uma etapa de quantificação desses transcritos.

**Busca e anotação de transcritos com ORFs no transcriptoma** – O *software* Trinity montou os transcritos a partir da informação dos *reads* sequenciados. Porém, nem todos estes

transcritos montados são reais, isto é, apresentam de fato ORFs (open read frames) que são potencialmente traduzidas. Desta forma, software Transdecoder (**Haas, <https://transdecoder.github.io/>**) foi utilizado para buscar ORFs completas ou incompletas em cada transcrito. Como resultado, foram obtidos 27.642 genes e 102.060 isoformas que apresentaram evidências de ORFs em suas sequências. Os transcritos com ORFs presentes foram anotados com o software Pannzer (**Koskinen, 2015**) que se baseia no alinhamento dos genes contra o banco de dados UniProt (**Apweiler, 2004**). Muitos genes não resultaram em nenhuma anotação biologicamente relevante, portanto utilizamos o software RPSBlast para busca de domínios proteicos conhecidos no banco de dados CDD (**Marchler-Bauer, 2005**).

**Análise de expressão diferencial** – Como citado anteriormente, para cada biblioteca os *reads* foram realinhados sobre a montagem do transcriptoma. Esta informação é utilizada pelo RSEM (**Li, 2011**) para a construção de matrizes de contagem de reads por transcrito. Ele também calcula o valor em transcritos por milhão (TPM), que consiste no valor da contagem de reads normalizados pelo tamanho do transcrito e pela quantidade de *reads* sequenciados na biblioteca de determinado tratamento. Analisando a tabela de TPMs foi possível investigar o perfil de transcrição de cada gene. A matriz de contagem de *reads* foi usada como entrada para o pacote DeSeq2 (**Love, 2014**) que utiliza inferências estatísticas baseadas na distribuição binomial negativa da expressão dos transcritos. Aplicando o filtro de *folding change* de  $\pm 2$  vezes e *p-value* ajustado menor que 0.01 tem-se como resultado listas de genes que estão diferencialmente expressos entre as plantas suscetíveis e tolerantes no mesmo período de tempo considerando suas respectivas réplicas biológicas. Para a busca dos genes diferencialmente expressos (entre plantas controle e inoculadas de um mesmo clone) utilizou-se o software DeSeq (**Anders, 2010**), já que não havia réplicas biológicas para as plantas controle.

*Seleção de genes-candidatos* – A partir da análise da expressão diferencial e da anotação em BLASTx, foram selecionados os genes candidatos. A escolha foi realizada, por meio de genes que possivelmente estão associados à resposta de defesa ou estresse biótico.

**Anotação funcional dos genes diferencialmente expressos** – Os genes diferencialmente expressos foram submetidos análise de enriquecimento utilizando o software topGo (**Alexa *et al.* 2006**) para determinação das funções gênicas de acordo com os termos do *Gene Ontology*.

## RESULTADOS

**Montagem de transcritos** – A montagem gerou um transcriptoma formador por 123.213 transcritos e 241.656 isoformas ( $\approx$  1.96 isoforma por gene). Como forma de avaliar a qualidade do transcriptoma alinhou-se os *reads* das bibliotecas contra a montagem utilizando o software Bowtie2 (Langmead, 2012) e verificou-se que todas as bibliotecas apresentaram entre 90% e 92% de alinhamento, o que é um valor que gera bastante confiança na montagem. A porcentagem não alinhada muito provavelmente são *reads* de regiões com baixa cobertura de sequenciamento ou com algum tipo de erro. Para avaliar a montagem utilizou-se a metodologia disponível no programa BUSCO (Simão, 2015). Ela baseia-se na busca de genes de cópia única que são conservados em um determinado grupo. Nesse caso, utilizou o banco de dados referente às embriófitas. De um total de 1440 genes conservados foram encontrados no transcriptoma 1247 (86.6%) genes que apareceram de forma completa.

**Busca de *reads* pertencentes ao patógeno** – O resultado dos alinhamentos mostrou uma quantidade extremamente baixa (menor que 0.01%) de *reads* do patógeno, presentes nessas bibliotecas, com números dentro dos valores de ruído causados por regiões de *repeats*.

**Busca e anotação de transcritos com ORFs no transcriptoma** – Como resultado tem-se 27.642 genes putativos e 102.060 isoformas que apresentaram evidências de ORFs em suas sequências. Os transcritos com ORFs presentes foram anotados com o software Pannzer (Koskinen, 2015) que se baseia no alinhamento dos genes contra o banco de dados UniProt (Apweiler, 2004). Muitos genes não resultaram em nenhuma anotação biologicamente relevante, portanto utilizamos o software RPSBlast para busca de domínios proteicos conhecidos no banco de dados CDD (Marchler-Bauer, 2005). Dessa forma foi possível anotar aproximadamente 61% dos genes usando o PANNZER e 75% usando o RPSBlast.



**Análise de expressão diferencial** – Aplicando o filtro de *folding change* de  $\pm 2$  vezes e p-value ajustado menor que 0.01 tem-se como resultado listas de genes que estão diferencialmente expressos entre as plantas susceptíveis e tolerantes no mesmo período de tempo considerando suas respectivas réplicas biológicas. As tabelas de 6 a 11 apresentam os 10 genes mais diferencialmente expressos, com maiores *folding change*, para cada biblioteca (tratamento analisado). As tabelas completas com os genes estão em anexo.

**Tabela 6.** Top10 genes diferencialmente expressos em *Tectona grandis* ‘Clone A’ (susceptível) aos 3 dias após a inoculação com *C. fimbriata*. Valores do *fold-change* estão coloridos em tons de vermelho para os reprimidos e em verde para os induzidos na infecção.

Clone S – 3DPI	folding	Annotation
DN37621_c0_g2	3,41	LRR receptor
DN39309_c0_g1	3,40	Transcriptional factor WRKY I
DN41600_c0_g1	3,17	Phospholipase-C (PIPLC)
DN46784_c0_g1	2,07	Phospholipase-C (PIPLC)
DN41750_c0_g2	-93,18	Not defined
DN39624_c0_g2	-340,93	Not defined
DN32146_c0_g1	-461,09	Not defined
DN35133_c0_g2	-556,59	Not defined
DN46288_c1_g2	-737,74	Not defined
DN37941_c1_g2	-2234,28	Not defined

**Tabela 7.** Top10 genes diferencialmente expressos em *Tectona grandis* ‘Clone A’ (susceptível) aos 7 dias após a inoculação com *C. fimbriata*. Valores do *fold-change* estão coloridos em tons de vermelho para os reprimidos e em verde para os induzidos na infecção.

Clone S – 7DPI	Folding	Annotation
DN17813_c0_g2	Inf	Not defined
DN50221_c1_g7	7,9	Not defined
DN45355_c0_g2	3,2	Ypr10 protein

DN44451_c2_g1	2,1	Metal ion binding protein, putative
DN43106_c0_g1	2,1	Disease resistance response protein 206
DN46402_c2_g4	-82,0	Not defined
DN37533_c2_g5	-117,5	Not defined
DN37946_c0_g1	-130,0	Not defined
DN41750_c0_g1	-138,0	Not defined
DN46402_c2_g12	-173,5	Not defined

**Tabela 8.** Top10 genes diferencialmente expressos no em *Tectona grandis* ‘Clone A’ (susceptível) aos 15 dias após dias após a inoculação com *C. fimbriata*. Valores do *fold-change* estão coloridos em tons de vermelho para os reprimidos e em verde para os induzidos na infecção.

CloneS – 15DPI	Folding	Annotation
DN27069_c0_g1	Inf	Not defined
DN32943_c0_g1	10,29	Not defined
DN32943_c1_g1	9,69	SMLII
DN50737_c1_g1	8,80	Os03g0241600 protein (Fragment)
DN27943_c0_g1	7,16	Histidine phosphotransfer protein
DN51963_c0_g4	-16,01	Not defined
DN52711_c5_g1	-18,06	Not defined
DN37946_c0_g1	-22,10	Not defined
DN36997_c0_g1	-28,63	Not defined
DN41974_c0_g5	-42,09	Hypothetical leucine rich repeat protein

**Tabela 9.** Top10 genes diferencialmente expressos em *Tectona grandis* ‘Clone B’ (tolerante) aos 3 dias após a inoculação com *C. fimbriata*. Valores do *fold-change* estão coloridos em tons de vermelho para os reprimidos e em verde para os induzidos na infecção.

CloneT – 3DPI	Fold	Annotation
DN44472_c0_g1	7,39	Tropinone reductase-like 1
DN42033_c1_g1	6,06	High affinity inorganic phosphate transporter
DN40955_c0_g1	4,75	Not defined
DN32773_c0_g1	4,59	Not defined
DN50238_c4_g2	2,72	Isoaspartyl peptidase/L-asparaginase 2
DN34961_c0_g1	-33,09	18,8 kDa class II heat shock protein
DN45528_c3_g1	-40,03	Stachyose synthase (Fragment)
DN31392_c0_g2	-64,36	Plant-specific domain TIGR01615 family protein
DN27794_c0_g2	-89,36	Not defined
DN33926_c0_g1	-138,10	Fiber expressed protein

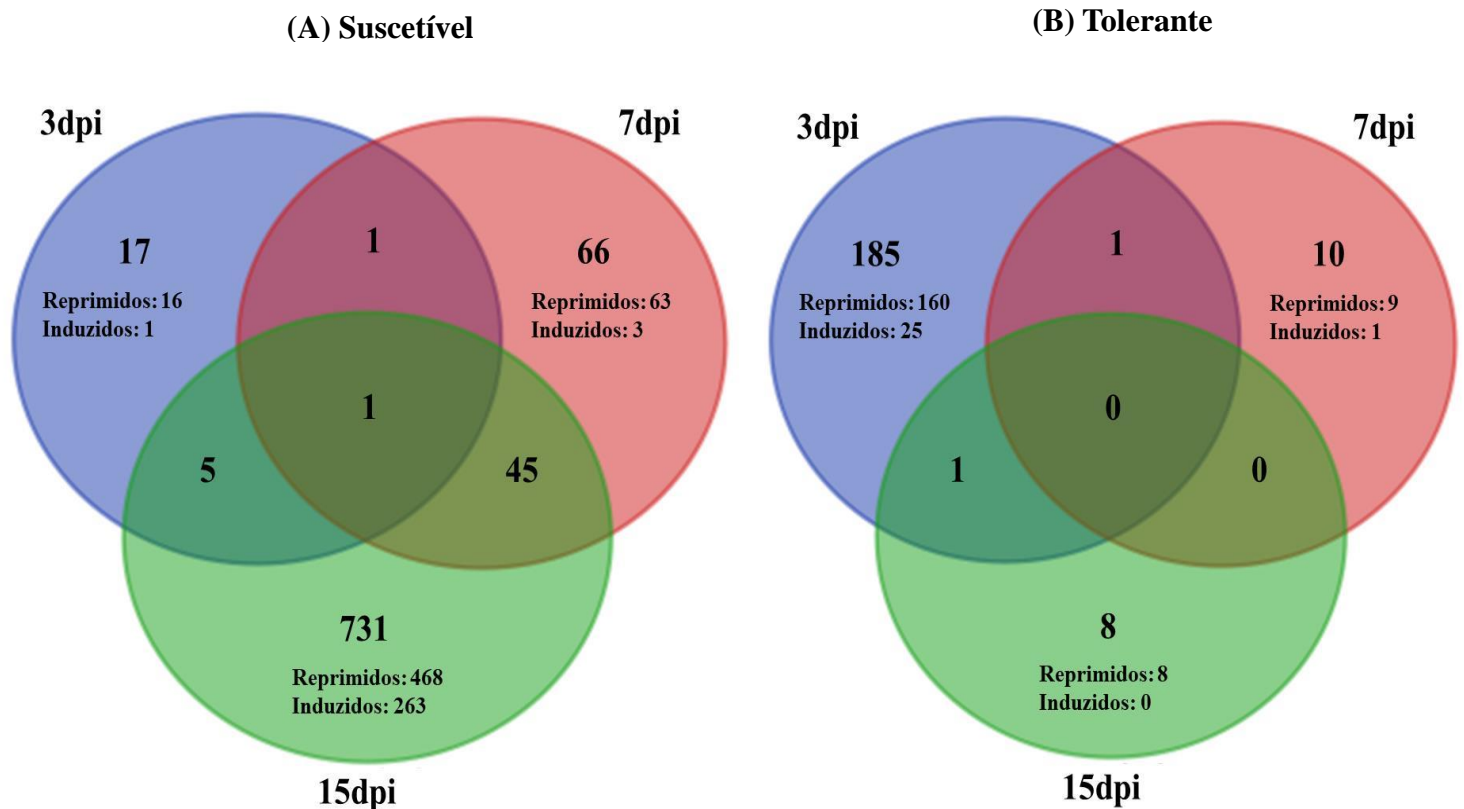
**Tabela 10.** Genes diferencialmente expressos em *Tectona grandis* ‘Clone B’ (tolerante) aos 7 dias após a inoculação com *C. fimbriata*. Valores do *fold-change* estão coloridos em tons de vermelho para os reprimidos e em verde para os induzidos na infecção.

CloneT – 7DPI	Fold	Annotation
DN50221_c1_g7	20,48	Not defined
DN45258_c1_g5	2,24	Alcohol dehydrogenase 1
DN43589_c0_g1	-2,91	Germin-like protein subfamily 1 member
DN41752_c0_g1	-4,35	Not defined
DN52876_c5_g3	-18,76	Not defined
DN27950_c0_g1	-22,29	Similar to chaperone/heat shock protein Hsp12
DN47015_c2_g2	-39,28	Not defined
DN52299_c0_g2	-51,23	Not defined
DN49519_c0_g2	-78,55	NAD-dependent formate dehydrogenase AciA/Fdh
DN46593_c1_g1	-86,13	Not defined
DN43266_c1_g2	-206,69	Aldehyde dehydrogenase

**Tabela 11.** Genes diferencialmente expressos em *Tectona grandis* ‘Clone B’ (tolerante) aos 15 dias após a inoculação com *C. fimbriata*. Valores do *fold-change* estão coloridos em tons de vermelho para os reprimidos e em verde para os induzidos na infecção.

CloneT – 15DPI	Fold	Annotation
DN49699_c1_g1	-3,17	Not defined
DN37572_c0_g1	-4,02	RING finger protein
DN39068_c0_g1	-4,79	Avr9/Cf-9 rapidly elicited protein 20 (Fragment)
DN33600_c0_g1	-7,26	ERF protein
DN38482_c0_g1	-7,42	Zinc finger protein PIF1
DN39893_c0_g1	-16,88	Salt responsive protein 2
DN38795_c0_g1	-18,91	Not defined
DN39893_c1_g2	-21,10	Not defined
DN27185_c0_g1	-21,90	Os05g0593000 protein

**Análise dos genes diferencialmente expressos na interação *T. grandis* – *C. fimbriata*–** A análise da expressão gênica diferencial na interação *T. grandis*–*C. fimbriata* foi realizada através da análise comparativa entre o ‘Clone B’ tolerante (T) e o ‘Clone A’ suscetível (S) inoculados com o patógeno *versus* seus respectivos controles não inoculados em diferentes períodos (3, 7, e 15 dias após a inoculação – DPI), com o objetivo de identificar os principais genes modulados tanto na interação compatível quanto na interação incompatível. Os genes exclusivos e comumente expressos em cada período avaliado nos clones T e S foram analisados utilizando o Diagrama de Venn (**Figura 20**). Nenhum gene foi comumente expresso entre os 3 períodos avaliados no clone T (**Figura 20**), mostrando que houve uma modulação específica de genes para cada período avaliado.



**Figura 20. Diagrama de Venn:** representação dos DEGs exclusivos e em comum para cada período avaliado no clone de teca suscetível ('Clone A') e tolerante ('Clone B') inoculados com *Ceratocystis fimbriata* comparando com seus respectivos controles não inoculados e genes exclusivos e compartilhados entre os clones S e T nos três períodos avaliados: 3 dias após a inoculação (3DPI), 7DPI e 15DPI.

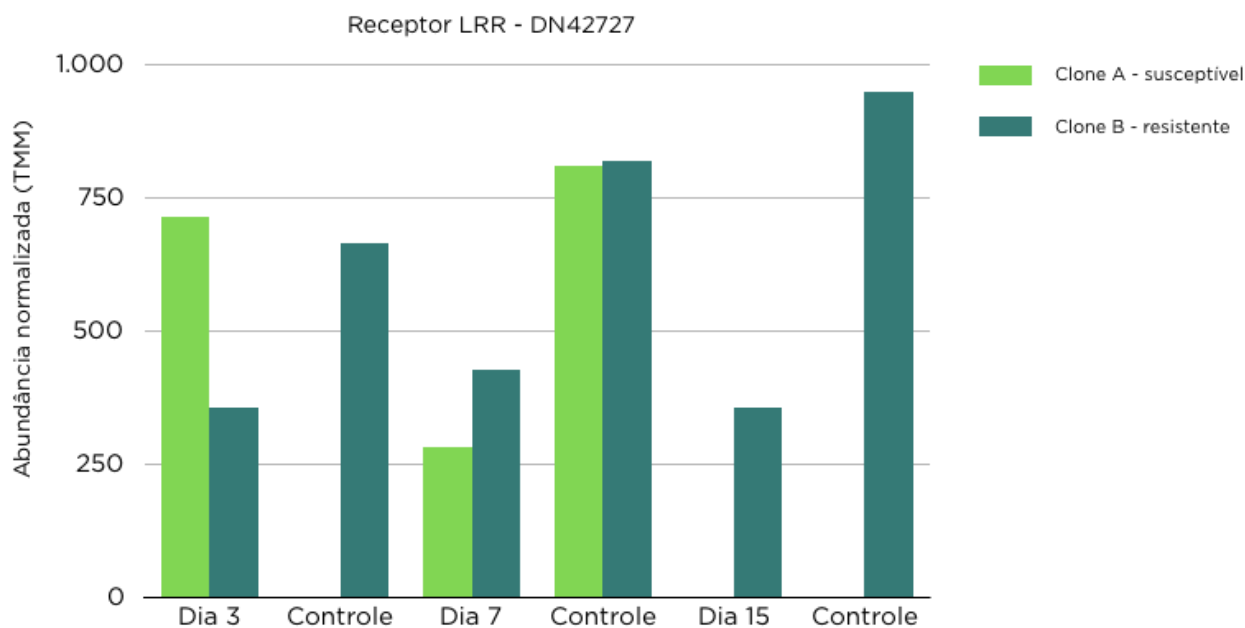
**Identificação de termos de *Gene Ontology* na resposta do 'Clone A' (suscetível) e do 'Clone B' (tolerante)** – O 'Clone A', susceptível à infecção do patógeno, apresentou muitos termos de *gene ontology* (GO) enriquecidos considerando aos períodos de avaliação amostrados: nove GOs aos 3 DPI, 16 GOs aos 7 DPI, e 30 GOs aos 15 DPI. O 'Clone B', que é tolerante ao patógeno, apresentou 37 GOs aos 3 DPI, três GOs aos 7 DPI e nenhum GO aos 15 DPI. Além disso, o 'Clone B' apresentou, aos 3 DPI, dois termos (transporte de lipídeos e transporte transmembrana) que aparecem apenas aos 7 DPI para o 'Clone A', e outros 4 termos (processos catabólicos de lignina, transporte transmembrana de ânions, regulação de

processos biossintéticos e processos metabólicos secundários) que aparecem apenas aos 15 DPI para o ‘Clone A’. Tanto a ausência de GOs enriquecidos no final da infecção do ‘Clone B’, quanto às semelhanças de termos do início da infecção desse clone com o final da infecção do ‘Clone A’, sugerem que a resposta da planta ao ataque do patógeno e sua eliminação é mais rápida no ‘Clone B’.

No processo de infecção de *T. grandis* pelo ascomiceto *C. fimbriata*, identificou-se receptores LRR diferencialmente expressos no ‘Clone A’ aos 15 DPI (**Tabela 8 e Tabela 12**), e nenhum diferencialmente expresso na infecção do ‘Clone B’, tolerante ao patógeno. No entanto, quando se verificou os níveis de expressão de receptores LRR nas bibliotecas, observou-se nove receptores cuja expressão no controle do ‘Clone B’ é 1,5 x maior que a expressão no controle do ‘Clone A’, aos 3 DPI. Dentre esses receptores, o DN42727, apresentou altos níveis de expressão no ‘Clone B’ mesmo na planta controle, bem como ao longo da infecção, contrastando com o observado para o ‘Clone A’ (**Figura 21**). Dessa forma, o receptor LRR DN42727 parece apresentar níveis constitutivos de expressão naturalmente elevados expressos no ‘Clone B’, e pode ajudar na rápida resposta deste à infecção por *C. fimbriata*.

**Tabela 12.** Genes de receptores LRR de teca na interação com *C. fimbriata* com *fold-change* >2 em ao menos um dos tratamentos analisados. Valores do *fold-change* estão coloridos em tons de vermelho para os reprimidos e em verde para os induzidos na infecção.

	Clone S			Clone T		
	3DPI	7DPI	15DPI	3DPI	7DPI	15DPI
DN37621_c0_g2	3,41	-3,64	2,28	1,89	-1,58	1,55
DN31301_c0_g1	2,38	1,54	2,40	1,78	1,26	1,24
DN52856_c3_g2	1,86	2,36	1,39	1,95	-1,12	1,66
DN41634_c0_g1	1,27	-1,50	2,55	-1,08	2,37	1,14
DN52455_c0_g1	1,25	1,18	-1,53	1,22	-1,61	1,15
DN46998_c0_g2	1,21	-12,00	1,74	1,49	-1,08	1,31
DN47637_c0_g1	1,20	-2,67	-4,00	1,23	1,39	-1,22
DN48688_c1_g3	1,19	Inf	Inf	1,05	1,04	1,25
DN52098_c4_g6	1,16	1,28	2,04	-2,07	-1,15	1,20
DN52793_c2_g2	1,13	1,18	2,55	-1,65	-1,12	-1,14
DN37621_c0_g1	1,11	-1,22	1,32	-1,08	-1,03	2,25
DN46614_c0_g1	1,07	1,23	2,69	-1,28	-1,18	-1,15
DN45895_c0_g2	1,07	-1,01	1,07	2,27	1,02	1,04
DN20137_c0_g1	1,01	2,99	1,33	-1,02	1,46	1,39
DN52098_c4_g4	-1,07	1,56	1,67	3,50	-1,11	-1,09
DN40675_c0_g1	-1,07	1,22	-2,57	-1,45	-1,12	-1,15
DN50851_c0_g1	-1,42	1,37	-2,30	-1,26	-1,52	-1,16
DN42727_c0_g1	-1,53	1,61	2,01	1,29	-1,41	-1,88
DN39498_c0_g1	-1,83	-1,80	-3,54	1,34	-1,23	-1,76
DN50772_c0_g1	-2,31	1,50	2,05	-1,18	-1,79	1,16
DN44121_c0_g1	-2,31	1,27	-1,30	1,20	-1,41	-1,69



**Figura 21.** Níveis de expressão do receptor LRR DN42727 de teca em resposta à infecção por *Ceratocystis fimbriata*. A abundância está apresentada em TPM (transcritos por milhão) normalizado entre amostras para TMM. Os valores apresentados são as medianas entre réplicas de cada dia de amostragem.

**Desenvolvimento da infecção**– O clone A da *T. grandis*, susceptível à infecção por *C. fimbriata*, apresentou várias etapas da defesa da planta nos termos enriquecidos de GO. A primeira amostragem, no dia 3 da infecção, apresentou dois grupos de GOs: os relacionados ao metabolismo de lipídeos e os relacionados à resposta a drogas (**Tabela 13**).



