

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
ENGENHARIA FLORESTAL**

**MORFOLOGIA, CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E
PATOGENICIDADE DE *Ceratocystis fimbriata* NO
RIO GRANDE DO SUL**

TESE DE DOUTORADO

Graziela Piveta

Santa Maria, RS, Brasil.

2013

**MORFOLOGIA, CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E
PATOGENICIDADE DE *Ceratocystis fimbriata* NO
RIO GRANDE DO SUL**

Graziela Piveta

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação
Engenharia Florestal, Área de Concentração em Silvicultura, da
Universidade Federal de Santa Maria (UFSM/RS), como
requisito parcial para obtenção do grau de
Doutor em Engenharia Florestal.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Marlove Fátima Brião Muniz

Santa Maria, RS, Brasil.

2013

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Piveta, Graziela
Morfologia, caracterização molecular e patogenicidade
de *Ceratocystis fimbriata* no Rio Grande do Sul /
Graziela Piveta. -2013.
66 p.; 30cm

Orientadora: Marlove Fátima Brião Muniz
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-
Graduação em Engenharia Florestal, RS, 2013

1. Murcha-de-ceratocystis 2. Kiwi 3. Resistência,
Epidemiologia 4. *Actinidia deliciosa* 5. *Eucalyptus* sp.
I. Muniz, Marlove Fátima Brião II. Título.

© 2013

Todos os direitos autorais reservados a