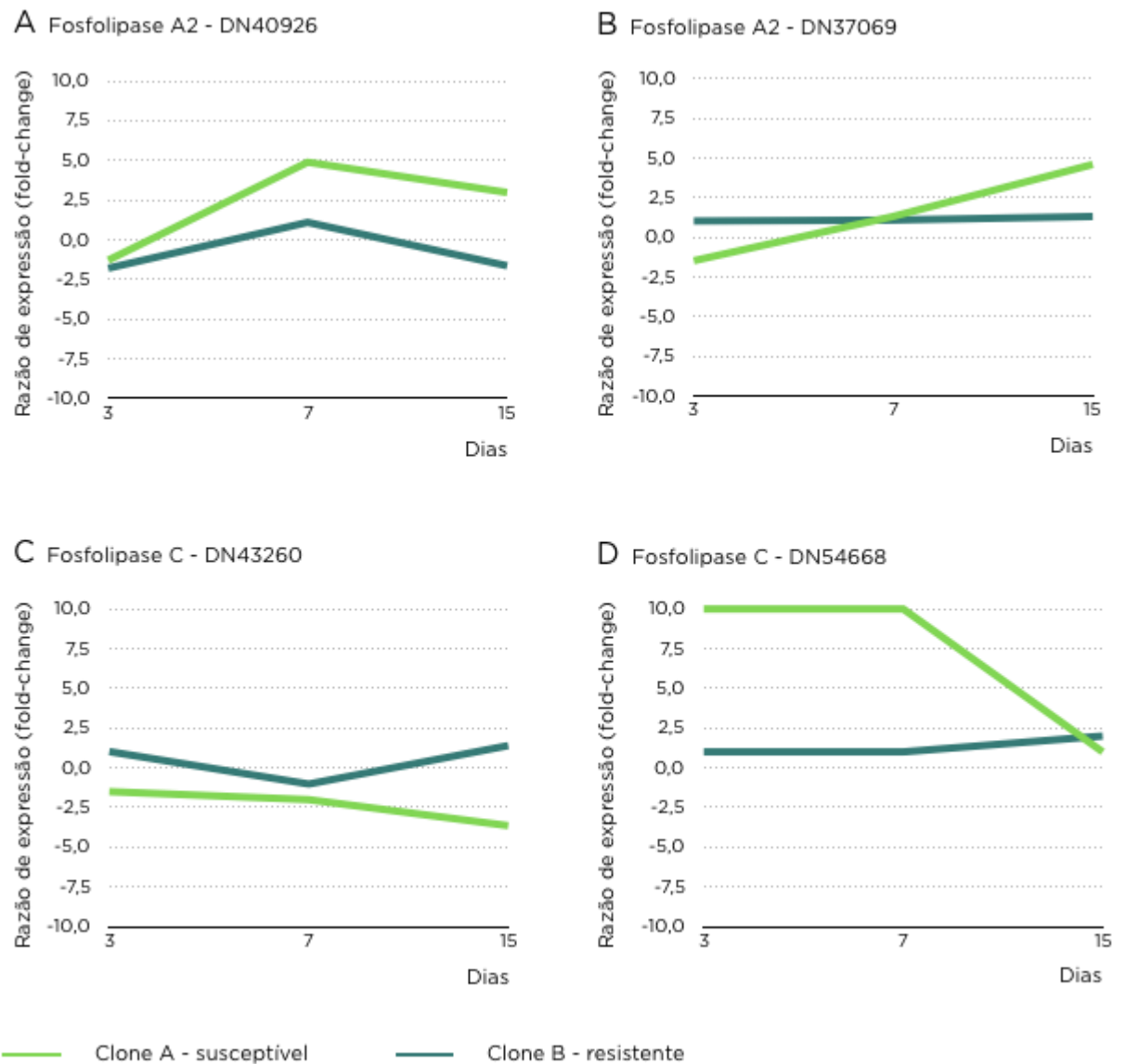
**Tabela 13.** Identificação de termos de *Gene Ontology* (GO) na resposta de *Tectona grandis* ‘Clone A’ (susceptível) aos três dias após a inoculação com *C. fimbriata*.

CloneS – 3DPI	P-value	N amostra	N total	Termo de GO
GO:0046854	0,014640	1	33	phosphatidylinositol phosphorylation
GO:0046834	0,014640	1	33	lipid phosphorylation
GO:0046488	0,024305	1	55	phosphatidylinositol metabolic process
GO:0030258	0,028237	1	64	lipid modification
GO:0006855	0,029545	1	67	drug transmembrane transport
GO:0015893	0,029545	1	67	drug transport
GO:0042493	0,030416	1	69	response to drug
GO:0006650	0,036929	1	84	glycerophospholipid metabolic process
GO:0046486	0,039092	1	89	glycerolipid metabolic process

Os enriquecimentos relacionados ao metabolismo de lipídeos estão associados à fosforilação e a moléculas lipídicas com fosfatidilinositol e ao metabolismo de glicerolipídeos. Nessa fase da infecção, enzimas fosfolipase estão diferencialmente expressas no clone A (**Tabela 6**). As enzimas fosfolipases apresentaram um comportamento diferente no clone B. Nenhuma das 97 fosfolipases identificadas (**Tabela 14**) foi diferencialmente expressa ao longo da infecção do clone B, e o comportamento diferenciado fica claro na (**Figura 22**). As enzimas fosfolipase-A2 (**Figura 22A e 22B**) apresentaram aumento na razão da expressão ao longo da expressão para o clone A, mas um aumento mais leve ou nenhum aumento para o clone B. Para as enzimas fosfolipase-C, observou-se um padrão oposto para uma delas (**Figura 22C**) e, para uma outra, foi observada alta razão de expressão já no início da infecção no clone A (**Figura 22D**).

Tabela 14. Top20 genes codificadores de enzimas fosfolipases. Valores de *fold-change* estão coloridos em tons de vermelho para os reprimidos e em verde para os induzidos em teca após a inoculação com *C. fimbriata*.

	Clone S			Clone T		
	3DPI	7DPI	15DPI	3DPI	7DPI	15DPI
DN59566_c0_g1	inf	1,03	1,00	1,05	inf	inf
DN6293_c0_g1	inf	Inf	1,00	Inf	1,46	1,00
DN41600_c0_g1	3,17	1,34	1,88	-2,09	1,10	-1,12
DN46784_c0_g1	2,07	-1,11	-1,51	-1,05	-1,12	1,06
DN48433_c2_g1	2,00	1,71	1,09	-1,03	-1,07	1,19
DN46700_c0_g3	1,78	1,26	1,94	-1,06	1,06	1,09
DN46123_c1_g2	1,73	1,23	2,98	1,28	inf	1,09
DN40480_c1_g1	1,70	1,61	4,21	1,57	1,12	1,25
DN38399_c0_g1	1,58	1,24	1,30	1,23	-1,59	1,47
DN41307_c0_g1	1,46	1,26	1,57	-2,30	1,79	-1,10
DN48433_c1_g1	-1,50	-1,18	1,40	-1,16	-1,06	1,50
DN29034_c0_g2	-1,55	1,53	-1,53	-1,48	-1,37	-1,80
DN43448_c0_g3	-1,59	1,14	-1,22	-1,16	1,13	1,16
DN33301_c0_g1	-1,61	1,41	2,06	-1,89	2,93	-1,38
DN35007_c0_g2	-1,78	4,89	-1,78	-1,61	-1,41	1,29
DN43260_c0_g1	-1,94	-1,50	1,88	-1,23	1,10	-1,22
DN19750_c0_g1	-1,99	1,43	3,21	-1,59	-1,26	2,29
DN45511_c0_g1	-2,22	1,26	1,21	-1,56	1,06	-1,07
DN26354_c0_g1	-3,32	1,65	1,64	-1,56	1,33	1,66
DN36569_c0_g1	-4,44	2,66	-1,44	-1,43	1,19	1,17



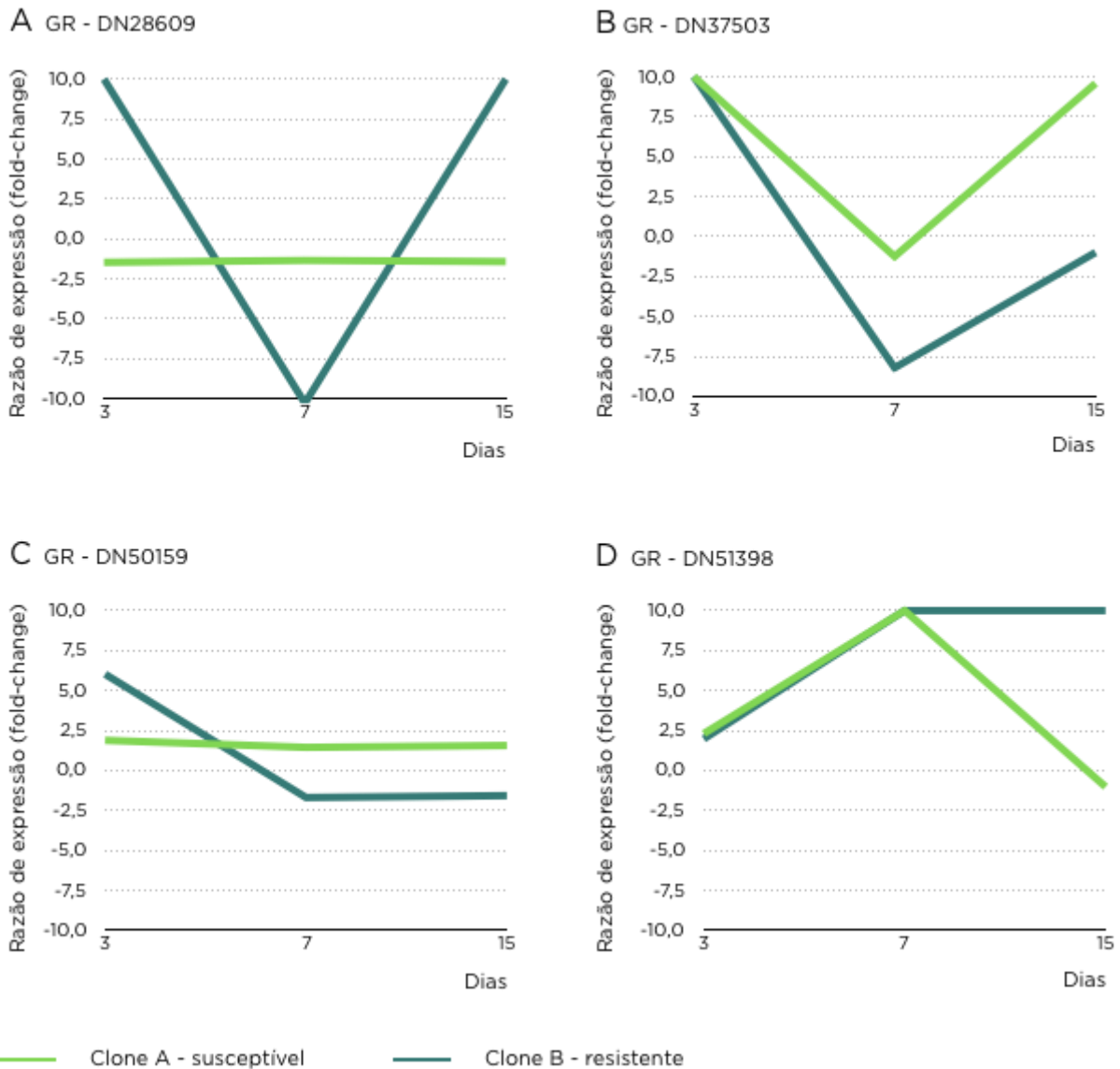
**Figura 22.** Razão da expressão (fold-change) de genes codificadores de enzimas fosfolipases no ‘Clone A’ e no ‘Clone B’ ao longo do processo de infecção. O valor 10 do *fold-change* foi artificialmente inserido para os casos em que a expressão no controle foi nula e o fold-change tende ao infinito.

O clone A apresentou em seguida nos enriquecimentos de GO, no dia 7 da infecção, outros sinais da resposta da planta ao patógeno (**Tabela 15**).

**Tabela 15.** Identificação de termos de *Gene Ontology* (GO) na resposta do clone suscetível A aos sete dias pós-infecção.

CloneS – 7DPI	P-value	N amostra	N total	Termo de GO
GO:0008272	0,000051	3	18	sulfate transport
GO:0072348	0,000082	3	21	sulfur compound transport
GO:0015698	0,000284	4	78	inorganic anion transport
GO:0006470	0,003423	3	74	protein dephosphorylation
GO:0006820	0,004671	4	166	anion transport
GO:0006869	0,012788	2	42	lipid transport
GO:0006811	0,015483	6	498	ion transport
GO:0034220	0,016893	5	368	ion transmembrane transport
GO:0010876	0,017153	2	49	lipid localization
GO:0044765	0,033170	9	1104	single-organism transport
GO:0006810	0,036069	11	1494	Transport
GO:1902578	0,037758	9	1130	single-organism localization
GO:0051234	0,038605	11	1510	establishment of localization
GO:0051179	0,044776	11	1546	Localization
GO:0035235	0,048185	1	12	ionotropic glutamate receptor signaling pathway
GO:0007215	0,048185	1	12	glutamate receptor signaling pathway

Além do enxofre, uma série de termos de GO relacionados ao transporte de substâncias e íons está enriquecida no sétimo dia de infecção dos clones A. Na infecção de *T. grandis* por *C. fimbriata*, encontrou-se 29 receptores de glutamato expressos, dois deles induzidos no ‘Clone A’, um deles também induzido no ‘Clone B’. O comportamento de quatro desses receptores está exposto na (Figura 23). Ao contrário do observado para as fosfolipases, dois desses receptores apresentam razão de expressão maior no início da infecção para o ‘Clone B’ (Figura 23A, 23C), e os outros dois apresenta razão alta o início para ambos os clones (Figura 23B, 23D).



**Figura 23.** Razão da expressão (fold-change) de receptores de glutamato em *Tectona grandis* ‘Clones A’ e ‘Clone B’, durante os dias após à infecção por *Ceratocystis fimbriata*. O valor 10 do fold-change foi artificialmente inserido para os casos em que a expressão no controle foi nula e o fold-change tende ao infinito.

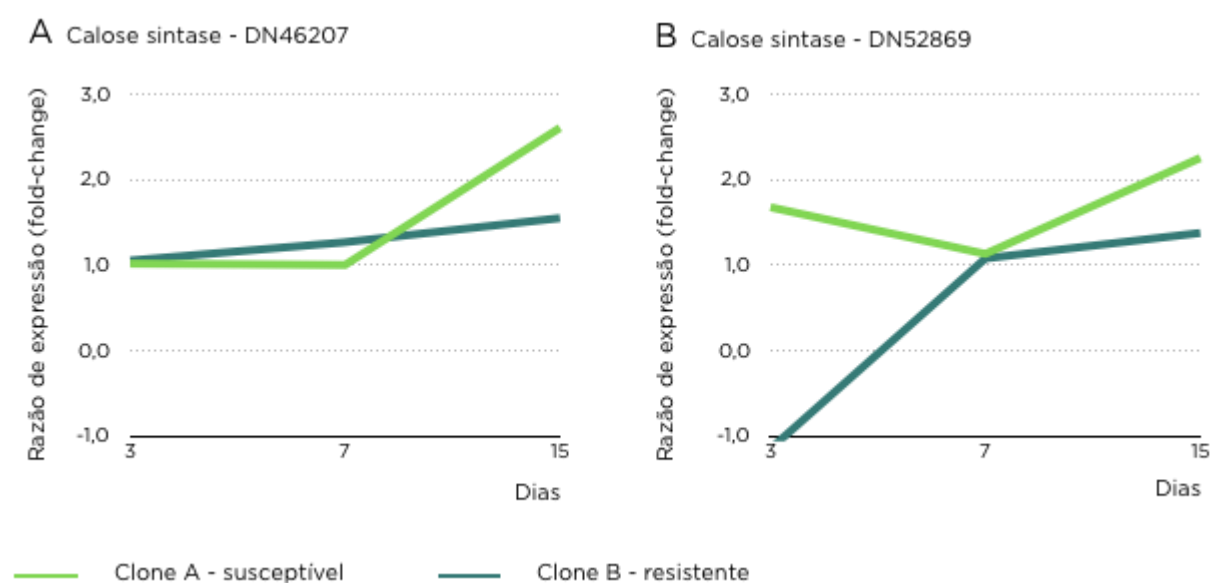
A relação dos canais de receptores de glutamato com a modulação por aminoácidos se estende do dia 7 ao dia 15 de infecção no ‘Clone A’, com o aparecimento dos termos de GO de transporte transmembrana de aminoácidos, e regulação do transporte transmembrana e de íons, enriquecidos (**Tabela 16**).

**Tabela 16.** Identificação de termos de Gene Ontology (GO) na resposta de *Tectona grandis* ‘Clone A’ (suscetível A) 15 dias após a inoculação por *C. fimbriata*.

CloneS – 15DPI	P-value	N amostra	N total	Termo de GO
GO:0006857	0,000007	8	34	oligopeptide transport
GO:0015833	0,000007	8	34	peptide transport
GO:0042886	0,000015	8	37	amide transport
GO:0071705	0,001272	12	138	nitrogen compound transport
GO:0005975	0,004357	37	757	carbohydrate metabolic process
GO:0043269	0,015128	5	47	regulation of ion transport
GO:0006826	0,017398	3	18	iron ion transport
GO:0006074	0,020191	3	19	(1->3)-beta-D-glucan metabolic process
GO:0006075	0,020191	3	19	(1->3)-beta-D-glucan biosynthetic process
GO:0016051	0,021554	12	198	carbohydrate biosynthetic process
GO:0034762	0,025082	4	36	regulation of transmembrane transport
GO:0034765	0,025082	4	36	regulation of ion transmembrane transport
GO:0044765	0,025699	46	1104	single-organism transport
GO:0051049	0,026166	5	54	regulation of transport
GO:0046271	0,026474	3	21	phenylpropanoid catabolic process
GO:0046274	0,026474	3	21	lignin catabolic process
GO:0032879	0,028072	5	55	regulation of localization
GO:0016567	0,031353	9	140	protein ubiquitination
GO:0006810	0,032188	59	1494	Transport
GO:1902578	0,036398	46	1130	single-organism localization
GO:0009250	0,036836	7	100	glucan biosynthetic process
GO:0032446	0,037988	9	145	protein modification by small protein conjugation
GO:0051234	0,038612	59	1510	establishment of localization
GO:0051179	0,041607	60	1546	Localization
GO:0003333	0,041797	3	25	amino acid transmembrane transport
GO:0019748	0,045416	8	127	secondary metabolic process
GO:0019252	0,046190	3	26	starch biosynthetic process
GO:0016137	0,046483	5	63	glycoside metabolic process
GO:0044703	0,047140	9	151	multi-organism reproductive process
GO:0055085	0,049137	32	757	transmembrane transport

Aos 15 DPI, o clone A apresentou o maior número de termos de GO enriquecidos.

As enzimas diferencialmente expressas no clone A nesta etapa são as 1,3-beta-glucano sintases, também chamadas de calose sintases, responsáveis pela formação de xiloglucanos e caloses na planta. Comparando os 4 transcritos de 1,3-beta-glucano sintases entre os clones A e B, percebeu-se que nenhum deles foi induzido na infecção do clone B. Apesar dos dois transcritos que apresentaram aumento de expressão na infecção do clone A, também terem aumentado a expressão no clone B (**Figura 24**), porém este aumento não foi significativo.



**Figura 24.** Razão da expressão (fold-change) de calose sintase (1,3-beta-D-glucano sintase) nos clones A e B, ao longo dos dias de infecção.

Além do enriquecimento da calose sintase, os termos relativos ao metabolismo e processo biossintético de carboidratos, e catabolismo de lignina, enriquecidos no clone A, também fazem referência aos processos de remodelamento e reforço da parede celular da planta. Nesta fase da infecção do clone A, observou-se a produção de metabólitos secundários usados pela planta no ataque ao fungo. O termo de GO enriquecido para processos catabólicos de fenilpropanóide inicialmente sugerem a degradação desse composto. No entanto, dentre os transcritos diferencialmente expressos no dia 15, identificou-se um regulador da transcrição que participa da biossíntese do fenilpropanóide (DN30073), na mesma via de síntese de lignina.

**Mecanismos de resistência da teca** – *Tectona grandis* clone tolerante B apresentou 37 termos de GOs enriquecidos aos 3 DPI, comparáveis aos termos observados aos 7 DPI no clone A. Outros termos, como o catabolismo de lignina (GO:0046274, **Tabela 17**), os processos biossintéticos (GO:0009808) e o metabolismo secundário, somente aparecem aos 15 DPI no clone suscetível. Isso sugere que clone tolerante possui uma resposta basal mais rápida à infecção. Alguns dos importantes transcritos induzidos no clone tolerante, como as fosfolipases e os receptores de glutamato, nem chegam a aparecer no clone suscetível. No sétimo dia da infecção do clone suscetível, apenas três termos de GO estão enriquecidos e os três se relacionam à produção de etanol pela planta (**Tabela 18**). No entanto, o processo de oxi-redução, enriquecido no clone tolerante, sugere uma indução das vias de obtenção de energia que, em baixas concentrações de oxigênio, podem levar à fermentação alcoólica pela enzima álcool desidrogenase (ADH) a enzima não tem um GO específico, ela pode se relacionar a diferentes termos e à produção de etanol, composto orgânico hidroxil que também apareceu enriquecido (**Tabela 9**).

**Tabela 17.** Identificação de termos de *Gene Ontology* (GO) enriquecidos na resposta de *Tectona grandis* ‘Clone B’ (tolerante) aos três dias após a inoculação com *C. fimbriata*.

CloneT – 3DPI	P-value	N amostra	N total	Termo de GO
GO:0006470	0,000981	4	74	protein dephosphorylation
GO:0005984	0,003093	3	49	disaccharide metabolic process
GO:0098661	0,004520	2	17	inorganic anion transmembrane transport
GO:0009311	0,005230	3	59	oligosaccharide metabolic process
GO:0046271	0,006873	2	21	phenylpropanoid catabolic process
GO:0046274	0,006873	2	21	lignin catabolic process
GO:0046351	0,006873	2	21	disaccharide biosynthetic process
GO:0016311	0,008308	5	210	Dephosphorylation
GO:0000272	0,008929	2	24	polysaccharide catabolic process
GO:0009889	0,009576	12	946	regulation of biosynthetic process
GO:0009312	0,011225	2	27	oligosaccharide biosynthetic process



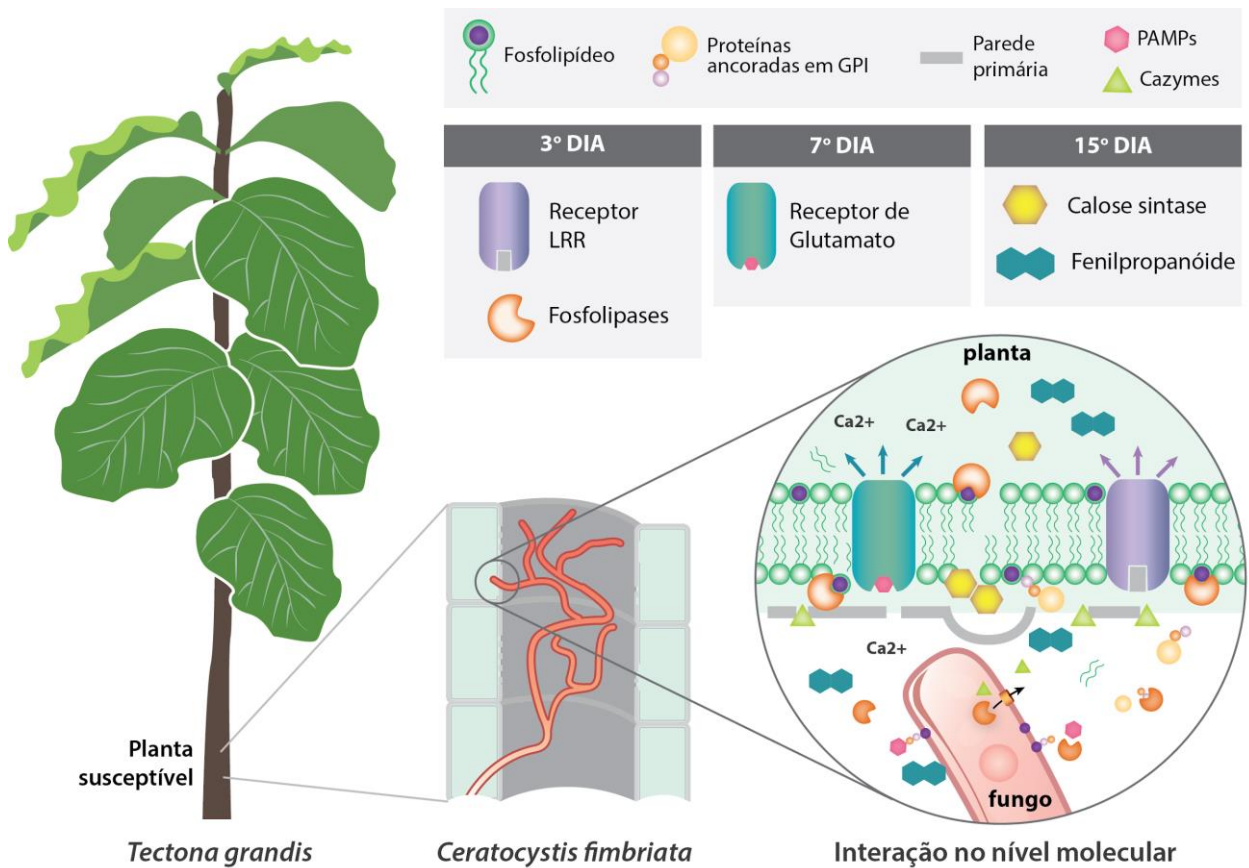
GO:0009808	0,012043	2	28	lignin metabolic process
GO:1903506	0,017372	11	903	regulation of nucleic acid-templated transcription
GO:0006355	0,017372	11	903	regulation of transcription, DNA-templated
GO:2001141	0,017503	11	904	regulation of RNA biosynthetic process
GO:0051252	0,017767	11	906	regulation of RNA metabolic process
GO:1901606	0,019466	2	36	alpha-amino acid catabolic process
GO:2000112	0,021173	11	930	regulation of cellular macromolecule biosynthetic process
GO:0010556	0,021325	11	931	regulation of macromolecule biosynthetic process
GO:0080090	0,021728	12	1058	regulation of primary metabolic process
GO:0009063	0,022635	2	39	cellular amino acid catabolic process
GO:0031326	0,023537	11	945	regulation of cellular biosynthetic process
GO:0031323	0,023670	12	1071	regulation of cellular metabolic process
GO:0010468	0,025046	11	954	regulation of gene expression
GO:0019219	0,025739	11	958	regulation of nucleobase-containing compound metabolic process
GO:0006869	0,026002	2	42	lipid transport
GO:0009066	0,028352	2	44	aspartate family amino acid metabolic process
GO:0009064	0,029558	2	45	glutamine family amino acid metabolic process
GO:0051171	0,029806	11	980	regulation of nitrogen compound metabolic process
GO:0006351	0,030002	11	981	transcription, DNA-templated
GO:0097659	0,030002	11	981	nucleic acid-templated transcription
GO:0032774	0,031193	11	987	RNA biosynthetic process
GO:0010876	0,034581	2	49	lipid localization
GO:0098656	0,037209	2	51	anion transmembrane transport
GO:1901605	0,038411	4	213	alpha-amino acid metabolic process
GO:0019748	0,040298	3	127	secondary metabolic process
GO:0060255	0,044019	11	1043	regulation of macromolecule metabolic process

Os efeitos da infecção por *C. fimbriata* nos enriquecimentos de GO do clone tolerante B diminuíram muito no dia 7 (**Tabela 10**) e não apareceram no dia 15 da infecção. Esse resultado mais uma vez reflete a rapidez da eliminação do patógeno no clone tolerante. A

rapidez da resposta imune do clone tolerante parece ser modulada pela expressão constitutiva de receptores LRR observada nas plantas controles. Além disso, para a eliminação do patógeno, esse clone parece usar a via de fermentação alcoólica finalizando a infecção fúngica com o aumento na concentração de etanol.

**Tabela 18.** Identificação de termos de Gene *Ontology* (GO) enriquecidos na resposta de *Tectona grandis* ‘Clone B’ (tolerante) aos sete dias após a inoculação com *Ceratocystis fimbriata*.

CloneT – 7DPI	P-value	N amostra	N total	Termo de GO
GO:0055114	0,009368	3	1544	oxidation-reduction process
GO:0006066	0,029652	1	84	alcohol metabolic process
GO:1901615	0,044229	1	126	organic hydroxy compound metabolic process



**Figura 25.** Modelo de resposta da teca (*Tectona grandis*) à infecção pelo fungo *Ceratocystis fimbriata*. O padrão de expressão gênica durante o processo de infecção do 'Clone A' (suscetível) por *C. fimbriata* revela os mecanismos da resposta da planta ao fungo. A interação ao nível molecular gira em torno dos efeitos do fungo na parede celular e no sistema de membranas das células. No terceiro dia após a inoculação, receptores do tipo LRR (*leucine rich receptors*) recebem o sinal de moléculas geradas pela degradação da parede celular e desencadeiam uma resposta imune primária da planta, induzindo a produção e secreção de enzimas fosfolipases, tendo como provável alvo o sistema de membranas do fungo. Por outro lado, o próprio fungo produz fosfolipases que quebram ligações ancoradas em glicosilfosfatidilinositol (GPI) e em sua ação sobre a parede da planta geram elicitores que intensificam a resposta a ponto de prejudicar a própria planta. No sétimo dia após a inoculação, a sinalização e comunicação intercelular está intensificada com os receptores de glutamato que reconhecem PAMPs (*pathogen associated molecular patterns*) e aumentam o transporte de íons, especialmente Ca<sup>2+</sup>. No décimo quinto dia após a inoculação, a resposta da planta já se encontra em estado avançado e o metabolismo de lignina se intensifica. Há um aumento da produção de calose sintase, enzima que contribui para a lignificação e formação de caloses nas regiões atacadas da parede primária. Além disso, esta mesma via metabólica gera compostos secundários do tipo fenilpropanóides que são tóxicos ao fungo e auxiliam no combate à invasão dos tecidos pelo patógeno.

## DISCUSSÃO

Na resposta compatível estudada empregando o ‘Clone A’ (suscetível) foram observados GOs relacionados com receptores de glutamato, remodelamento e reforço da parede celular da planta, xilanases, chitinases e fenilpropanóides. Muitos dos GOs enriquecidos do clone suscetível A estão relacionados com o processo metabólico e biossintético de (1,3)-beta-D-glucano. Esses compostos fazem parte da sinalização celular em resposta aos padrões associados a patógenos (PAMPs– *pathogen associated molecular patterns*), levando ao remodelamento e reforço da parede celular da planta. Além desses foram observados os termos relativos ao metabolismo e processo biossintético de carboidratos, e catabolismo de lignina, e de produção de metabólitos secundários usados pela planta no ataque ao fungo. O termo de GO enriquecido para processos catabólicos de fenilpropanóide inicialmente sugerem a degradação deste composto.

Aos 3 DPI, observa-se no clone suscetível A um enriquecimento de genes relacionados ao estresse da planta e à indução do metabolismo de fosfolipídios. Os enriquecimentos relacionados ao metabolismo de lipídeos estão associados à fosforilação e a moléculas lipídicas com fosfatidilinositol e ao metabolismo de glicerolipídeos. Nessa fase da infecção de teca por *C. fimbriata*, genes codificadores de enzimas fosfolipases estão diferencialmente expressas no ‘Clone A’ (suscetível). Enzimas fosfolipases são rapidamente ativadas em plantas após o reconhecimento inicial de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), como xilanases, chitinases e proteínas efetoras de patogenicidade (Gonorazky *et al.* 2016).

O importante papel das fosfolipases na resposta à infecção microbiana foi demonstrado em diversos estudos. O silenciamento da fosfolipase-C em *Arabidopsis* aumentou a susceptibilidade dessa planta à bactéria *Pseudomonas syringae* e ao fungo *Erysiphe pisi* (Ambrosio *et al.* 2017). Por outro lado, o silenciamento da fosfatidilinositol-fosfolipase-C (SIPLC2) em tomate reduziu os níveis de susceptibilidade ao fungo necrotrófico

*Botrytis cinerea* (Gonorazky *et al.* 2016). Em tomate, duas fosfolipases-C (SIPLC2 e SIPLC5) foram previamente estudadas e apenas a SIPLC2 mostrou indução por xilanases, sugerindo que diferentes fosfolipases participam de diferentes vias de resposta da planta. Mutantes de *Arabidopsis* para duas fosfolipases-D (PLD $\alpha$ 1 e PLD $\delta$ ) exibiram resistência aumentada em um dos mutantes, e a susceptibilidade aumentada no outro, ao fungo *Podosphaera xanthii*, indicando efeitos opostos das moléculas na resistência pós-penetração (Zhang *et al.* 2018).

Por outro lado, enzimas fosfolipases extracelulares também são consideradas agentes de patogenicidade dos fungos no ataque às plantas (Ghannoum, 2000). A fosforilação de lipídios com fosfatidilinositol por fosfolipases-C (PI-PLC) foi recentemente apresentada como um mecanismo de patogenicidade de espécies fungo do gênero *Ceratocystis*, que apresentam expansão dessas enzimas para cerca de uma centena de cópias no genoma e com evidências de seleção natural moldando suas sequências (Molano *et al.* 2018). A atividade dessas enzimas foi relacionada à presença de tiloses (evaginações da membrana celular) no xilema do cacau como tentativa de impedir a invasão do fungo *Ceratocystis cacaofunesta* em seus vasos. Além disso, a ação das PI-PLC na infecção por *Ceratocystis* potencialmente liberam proteínas ancoradas na membrana por glicosilfosfatidilinositol (GPI) que por sua vez induzem a resposta imune primária da planta. Ou seja, fungos do gênero *Ceratocystis* poderiam usar as PI-PLC para intensificar a resposta de suscetibilidade da planta hospedeira, levando a morte celular prematura de células do xilema (Molano *et al.* 2018). Plantas infectadas por *C. fimbriata* apresentam um quadro sintomatológico característico que inclui o escurecimento do feixe do xilema, em geral da periferia para a medula. Este escurecimento é decorrente do colapso dos vasos do xilema causado pela invasão e colonização do fungo (Firmino *et al.* 2015). Alguns dos fatores de virulência descritos em *C. fimbriata* (Faris *et al.* 2010, Zhang *et al.* 2014) induzem danos que acarretam a formação de subprodutos que

podem funcionar como sinalizadores para as células da parede celular iniciarem a liberação de de glucanos, xiloglucanos e quitinas, percebidos por receptores do tipo LRR (Leucine Rich Repeat), que compõem uma das mais importantes classes de genes de resistência em plantas (Faris *et al.* 2010, Zhang *et al.* 2014). O sucesso da resposta imune inata da planta em conter o avanço do patógeno depende da rapidez com que as células afetadas percebam e transmitam estes sinais da infecção para o sistema de defesa da planta.

Um aumento nos níveis de expressão de genes associados com a via do ácido jasmônico evidencia claramente seu envolvimento de uma resposta de defesa da planta hospedeira (Verma *et al.* 2016). Após essa primeira resposta inata da planta, observou-se também no ‘Clone A’ (suscetível) aos 7 DPI a indução de genes codificadores de enzimas de transporte, como o de enxofre, de glutamato e de íons. A indução de genes codificadores de enzimas relacionadas ao transporte de enxofre foi previamente observada como resposta à efeitos de patogenicidades de fungos biotróficos (Mukhtar *et al.* 2011). Também foi sugerido que o fungo *Melampsora larici-populina* manipularia a fisiologia da planta hospedeira de forma a aumentar o transporte de enxofre para seu uso (Petre *et al.* 2012).

O transporte de íons está intimamente relacionado com a via de sinalização desencadeada por receptores de glutamato, que estão enriquecidos aos 7 DPI da infecção no ‘Clone A’ (suscetível). Receptores de glutamato são considerados componentes da célula vegetal capazes de reconhecer padrões (PRR – *pattern recognition receptors*), identificando moléculas PAMP dos patógenos e ativando respostas de defesa (Boller & Felix 2009). A segunda maior classe de PRRs em plantas envolve o receptor de glutamato ionotrófico (*ionotropic glutamate receptors* – iGluR), associados aos canais permeáveis a cálcio  $Ca^{2+}$ . Canais do tipo iGluR em *Arabidopsis* são permeáveis aos íons  $Ca^{2+}$ ,  $Na^{+}$  e  $K^{+}$  (Tapken & Hollmann 2008). Esses canais apresentam um controle do fluxo dos íons mediados por aminoácidos, levando a um acúmulo de transcritos de genes de defesa em plantas (Kwaaitaal

*et al.* 2011). A modulação dos canais de iGluR por aminoácidos leva à relação de altas concentrações desses no apoplasto com o aumento da resposta de defesa em plantas e o aumento da comunicação entre células da planta (**Price *et al.* 2012**). Uma forte evidência de que receptores de glutamato e os canais associados são importante parte das defesas da planta vem da superexpressão desses receptores em *Arabidopsis* que resultou em um aumento na expressão de genes de defesa em resposta fungo necrotrófico *Botrytis cinerea* (**Forde *et al.* 2014**).

No presente estudo, após intensa sinalização intercelular mediada pelos canais associados aos receptores de glutamato no ‘Clone A’ (suscetível), que se estendeu até aos 15 DPI, esse clone passa a induzir a expressão de genes codificadores de calose sintases, visando uma potencial deposição de xiloglucanos na parede celular. O xiloglucano é o principal polissacarídeo hemicelulósico na parede primária de dicotiledôneas e é degradado por endoglucanases específicas (XEG) secretadas por uma ampla gama de fungos (**Bellincampi *et al.* 2014**). Os danos da parede celular são induzidos por PAMPs na infecção e intensificam o reforço da parede com a deposição de calose mediada pela enzima hospedeira calose sintase (**Bellincampi *et al.* 2014**). No entanto, alguns fungos neutralizam essa ação de defesa da planta usando a deposição de calose a seu favor. É sabido que a calose pode também contribuir para a estabilidade e funcionamento do haustório, estrutura do fungo responsável pela absorção de nutrientes, protegendo a estrutura de metabólitos tóxicos produzidos pelo sistema de defesa vegetal. Além disso, a calose limita a difusão de elicitores, reduzindo as respostas de defesa sistêmicas da planta (**Underwood, 2012**).

Além da produção de caloses, o perfil de expressão de genes do ‘Clone A’ (suscetível) aos 15 DPI indica que a planta tenta aproveitar a biossíntese de carboidratos e de lignina para a produção de metabólitos secundários potencialmente tóxicos ao fungo. Entre os transcritos diferencialmente expressos aos 15 DPI, identificou-se um regulador da transcrição

(DN30073) que participa da biossíntese do fenilpropanóide, na mesma via de síntese de lignina.

A produção de fenilpropanóides é uma resposta universal de plantas ao ataque de fungos. Terpenóides e fenilpropanóides são importantes componentes da resposta de diversas plantas ao fungo necrotrófico *Verticillium dahliae* (Gayoso *et al.* 2010). O aumento da expressão de diversos genes da via do fenilpropanóide tem sido observado em plantas de algodão, tanto tolerantes quanto suscetíveis ao fungo *V. dahliae*, mas com uma maior indução nas suscetíveis (Xu *et al.*, 2011). Apesar observação de um gene desta via induzido no ‘Clone A’, nenhum deles estavam induzidos no ‘Clone B’ (tolerante).

A análise do perfil transcricional do ‘Clone B’ (tolerante) indicou uma resposta mais rápida ao patógeno, o que pode ser observado pelo número mais elevado de genes diferencialmente expressos aos 3 DPI (Figura 20): 17 genes no ‘Clone A’ (suscetível) versus 185 no ‘Clone B’ (tolerante). Entre esses genes foi observada a expressão (aparentemente constitutiva) de alguns receptores LRR no ‘Clone B’ (tolerante), o que não ocorre no ‘Clone A’ (suscetível). A indução da expressão de LRRs foi relacionada à resistência ao fungo *Cladosporium fulvum* no tomate (Luderer *et al.* 2001) e ao fungo *Leptosphaeria maculans* na canola (Larkan *et al.* 2013). Na infecção da planta do algodão pelo patógeno *Verticillium dahliae*, que infecta o xilema da planta, como os patógenos do gênero *Ceratocystis*, foi observada uma gama de receptores LRR tanto com aumento, quanto com diminuição da expressão, sugerindo que diferentes receptores sejam específicos a diferentes tipos de infecção (Xu *et al.* 2011). A resposta imune inata da planta ocorre pela expressão desses receptores ricos em leucina (LRR – *leucine rich receptors*), entre outros, que compõem uma das mais importantes classes de genes de resistência em plantas (Faris *et al.* 2010, Zhang *et al.* 2014). Dos receptores com expressão diferencial o padrão mais marcante foi observado com o gene DN42727. Este receptor teve sua expressão elevada no clone tolerante durante



todo o período amostrado (3, 7 e 15 DPI) com ou sem a presença da infecção por *Ceratocystis* enquanto o clone suscetível teve a expressão aumentada apenas aos 7 DPI no controle não inoculado e nenhuma expressão após esta data mesmo no controle inoculado (**Figura 20**). Este padrão pode indicar a indução da resposta imune por algum patógeno presente nas condições do experimento que não o *Ceratocystis* ou uma expressão constitutiva do gene. Como ambos os clones foram submetidos às mesmas condições supõem-se que o clone tolerante expressa o receptor com maior eficiência que o clone suscetível.

A análise comparativa das respostas transcricionais do ‘Clone A’ (suscetível) e do ‘Clone B’ (tolerante) à infecção de *C. fimbriata* revelam alguns dos potenciais mecanismos associados com a resposta de tolerância ao fungo. De fato, duas diferenças manifestam-se mais claramente entre os clones contrastantes em relação a interação com *C. fimbriata* logo no início da infecção e que parecem cruciais para explicar a resposta de tolerância ao fungo. A primeira diferença marcante refere-se à intensificação na expressão de genes codificadores de receptores LRR. Esses receptores recebem os sinais iniciais da infecção e desencadeiam um leque de mecanismos celulares associados com a resposta imune primária da planta. Esses receptores também são ativados no ‘Clone A’ (suscetível). No entanto, essa resposta é mais lenta e tardia quando comparada com o ‘Clone B’ (tolerante). Estes mesmos receptores LRR já se expressavam constitutivamente no ‘Clone B’ (tolerante) como pode ser observado no controle não-inoculado. A expressão constitutiva desses receptores LRR permitem, possivelmente, desencadear respostas mais eficientes da planta prevenindo a indução de danos mais severos pelo fungo. A segunda diferença crucial entre os clones contrastantes é a resposta exacerbada de indução de enzimas fosfolipases no início da infecção. A superexpressão de genes codificadores de fosfolipases é um processo dual, sendo ao mesmo tempo um sistema de defesa importante para planta, mas que pode também ser manipulado pelos fungos fitopatógenos no processo de infecção. Existem fortes evidências de que fungos

do gênero *Ceratocystis* empregam as PI-PLCs para intensificar a resposta da planta levando a intensificação de mortes celulares prematuras (especialmente nas células alvo do xilema). Ao contrário do clone suscetível que induz muitas fosfolipases no início da infecção, o clone tolerante mantém a expressão de apenas um subgrupo dessas enzimas. As subsequentes respostas do clone suscetível parecem ser apenas consequência desta forte resposta inicial: o aumento da sinalização intercelular com receptores ionotróficos de glutamato e a indução da calose sintase para o remodelamento da parede celular já em processo de degradação. A resposta subsequente do clone tolerante (que já acionou suas defesas mais rapidamente e aumentou a sinalização por transporte de íons desde o início) parece condicionar, primariamente, uma restrição da invasão do fungo.

A resposta à infecção por *C. fimbriata* no ‘Clone B’ (tolerante) passa rapidamente (3 DPI) pelas etapas de sinalização celular que foram observadas no ‘Clone A’ (suscetível) apenas aos 7 e 15 DPI. Após essa sinalização e reorganização dos processos transcricionais, o ‘Clone B’ induz a expressão de genes do processo fermentativo alcoólico, tais como o gene da enzima álcool desidrogenase (ADH). A presença da enzima ADH codificada por este gene tem sido relacionado a diminuição da necrose induzida pelo patógeno. Por exemplo, a infecção por *Blumeria graminis* leva à indução precoce da ADH na planta de cevada (**Käsbauer et al. 2017**). A indução da expressão de álcool desidrogenase 1 (ADH1) foi observada também em soja, associada a um aumento da concentração de etanol, em plantas infectadas pelo fungo necrotrófico *Rhizoctonia solani* (**Copley et al. 2017**). Da mesma forma, a deleção deste gene em *Arabidopsis* no mesmo trabalho, levou à um aumento da necrose durante a infecção. A completa eliminação do fungo no clone tolerante parece ser consequência direta da indução da via fermentativa em resposta à hipóxia no local da infecção. Essa hipóxia pode ser gerada tanto pela competição por oxigênio com o fungo, quanto pelo uso desse gás.

Uma análise sinóptica do padrão de expressão gênica dos clones de teca contrastantes para resposta ao fungo permite uma elaboração preliminar de um modelo teórico desta interação (**Figura 25**). A infecção do ‘Clone A’ (suscetível) pelo fungo revela os passos do avanço da resposta da planta ao fungo, e a interação no nível molecular está focada na parede e membrana das células. Aos 3 DAI, receptores do tipo LRR (*leucine rich receptors*) recebem o sinal de moléculas geradas pela degradação da parede celular e desencadeiam a resposta imune primária da planta, induzindo a produção e secreção de enzimas fosfolipases que pode danificar estruturalmente as membranas do fungo. Por outro lado, o próprio fungo produz fosfolipases que quebram ligações ancoradas em GPIs e geram elicitores em sua ação sobre a parede da planta que intensificam a resposta a ponto de serem deletérios para a própria planta. Aos 7 DAI, a sinalização e comunicação intercelular está intensificada com os receptores de glutamato que reconhecem PAMPs (*pathogen associated molecular patterns*) e aumentam o transporte de íons, especialmente  $\text{Ca}^{2+}$ . No décimo quinto dia da infecção, a resposta da planta já está avançada e o metabolismo de lignina está intensificado. Há um aumento da produção de calose sintase, enzima que contribui para a lignificação e formação de caloses nas regiões atacadas da parede primária. Além disso, esta mesma via gera compostos secundários do tipo fenilpropanóides que são tóxicos ao fungo e auxiliam no combate à infecção.

Os resultados obtidos sobre o perfil de expressão gênica da interação *T. grandis*–*C. fimbriata* levantam hipóteses a serem validadas em trabalhos futuros, incluindo a potencial relação dos receptores LRR (ex. **DN42727**) com os níveis elevados de tolerância à *Ceratocystis*; a potencial relação de fosfolipases (ex. **DN54668**) com a suscetibilidade ao fungo bem como ao provável uso da produção de etanol (pela indução da fermentação) como um sistema alternativo de defesa de *T. grandis* ao patógeno *C. fimbriata*.

Em sumário, esse estudo pioneiro possibilitou identificar e catalogar subgrupos de genes modulados na interação *T. grandis*–*C. fimbriata*, incluindo potenciais fatores de

resistência e de suscetibilidade. Essa informação genética/genômica pode auxiliar no desenvolvimento de clones resistentes/tolerantes via melhoramento clássico (através de seleção assistida por marcadores moleculares) bem como em estratégias biotecnológicas (edição e silenciamento gênicos).

## CONCLUSÕES

- ✓ Importantes novas hipóteses foram levantadas e serão passíveis de serem testadas em trabalhos futuros:
- ✓ A potencial relação dos receptores LRR (ex. **DN42727**) com a resposta de tolerância ao *Ceratocystis*;
- ✓ A potencial involvimento de fosfolipases (ex. **DN54668**) com a susceptibilidade ao fungo;
- ✓ Potencial uso da produção de etanol pela indução da fermentação no combate da planta *Tectona grandis* ao patógeno *Ceratocystis fimbriata*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALFENAS, A. C. **2009**. Clonagem e Doenças do Eucalipto. 2ed. Viçosa, Minas Gerais, Brasil: Editora UFV, 500 p.

ANDERS, S & HUBER, W. **2010**. Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biology* 11(10): R106.

ALEXA, A., RAHNENFUHRER, J & LENGAUER, T. 2006. Improved scoring of functional groups from gene expression. Data by decorrelating GO graph structure. *Bioinformatics* 22: 1600–1607.

APWEILER, R., BAIROCH, A & WU, C.H. **2004**. UniProt: the Universal Protein knowledgebase. *Nucleic Acids Research* 432: 115–119.

BELLINCAMPI, D.; CERVONE, F & LIONETTI, V. **2014**. Plant cell wall dynamics and wall-related susceptibility in plant-pathogen interactions. *Frontiers in Plant Science* 5: 1–8.

BEBARTA, K.C. **1999**. Teak: Ecology, Silviculture, Management and profitability. International Book Distributors. Dehra Dum India. Chapter 6, 379 pages.

BOLLER, T & FELIX, G. **2009**. A Renaissance of elicitors: Perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annu Rev Plant Biol* 60: 379–406.

BORGES, R.C.F.; SANTOS, M.D.M.; MACEDO, M.A.; MARTINS, I.; NASCIMENTO, A.G.; CAFÉ-FILHO, A.C.; BOITEUX, L.S.; FONSECA, M.E.N.; INÁCIO, C.A & MELLO, S.C.M. **2015**. A trunk canker disease of *Tectona grandis* induced by *Lasiodiplodia theobromae* in Brazil. *New Disease Reports* 31: 26.

D'AMBROSIO, J.M.; COUTO, D.; FABRO, G.; SCUFFI, D.; LAMATTINA, L.; MUNNIK, T.; ANDERSSON, M.X.; ALVAREZ, M.E.; ZIPFEL, C & LAXALT, A.M. **2017**. PLC2

regulates MAMP-triggered immunity by modulating ROS production in Arabidopsis. *Plant Physiology*: 00173.2017

DRESCHER, R. **2004**. Crescimento e produção de *Tectona grandis* Linn F., em povoamentos jovens de duas regiões do estado de Mato Grosso – Brasil. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal) - Universidade Federal de Santa Maria 133 p.

FARIS, J.D.; ZHANG, Z.; LU, H.; LU, S.; REDDY, L.; CLOUTIER, S.; FELLERS, J.P.; MEINHARDT, S.W.; RASMUSSEN, J.B & XU, S.S. **2010**. A unique wheat disease resistance-like gene governs effector-triggered susceptibility to necrotrophic pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 107: 13544–13549

FERREIRA, M.A.; HARRINGTON, T.C.; GONGORA-CANUL, C.C.; MAFIA, R.G.; ZAUZA, E.A.V & ALFENAS, A.C. **2013**. Spatial–temporal patterns of *Ceratocystis* wilt in *Eucalyptus* plantations in Brazil. *Forest Pathology* 43: 153–164.

FIGUEIREDO, E.O.; Oliveira, L.C & Barbosa, L.K.F. **2005**. Teca (*Tectona grandis* L.f.): Principais Perguntas do Futuro empreendedor Florestal. Embrapa Acre. 87 p.

FIRMINO, A.C.; TOZZE JR., H.J.; FURTADO, E.L. **2012**. First report of *Ceratocystis fimbriata* causing wilt in *Tectona grandis* in Brazil. *New Disease Reports* 25: 24.

FIRMINO, A.C.; TANAKA, F.A.O.; SILVA, S.D.V.M.; ITO, M.F.; FURTADO, E.L. **2015**. Colonização do xilema de eucalipto por *Ceratocystis* spp. isolado de diferentes hospedeiros. *Summa Phytopathologica* 41: 138–143.

FORDE, B.G & ROBERTS, M.R. **2014**. Glutamate receptor-like channels in plants: A role as amino acid sensors in plant defence? *F1000 Prime Rep* 6: 1–7.

GAYOSO, C.; POMAR, F.; NOVO-UZAL, E.; MERINO & MARTÍNEZ DE ILÁRDUYA, Ó. **2010**. The *Ve*-mediated resistance response of the tomato to *Verticillium dahliae* involves H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, peroxidase and lignins and drives PAL gene expression. *BMC Plant Biology* 10: 232.

GRABHERR, M.G. **2011**. Full-length transcriptome assembly from RNA-seq data without a reference genome. *Nature Biotechnology* 29: 644–652.

GOH, D.K. S, GALIANA, A. **2000**. Vegetative propagation of teak. *Jircas Working Report* 16: 35–43.

GONORAZKY, G.; GUZZO, M.C & LAXALT, A.M. **2016**. Silencing of the tomato phosphatidylinositol-phospholipase C2 (SIPLC2) reduces plant susceptibility to *Botrytis cinerea*. *Molecular Plant Pathology* 17(9): 1354–1363.

INSTITUTO DE PESQUISAS E ESTUDOS FLORESTAIS (IPEF) *Tectona grandis*. **2003**. Disponível em: <<http://www.ipef.br/identificacao/tectona.grandis.asp>> Acesso em: 06 de junho 2018.

KWAAITAAL, M.; HUISMAN, R.; MAINTZ, J.; REINSTÄDLER, A & PANSTRUGA, R. **2011**. Ionotropic glutamate receptor (iGluR)-like channels mediate MAMP-induced calcium influx in *Arabidopsis thaliana*. *Biochemical Journal* 440: 355–373

KOPYLOVA E., NOÉ, L & TOUZET, H. **2012**. SortMeRNA: Fast and accurate filtering of ribosomal RNAs in metatranscriptomic data. *Bioinformatics* 28(24): 3211–3217.

KIM, D., LANGMEAD, B & SALZBERG, S.L. **2015**. HISAT: A fast spliced aligner with low memory requirements. *Nature Methods* 12(4): 357.

KOSKINEN, P., TORONEN, P., NOKSO-KOIVISTO, J & HOLM, L. **2015**. PANNZER: high-throughput functional annotation of uncharacterized proteins in an error-prone environment. *Bioinformatics* 31: 1444–1452.

LANGMEAD, B & SALZBERG, S. **2012**. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature Methods*. 9: 357–359.

LI, B & DEWEY, C.N. **2011**. RSEM: accurate transcript quantification from RNA-seq data with or without a reference genome. *BMC Bioinformatics* 12: 323.



LOVE, M.I. **2014**. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-Seq data with DESeq2. *bioRxiv. Genome Biology* 15(12): 550.

LARKAN, N.J.; LYDIATE DJ, PARKIN I.A.P.; NELSON, M.N.; EPP, D.J.; COWLING, W.A.; RIMMER, S.R & Borhan, M.H. **2013**. The *Brassica napus* blackleg resistance gene LepR3 encodes a receptor-like protein triggered by the *Leptosphaeria maculans* effector AVR1M1. *New Phytologist* 197: 595–605.

LUDERER, R.; RIVAS, S.; NÜRNBERGER, T.; MATTEI, B.; VAN DEN HOOVEN, H.W.; ROMEIS, T.; WEHRFRITZ, J.M.; BLUME, B & NENNSTIEL. **2001**. No evidence for binding between resistance gene product Cf-9 of tomato and avirulence gene product AVR9 of *Cladosporium fulvum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 14: 867–876.

MARCHLER-BAUER, J.B., ANDERSON, P.F., CHERUKURI, C., DEWEESE-SCOTT, L.Y., GEER, M., GWADZ, S., HE, D.I., HURWITZ, J.D., JACKSON, Z & KE, Z. **2005**. CDD: a Conserved Domain Database for protein classification. *Nucleic Acids Research* 33 (Database issue): D192–D196.

MAZIAH, Z.; LEE, S.S. **1999**. Diseases and Disorders of Teak (*Tectona grandis*) in Peninsular Malaysia. *Proceedings of the 5<sup>th</sup> International Conference on Plant Protection in the Tropics*. Kuala Lumpur, p.158–163.

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. **2018**. *Ceratocystis cacaofunesta* genome analysis reveals a large expansion of extracellular phosphatidylinositol-specific phospholipase-C genes (PI-PLC). *BMC Genomics* 19: 1–24

PETRE, B.; MORIN, E.; TISSERANT, E.; HACQUARD, S.; DA SILVA, C.; POULAIN, J.; DELARUELLE, C.; MARTIN, F.; ROUHIER, N & KOHLER, A. **2012**. RNA-seq of early-infected poplar leaves by the rust pathogen *Melampsora larici-populina* uncovers PtSultr3;5, a fungal-induced host sulfate transporter. *PLoS One* 7(8): e44408.

SIMÃO, F.A.; WATERHOUSE, R.M.; IOANNIDIS, P.; KRIVENTSEVA, E.V & ZDOBNOV, E.M. **2015**. BUSCO: assessing genome assembly and annotation completeness with single-copy orthologs. *Bioinformatics* 31: 3210–3212.

TAPKEN, D & HOLLMANN, M. **2008**. *Arabidopsis thaliana* glutamate receptor ion channel function demonstrated by ion pore transplantation. *Journal of Molecular Biology* 383: 36–48.

UNDERWOOD, W. **2012**. The Plant Cell Wall: A Dynamic Barrier Against Pathogen Invasion. *Frontiers in Plant Science* 3:1–6.

VERMA, V.; RAVINDRAN, P & Kumar, P.P.**2016**. Plant hormone-mediated regulation of stress responses. *BMC Plant Biol* 16: 1–10.

WEAVER, P. L. **1993**. *Tectona grandis* Linn f. Teak. New Orleans: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Southern Forest Experiment Station 18 p.

WILKEN, P.M., STEENKAMP, E.T., WINGFIELD, M.J., DE BEE, Z.W & WINGFIELD, B. D. 2013. IMA Genome- F1: *Ceratocystis fimbriata* draft nuclear genome sequence for the plant pathogen, *Ceratocystis fimbriata*. *IMA Fungus* 4: 357–358.

XU, L.; ZHU, L.; TU, L.; LIU, L.; YUAN, D.; JIN, L.; LONG, L & ZHANG, X. **2011**. Lignin metabolism has a central role in the resistance of cotton to the wilt fungus *Verticillium dahliae* as revealed by RNA-Seq-dependent transcriptional analysis and histochemistry. *Journal of Experimental Botany* 62: 5607–5621.

ZHANG, L.; KARS, I.; ESSENSTAM, B.; LIEBRAND, T.W.H.; WAGEMAKERS, L.; ELBERSE, J.; TAGKALAKI, P.; TJOITANG, D.; VAN DEN ACKERVEKEN, G & VAN KAN, J.A.L. **2014**. Fungal endopolygalacturonases are recognized as microbe-associated molecular patterns by the Arabidopsis receptor-like protein RESPONSIVENESS TO *Botrytis* POLYGALACTURONASES1. *Plant Physiology* 164: 352–364

ZHANG, Q.; BERKEY, R.; BLAKESLEE, J.J.; LIN, J.; MA, X.; KING, H.; LIDDLE, A.; GUO, L.; MUNNIK, T & WANG, X. **2018**. *Arabidopsis* phospholipase D $\alpha$ 1 and D $\delta$

oppositely modulate EDS1- and SA-independent basal resistance against adapted powdery mildew. *Journal of Experimental Botany*: ery146.

**ANEXOS (TABELAS SUPLEMENTARES)**

**Tabela 19:** Genes diferencialmente expressos no clone susceptível aos 3 dias após a infecção. Valores do fold-change estão coloridos em tons de vermelho para os reprimidos e em verde para os induzidos na infecção.

Clone S – 3DPI	folding	Annotation
DN37621_c0_g2	3,41	LRR receptor
DN39309_c0_g1	3,40	Transcriptional factor WRKY I
DN41600_c0_g1	3,17	Phospholipase-C (PIPLC)
DN46784_c0_g1	2,07	Phospholipase-C (PIPLC)
DN46257_c0_g1	-2,52	Pollen proteins Ole e I like
DN36432_c0_g1	-2,69	Not defined
DN32899_c0_g4	-3,11	Not defined
DN10406_c0_g1	-3,18	Not defined
DN51014_c0_g1	-3,29	PPR, Pentatricopeptide repeat, RNA-binding module
DN43106_c0_g1	-3,33	Disease resistance response protein 206
DN4663_c0_g1	-3,69	Not defined
DN48177_c0_g4	-3,90	Rhcadhesin receptor, putative
DN43960_c0_g2	-4,13	Vestitone reductase
DN52177_c2_g2	-4,37	Not defined
DN31392_c0_g2	-7,81	Plant-specific domain TIGR01615 family protein
DN51940_c0_g1	-8,01	Phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase 8
DN43947_c0_g1	-8,46	Ferric reductase defective 3b
DN26565_c0_g1	-8,93	Not defined
DN50221_c1_g7	-11,25	Not defined
DN32943_c0_g1	-12,40	Not defined
DN50221_c1_g5	-14,44	Not defined
DN41750_c0_g2	-93,18	Not defined
DN39624_c0_g2	-340,93	Not defined
DN32146_c0_g1	-461,09	Not defined
DN35133_c0_g2	-556,59	Not defined
DN46288_c1_g2	-737,74	Not defined
DN37941_c1_g2	-2234,28	Not defined

**Tabela 20:** Genes diferencialmente expressos no clone susceptível aos 7 dias após a infecção. Valores do fold-change estão coloridos em tons de vermelho para os reprimidos e em verde para os induzidos na infecção.

Clone S – 7DPI	folding	Annotation
DN17813_c0_g2	inf	Not defined
DN50221_c1_g7	7,9	Not defined
DN45355_c0_g2	3,2	Ypr10 protein
DN44451_c2_g1	2,1	Metal ion binding protein, putative
DN43106_c0_g1	2,1	Disease resistance response protein 206
DN42268_c0_g1	2,0	Not defined
DN50855_c0_g4	-2,0	Starch branching enzyme I
DN32694_c0_g1	-2,0	Not defined
DN52416_c1_g3	-2,0	EIX receptor 2
DN35287_c0_g1	-2,1	Putative HGA1
DN50690_c1_g1	-2,1	Not defined
DN38964_c0_g1	-2,1	Calmodulin binding protein, putative
DN38948_c0_g1	-2,1	Not defined
DN37194_c0_g1	-2,1	GDSL esterase/lipase At5g14450
DN51934_c0_g1	-2,1	Not defined
DN48659_c1_g2	-2,1	Ring finger protein, putative
DN50629_c1_g1	-2,1	Not defined
DN50104_c0_g1	-2,2	Putative general amino acid permease (Fragment)
DN50409_c1_g2	-2,2	Predicted small molecule transporter
DN38419_c1_g2	-2,2	Not defined
DN50464_c0_g1	-2,2	Glutamate receptor
DN48372_c0_g1	-2,2	Sulfate/bicarbonate/oxalate exchanger and transporter sat-1
DN45128_c1_g1	-2,2	Calcineurin B-like protein 2
DN28088_c0_g1	-2,2	UDP-glucose iridoid glucosyltransferase
DN52185_c0_g1	-2,3	Protein kinase; Type I EGF
DN39338_c0_g1	-2,3	Peptide transporter PTR1
DN39482_c0_g1	-2,3	Not defined
DN38419_c1_g1	-2,3	Not defined
DN41891_c0_g1	-2,3	Calcineurin B-like protein-interacting protein kinase
DN42319_c2_g2	-2,3	Nodulin 26-like intrinsic protein
DN38419_c1_g3	-2,3	Not defined

DN51963_c0_g8	-2,3	Not defined
DN51718_c0_g1	-2,4	NN mitogen-activated protein kinase
DN44942_c0_g1	-2,4	Protein phosphatase 2c
DN36363_c0_g1	-2,4	Class II chitinase
DN49520_c2_g1	-2,4	Transcription factor bHLH123
DN52711_c5_g3	-2,4	Not defined
DN41939_c1_g1	-2,4	Not defined
DN51453_c1_g2	-2,5	Alcohol dehydrogenase
DN51988_c0_g1	-2,5	Sulfate/bicarbonate/oxalate exchanger and transporter sat-1
DN51352_c0_g1	-2,5	Putative alkaline alpha-galactosidase seed imbibition protein (Fragment)
DN52660_c2_g2	-2,5	Seed imbibition protein 1
DN27842_c0_g2	-2,6	Not defined
DN50806_c0_g2	-2,6	Peptide transporter
DN52592_c0_g1	-2,6	Di-trans,poly-cis-decaprenylcistransferase
DN41024_c0_g1	-2,6	Gibberellin 20 oxidase, putative
DN42802_c0_g1	-2,7	Isoaspartyl aminopeptidase (Fragment)
DN52406_c0_g3	-2,7	Somatic embryogenesis receptor kinase
DN47431_c0_g2	-2,7	Chloride channel Stcl1
DN39932_c0_g1	-2,7	Putative zinc finger protein
DN52607_c1_g1	-2,8	Os08g0203300 protein (Fragment)
DN44223_c3_g1	-2,8	Protein phosphatase 2C
DN48080_c1_g2	-2,8	9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase 3
DN48935_c1_g1	-2,8	Desacetoxyvindoline 4-hydroxylase, putative
DN50249_c0_g1	-2,8	Not defined
DN52735_c0_g1	-2,8	Putative CLAVATA1 receptor kinase
DN48590_c0_g1	-2,9	Pectase lyase
DN47163_c0_g1	-2,9	BURP domain-containing protein
DN42040_c0_g1	-2,9	WRKY transcription factor, putative
DN45216_c0_g1	-2,9	Cysteine-rich repeat secretory protein
DN36651_c0_g1	-2,9	Not defined
DN44223_c2_g1	-2,9	Protein phosphatase 2C catalytic subunit (Fragment)
DN45446_c0_g2	-3,0	1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase
DN52711_c5_g2	-3,0	Not defined
DN36540_c1_g1	-3,0	NAC domain protein NAC4

DN36268_c0_g1	-3,0	Jasmonate O-methyltransferase, putative
DN45127_c0_g1	-3,1	Subtilisin-like serine protease
DN46890_c0_g2	-3,5	Carotenoid cleavage dioxygenase 8
DN45339_c2_g1	-3,6	White-brown-complex ABC transporter family (Fragment)
DN48080_c0_g1	-3,6	Not defined
DN47431_c0_g1	-3,7	Not defined
DN42555_c0_g1	-3,7	Not defined
DN38478_c0_g1	-3,8	Xylem sap protein 10 kDa
DN44401_c0_g1	-3,9	ORF (Fragment)
DN42428_c0_g1	-4,0	Not defined
DN34936_c0_g1	-4,0	Not defined
DN46192_c0_g3	-4,1	Not defined
DN48413_c0_g1	-4,2	Not defined
DN38795_c0_g1	-4,2	Not defined
DN46339_c0_g1	-4,2	Not defined
DN52850_c3_g3	-4,4	Not defined
DN51867_c0_g1	-4,6	Os02g0609900 protein
DN48447_c0_g2	-4,9	Beta 1-3 glucanase
DN41505_c0_g1	-5,0	Beta-1,3-glucanase, basic
DN48829_c0_g4	-5,2	Sulfate/bicarbonate/oxalate exchanger and transporter sat-1
DN24388_c0_g1	-5,2	Not defined
DN44630_c0_g1	-5,3	Mitochondrial import inner membrane translocase, subunit Tim17/22
DN32669_c0_g1	-5,4	Not defined
DN36269_c0_g1	-5,7	Not defined
DN45734_c0_g2	-6,2	Putative small heat shock protein
DN37231_c0_g2	-6,7	Protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein family protein
DN51225_c0_g6	-6,9	Galactosyltransferase family protein (Fragment)
DN38238_c0_g1	-7,1	Not defined
DN50230_c3_g1	-8,0	Not defined
DN52944_c5_g8	-8,6	Not defined
DN29750_c0_g1	-9,6	Not defined
DN38328_c0_g6	-9,9	Not defined
DN37533_c2_g2	-11,8	Not defined
DN52935_c18_g5	-13,1	Not defined



DN37533_c2_g4	-18,0	Not defined
DN38328_c0_g3	-23,7	Not defined
DN33081_c0_g1	-27,5	Not defined
DN29939_c0_g1	-30,7	Not defined
DN33081_c0_g2	-34,8	Not defined
DN39306_c0_g1	-40,1	Not defined
DN34333_c0_g2	-63,6	Not defined
DN42271_c0_g11	-65,5	Not defined
DN32599_c1_g1	-72,4	Not defined
DN46402_c2_g4	-82,0	Not defined
DN37533_c2_g5	-117,5	Not defined
DN37946_c0_g1	-130,0	Not defined
DN41750_c0_g1	-138,0	Not defined
DN46402_c2_g12	-173,5	Not defined

**Tabela 21:** Genes diferencialmente expressos no clone susceptível aos 15 dias após a infecção. Valores do fold-change estão coloridos em tons de vermelho para os reprimidos e em verde para os induzidos na infecção.

CloneS – 15DPI	folding	Annotation
DN27069_c0_g1	inf	Not defined
DN32943_c0_g1	10,29	Not defined
DN32943_c1_g1	9,69	SMLII
DN50737_c1_g1	8,80	Os03g0241600 protein (Fragment)
DN27943_c0_g1	7,16	Histidine phosphotransfer protein
DN34234_c0_g1	6,18	Not defined
DN41680_c0_g1	5,66	Hydroxycinnamoyl-CoA shikimate/quinate hydroxycinnamoyl transferase (Fragment)
DN44268_c0_g1	5,66	Cytokinin dehydrogenase
DN45109_c0_g1	5,31	Not defined
DN49973_c0_g3	5,28	Maturase K
DN49092_c0_g1	4,97	Photosystem II CP43 chlorophyll apoprotein
DN42602_c0_g1	4,88	Not defined
DN47034_c0_g1	4,62	Xenotropic and polytropic murine leukemia virus receptor pho1, putative

DN44720_c0_g1	4,56	MYB transcription factor MIXTA-like protein
DN26449_c0_g1	4,33	Class I heat shock protein
DN10406_c1_g1	4,29	Not defined
DN51957_c3_g2	4,11	AP2/ERF domain-containing transcription factor
DN47635_c0_g1	4,07	Geraniol synthase
DN42445_c0_g1	3,92	Not defined
DN48295_c0_g3	3,90	Photosystem I P700 apoprotein A1
DN45846_c0_g2	3,86	Cytochrome b
DN48796_c0_g2	3,80	Sucrose-phosphate synthase isoform C
DN18592_c1_g1	3,77	Short chain alcohol dehydrogenase, putative
DN50929_c2_g2	3,77	Expansin
DN45001_c1_g3	3,61	Os09g0332700 protein
DN46826_c2_g3	3,58	Ribulose biphosphate carboxylase large chain
DN43589_c0_g1	3,57	Germin-like protein subfamily 1 member
DN4663_c0_g1	3,55	Not defined
DN49082_c0_g1	3,55	Pleckstrin homology (PH) and lipid-binding START domain-containing protein
DN45166_c0_g1	3,50	Beta expansin 2 (Precursor)
DN43685_c0_g1	3,50	Putative endo-beta-1,4-glucanase OfEG2 (Fragment)
DN50546_c2_g2	3,45	Not defined
DN18947_c0_g2	3,45	Not defined
DN47955_c0_g1	3,43	Not defined
DN44972_c1_g4	3,42	Soluble inorganic pyrophosphatase
DN43106_c0_g1	3,41	Disease resistance response protein 206
DN52678_c1_g1	3,38	Auxin efflux carrier family protein
DN43051_c0_g3	3,36	Not defined
DN52856_c4_g1	3,32	Not defined
DN52589_c0_g1	3,29	Not defined
DN44695_c0_g1	3,28	Geranyl diphosphate synthase small subunit
DN41521_c1_g1	3,26	Not defined
DN46195_c0_g1	3,24	Not defined
DN45546_c1_g1	3,23	BHLH transcription factor
DN48099_c0_g2	3,21	Os08g0477100 protein
DN44540_c0_g4	3,20	Vegetative storage protein PNI288
DN33077_c0_g1	3,17	ARK3 (Fragment)

DN46164_c0_g1	3,16	Peroxidase
DN10406_c0_g1	3,16	Not defined
DN51678_c0_g4	3,15	Serine carboxypeptidase
DN30401_c0_g1	3,14	Not defined
DN50919_c1_g1	3,13	Rosmarinic acid synthase
DN38786_c0_g1	3,12	Progesterone 5beta-reductase 2
DN40821_c0_g1	3,11	Trehalose-phosphatase
DN49275_c1_g1	3,08	Trans-zeatin O-beta-D-glucosyltransferase
DN42960_c0_g1	3,08	Phosphofructokinase family protein
DN36080_c0_g1	3,06	Alcohol dehydrogenase
DN45171_c1_g1	3,05	Catechol oxidase
DN45837_c0_g1	3,03	Diphosphoinositol polyphosphate phosphohydrolase, putative
DN52855_c2_g3	3,00	Not defined
DN44998_c0_g2	2,98	Root hair defective GTP-binding protein (Fragment)
DN47087_c1_g1	2,95	Anoctamin-like protein At1g73020
DN50433_c1_g9	2,95	Not defined
DN42930_c0_g1	2,95	Not defined
DN47364_c0_g1	2,89	Not defined
DN52632_c2_g1	2,87	Not defined
DN50911_c0_g1	2,85	Inward rectifying potassium channel
DN49797_c2_g1	2,85	Not defined
DN47362_c0_g1	2,84	Heparanase
DN48325_c0_g2	2,83	Transferase, transferring glycosyl groups, putative
DN41546_c0_g1	2,83	Tyrosine decarboxylase
DN51162_c0_g3	2,83	Putative receptor-like protein kinase RLPK1 (Fragment)
DN45231_c0_g1	2,81	Calmodulin binding protein, putative
DN32899_c0_g4	2,79	Not defined
DN48867_c0_g1	2,78	Os02g0813166 protein
DN52904_c2_g4	2,77	S-locus lectin protein kinase family protein (Fragment)
DN47188_c0_g1	2,73	Large secreted protein, putative, expressed
DN46997_c0_g1	2,73	Not defined
DN45420_c3_g1	2,73	Annexin D4
DN51459_c3_g6	2,72	Os07g0273600 protein
DN49324_c0_g2	2,72	Os01g0141900 protein

DN47441_c1_g2	2,72	Not defined
DN51201_c2_g4	2,71	Glycosyltransferase, group 2 family protein (Fragment)
DN46582_c0_g2	2,71	Putative growth regulator protein
DN38066_c0_g1	2,71	Not defined
DN36654_c0_g2	2,70	Chalcone isomerase
DN24994_c0_g1	2,70	Not defined
DN50898_c0_g4	2,70	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain, putative
DN37117_c2_g1	2,68	UDP-glucose iridoid glucosyltransferase
DN44208_c0_g1	2,68	DIAPH1 protein (Fragment)
DN34283_c0_g1	2,68	Peroxidase 3
DN49184_c1_g1	2,67	Glutathione peroxidase
DN52936_c2_g3	2,67	Os11g0261600 protein (Fragment)
DN41029_c0_g3	2,67	Not defined
DN52056_c0_g2	2,66	Peptide transporter PTR3-B
DN42777_c0_g1	2,65	Cytochrome P450
DN43670_c1_g2	2,64	Not defined
DN51117_c0_g2	2,63	Not defined
DN42261_c0_g1	2,62	Transferase, transferring glycosyl groups, putative
DN32398_c1_g1	2,62	Nucleotide binding site-leucine rich repeat protein (Fragment)
DN46566_c0_g1	2,62	Haloacid dehalogenase-like hydrolase family protein, putative, expressed
DN51482_c0_g2	2,61	Not defined
DN46207_c0_g1	2,61	Os02g0832400 protein (Fragment)
DN27328_c0_g1	2,61	Not defined
DN45933_c0_g3	2,60	Aspartyl protease family protein
DN32204_c0_g1	2,60	Spotted leaf protein, putative
DN49376_c0_g2	2,59	Subunit of the COMPASS (Set1C) complex, putative (Compass histone methyltransferase subunit, putative)
DN52850_c1_g4	2,58	ATP synthase subunit alpha, chloroplastic
DN48913_c1_g1	2,57	Probable trehalose-phosphate phosphatase J
DN41962_c0_g2	2,55	Not defined
DN47055_c0_g1	2,55	Phosphatidyl serine synthase family protein
DN42958_c1_g2	2,55	Auxin efflux carrier-like protein
DN50274_c1_g1	2,54	ANT (Fragment)
DN42762_c0_g2	2,54	NAC domain protein, IPR003441

DN51917_c3_g1	2,53	CDNA clone:J033105C09, full insert sequence
DN50263_c0_g1	2,53	Ankyrin repeat family protein
DN46870_c0_g3	2,53	Os11g0150700 protein
DN51829_c2_g1	2,52	Carboxyl-terminal proteinase
DN52678_c2_g1	2,52	AT2G17500 protein (Fragment)
DN46098_c0_g3	2,50	Reversibly glycosylated polypeptide
DN45804_c0_g3	2,49	Progesterone 5-beta-reductase
DN51292_c0_g3	2,49	Beta-glucosidase 08
DN27871_c0_g1	2,49	Os05g0149100 protein
DN42879_c0_g1	2,49	Os01g0839200 protein
DN42549_c0_g1	2,48	Not defined
DN49057_c0_g1	2,48	Os09g0357400 protein
DN44782_c0_g1	2,48	Diphosphonucleotide phosphatase 1 (Precursor)
DN50086_c1_g1	2,47	Os05g0242000 protein
DN50275_c0_g1	2,47	Putative small molecule transporter
DN52929_c3_g2	2,46	Late blight resistance protein R1-A, putative
DN52463_c1_g1	2,44	Calcium ion binding protein, putative
DN18606_c0_g1	2,44	Not defined
DN49120_c0_g1	2,44	Os05g0418100 protein (Fragment)
DN48885_c0_g2	2,43	AT3G13750 protein (Fragment)
DN37117_c0_g1	2,42	Os08g0168600 protein
DN52440_c0_g4	2,42	Myosin XI (Fragment)
DN35429_c0_g2	2,41	Not defined
DN49503_c3_g1	2,41	Hypothetical protein
DN42995_c0_g4	2,41	Stem 28 kDa glycoprotein, putative
DN45632_c0_g1	2,40	Peroxidase
DN52856_c3_g2	2,40	LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase FEI
DN49633_c0_g1	2,39	Sec14 cytosolic factor
DN49550_c0_g1	2,38	BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 1-associated receptor kinase 1, putative
DN49272_c0_g1	2,38	Hydrolase, hydrolyzing O-glycosyl compounds
DN47604_c0_g2	2,38	Nitrate transporter (Fragment)
DN51090_c0_g1	2,37	Acidic cellulase
DN52872_c1_g2	2,37	Os01g0229700 protein
DN49294_c0_g1	2,36	Beta xylosidase

DN51309_c0_g1	2,35	Not defined
DN48511_c1_g1	2,34	Expansin-like A2
DN33809_c0_g1	2,33	Not defined
DN48671_c0_g1	2,33	LIM domain kinase, putative
DN42681_c1_g3	2,33	Not defined
DN46330_c0_g1	2,32	Inositol monophosphatase
DN48960_c0_g2	2,31	Beta-hexosaminidase alpha chain
DN49418_c0_g1	2,31	Arogenate dehydrogenase 1
DN51134_c1_g1	2,31	Not defined
DN45965_c0_g1	2,31	Os07g0413800 protein
DN48267_c1_g2	2,30	Putative MATE family transporter
DN42681_c1_g1	2,30	Not defined
DN51425_c3_g4	2,30	Hippocampus abundant transcript-like protein
DN46257_c0_g1	2,30	Not defined
DN41731_c4_g1	2,29	Not defined
DN42681_c1_g2	2,29	Not defined
DN32015_c0_g1	2,29	Not defined
DN51730_c0_g1	2,29	Putative integral membrane protein MviN
DN52904_c2_g1	2,28	LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase HSL2
DN42065_c0_g1	2,28	ORF (Fragment)
DN39466_c0_g1	2,28	3-ketoacyl-CoA synthase 11
DN51162_c0_g2	2,28	Putative receptor-like protein kinase RLPK1 (Fragment)
DN52110_c1_g1	2,27	Not defined
DN47758_c0_g1	2,27	Hexadecanal dehydrogenase (acylating)
DN50562_c0_g3	2,27	Not defined
DN39915_c0_g3	2,27	Protein trichome birefringence-like 35
DN35367_c1_g1	2,26	Thaumatococcus-like protein SE39b
DN22656_c0_g1	2,26	Not defined
DN52597_c1_g1	2,26	MFS transporter (Fragment)
DN46157_c1_g5	2,26	Hydroxycinnamoyl-CoA shikimate/quinic acid hydroxycinnamoyl transferase (Fragment)
DN52869_c1_g1	2,26	Callose synthase (Fragment)
DN52691_c3_g3	2,25	Putative glucose acyltransferase (Fragment)
DN47079_c0_g1	2,25	Molybdopterin cofactor sulfurase, putative

DN51396_c0_g1	2,25	Zinc finger protein, putative
DN45693_c0_g1	2,24	Calmodulin binding protein, putative
DN30254_c1_g1	2,23	Not defined
DN45649_c0_g1	2,23	Not defined
DN52042_c1_g1	2,23	Os03g0351800 protein
DN30624_c0_g1	2,23	Anthocyanidin 3-O-glucosyltransferase
DN52372_c0_g1	2,23	Sieve element occlusion protein 2
DN51911_c0_g1	2,22	CDNA FLJ57056 (Fragment)
DN28215_c0_g1	2,22	Os08g0356500 protein
DN52384_c1_g4	2,22	Not defined
DN42120_c0_g1	2,22	Not defined
DN48381_c0_g3	2,22	Not defined
DN45741_c1_g2	2,21	Apyrase
DN52717_c0_g1	2,21	Disease resistance protein RPP13, putative
DN50883_c0_g3	2,20	Cholesterol transport protein
DN47687_c0_g1	2,20	Not defined
DN47356_c0_g1	2,19	Not defined
DN41014_c1_g3	2,19	Not defined
DN52283_c0_g1	2,19	Serine/threonine protein phosphatase 6 regulatory ankyrin repeat subunit C
DN45521_c4_g1	2,19	Hippocampus abundant transcript-like protein
DN19843_c0_g2	2,18	Receptor-like kinase with LRR repeats (Fragment)
DN43125_c2_g2	2,18	NC domain-containing protein
DN38737_c0_g1	2,18	Not defined
DN52222_c0_g1	2,18	Outward rectifying potassium channel
DN41541_c0_g1	2,18	Not defined
DN45287_c0_g1	2,18	Glucan endo-1,3-beta-glucosidase 1
DN49576_c0_g1	2,17	Phosphatidic acid phosphatase, putative
DN27447_c0_g1	2,17	Not defined
DN41742_c0_g1	2,16	Transcription factor bHLH74
DN52449_c0_g2	2,15	DNA polymerase alpha-associated DNA helicase A
DN20977_c0_g2	2,15	Not defined
DN43411_c0_g1	2,14	Os12g0122100 protein (Fragment)
DN47356_c1_g2	2,14	Protein PHYTOCHROME KINASE SUBSTRATE 4
DN49226_c0_g2	2,14	Not defined

DN52534_c1_g1	2,13	UPF0496 protein At2g18630
DN51368_c3_g3	2,13	Not defined
DN20977_c0_g1	2,13	Not defined
DN51038_c0_g2	2,13	Systemin receptor SR160, putative
DN40687_c0_g1	2,13	Os01g0199700 protein
DN52359_c0_g1	2,13	Transducin family protein (Fragment)
DN45194_c0_g1	2,13	Not defined
DN33662_c0_g1	2,13	Not defined
DN51721_c1_g1	2,13	Flavone synthase II
DN39484_c0_g2	2,13	Dehydroquinase dehydratase/ shikimate dehydrogenase
DN51910_c0_g1	2,12	Sieve element occlusion protein 1
DN52384_c1_g3	2,12	Interferon-induced GTP-binding protein Mx
DN40402_c0_g1	2,12	Not defined
DN38717_c0_g1	2,12	Polygalacturonase non-catalytic subunit AroGP2
DN52230_c1_g1	2,12	Callose synthase-like protein (Fragment)
DN43173_c0_g1	2,11	LAX2 protein
DN21037_c0_g1	2,11	Not defined
DN50101_c0_g2	2,11	RGC2 resistance protein K (Fragment)
DN45238_c0_g1	2,10	Chromatin remodeling complex subunit
DN50442_c2_g1	2,10	Receptor-like protein kinase THESEUS 1
DN52590_c1_g1	2,10	Not defined
DN35568_c0_g1	2,09	Not defined
DN50912_c0_g1	2,09	AT3G13750 protein (Fragment)
DN52145_c1_g3	2,09	G-type lectin S-receptor-like serine/threonine-protein kinase At4g27290
DN40593_c0_g1	2,08	Hydroxycinnamoyl transferase
DN40779_c0_g1	2,08	Aspartic proteinase nepenthesin-1, putative
DN42893_c0_g1	2,08	Glycosyl hydrolase family 17 protein
DN51417_c1_g2	2,07	Flavin containing monooxygenase 3-like
DN47246_c3_g1	2,07	AT4G38420 protein
DN38780_c1_g1	2,07	Not defined
DN46241_c0_g1	2,07	Jacalin lectin family protein
DN50554_c0_g1	2,06	C2 calcium/lipid-binding plant phosphoribosyltransferase-like protein
DN52909_c7_g3	2,06	ATP-binding cassette transporter
DN47393_c1_g1	2,06	Ran GTPase binding protein, putative



DN48392_c0_g1	2,06	Protein kinase protein with tetratricopeptide repeat domain
DN46395_c0_g1	2,06	TPR repeat-containing thioredoxin TTL1
DN45509_c0_g1	2,05	Receptor-kinase isolog
DN52917_c5_g2	2,05	Not defined
DN52359_c0_g2	2,05	Not defined
DN48741_c0_g3	2,04	KAN (KANADI); transcription factor
DN42713_c0_g1	2,03	Not defined
DN46157_c1_g6	2,03	Os08g0111800 protein
DN44788_c0_g2	2,03	NLI interacting factor family protein
DN39311_c0_g1	2,03	Pectinesterase
DN49295_c0_g1	2,03	Not defined
DN39026_c0_g1	2,03	Cytochrome P450
DN52903_c3_g2	2,02	Monoterpene synthases
DN52054_c0_g1	2,02	Multidrug resistance pump, putative
DN46469_c0_g1	2,02	Not defined
DN50963_c0_g2	2,02	HIPL1 protein, putative
DN47341_c0_g2	2,01	Alcohol dehydrogenase
DN42992_c1_g1	2,01	Probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At1g67720
DN51013_c2_g2	2,01	Ran GTPase binding protein, putative
DN50619_c1_g1	2,00	Peroxidase 2, putative, expressed
DN50921_c1_g1	2,00	Os01g0798800 protein
DN48175_c2_g1	2,00	Not defined
DN45228_c0_g1	-2,00	Not defined
DN43127_c1_g1	-2,01	Not defined
DN51236_c0_g1	-2,01	Not defined
DN49397_c1_g1	-2,01	Cold regulated protein 27
DN51138_c0_g1	-2,01	ATP-dependent Clp protease adaptor protein ClpS
DN41985_c0_g1	-2,01	Laccase 110b
DN49404_c0_g1	-2,01	Probable receptor-like protein kinase At5g56460
DN52342_c3_g3	-2,02	Cbs domain protein
DN45387_c0_g1	-2,02	Probable peptide/nitrate transporter At3g54450
DN50372_c2_g3	-2,02	Importin subunit alpha-1 (Fragment)
DN37009_c0_g1	-2,02	Not defined
DN36268_c1_g1	-2,02	UDP-glucose:salicylic acid glucosyltransferase

DN45046_c0_g1	-2,02	Zinc finger protein-like protein
DN46809_c0_g2	-2,03	R3h domain containing protein, putative
DN46012_c0_g1	-2,03	Os02g0697700 protein
DN45164_c0_g1	-2,03	AN1-like transcription factor
DN45800_c0_g1	-2,03	DIV1B protein
DN46898_c0_g3	-2,03	Hydrolase, NUDIX family
DN16707_c0_g1	-2,03	Neoxanthin synthase
DN45783_c0_g2	-2,03	TRANSPARENT TESTA 12 protein, putative
DN36995_c0_g1	-2,04	Transcription factor (Fragment)
DN47745_c0_g5	-2,04	Glutathione transferase
DN40576_c1_g2	-2,04	Avr9/Cf-9 induced kinase 1
DN29483_c0_g1	-2,04	Not defined
DN48316_c0_g2	-2,05	Not defined
DN41488_c0_g1	-2,05	Not defined
DN51480_c0_g2	-2,05	Zinc finger family protein
DN48507_c1_g1	-2,05	Not defined
DN34173_c0_g1	-2,05	Not defined
DN44193_c4_g3	-2,05	Not defined
DN41895_c0_g1	-2,05	Not defined
DN52799_c0_g1	-2,06	Isoamylase isoform 2
DN34051_c0_g1	-2,07	Leucine-rich repeat receptor protein kinase EXS, putative
DN41108_c0_g1	-2,07	Pirin family protein
DN41764_c1_g2	-2,07	Thioredoxin peroxidase 1
DN38183_c0_g1	-2,08	Not defined
DN45624_c0_g1	-2,08	Leucoanthocyanidin dioxygenase, putative
DN49737_c1_g2	-2,08	Not defined
DN43858_c0_g1	-2,08	Not defined
DN45528_c2_g1	-2,08	Not defined
DN27016_c0_g1	-2,08	Os08g0446400 protein (Fragment)
DN32807_c0_g1	-2,09	Not defined
DN50242_c1_g1	-2,09	Spotted leaf protein, putative
DN42435_c0_g2	-2,09	Carotenoid cleavage dioxygenase 7
DN52019_c1_g1	-2,10	Putative translation initiation factor eIF-1A-like
DN44970_c0_g1	-2,10	Putative pollen specific LIM domain-containing protein

DN36674_c0_g1	-2,10	Hypothetical protein
DN44598_c3_g2	-2,10	Os03g0254900 protein
DN52343_c1_g2	-2,10	Not defined
DN44304_c0_g1	-2,11	Salutaridinol 7-O-acetyltransferase, putative
DN44027_c0_g1	-2,11	RING finger protein
DN32956_c0_g1	-2,11	Not defined
DN42580_c0_g1	-2,12	AT5G37740 protein
DN44488_c1_g1	-2,12	AT4G21215 protein
DN44955_c1_g1	-2,12	Anthocyanin O-methyltransferase
DN32120_c0_g1	-2,13	Not defined
DN46658_c2_g2	-2,13	Alanine glyoxylate aminotransferase-like protein
DN48211_c1_g1	-2,14	Truncated Nod-factor receptor 5A
DN47099_c1_g1	-2,14	Os07g0484800 protein
DN44543_c0_g1	-2,14	Calcium ion binding protein, putative
DN51083_c1_g1	-2,14	Os02g0527200 protein
DN50805_c0_g2	-2,14	Fiber protein Fb2
DN35182_c1_g1	-2,14	9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase 3 protein family isoform 2
DN29574_c0_g1	-2,14	Not defined
DN47294_c0_g1	-2,14	Os01g0639600 protein
DN35511_c0_g1	-2,15	Glucosyltransferase
DN51308_c1_g1	-2,15	Probable receptor-like protein kinase At5g24010
DN47022_c0_g1	-2,15	1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase 1 (Precursor)
DN39716_c0_g1	-2,15	Amino acid binding protein, putative
DN46293_c0_g2	-2,15	Mas-binding factor MBF3 (Fragment)
DN44072_c2_g1	-2,15	DnaJ homolog subfamily C member
DN40897_c0_g1	-2,15	Os02g0689500 protein
DN38393_c0_g1	-2,16	Not defined
DN41530_c0_g1	-2,16	CDNA clone:J013098A10, full insert sequence
DN52288_c0_g3	-2,16	Not defined
DN49269_c0_g2	-2,16	Not defined
DN44355_c0_g5	-2,16	Os04g0337700 protein
DN47387_c0_g3	-2,16	Os04g0169500 protein
DN51745_c0_g1	-2,16	Not defined
DN51971_c0_g1	-2,17	Not defined

DN41679_c0_g1	-2,17	Stress enhanced protein 2
DN51126_c0_g1	-2,17	Putative copalyl diphosphate synthase
DN48108_c0_g2	-2,17	HSP transcription factor
DN43424_c0_g1	-2,18	Galacturonic acid reductase
DN46878_c2_g1	-2,18	Racemase and epimerase, acting on amino acids and derivatives, putative
DN44073_c0_g1	-2,18	Iaa-amino acid hydrolase 11
DN45145_c0_g3	-2,19	MEtRS
DN52239_c0_g1	-2,19	Ubiquitin conjugating enzyme, putative
DN48038_c0_g1	-2,19	YTH domain family protein
DN50483_c2_g2	-2,19	Pleiotropic drug resistance protein
DN39019_c0_g1	-2,20	Not defined
DN45296_c1_g1	-2,21	Not defined
DN37457_c0_g1	-2,21	Not defined
DN46869_c1_g1	-2,21	Transcription factor
DN51707_c0_g2	-2,22	Os11g0445300 protein
DN43022_c0_g1	-2,22	Aberrant large forked product, putative
DN49908_c0_g1	-2,22	Transcription factor UNE12
DN42856_c0_g1	-2,22	Disease resistance response protein, putative
DN40802_c0_g3	-2,23	Metal ion binding protein, putative
DN48291_c0_g1	-2,24	Inositol transporter 4
DN40371_c1_g1	-2,24	Synovial sarcoma associated ss18 protein, putative
DN45794_c2_g3	-2,24	Plasma intrinsic protein 2,2
DN50680_c0_g2	-2,24	Not defined
DN52911_c4_g4	-2,24	EFR (Fragment)
DN43697_c0_g1	-2,24	Not defined
DN42489_c0_g1	-2,24	BURP domain-containing protein
DN38952_c0_g1	-2,25	Domain found in Dishevelled, Egl-10, and Pleckstrin family protein, expressed
DN45769_c0_g1	-2,25	Speckle-type POZ protein
DN45568_c1_g1	-2,25	Pseudo response regulator
DN41740_c0_g1	-2,25	Ribosome biogenesis protein BMS1 homolog
DN48889_c1_g1	-2,26	E3 ubiquitin-protein ligase RMA1H1
DN46219_c0_g2	-2,26	GRAS family transcription factor
DN50629_c1_g1	-2,27	Not defined

DN50372_c0_g1	-2,27	Importin subunit alpha
DN52284_c4_g1	-2,28	Proline transporter (Fragment)
DN33640_c0_g1	-2,28	Not defined
DN51718_c0_g1	-2,28	NN mitogen-activated protein kinase
DN41094_c0_g1	-2,28	Os01g0300000 protein
DN42012_c0_g1	-2,28	SCL domain class transcription factor
DN39674_c1_g1	-2,29	Putative spermine synthase
DN40532_c0_g1	-2,29	Flavonoid 3-O-glucosyltransferase
DN37134_c0_g1	-2,29	Not defined
DN52415_c1_g1	-2,30	MYB transcription factor
DN22789_c0_g1	-2,30	Not defined
DN51189_c0_g1	-2,30	Not defined
DN49748_c0_g1	-2,30	BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 1, putative
DN52861_c0_g1	-2,30	Digalactosyldiacylglycerol synthase (Fragment)
DN51614_c1_g3	-2,30	Hexose transporter pGIT
DN36320_c0_g1	-2,31	Protochlorophyllide reductase, chloroplastic
DN31292_c0_g1	-2,31	Not defined
DN40739_c0_g1	-2,32	Metal ion binding protein, putative
DN40423_c0_g1	-2,32	Os08g0425800 protein
DN31582_c0_g1	-2,33	Not defined
DN47797_c4_g3	-2,34	Amino acid transporter a (Fragment)
DN40192_c0_g3	-2,35	Not defined
DN48672_c0_g6	-2,35	Not defined
DN52415_c0_g1	-2,36	MYB transcription factor
DN49044_c0_g1	-2,36	Not defined
DN45145_c0_g4	-2,36	Not defined
DN25013_c0_g1	-2,36	Not defined
DN26209_c0_g1	-2,37	Os01g0967200 protein
DN34796_c0_g1	-2,37	Not defined
DN38870_c0_g1	-2,37	Early flowering 4, putative, expressed
DN50057_c0_g1	-2,37	Not defined
DN39727_c0_g1	-2,38	Not defined
DN45533_c1_g3	-2,38	Os08g0107100 protein
DN37014_c0_g1	-2,38	Not defined

DN40233_c0_g1	-2,39	AP2/ERF domain-containing transcription factor
DN40283_c0_g1	-2,39	Ccaat-binding transcription factor subunit A, putative
DN24608_c0_g1	-2,40	Not defined
DN49269_c0_g1	-2,41	Not defined
DN37940_c0_g1	-2,41	Not defined
DN49957_c0_g1	-2,41	Not defined
DN50104_c0_g1	-2,42	Putative general amino acid permease (Fragment)
DN43381_c0_g1	-2,42	Biotin carboxyl carrier protein (BCCP) domain-containing protein
DN10671_c0_g1	-2,42	Not defined
DN48473_c0_g1	-2,42	Contains similarity to reverse transcriptase , related
DN49404_c0_g3	-2,42	Putative avr9/cf-9 induced kinase 1 protein (Fragment)
DN50810_c0_g1	-2,42	Not defined
DN41252_c0_g1	-2,42	Probable protein phosphatase 2C 61
DN45505_c0_g1	-2,43	Conserved transmembrane protein-like
DN37859_c0_g1	-2,43	Adenylyl-sulfate kinase 1, chloroplastic
DN36268_c0_g1	-2,43	Jasmonate O-methyltransferase, putative
DN564_c0_g2	-2,44	Not defined
DN43915_c0_g1	-2,44	Not defined
DN46973_c0_g2	-2,44	Not defined
DN82421_c0_g1	-2,44	Not defined
DN39558_c0_g1	-2,45	Wall-associated receptor kinase
DN52383_c0_g1	-2,45	GRAS family protein (Fragment)
DN44295_c0_g1	-2,46	Not defined
DN32260_c0_g2	-2,46	Os01g0875000 protein
DN48145_c0_g1	-2,47	Putative subtilisin-like serine proteinase
DN41024_c0_g1	-2,47	Gibberellin 20 oxidase, putative
DN40704_c0_g1	-2,47	Not defined
DN49606_c0_g1	-2,48	Glycosyltransferase UGT4
DN37269_c0_g2	-2,48	Homeodomain leucine-zipper 1
DN49159_c0_g2	-2,48	BTB/POZ domain-containing protein NPY2
DN49732_c0_g1	-2,49	Probable methyltransferase PMT27
DN50477_c0_g1	-2,50	Cytokinin dehydrogenase
DN50960_c0_g1	-2,51	Not defined
DN36588_c0_g1	-2,51	Not defined

DN33767_c0_g1	-2,51	Cytochrome P450
DN45076_c0_g1	-2,52	RNA polymerase sigma factor rpoD1, putative
DN45558_c0_g1	-2,53	Class III peroxidase
DN36026_c1_g1	-2,53	Homeobox-leucine zipper protein HOX3
DN51952_c0_g1	-2,53	Glucose-1-phosphate adenylyltransferase large subunit 1 (Fragment)
DN8379_c0_g2	-2,55	Not defined
DN31210_c0_g1	-2,55	Not defined
DN32694_c0_g1	-2,56	Not defined
DN45585_c0_g1	-2,56	Not defined
DN35187_c2_g1	-2,56	Not defined
DN28146_c0_g1	-2,57	Not defined
DN48249_c3_g1	-2,57	Pleiotropic drug resistance protein
DN31842_c0_g1	-2,58	Not defined
DN29454_c0_g1	-2,58	Nectarin 5 (Fragment)
DN42562_c0_g3	-2,58	BURP domain-containing protein
DN38436_c1_g1	-2,58	Os05g0311500 protein
DN52700_c0_g1	-2,59	Putative receptor-like protein kinase INRPK1
DN40535_c0_g1	-2,59	Coniferyl alcohol acyltransferase
DN48214_c1_g1	-2,59	Putative potassium transporter
DN36188_c0_g1	-2,60	Hypothetical protein
DN29901_c0_g1	-2,60	Myb-like transcription factor
DN35287_c0_g1	-2,61	Putative HGA1
DN48624_c0_g1	-2,61	Hypersensitivity related-like protein, Nicotiana tabacum, X95343
DN33429_c0_g1	-2,61	Not defined
DN51219_c1_g1	-2,61	ADP,ATP carrier protein 2, mitochondrial, putative, expressed
DN49302_c0_g1	-2,61	TGF-beta receptor, type I/II extracellular region
DN43310_c0_g1	-2,61	Avr9/Cf-9 rapidly elicited protein 276
DN32754_c1_g4	-2,63	Dehydration-responsive element-binding protein DREB2
DN39417_c0_g1	-2,63	RING finger protein
DN38064_c0_g1	-2,64	Not defined
DN41994_c0_g1	-2,65	Gibberellin 3-beta-dioxygenase
DN52162_c0_g1	-2,65	Not defined
DN51584_c0_g1	-2,65	Starch phosphorylase
DN42040_c0_g1	-2,65	WRKY transcription factor, putative

DN41676_c1_g1	-2,66	Heat shock factor protein, putative
DN39162_c0_g1	-2,68	Homeobox leucine zipper protein
DN52666_c0_g1	-2,68	MuDRA transposase-like
DN23781_c0_g1	-2,69	Not defined
DN33194_c0_g1	-2,70	Not defined
DN52569_c1_g3	-2,70	Not defined
DN35382_c0_g1	-2,70	Not defined
DN45205_c0_g2	-2,70	WRKY transcription factor 2
DN27752_c0_g1	-2,71	Not defined
DN46529_c0_g1	-2,71	Not defined
DN50409_c1_g2	-2,71	Predicted small molecule transporter
DN44715_c0_g1	-2,72	Clathrin light chain 3
DN50853_c1_g4	-2,72	Not defined
DN43386_c0_g1	-2,73	Not defined
DN44302_c0_g1	-2,73	Ferric reduction oxidase 8, mitochondrial
DN38597_c0_g1	-2,73	Adenine nucleotide translocase
DN41853_c0_g1	-2,73	Not defined
DN46487_c0_g2	-2,73	Copper ion binding protein
DN38948_c0_g1	-2,74	Not defined
DN31780_c0_g1	-2,74	Not defined
DN19521_c0_g1	-2,74	Not defined
DN49699_c1_g1	-2,75	Not defined
DN48662_c0_g1	-2,75	Not defined
DN51116_c1_g2	-2,75	Amino acid permease 3
DN39236_c0_g1	-2,77	Not defined
DN36079_c0_g1	-2,77	Not defined
DN38368_c0_g1	-2,78	Amino acid permease family-like protein (Fragment)
DN52850_c3_g3	-2,79	Not defined
DN43396_c0_g13	-2,79	Not defined
DN44351_c0_g1	-2,80	Not defined
DN43235_c0_g1	-2,80	Flavonol 4'-sulfotransferase, putative
DN29474_c0_g1	-2,80	Not defined
DN45935_c3_g2	-2,80	Not defined
DN43373_c0_g2	-2,81	Phosphoenolpyruvate carboxykinase (ATP)



DN46115_c0_g1	-2,82	Probable purine permease 9
DN51946_c1_g4	-2,82	Not defined
DN41939_c1_g1	-2,83	Not defined
DN43010_c0_g1	-2,83	Not defined
DN24906_c0_g1	-2,84	Not defined
DN37808_c0_g1	-2,84	Os01g0131300 protein
DN36575_c0_g1	-2,84	Zinc finger protein, putative
DN36427_c0_g1	-2,85	Reticuline oxidase, putative
DN33782_c0_g1	-2,86	Proton-dependent oligopeptide transport family protein
DN35270_c0_g1	-2,86	Not defined
DN45114_c1_g1	-2,86	Peptide transporter PTR3-A
DN37281_c0_g1	-2,87	Phosphoglycerate mutase
DN52928_c0_g1	-2,88	Cyclin-dependent protein kinase regulator Pho80
DN49528_c0_g1	-2,88	Putative HGA1
DN41128_c0_g1	-2,88	Not defined
DN39157_c1_g1	-2,89	Glucose-1-phosphate adenylyltransferase small subunit, chloroplastic/amyloplastic
DN48606_c0_g2	-2,90	Not defined
DN38888_c0_g1	-2,90	PAN domain-containing protein At5g03700
DN41102_c0_g1	-2,90	Not defined
DN43396_c0_g9	-2,91	Not defined
DN40809_c0_g1	-2,91	Not defined
DN27729_c0_g1	-2,91	Not defined
DN39887_c0_g1	-2,92	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 18
DN24608_c0_g2	-2,92	Not defined
DN24269_c1_g1	-2,93	Not defined
DN37188_c0_g1	-2,93	Not defined
DN43346_c4_g1	-2,94	STP
DN48324_c0_g5	-2,96	Not defined
DN43436_c0_g1	-2,96	Not defined
DN47431_c0_g2	-2,96	Chloride channel Stlc1
DN45969_c0_g2	-2,97	Not defined
DN31344_c0_g1	-2,97	Not defined
DN49977_c0_g3	-2,97	Not defined
DN39482_c0_g1	-2,98	Not defined

DN45081_c0_g1	-2,99	CBL-interacting protein kinase 20
DN39193_c0_g1	-2,99	Protein BPS1
DN50534_c2_g2	-3,00	Phosphorylase
DN43396_c0_g16	-3,00	Not defined
DN50464_c0_g1	-3,00	Glutamate receptor
DN33937_c0_g1	-3,01	Not defined
DN51988_c0_g1	-3,02	Sulfate/bicarbonate/oxalate exchanger and transporter sat-1
DN51219_c1_g2	-3,03	Not defined
DN38900_c0_g1	-3,03	Not defined
DN39421_c0_g1	-3,05	Not defined
DN46364_c1_g1	-3,06	Not defined
DN49995_c1_g1	-3,06	Peptide transporter PTR1
DN38964_c0_g1	-3,07	Calmodulin binding protein, putative
DN46967_c1_g1	-3,07	Not defined
DN44585_c0_g2	-3,09	Phosphatidylcholine transfer protein, putative
DN41408_c0_g1	-3,09	Not defined
DN42098_c0_g4	-3,09	Not defined
DN45003_c2_g1	-3,10	Not defined
DN39135_c0_g1	-3,10	Not defined
DN52406_c0_g3	-3,11	Somatic embryogenesis receptor kinase
DN43023_c0_g2	-3,11	WRKY transcription factor 29-2 (Fragment)
DN43003_c1_g2	-3,13	Cysteine-rich receptor-like protein kinase 29
DN36845_c0_g1	-3,13	Hypothetical protein
DN39338_c0_g1	-3,13	Peptide transporter PTR1
DN47431_c0_g1	-3,14	Not defined
DN41129_c0_g1	-3,15	Laccase
DN42319_c2_g2	-3,16	Nodulin 26-like intrinsic protein
DN37251_c0_g2	-3,16	Metalloendoproteinase 1, putative
DN34138_c0_g1	-3,16	Glycosyltransferase family 61 protein
DN48606_c0_g1	-3,17	Not defined
DN49520_c2_g1	-3,17	Transcription factor bHLH123
DN44106_c0_g1	-3,18	Acc synthase, putative
DN43809_c0_g2	-3,18	Not defined
DN45479_c3_g1	-3,18	Not defined

DN52417_c2_g2	-3,18	Cytochrome P450 monooxygenase (Fragment)
DN52735_c0_g1	-3,18	Putative CLAVATA1 receptor kinase
DN36722_c1_g2	-3,18	Not defined
DN51116_c0_g1	-3,18	Amino acid permease (Fragment)
DN44629_c0_g1	-3,19	Glycosyl hydrolase family 3 N terminal domain containing protein, expressed
DN47882_c1_g3	-3,19	Glucose-6-phosphate/phosphate translocator 2
DN51503_c0_g1	-3,21	Cationic amino acid transporter
DN51412_c6_g3	-3,21	Not defined
DN39184_c0_g1	-3,22	Nucleic acid binding protein, putative
DN37096_c0_g1	-3,22	Avr9/Cf-9 rapidly elicited protein
DN39932_c0_g1	-3,23	Putative zinc finger protein
DN48550_c1_g1	-3,24	MFS transporter
DN49867_c0_g1	-3,27	Nramp transporter
DN35862_c1_g2	-3,27	Not defined
DN37368_c0_g2	-3,29	Kinase interacting family protein
DN36722_c1_g1	-3,29	Not defined
DN42784_c0_g1	-3,29	Not defined
DN29883_c0_g1	-3,30	Not defined
DN38938_c0_g1	-3,31	Adenylate dimethylallyltransferase
DN49977_c0_g1	-3,31	Phosphatase 2C family protein
DN46589_c0_g1	-3,31	Not defined
DN45145_c0_g5	-3,31	Not defined
DN73285_c0_g1	-3,33	Cysteine proteinase
DN50249_c2_g3	-3,34	Peptide transporter PTR3-B
DN43461_c0_g3	-3,34	Not defined
DN35283_c0_g1	-3,34	Glutaredoxin
DN47250_c1_g1	-3,36	Nodulin MtN3 family protein
DN36627_c0_g1	-3,37	Not defined
DN36916_c0_g1	-3,37	Not defined
DN29412_c0_g1	-3,38	Thiazole biosynthetic enzyme (Fragment)
DN51756_c0_g1	-3,39	Ferric reductase
DN47789_c1_g1	-3,40	Os06g0652100 protein
DN52911_c4_g3	-3,40	Not defined
DN41252_c0_g2	-3,40	Not defined

DN39822_c0_g1	-3,40	Not defined
DN38256_c0_g1	-3,41	Nodulin family protein
DN50806_c0_g2	-3,41	Peptide transporter
DN37093_c0_g1	-3,42	Glycerolipase A1
DN33281_c1_g2	-3,43	SRK protein (Fragment)
DN52592_c0_g1	-3,43	Di-trans,poly-cis-decaprenylcistransferase
DN38189_c0_g1	-3,46	Not defined
DN35523_c0_g2	-3,46	Os11g0570000 protein
DN52162_c1_g2	-3,47	Not defined
DN31087_c0_g1	-3,49	Putative chloroplast thiazole biosynthetic protein
DN41208_c2_g1	-3,49	Os05g0207400 protein
DN34353_c0_g1	-3,49	CCT
DN50768_c2_g2	-3,50	Squalene monooxygenase 2
DN43851_c0_g1	-3,51	Not defined
DN47237_c0_g1	-3,53	Mannan endo-1,4-beta-mannosidase
DN49251_c1_g3	-3,53	Os01g0724700 protein
DN52911_c1_g1	-3,54	LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase EFR
DN42087_c0_g1	-3,55	Not defined
DN35361_c0_g1	-3,55	Not defined
DN40587_c0_g2	-3,56	Probable protein phosphatase 2C 23
DN32931_c0_g1	-3,56	Not defined
DN51773_c2_g4	-3,57	Not defined
DN47200_c0_g1	-3,60	BTB and TAZ domain protein
DN42675_c0_g2	-3,60	Os12g0498650 protein
DN20216_c0_g1	-3,62	Not defined
DN43396_c0_g5	-3,62	Not defined
DN46381_c0_g1	-3,62	Putative MATE transporter
DN51848_c1_g5	-3,63	Not defined
DN50809_c2_g2	-3,63	Os02g0812700 protein
DN51492_c0_g1	-3,64	Nodulin family protein
DN39471_c0_g1	-3,67	Gibberellin 20-oxidase
DN51859_c1_g1	-3,69	Pyridoxamine 5'-phosphate oxidase family protein
DN52168_c0_g1	-3,71	Os06g0140200 protein (Fragment)
DN50143_c0_g1	-3,72	Secreted glycoprotein 3

DN52343_c2_g2	-3,73	Hypothetical protein
DN46956_c0_g2	-3,73	Putative D27 family protein
DN8379_c0_g1	-3,75	Not defined
DN46993_c0_g2	-3,75	Putative dioscorin class A
DN46544_c1_g3	-3,76	Not defined
DN39704_c0_g1	-3,76	Sulfate transporter
DN48512_c0_g2	-3,76	Metal-nicotianamine transporter YSL1
DN42792_c0_g1	-3,76	Exostosin family protein
DN44232_c1_g1	-3,78	Putative proton-dependent oligopeptide or low-affinity nitrate transporter (Fragment)
DN41571_c0_g1	-3,80	Verticillium wilt resistance-like protein
DN47092_c0_g2	-3,80	Not defined
DN52185_c0_g1	-3,85	Protein kinase; Type I EGF
DN51329_c0_g4	-3,86	Putative RF3 protein
DN48978_c1_g2	-3,87	Not defined
DN39013_c0_g1	-3,88	Not defined
DN50249_c0_g1	-3,88	Not defined
DN51934_c0_g1	-3,89	Not defined
DN43231_c0_g1	-3,89	Os08g0459300 protein
DN42305_c0_g1	-3,91	Glucosyltransferase
DN52607_c1_g1	-3,91	Os08g0203300 protein (Fragment)
DN31609_c0_g1	-3,91	Not defined
DN43264_c5_g3	-3,92	Not defined
DN44849_c0_g1	-3,93	Not defined
DN49606_c0_g2	-3,94	Glycosyltransferase UGT4
DN29834_c0_g1	-3,94	Not defined
DN57088_c0_g1	-3,97	Not defined
DN36216_c0_g1	-3,99	Not defined
DN52430_c0_g1	-4,03	Hypothetical protein
DN47163_c0_g1	-4,04	BURP domain-containing protein
DN31697_c0_g1	-4,07	Not defined
DN36545_c0_g1	-4,07	Plastid RNA-binding protein 1
DN34854_c0_g1	-4,07	Not defined
DN36363_c0_g1	-4,08	Class II chitinase

DN46544_c1_g2	-4,13	WRKY transcription factor 22
DN43396_c0_g18	-4,16	Not defined
DN27842_c0_g2	-4,17	Not defined
DN29379_c0_g1	-4,19	Not defined
DN47388_c0_g3	-4,20	ABI3L domain class transcription factor
DN41898_c0_g1	-4,27	Hypothetical protein
DN50547_c0_g1	-4,29	Not defined
DN43774_c0_g3	-4,32	Not defined
DN44339_c0_g1	-4,34	Not defined
DN42536_c0_g1	-4,34	CASP-like protein F16
DN37431_c0_g1	-4,36	Spotted leaf protein, putative
DN44739_c0_g1	-4,36	Not defined
DN24732_c0_g1	-4,36	Not defined
DN45760_c0_g2	-4,40	Os08g0429250 protein
DN41942_c0_g2	-4,41	Wound induced protein (Fragment)
DN45127_c0_g1	-4,41	Subtilisin-like serine protease
DN37043_c0_g1	-4,43	Not defined
DN34301_c0_g1	-4,44	Not defined
DN38109_c0_g1	-4,45	Not defined
DN40949_c0_g1	-4,55	Auxin-induced protein 5NG4
DN44342_c1_g1	-4,56	Transcription factor bHLH
DN42352_c0_g3	-4,57	Zinc finger protein CONSTANS-like protein
DN51963_c0_g8	-4,59	Not defined
DN40360_c0_g1	-4,59	Anthocyanin 5-O-glucoside-4"-O-malonyltransferase
DN47882_c1_g1	-4,60	Not defined
DN49660_c3_g1	-4,63	Not defined
DN41692_c0_g1	-4,64	Tetratricopeptide repeat domain-containing protein
DN52711_c5_g3	-4,66	Not defined
DN49702_c1_g3	-4,67	Multicopper oxidase
DN45950_c1_g1	-4,68	X intrinsic protein
DN52803_c2_g2	-4,73	Os04g0616600 protein
DN49486_c0_g1	-4,77	Not defined
DN46761_c2_g4	-4,77	EIX receptor 2
DN46874_c0_g1	-4,79	Not defined

DN33690_c0_g1	-4,82	Not defined
DN40925_c0_g1	-4,83	Os07g0123800 protein
DN51963_c0_g5	-4,90	Not defined
DN39409_c0_g1	-5,00	Not defined
DN35600_c0_g1	-5,03	Not defined
DN23188_c0_g1	-5,05	Not defined
DN48935_c1_g1	-5,06	Desacetoxyvindoline 4-hydroxylase, putative
DN38419_c1_g2	-5,12	Not defined
DN42802_c0_g1	-5,12	Isoaspartyl aminopeptidase (Fragment)
DN34095_c0_g1	-5,13	Acidic endochitinase (Fragment)
DN44323_c0_g2	-5,14	Glycosyltransferase UGT90A7
DN38695_c0_g1	-5,16	Os05g0318600 protein (Fragment)
DN46857_c0_g2	-5,19	Os08g0203100 protein (Fragment)
DN32951_c0_g1	-5,20	GH3 protein (Fragment)
DN46162_c4_g5	-5,20	Putative receptor kinase Aly14 (Fragment)
DN44342_c1_g2	-5,24	Not defined
DN45760_c0_g1	-5,31	Not defined
DN39736_c1_g1	-5,35	Not defined
DN47126_c0_g1	-5,39	Not defined
DN20691_c0_g1	-5,71	Not defined
DN52098_c4_g7	-5,73	Not defined
DN52733_c0_g2	-5,82	Not defined
DN39469_c0_g1	-5,85	Myosin heavy chain-like protein
DN29467_c0_g1	-5,87	Not defined
DN36021_c0_g1	-5,93	Auxin and ethylene responsive GH3-like protein
DN45216_c0_g1	-5,94	Cysteine-rich repeat secretory protein
DN42288_c0_g1	-5,99	Probable glycosyltransferase At5g25310
DN45790_c0_g1	-6,04	1,3-beta-D-glucan glucanohydrolase (Glucan endo-1,3-beta-glucosidase a) (Precursor)
DN33906_c0_g1	-6,21	Not defined
DN44892_c0_g1	-6,23	Geranylgeranyl diphosphate synthase 2
DN51323_c2_g1	-6,39	Not defined
DN38287_c0_g1	-6,50	NAC domain protein, IPR003441
DN38419_c1_g1	-6,51	Not defined

DN50249_c2_g1	-6,58	Peptide transporter PTR3-B
DN37120_c0_g1	-6,66	Not defined
DN51963_c0_g3	-6,69	Not defined
DN43466_c0_g1	-6,71	Not defined
DN39385_c0_g1	-6,96	Not defined
DN39094_c0_g1	-7,03	Thiamine thiazole synthase 2, chloroplastic
DN40173_c0_g1	-7,05	Myb-like transcription factor
DN26092_c0_g1	-7,39	Not defined
DN38419_c1_g3	-7,47	Not defined
DN31858_c0_g1	-7,52	Not defined
DN52711_c5_g2	-7,77	Not defined
DN44938_c0_g1	-7,91	Heat shock protein 26 (Type I)
DN42211_c0_g1	-7,92	Hypothetical protein
DN50372_c0_g3	-8,18	Importin subunit alpha
DN34374_c0_g1	-9,03	Not defined
DN29549_c0_g1	-9,17	Not defined
DN50477_c1_g2	-9,26	Cell-wall invertase
DN33866_c0_g1	-10,07	Cytochrome P450
DN41974_c0_g2	-12,44	Hypothetical leucine rich repeat protein (Fragment)
DN32669_c0_g1	-15,18	Not defined
DN38464_c0_g1	-15,80	Not defined
DN51963_c0_g4	-16,01	Not defined
DN52711_c5_g1	-18,06	Not defined
DN37946_c0_g1	-22,10	Not defined
DN36997_c0_g1	-28,63	Not defined
DN41974_c0_g5	-42,09	Hypothetical leucine rich repeat protein

**Tabela 22:** Genes diferencialmente expressos no clone tolerante aos 3 dias após a infecção. Valores do fold-change estão coloridos em tons de vermelho para os reprimidos e em verde para os induzidos na infecção.

CloneT – 3DPI	fold	Annotation
DN44472_c0_g1	7,39	Tropinone reductase-like 1



DN42033_c1_g1	6,06	High affinity inorganic phosphate transporter
DN40955_c0_g1	4,75	Not defined
DN32773_c0_g1	4,59	Not defined
DN50238_c4_g2	2,72	Probable isoaspartyl peptidase/L-asparaginase 2
DN46192_c0_g3	2,71	Not defined
DN38573_c0_g1	2,66	Anion exchanger family protein (Fragment)
DN45629_c1_g2	2,25	Not defined
DN40055_c3_g4	2,24	Not defined
DN44074_c1_g5	2,24	Not defined
DN40088_c2_g4	2,22	Not defined
DN40088_c2_g3	2,22	Not defined
DN45622_c0_g7	2,18	Not defined
DN30828_c0_g1	2,17	Not defined
DN48890_c1_g2	2,17	Multicopper oxidase
DN45277_c4_g1	2,17	Not defined
DN52941_c13_g5	2,16	Not defined
DN30680_c0_g2	2,15	Not defined
DN52934_c20_g6	2,15	Not defined
DN45629_c1_g1	2,14	Not defined
DN46033_c3_g2	2,12	Not defined
DN40055_c2_g3	2,11	Not defined
DN38161_c0_g2	2,06	Not defined
DN49038_c0_g1	2,05	Metal ion binding protein
DN37663_c0_g2	2,04	Not defined
DN44599_c0_g2	-2,00	CASP-like protein Ni6
DN49545_c1_g2	-2,01	Sucrose synthase (Fragment)
DN37298_c1_g2	-2,03	Glycosyltransferase, group 2 family protein (Fragment)
DN48507_c1_g1	-2,05	Not defined
DN50536_c0_g3	-2,05	Not defined
DN47643_c0_g1	-2,08	COL domain class transcription factor
DN34445_c0_g1	-2,09	Inactive beta-amylase 9
DN43854_c2_g3	-2,10	Os07g0684000 protein
DN46011_c0_g1	-2,13	Solute carrier family 13 , member 2 (Fragment)
DN39467_c0_g1	-2,14	CDNA clone:J033105C09, full insert sequence

DN51155_c1_g2	-2,18	Alkaline alpha galactosidase 3
DN44830_c0_g1	-2,18	Not defined
DN43854_c2_g5	-2,19	Not defined
DN48533_c0_g2	-2,19	Not defined
DN45258_c1_g5	-2,22	Alcohol dehydrogenase 1
DN45463_c0_g4	-2,22	Hypothetical protein
DN46566_c0_g2	-2,23	Haloacid dehalogenase-like hydrolase family protein, putative, expressed
DN46763_c0_g2	-2,25	Not defined
DN35341_c0_g1	-2,28	Hypothetical protein
DN38686_c0_g1	-2,29	Not defined
DN50297_c2_g6	-2,29	Tartrate-resistant acid phosphatase type 5, putative
DN42731_c0_g1	-2,30	Plasma membrane-associated AAA-ATPase
DN36022_c0_g1	-2,34	Nodule-enhanced protein phosphatase type 2C
DN48080_c0_g1	-2,35	Not defined
DN50541_c0_g1	-2,40	Not defined
DN50976_c0_g1	-2,43	Not defined
DN41891_c0_g1	-2,45	Calcineurin B-like protein-interacting protein kinase
DN47594_c1_g2	-2,49	Beta-carotene hydroxylase 1
DN46777_c0_g1	-2,50	Not defined
DN42281_c0_g2	-2,50	Os05g0577100 protein
DN42428_c0_g1	-2,51	Not defined
DN32330_c0_g1	-2,51	Calvin cycle protein CP12-3, chloroplastic
DN2873_c0_g1	-2,55	Putative arginine decarboxylase (Fragment)
DN36349_c0_g1	-2,56	Ent-kaurenoic acid oxidase
DN42431_c0_g2	-2,57	Protein PPLZ12
DN51210_c0_g2	-2,60	Glycosyl hydrolase family 17 protein
DN44072_c2_g1	-2,60	DnaJ homolog subfamily C member
DN36059_c0_g1	-2,62	Hydroxycinnamoyl-CoA shikimate/quinate hydroxycinnamoyl transferase
DN48080_c1_g2	-2,62	9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase 3
DN52462_c0_g1	-2,66	AT4G19160 protein
DN40405_c0_g1	-2,68	Tuber-specific and sucrose-responsive element binding factor (Fragment)
DN42075_c0_g1	-2,68	GMP synthase

DN35460_c0_g1	-2,70	Not defined
DN51257_c1_g2	-2,70	Not defined
DN52462_c0_g2	-2,72	Not defined
DN38765_c0_g1	-2,77	Homeodomain leucine zipper protein HDZ2
DN47214_c0_g1	-2,80	Glycosyl hydrolase family 14 protein, expressed
DN39850_c0_g1	-2,87	Extracellular ligand-gated ion channel
DN46869_c0_g1	-2,87	Not defined
DN32754_c1_g4	-2,87	Dehydration-responsive element-binding protein DREB2
DN49699_c1_g1	-2,91	Not defined
DN44223_c3_g1	-2,93	Protein phosphatase 2C
DN43596_c0_g2	-3,01	Not defined
DN39160_c0_g1	-3,09	Cytokinin oxidase/dehydrogenase-like
DN41110_c0_g1	-3,10	Not defined
DN35949_c0_g1	-3,12	Not defined
DN50690_c1_g1	-3,14	Not defined
DN47088_c0_g3	-3,18	Aspartate--ammonia ligase
DN50172_c0_g1	-3,18	Os03g0796600 protein
DN47729_c0_g2	-3,25	Alpha,alpha-trehalose-phosphate synthase (UDP-forming)
DN48413_c0_g1	-3,27	Not defined
DN46084_c1_g2	-3,38	Not defined
DN42170_c2_g3	-3,38	Hypothetical protein
DN47553_c1_g3	-3,41	Putative alkaline alpha-galactosidase seed imbibition protein (Fragment)
DN44223_c2_g1	-3,49	Protein phosphatase 2C catalytic subunit (Fragment)
DN36316_c0_g1	-3,51	Not defined
DN37691_c0_g1	-3,52	Homeodomain 20 transcription factor
DN45049_c0_g1	-3,55	Not defined
DN48177_c0_g4	-3,57	Rhcadhesin receptor, putative
DN43654_c1_g1	-3,57	Not defined
DN51334_c0_g12	-3,57	Not defined
DN36540_c1_g1	-3,61	NAC domain protein NAC4
DN44606_c0_g2	-3,71	Not defined
DN32613_c0_g1	-3,73	Not defined
DN37887_c0_g1	-3,86	Not defined
DN51696_c0_g1	-3,87	Mechanosensitive ion channel protein 4

DN36651_c0_g1	-3,87	Not defined
DN52660_c2_g2	-3,96	Seed imbibition protein 1
DN48439_c1_g1	-3,98	Not defined
DN52850_c3_g3	-4,00	Not defined
DN40842_c0_g1	-4,04	Ras-related protein RABC2a
DN48890_c1_g1	-4,06	Multicopper oxidase
DN39565_c1_g1	-4,13	Zinc finger protein ZF3
DN36838_c0_g1	-4,13	Aspartate--ammonia ligase
DN37427_c0_g1	-4,17	Serine rich protein
DN45039_c0_g1	-4,19	Not defined
DN32943_c0_g1	-4,20	Not defined
DN42555_c0_g1	-4,26	Not defined
DN49568_c0_g1	-4,28	Not defined
DN49365_c0_g1	-4,30	Not defined
DN37566_c0_g1	-4,30	Heat stress transcription factor A-2c
DN40233_c0_g1	-4,36	AP2/ERF domain-containing transcription factor
DN44942_c0_g1	-4,37	Protein phosphatase 2c
DN52431_c2_g2	-4,41	Metal ion binding protein, putative
DN50916_c0_g1	-4,65	Spotted leaf protein, putative
DN46339_c0_g1	-4,66	Not defined
DN50221_c1_g5	-4,66	Not defined
DN45413_c0_g1	-4,67	Not defined
DN41972_c0_g1	-4,72	Branched-chain-amino-acid aminotransferase 2, chloroplastic
DN39423_c0_g1	-4,84	Not defined
DN23270_c0_g1	-4,87	Not defined
DN49525_c0_g1	-4,93	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta
DN8593_c0_g1	-5,07	Not defined
DN35884_c0_g1	-5,10	Not defined
DN40284_c0_g1	-5,14	Not defined
DN36937_c0_g1	-5,25	Not defined
DN35973_c0_g1	-5,28	Not defined
DN37231_c0_g2	-5,49	Protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein family protein
DN37682_c0_g2	-5,62	Os06g0300500 protein
DN51813_c0_g1	-5,66	BP8 protein

DN39423_c0_g2	-5,92	Not defined
DN49289_c2_g1	-5,96	Hypothetical protein
DN38260_c0_g1	-6,23	RING-H2 type zinc finger
DN39895_c0_g1	-6,24	Not defined
DN49728_c0_g3	-6,31	Osmotic stress-induced zinc-finger protein
DN52572_c0_g2	-6,34	Raffinose synthase
DN26712_c0_g1	-6,43	Not defined
DN52673_c0_g1	-6,51	Os03g0133300 protein (Fragment)
DN38439_c0_g1	-6,56	Not defined
DN41927_c0_g1	-6,77	Not defined
DN39140_c0_g1	-6,97	Not defined
DN48080_c1_g1	-7,10	9-cis-epoxy-carotenoid dioxygenase 1
DN45859_c1_g1	-7,30	Remorin
DN42867_c0_g1	-7,34	Not defined
DN38478_c0_g1	-7,52	Xylem sap protein 10 kDa
DN32990_c0_g1	-7,74	Not defined
DN30378_c0_g1	-7,98	Phosphatidylethanolamine binding protein, putative
DN34681_c1_g1	-8,16	Nodulin MtN21 family protein
DN45734_c0_g2	-8,81	Putative small heat shock protein
DN26749_c0_g1	-10,15	Not defined
DN42768_c0_g1	-10,59	Not defined
DN35452_c0_g1	-10,98	Ethylene-responsive transcription factor TINY
DN39118_c0_g1	-11,10	Not defined
DN39085_c0_g2	-11,50	Not defined
DN52572_c0_g1	-11,87	Raffinose synthase
DN38329_c0_g1	-11,97	Not defined
DN51049_c1_g3	-12,38	Galactinol synthase 2
DN51049_c1_g1	-13,47	Not defined
DN51334_c0_g11	-13,68	Not defined
DN37946_c0_g1	-14,04	Not defined
DN44630_c0_g1	-16,47	Mitochondrial import inner membrane translocase, subunit Tim17/22
DN26077_c0_g1	-17,72	RING-H2 type zinc finger
DN33852_c0_g1	-18,37	Ethylene-responsive element binding protein 2
DN40940_c0_g1	-20,70	Xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 2

DN47917_c0_g1	-20,98	Not defined
DN52067_c2_g2	-21,65	Not defined
DN37941_c1_g2	-21,85	Not defined
DN39410_c0_g2	-23,26	Uncharacterized plant-specific domain TIGR01615 family protein
DN39306_c0_g1	-23,70	Not defined
DN30330_c0_g2	-24,21	Stachyose synthase
DN40372_c0_g1	-27,93	Not defined
DN39624_c0_g2	-28,16	Not defined
DN37682_c0_g1	-29,25	Not defined
DN46744_c2_g1	-30,67	Protein HVA22
DN33349_c0_g1	-30,75	Late embryogenesis abundant protein
DN92111_c0_g1	-31,29	Not defined
DN52019_c0_g1	-31,49	Late embryogenesis abundant protein (Fragment)
DN34961_c0_g1	-33,09	18,8 kDa class II heat shock protein
DN45528_c3_g1	-40,03	Stachyose synthase (Fragment)
DN31392_c0_g2	-64,36	Plant-specific domain TIGR01615 family protein
DN27794_c0_g2	-89,36	Not defined
DN33926_c0_g1	-138,10	Fiber expressed protein

**Tabela 23:** Genes diferencialmente expressos no clone tolerante aos 7 dias após a infecção. Valores do fold-change estão coloridos em tons de vermelho para os reprimidos e em verde para os induzidos na infecção.

CloneT – 7DP1	fold	Annotation
DN50221_c1_g7	20,48	Not defined
DN45258_c1_g5	2,24	Alcohol dehydrogenase 1
DN43589_c0_g1	-2,91	Germin-like protein subfamily 1 member
DN41752_c0_g1	-4,35	Not defined
DN52876_c5_g3	-18,76	Not defined
DN27950_c0_g1	-22,29	Similar to chaperone/heat shock protein Hsp12
DN47015_c2_g2	-39,28	Not defined
DN52299_c0_g2	-51,23	Not defined
DN49519_c0_g2	-78,55	NAD-dependent formate dehydrogenase AciA/Fdh

DN46593_c1_g1	-86,13	Not defined
DN43266_c1_g2	-206,69	Aldehyde dehydrogenase

**Tabela 24:** Genes diferencialmente expressos no clone tolerante aos 15 dias após a infecção. Valores do fold-change estão coloridos em tons de vermelho para os reprimidos e em verde para os induzidos na infecção.

CloneT – 15DPI	fold	Annotation
DN49699_c1_g1	-3,17	Not defined
DN37572_c0_g1	-4,02	RING finger protein
DN39068_c0_g1	-4,79	Avr9/Cf-9 rapidly elicited protein 20 (Fragment)
DN33600_c0_g1	-7,26	ERF protein
DN38482_c0_g1	-7,42	Zinc finger protein PIF1
DN39893_c0_g1	-16,88	Salt responsive protein 2
DN38795_c0_g1	-18,91	Not defined
DN39893_c1_g2	-21,10	Not defined
DN27185_c0_g1	-21,90	Os05g0593000 protein

## **Capítulo 5**

**Caracterização de novos patógenos afetando o cultivo de teca no Brasil.**



## RESUMO

No Brasil, a exploração comercial de teca – *Tectona grandis* L. f. (família Lamiaceae) – vem sendo particularmente auspiciosa, pela elevada densidade, ciclo de produção mais curto, comparados aos praticados nos países de origem. A madeira da teca apresenta durabilidade, estabilidade, resistência natural ao fogo e densidade média de 0,65 g/cm<sup>3</sup>. Tais características incentivaram a demanda no mercado internacional, merecendo com isto fortes estímulos aos investimentos em reflorestamentos de teca no Brasil. Apesar das características favoráveis ao desenvolvimento da teca, verificadas na maioria das áreas cultivadas do mundo e da notória resistência da cultura a uma gama de fatores bióticos e abióticos, problemas fitossanitários capazes de comprometer a produção têm sido constatados. Esse capítulo teve como objetivo, sumarizar um conjunto de registros de novos patógenos/doenças foram detectados afetando a cultura da teca no Brasil.

**(1) Murcha de *Fusarium oxysporum*** – Em levantamento de campo realizado em 2014, um conjunto de sintomas peculiares, foram encontrados em floresta de teca. No presente estudo foi possível realizar análises morfológicas, moleculares e teste de patogenicidade. As plantas de teca apresentaram sintomas semelhantes aos observados em condições de campo em aproximadamente 60 dias após inoculação por imersão de raízes. Para confirmar a identidade dos isolados fúngicos, a nível de espécie, foram realizadas análises moleculares utilizando fator de elongação (TEF1- $\alpha$ ) e (RPB2). Análises filogenéticas das sequências do amplicon colocaram os isolados no mesmo agrupamento de isolados pertencentes ao complexo de espécies de *Fusarium oxysporum*. Para nosso conhecimento, esse é o primeiro relato de murcha vascular de teca causada por *F. oxysporum* na região Neotropical.

**(2) Manchas foliares causadas por *Paramyrothecium roridum*** – Em agosto de 2016, manchas circulares de folhas castanhas escuras (variando de 1 a 20 mm de diâmetro) com bordas bem definidas foram encontradas principalmente em mudas de áreas de produção comercial em Cáceres, Estado do Mato Grosso, Brasil. As lesões muitas vezes induziam a desfolha, além de reduzir o crescimento. Colônias de fungos jovens apresentaram micélio branco com anéis concêntricos variando de verde escuro a tons escuros com a produção de esporodóquios negros. Observações microscópicas indicaram a presença de conidióforos hialinos com phialides em forma de bastão (10 a 17  $\times$  1,5 a 3,0  $\mu$ m). Os conídios eram hialinos, cilíndricos (6 a 8  $\times$  2,0 a 2,5  $\mu$ m) com extremidades arredondadas. Os isolados foram identificados como *Paramyrothecium roridum* (Tode). O DNA genômico foi extraído de colônias de dois isolados monospóricos representativos. Os ensaios de reação em cadeia da polimerase foram realizados com o par de primers ITS1 e ITS4 capazes de amplificar um

segmento da região rDNA-ITS (White et al. 1990), que é o maior banco de dados disponível para o gênero *Paramyrothecium*. Os alinhamentos dos dois isolados de teca (números de acesso MF579530 e MF579531) exibiram 100% de identidade entre si e 99% de identidade com o isolado de referência de *P. roridum* CBS 372.50 (KU846301) relatado em plantas de *Coffea* (Lombard et al. 2016). Mudanças inoculadas com *P. roridum* apresentaram sintomas iniciais de folhas 7 dias após a inoculação, enquanto os controles permaneceram livres de sintomas. *P. roridum* foi reisolado apenas a partir das plantas sintomáticas. Este patógeno foi relatado anteriormente infectando teca em Taiwan. No entanto, este é o primeiro relatório deste fungo sobre teca no país.

**(3) Manchas foliares de *Xanthomonas*** – Lesões de folhas necróticas frequentemente circundadas por halos cloróticos foram observadas em plantas de teca (100 dias após a germinação) em minijardim clonal exibindo ~ 15% de incidência no estado de Mato Grosso (maio de 2016). Cinco isolados bacterianos (com colônias pigmentadas de amarelo com aspecto arredondado mucóide) foram obtidos pelo isolamento de 15 plantas distintas em meio de NA (28 ° C / 72h). Todos os isolados foram inoculados em quatro clones de teca (TG01 a TG04; 90 dias após a germinação). Os sintomas apareceram 11 dias após a inoculação e as colônias semelhantes foram re-isoladas das folhas sintomáticas. Dois isolados foram selecionados para confirmação etiológica. A identificação do gênero foi realizada utilizando a região 16S rRNA (primers 27F / 1492R) (MF033093 a MF033097) em EzBioCloud (Yoon et al. 2017) e reconhecida como um membro do gênero *Xanthomonas*. Dois isolados foram selecionados para confirmação etiológica. A identificação do gênero foi realizada utilizando a região 16S rRNA (primers 27F / 1492R) (MF033093 a MF033097). A identificação adicional das bactérias foi realizada por sequenciação da sequência parcial *gyrB* (emigyr-B1F / emigyrB4R) com 864 pares de bases (pb) e *rpoD* (emirpo11F / emirpo13R), também parcial, com 873 pb. A análise filogenética de ambos os genes foi realizada com inferência Bayesiana. Análise filogenética *gyrB* (MF034328 a MF034332), ambas as sequências XanTeca agrupadas com *X. fuscans* e *X. fuscans* subsp. *aurantifolii*.

## ABSTRACT

In Brazil, the commercial exploitation of teak – *Tectona grandis* L. f. (Lamiaceae family) – has been particularly auspicious because of the high density, shorter production cycle, compared to those practiced in the countries of origin. Teak wood presents durability, stability, natural fire resistance and average density of 0.65 g / cm<sup>3</sup>. These characteristics stimulated the demand in the international market as well as investments in teak reforestation in Brazil. Despite the favorable development and its remarkable resistance to a range of biotic and abiotic factors, phytosanitary problems capable of compromising production have been observed in the teak plantations in Brazil. The main objective of the present chapter was to summarize a set of records of new pathogens / diseases that were detected affecting the teak crop in Brazil.

**(1) Wilt caused by *Fusarium oxysporum*** – In field survey conducted in 2014, a set of peculiar symptoms were found in teak forest. In the present study it was possible to perform morphometric, molecular and pathogenicity tests. Teak plants showed symptoms similar to those observed in field experiments at approximately 60 days after inoculation by root immersion. To confirm the identity of the fungal isolates, at the species level, molecular analyzes were performed using elongation factor (TEF1- $\alpha$ ) and (RPB2). Phylogenetic analyzes of the amplicon sequences placed the isolates in the same cluster of isolates belonging to the *Fusarium oxysporum* species complex. To our knowledge, this is the first report of teak vascular wilt caused by *F. oxysporum* in the Neotropical region.

**(2) Leaf spots caused by *Paramyrothecium roridum*** – In August 2016, circular spots of dark brown leaves (ranging from 1 to 20 mm in diameter) with well defined borders were found mainly in seedlings of commercial production areas in Cáceres, State of Mato Grosso, Brazil. Lesions often induced defoliation and reduced growth. Colonies of young fungi showed white mycelium with concentric rings ranging from dark green to dark tones with the production of black sporodocles. Microscopic observations indicated the presence of hyaline conidiophores with stick-shaped phialides (10 to 17  $\times$  1.5 to 3.0  $\mu$ m). The conidia were hyaline, cylindrical (6 to 8  $\times$  2.0 to 2.5  $\mu$ m) with rounded ends. The isolates were identified as *Paramyrothecium roridum* (Tode). Genomic DNA was extracted from colonies of two representative monosporic isolates. Polymerase chain reaction assays were performed with the pair of ITS1 and ITS4 primers capable of amplifying a segment of the rDNA-ITS region, which is the largest database available for the genus *Paramyrothecium*. The alignments of the two teak isolates (accession numbers MF579530 and MF579531) exhibited 100% identity to each

other and 99% identity to the reference isolate of *P. roridum* CBS 372.50 (KU846301) reported in *Coffea* plants (Lombard et al. 2016). Seedlings inoculated with *P. roridum* had initial leaf symptoms 7 days after inoculation, while controls remained symptom free. *P. roridum* was reisolated only from the symptomatic plants. This pathogen was previously reported infecting teak in Taiwan. However, this is the first report of this fungus on teak in the country.

**(3) *Xanthomonas* leaf spot** – Lesions of necrotic leaves frequently surrounded by chlorotic halos were observed in teak plants (100 days after germination) in clonal minibardim exhibiting ~ 15% incidence in the state of Mato Grosso (May 2016). Five bacterial isolates (with yellow pigmented colonies with rounded mucoid aspect) were obtained by the isolation of 15 distinct plants in NA medium (28 ° C / 72h). All the isolates were inoculated into four teak clones (TG01 to TG04; 90 days after germination). Symptoms appeared 11 days after inoculation and similar colonies were re-isolated from symptomatic leaves. Two isolates were selected for etiological confirmation. Identification of the genus was performed using the 16S rRNA region (primers 27F / 1492R) (MF033093 to MF033097) in EzBioCloud (Yoon et al., 2017) and recognized as a member of the genus *Xanthomonas*. Two isolates were selected for etiological confirmation. Identification of the genus was performed using the 16S rRNA region (primers 27F / 1492R) (MF033093 to MF033097). Further identification of the bacteria was performed by sequencing the partial sequence *gyrB* (emigr-B1F / emigrB4R) with 864 base pairs (bp) and *rpoD* (emirpo11F / emirpo13R), also partial, with 873bp. Phylogenetic analysis of both genes was performed with Bayesian inference. Phylogenetic analysis *gyrB* (MF034328 to MF034332), both XanTeca sequences clustered with *X. fuscans* and *X. fuscans* subsp. *aurantifolii*.

NEW OR UNUSUAL DISEASE REPORTS

**Vascular wilt of teak (*Tectona grandis*) caused by *Fusarium oxysporum* in Brazil**

Rafaela C. F. BORGES<sup>1</sup>, Mônica A. MACEDO<sup>1</sup>, Cléia S. CABRAL<sup>1</sup>, Maurício ROSSATO<sup>1</sup>, Maria G. FONTES<sup>1</sup>, Maria D. M. SANTOS<sup>1</sup>, Maria A. FERREIRA<sup>2\*</sup>, Maria E. N. FONSECA<sup>3</sup>, Ailton REIS<sup>3</sup>, and Leonardo S. BOITEUX<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Plant Pathology Department, University of Brasília, Brasília–DF, Brazil

<sup>2</sup> Plant Pathology Department, University of Lavras–MG, Brazil

<sup>3</sup> National Center for Vegetable Crops Research (CNPV), Embrapa Hortaliças, Brasília–DF, Brazil

\*Corresponding author: [rafaelafal@hotmail.com](mailto:rafaelafal@hotmail.com)

**Summary.** Commercial plantations of teak (*Tectona grandis* L.f.) are affected by many economically important fungal diseases under Brazilian conditions. Teak plants exhibiting distinctive vascular wilt symptoms were observed in Mirassol do Oeste (MT), Brazil. Trunk samples of the affected trees were collected, disinfected, and plated onto potato dextrose agar. Fungal cultures obtained displayed morphological characteristics typical of the *Fusarium oxysporum* species complex. A representative *F. oxysporum* isolate was used in pathogenicity assays. Teak plants displayed symptoms similar to those observed under field conditions approx. 60 d after root-dipping inoculation. Amplicons corresponding to segments of the translation elongation factor 1- $\alpha$  (TEF-1 $\alpha$ ) and RNA polymerase II second largest subunit (RPB2) genes were obtained using as template the genomic DNA extracted from two *Fusarium* isolates obtained from teak. Phylogenetic analyses of the amplicon sequences placed the isolates into the same cluster of isolates belonging to the *F. oxysporum* species complex. To our knowledge, this is the first report of vascular wilt of teak caused by *F. oxysporum* in the Neotropical region.

**Keywords:** teak, vascular disease, molecular diagnosis.

Corresponding author: R.C.F. Borges  
E-mail: [rafaelafal@hotmail.com](mailto:rafaelafal@hotmail.com)

**Introduction**

Teak (*Tectona grandis* Lf; Lamiaceae family) is a tropical forest

species, which is native from the monsoon areas of India, Myanmar (Burma), Laos, and Thailand (Narayanan *et al.*, 2007). Teak wood has high commercial value due to its aesthetic qualities, durability, and resistance to environmental factors (Mesquita *et al.*, 2017).

Teak introduction and commercial cultivation in Brazil was initiated in the early 1970s, in the boundaries as well as within the Legal Amazon region. Since then, several economically important diseases of fungal etiology, associated with extensive yield and quality losses, have been reported in commercial plantations in this warm tropical region. These include rust caused by *Olivea tectonae* (Cabral *et al.*, 2010); vascular wilt caused by *Ceratocystis fimbriata* (Firmino *et al.*, 2012) and, more recently, trunk canker disease caused by *Lasiodiplodia theobromae* isolates (Borges *et al.*, 2015). In field surveys carried out in 2014, vascular

disease of teak, with a peculiar set of symptoms, was found in commercial forests in Mirassol do Oeste, Mato Grosso State-MT, Brazil. *Fusarium oxysporum* isolates were consistently isolated from these affected trees. In the present study, we carried out morphometrical analyses and pathogenicity assays of these isolates, aiming to characterize the causal agents associated with this vascular disease, which was previously unreported in Brazil. To confirm the identity of isolated fungi at the species level, molecular analyses were carried out using genomic information from the partial translation elongation factor 1- $\alpha$  (TEF1- $\alpha$ ) and RNA polymerase second largest subunit (RPB2) genes. These are the most phylogenetically informative genomic regions and the best represented sequence databases of *Fusarium* (O'Donnell *et al.*, 2010).

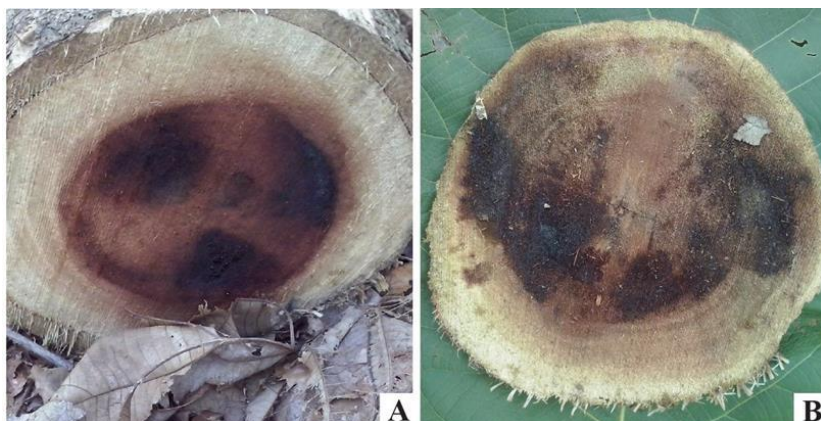
In 2014, teak trees with typical vascular wilt symptoms were observed in field inspections in Mirassol do Oeste (MT), Brazil. Trunks disks with dark heartwood and sapwood dark lesions (Figure 1) were collected and subjected to a series of disinfection steps with 70% alcohol for 1 min, followed by submersion of the plant tissues in 2% of sodium hypochlorite for 1 min and a final washing step in double distilled water for 1 min. The disinfected trunk fragments were then transferred to Petri plates containing 2% water agar, and maintained at  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  with a photoperiod 12 h during 3 d. Agar plugs (0.5 mm diam.) containing fungal structures were then transferred to Petri plates containing Saltwater Nutrient Agar (SNA), and these plates were then incubated under the same conditions. Pure fungal cultures were examined under a light microscope (Leica DM 2500) and photographed using a Leica

QWin-Plus program. The type of phialides as well as the lengths and widths of macroconidia, microconidia, and chlamydospores ( $n = 30$ ) were annotated using fungal samples from 25 d-old cultures.

To confirm the identity of the vascular wilt causal agent at the species level, a set of analyses were carried out for two representative fungal isolates ('FusTeca2' and 'FusTeca3'), using the genomic information from (TEF1- $\alpha$ ) and (RPB2) genes (O'Donnel *et al.*, 2010). Genomic DNA from fungal samples was extracted using the 2 $\times$  CTAB buffer and

organic solvents with minor modifications (Boiteux *et al.*, 1999). PCR assays were carried out using total genomic DNA with the primers EF1 and EF2 targeting the TEF-1 $\alpha$  region, and fRPB2-5f and fRPB2 targeting the RPB2 region (O'Donnel *et al.*, 2010).

The TEF-1 $\alpha$  and RPB2 amplicons were gel-purified and directly sequenced in both directions. The identities of the sequences were confirmed to correspond to the TEF-1 $\alpha$  and RPB2 regions via BLAST, and their alignments were conducted using MAFFT software (Kato *et al.*, 2013) as a plugin of Geneious R8 (Kearse *et al.*, 2012). A phylogenetic tree was constructed using the Bayesian inference method (two million chains; 25% burn-in), using concatenated sequences of partial TEF-1 $\alpha$  (420 bp alignments) and RPB2 (298 bp alignments) of two *Fusarium* isolates from teak ('FusTeca2' and 'FusTeca3') as well as 20 reference sequences of *Fusarium* isolates available at the GenBank (Table 1). *Fusarium solani* was employed as outgroup in the analyses. The analyses employed GTR model (Tavaré, 1986) with gamma-distributed variation rate across sites chosen by Mega 7.0 (Kumar *et al.*, 2016).



**Figure 1.** Cross sections of teak (*Tectona grandis*) tree trunks displaying heartwood and sapwood (xylem) darkening as well as black vascular areas (a and b).

**Table 1.**

<b>Species</b>	<b>Strain</b>	<b>RPB2</b>	<b>TEF</b>
<i>Fusarium anthophilum</i>	NRRL 25214	KU171696	KU171716
<i>Fusarium babinda</i>	NRRL 25539	KU171698	KU171718
<i>Fusarium bulbicola</i>	NRRL 22947	KU171699	KU171719
<i>Fusarium dlaminii</i>	NRRL 13164	KU171701	KU171721
<i>Fusarium euwallaceae</i>	NRRL 62626	KU171702	KU171722
<i>Fusarium foetens</i>	NRRL 38302	KU171703	KU171723
<i>Fusarium gaditjirri</i>	NRRL 45417	KU171704	KU171724
<i>Fusarium miscanthi</i>	NRRL 26231	KU171705	KU171725
<i>Fusarium oxysporum</i>	FusTeca2	MF170550	MF170551
<i>Fusarium oxysporum</i>	FusTeca3	MF170552	MF170553
<i>Fusarium oxysporum</i>	CIB_11	LN828100	LN828039
<i>Fusarium oxysporum</i>	CIB_13	LN828102	LN828041
<i>Fusarium oxysporum</i>	CIB_23	LN828106	LN828045
<i>Fusarium oxysporum</i>	LEMM_110248	LN828073	LN828011
<i>Fusarium oxysporum</i>	LEMM_110414	LN828079	LN828017
<i>Fusarium oxysporum</i>	LEMM_122066	LN828096	LN828034
<i>Fusarium proliferatum</i>	NRRL 62905	KU171707	KU171727
<i>Fusarium redolens</i>	NRRL 22901	KU171708	KU171728
<i>Fusarium solani</i>	LEMM_110029	LN828048	LN827959
<i>Fusarium solani</i>	LEMM_111347	LN828058	LN827970
<i>Fusarium succisae</i>	NRRL 13298	KU171712	KU171732
<i>Fusarium thapsinum</i>	NRRL 22049	KU171713	KU171733

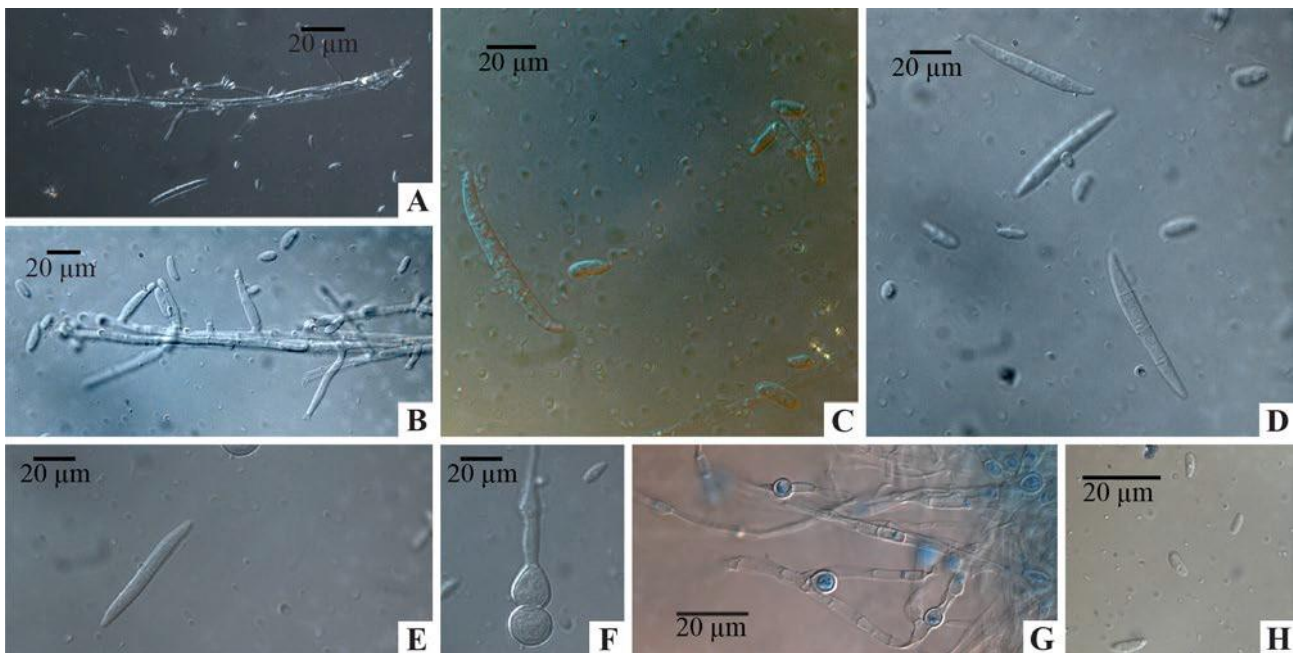


For pathogenicity assays, three elite teak clones (named clones A, B, and C) were inoculated with one representative fungal isolate ('FusTeca2'). Inoculation of teak plants (80 d after transplanting) was carried out via root-dipping, using a suspension of *F. oxysporum* microconidia (adjusted to  $10^6$  mL<sup>-1</sup>). Sterile water suspension was used in the inoculation of the control plants. The inoculated plants were maintained under greenhouse conditions and visually evaluated for disease up to 90 d after inoculation.

## Results

The symptoms of previously unreported disease were initially found in tree trunks, which displayed black darkening of heartwood and sapwood vascular areas (Figure 1). External symptoms of leaf yellowing, leaf abscission and wilting were also observed in the analyzed trees.

On culture medium, the microconidia of the fungal isolates had lengths of 5–10 μm and widths of 2–4 μm (Figure 2a, b, c, d and h). The microconidia were predominantly oval to ellipsoid, slightly curved (without septae) (Figure 2a, b, c and d), and organized in false heads produced in short monophialides (Figure 2a and b). Macroconidia (lengths 19–45 μm and widths 3–6 μm) were falcate, moderately curved, and each with three to five septae (Figure 2c, d and e). Chlamydospores were globular and formed at the ends or interspersed within the hyphae occurring singly, in pairs, or in chains (Figure 2f and g).



**Figure 2.** Morphological characteristics of a teak-infecting *Fusarium oxysporum* isolate. Conidiophores and phialides (a and b). Microconidia (oval to ellipsoid and slightly curved) with no septae (a, b, c, d, and h). Falcate and slightly curved macroconidia with three to five septae (c, d, and e). Globose to oval chlamydospores formed at the ends of hyphae or interspersed in the mycelium, which were found single, in pairs, or in chains (f and g).

The three teak clones used in the pathogenicity assays exhibited wilting, and associated symptoms of premature leaf dropping and vascular browning, followed by plant collapse and death about 60 d after inoculation (Figure 3). Fungi isolated from affected plants onto PDA displayed the same morphological and molecular characteristics of the inoculated

The *TEF-1 $\alpha$*  sequences obtained from the *Fusarium* isolates 'FusTeca2' and 'FusTeca3' were deposited in the GenBank database as 'FusTeca2' (MF170551) and 'FusTeca3' (MF170553). RPB2 sequences of these two isolates were also deposited in the GenBank database as 'FusTeca2' (MF170550) and 'FusTeca3' (MF170552).

Both of these *Fusarium* isolates clustered with other *F. oxysporum* isolates, with maximum values of posterior probability (Figure 4). These phylogenetic analyses confirmed that the causal



**Figure 3.** Pathogenicity assay of one *Fusarium oxysporum* isolate ('FusTeca2') from teak (*Tectona grandis*): seedlings of teak (80 d after transplanting) were inoculated via root-dipping using microconidium suspension (a). Typical damage induced by the *F. oxysporum* isolate in teak seedlings (b). Overview of teak seedlings in the pathogenicity assay with the *F. oxysporum* isolate (c). Distinct levels of vascular browning symptoms after inoculation of teak seedlings with the *F. oxysporum* isolate (c, d, e, and f).

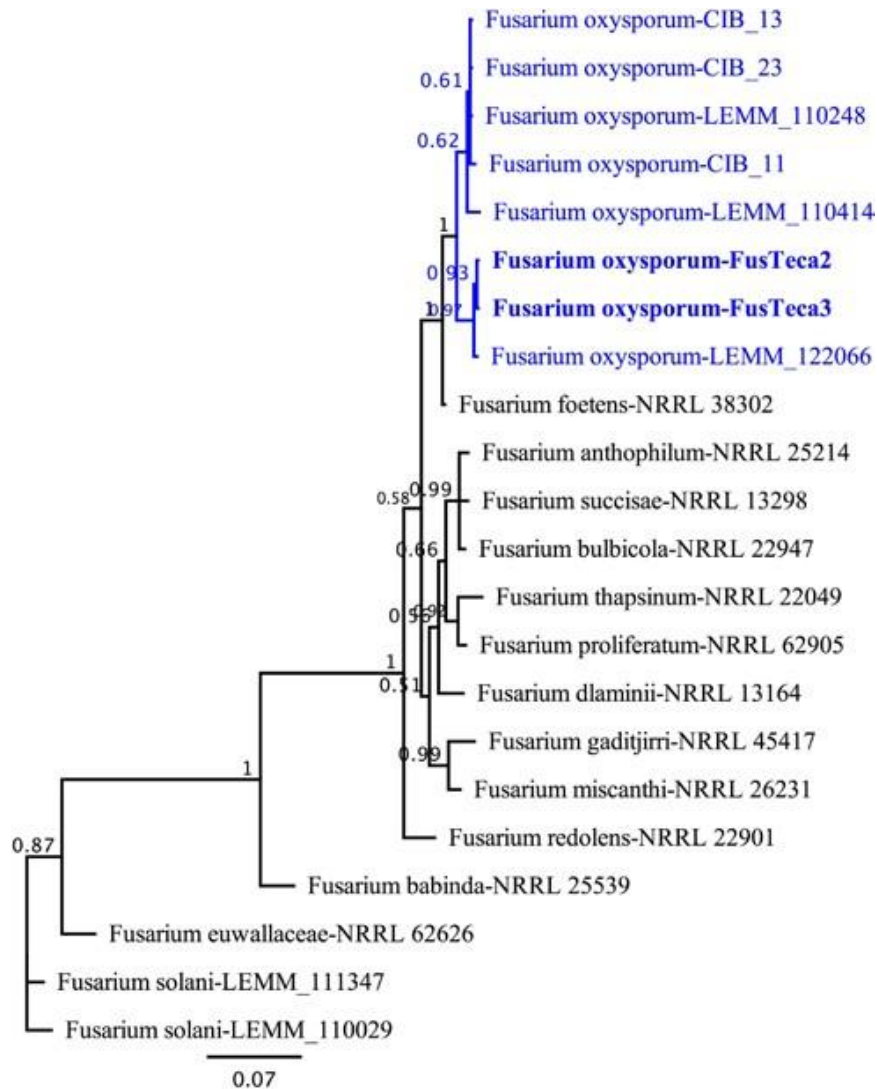
## Discussion

The *Fusarium oxysporum* species complex (FOSC) is a cosmopolitan group of soil-borne pathogens that has been reported in association with vascular wilt diseases in a wide range of plant species (O'Donnell *et al.*, 2010). Approximately 80 host-specific *formae speciales* are described within the FOSC. The three teak clones used in the pathogenicity assays exhibited wilting symptoms after inoculation with one isolate morphologically and molecularly identical to the *Fusarium* isolates re-isolated on PDA, thus fulfilling the Koch's postulates for this pathogen. Molecular markers have been developed to identify

The TEF-1 $\alpha$  and RPB2 genomic regions are usually employed in *formae speciales* discrimination assays, mainly because of their adequate levels of phylogenetic signal (O'Donnell *et al.*, 2010). Due to their importance and utility, these regions were used in the present study in concatenated analyses (with three phylogenetic methods). The results strongly indicated a clustering of *Fusarium* isolates from teak with a set of reference *F. oxysporum* isolates. No base differences were found in alignments of the isolates 'FusTeca2' and 'FusTeca3' with other reference *F. oxysporum* isolates, corroborating these high levels of genetic similarity.

various *formae speciales* (Lievens *et al.*, 2008). Given the high level of phylogenetic diversity and large number of *formae speciales*, multilocus DNA sequence typing currently represents the most robust approach for characterizing these fungal variants (Lievens *et al.*, 2008; O'Donnell *et al.*, 2009; 2010). However, pathogenicity assays are still the standard technique for identifying host-specific pathogens within members of the FOSC.

In the present study, the infectivity of this *F. oxysporum* isolate was only confirmed in teak. A host range assessment needs to be performed to confirm if this isolate represents a new *forma specialis* of *F. oxysporum*.



**Figure 4.** Phylogenetic tree obtained by Bayesian inference (GTR+G model) of the concatenated partial translation elongation factor1- $\alpha$  (TEF1- $\alpha$ ) and RNA polymerase second largest subunit (RPB2) genes sequences along with other 20 reference *Fusarium* isolates available at the GenBank.

There are no formal reports of FOSC members infecting teak in other continents, including Asia. To our knowledge, this is the first report of *F. oxysporum* in teak in the Neotropics, and probably the first world-wide report of vascular wilt caused by *F. oxysporum* in this host species. The geographic origins of the *F. oxysporum* isolates for which we found the greatest sequence similarities from the

BLASTn search were mainly from countries in Asia (data not presented). This suggests that *F. oxysporum* from teak in Brazil is more likely to be exotic than endemic. Teak is a tropical forest species found dispersed across India, Myanmar, Laos, and Thailand, and several members of FOSC are well-known to be transmitted via contaminated seeds and/or seedlings (Reis *et al.*, 2008; Cabral *et al.*, 2014) or as endophytes. Therefore, this potentially new *forma specialis*

of *F. oxysporum* from teak was likely to be introduced into Brazil via contaminated plant material.

The commercial teak production areas in Brazil are expanding, but some soil-borne diseases have already caused serious yield and quality losses. Description of this new vascular disease caused by *F. oxysporum* provides important new knowledge to stimulate the teak production industry and researchers to search for development of effective vascular wilt management strategies.

### Literature cited

- Boiteux L.S., M.E.N. Fonseca, and P.W. Simon, 1999. Effects of plant tissue and DNA purification method on randomly amplified polymorphic DNA-based genetic fingerprinting analysis in carrot. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 124, 32–36.
- Borges R.C.F., M. D. M. Santos, M.A. Macedo, I. Martins, A.G. Nascimento, A.C. Café-Filho, L.S. Boiteux, M.E.N. Fonseca, C.A. Inácio and S.C. M. Mello, 2015. A trunk canker disease of *Tectona grandis* induced by *Lasiodiplodia theobromae* in Brazil. *New Disease Report* 31, 26.
- Cabral P. G. C., A. S. Capucho, O.L. Pereira, E. Maciel-Zambolim, R.L. Freitas and L. Zambolim, 2010. First report of teak leaf rust disease caused by *Olivea tectonae* in Brazil. *Australasian Plant Disease Notes* 5, 113–114.
- Cabral C.S., K.R. Brunelli, H. Costa, M.E.N. Fonseca, L.S. Boiteux, and A. Reis, 2014. Identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* race 1 as the causal agent of lettuce wilt in Brazil. *Tropical Plant Pathology* 39, 197–202.
- Firmino A.C., H.J. Tozze Jr, and E.L. Furtado, 2012. First report of *Ceratocystis fimbriata* causing wilt in *Tectona grandis* in Brazil. *New Disease Reports* 25, 24.
- Katoh K and D.M. Standley, 2013. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution* 30, 772–780.
- Kearse M., R. Moir, A. Wilson, S. Stones-Havas, M. Cheung, S. Sturrock, S. Buxton, A. Cooper, S. Markowitz, C. Duran, T. Thierer, B. Ashton, P. Meintjes and A. Drummond, 2012. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* 28, 1647–1649.
- Kumar S., G. Stecher and K. Tamura, (2016). MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution* 33, 1870–1874.
- Lievens B., M. Rep and B.P.H.J Thomma, 2008. Recent developments in the molecular discrimination of formae speciales of *Fusarium oxysporum*. *Pest Management Science* 64, 781–788.
- Mesquita R.R.S., J.C. Gonçalves and M.H. de Paula, 2017. Comportamento da madeira de *Tectona grandis* frente ao intemperismo. *Revista Floresta* 47, 29–36.
- Narayanan C., S.A. Wali, N. Shukla, R. Kumar, A.K. Mandal and S.A. Ansari, 2007. RAPD and ISSR markers for molecular characterization of teak (*Tectona grandis*) plus trees. *Journal of Tropical Forest Science* 19, 218–225.
- O'Donnell K., C. Gueidan, S. Sink, P.R. Johnston, P.W. Crous, A. Glenn, R. Riley, N.C. Zitomer, P. Colyer, C. Waalwijk, T. Lee, A. Moretti, S. Kang, H. S. Kim, D. M. Geiser, J. H. Juba, R. P. Baayen, M. G. Cromey, S. Bithell, D. A. Sutton, K. Skovgaard, R. Ploetz, H. Corby Kistler, M. Elliott, M. Davis and B.A.J. Sarver, 2009. A two-locus DNA sequence database for typing plant and human pathogens within the *Fusarium oxysporum* species complex. *Fungal Genetics and Biology* 46, 936–948.
- O'Donnell K., D.A. Sutton, M.G. Rinaldi, B.A. Sarver, S.A. Balajee, H.J. Schroers, R.C. Summerbel, V.A.R.G. Robert, P. W. Crous, N. Zhang, T. Aoki, K. Jung, J. Park, Y. H. Lee, S. Kang, B. Park and D. M. Geiser, 2010. Internet-accessible DNA sequence database for identifying fusaria from human and

- animal infections. *Journal of Clinical Microbiology* 48, 3708–3718.
- Reis A., L.S. Boiteux and R.F. Vieira, 2008. Search for sources of wide-spectrum resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *basilici* isolates in accessions of *Ocimum* species. *Journal of General Plant Pathology* 74, 375–381.
- Tavaré S. 1986. Some probabilistic and statistical problems in the analysis of DNA sequences. *Lectures on Mathematics in the Life Sciences* 17, 57–86.

*Accepted for publication: March 15, 2018*

*Published online: May 15, 2018*

## Plant Disease

August 2018, Volume 102, Number 8 Page 1661

<https://doi.org/10.1094/PDIS-09-17-1364-PDN>

### Disease Note Diseases

#### Caused by Fungi and Fungus-Like Organisms

**First Report of a Leaf Spot Caused by *Paramyrothecium roridum* on *Tectona grandis* in Brazil.** R. C. F. Borges, M. Rossato, and M. D. M. Santos, Dept. Fitopatologia, UnB, Brasília–DF, Brazil; M. A. Ferreira, UFLA, Lavras–MG, Brazil; and M. E. N. Fonseca, A. Reis, and L. S. Boiteux,† Embrapa/CNPq, Brasília–DF, Brazil. *Plant Dis.* 102:1, 2018; published online as <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-17-1364-PDN>. Accepted for publication 25 February 2018.

*Tectona grandis* Lf (teak) is a deciduous forest species with increasing economic importance in timber production in subequatorial Brazil. In August 2016, circular dark brown leaf spots (ranging 1 to 20 mm in diameter) with well-defined edges were found mainly in seedlings of commercial production areas in Cáceres, Mato Grosso State, Brazil. The lesions often induced defoliation, as well as slower plant growth and development. For isolation of the causal agent, foliar lesions were submitted to a series of disinfection steps (70% alcohol for 1 min and 2% sodium hypochlorite for 1 min, followed by a double rinse in distilled water for 1 min). The tissues were then transferred to Petri dishes with potato dextrose agar (Merck) medium and incubated at 25°C for 5 days in the dark. Young fungal colonies displayed white mycelium with concentric rings varying from dark green to blackish shades with the production of black sporodochia. Microscopic observations indicated the presence of hyaline conidiophores with rod-shaped phialides (10 to 17 × 1.5 to 3.0 μm). Conidia were hyaline, cylindrical (6 to 8 × 2.0 to 2.5 μm) with rounded ends. The isolates were identified as *Paramyrothecium roridum* (Tode) L. Lombard & Crous comb. nov. (**Lombard et al. 2016**) (syn. *Myrothecium roridum* Tode). Genomic DNA was extracted from colonies of two representative monosporic isolates using a cetyl trimethylammonium bromide method. Polymerase chain reaction assays were carried out with the primer pair ITS1 and ITS4 able to amplify a segment of the rDNA-ITS region (**White et al. 1990**), which is the largest database available for the genus

*Paramyrothecium*. The isolates from teak were deposited in “Maria Menezes” (UFRPE, Recife–PE, Brazil) public fungal collection under the numbers CMM4729 and CMM4730. Alignments of the two teak isolates (accession nos. MF579530 and MF579531) displayed 100% identity with each other and 99% identity with the reference *P. roridum* isolate CBS 372.50 (KU846301) reported on *Coffea* plants (**Lombard et al. 2016**). Healthy plants of three elite clones (six seedlings of each) were inoculated by spraying a suspension of  $1 \times 10^6$  conidia/ml using leaves either after softly wounded (by toothbrush) or employing intact tissues. The mockinoculated controls (wounded and nonwounded plants) were sprayed with sterile water. The seedlings were kept on a moist chamber (25°C) for 2 days. Seedlings inoculated with *P. roridum* displayed initial leaf symptoms 7 days after inoculation, whereas the controls remained free of symptoms. *P. roridum* was reisolated only from the symptomatic plants. This pathogen has been previously reported infecting teak in Taiwan (**Doilom et al. 2016**). In Brazil, *P. roridum* was reported on a wide range of mainly herbaceous hosts (**Fujinawa et al. 2016; Mendes et al. 1998**). However, this is the first report of this fungus on teak in the country. The occurrence of this wide host range pathogen will demand the deployment of novel preemptive diagnostic and control strategies to avoid potential yield losses in teak under Brazilian conditions.

## References

**Doilom, M.** et al. 2016. *Mycosphere* 7: 656.

**Fujinawa, M. F.** et al. 2016. *Plant Dis.* 100:655. **Lombard, L.** et al. 2016. *Persoonia* 36:156.

**Mendes, M. A. S.** et al. 1998. *Fungos em Plantas no Brasil*. Embrapa–Cenargen, Brasília, DF.

**White, T. J.** et al. 1990. Page 315 in: *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*.



## A Leaf Spot of *Tectona grandis* Caused by *Xanthomonas fuscans* in Brazil

**Rafaela C. F. Borges**<sup>1</sup>, Maurício Rossato<sup>1</sup>, Maria do Desterro M. Santos<sup>1</sup>, Cléia S. Cabral<sup>1</sup>, Greecy Mirian R. Albuquerque<sup>2</sup>, Maria A. Ferreira<sup>3</sup>, Maria Esther N. Fonseca<sup>4</sup>, Leonardo Silva Boiteux<sup>4</sup>

1 Department of Plant Pathology, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, DF 70910-900, Brazil

2 Department of Agronomy, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE 52171-900, Brazil

3 Department of Plant Pathology, Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG 37200-000, Brazil

4 Plant Breeding Lab, Embrapa Vegetable Crops, Brasília, DF 70275-970, Brazil

*Tectona grandis* (teak) is a major timber crop in the North Brazilian region. Necrotic leaf lesions often surrounded by chlorotic halos were observed in teak plants (100 days after germination) in a clonal mini-garden displaying ~15% incidence in Mato Grosso State (May, 2016). Five bacterial isolates (with yellow-pigmented colonies with mucoid-rounded aspect) were obtained by isolation of 15 distinct plants in NA medium (28°C/72h). All isolates were inoculated in four teak clones (TG01 to TG04; 90 days after germination) via cuts (0.5 cm) with scissors at the end of the leaf blades followed by immersion into bacterial suspensions ( $10^8$  CFU.mL<sup>-1</sup>). The symptoms appeared 11 days after inoculation and similar colonies were re-isolated from symptomatic leaves. Two isolates were selected for etiology confirmation. Genus identification was performed using 16S rRNA region (primers 27F/1492R) (MF033093 to MF033097) in EzBioCloud (Yoon et al. 2017), and recognized as a member of the *Xanthomonas* genus. Further identification of the bacteria was performed by sequencing *gyrB* partial sequence (emigyr-B1F/emigyrB4R) with 864 base pairs (bp) and *rpoD* (emirpo11F/ emirpo13R), also partial, with 873bp. Phylogenetic analysis of both genes were executed with Bayesian inference, model GTR+G+I, selected with Akaike Information Criterion (AIC). For use as references, type strains sequences of several species were downloaded from GenBank, added by a *X. axonopodis* pv. *melhusii*, reported on teak (EU285161; Parkinson et al. 2009). *gyrB* (MF034328 to MF034332) phylogenetic analysis, both clustered XanTeca sequences with *X. fuscans* and *X. fuscans* subsp. *aurantifolii* (isolates ICMP10027, ICMP10030, ICMP8432, NCPPB381) with a value of “1” of posterior probability. Four *X. fuscans* isolates from teak (CCRMXF01, CCRMXF02, CCRMXF03, CCRMXF04) were deposited in the public culture collection “Rosa Mariano” of the Plant Bacteriology Lab (UFRPE, Recife-PE, Brazil). To our knowledge, this is the first worldwide report of *X. fuscans* infecting teak.

## References

Parkinson N, Cowie C, Heeney J, Stead D (2009) Phylogenetic structure of *Xanthomonas* determined by comparison o *gyrB* sequences. *Int J Syst Evol Microbiol* 59: 264-274

Yoon, S. H., Ha, S. M., Kwon, S., Lim, J., Kim, Y., Seo, H. and Chun, J. (2017). Introducing EzBioCloud: A taxonomically united database of 16S rRNA and whole genome assemblies. *Int J Syst*

*Evol*

*Microbiol.*

67:1613-16

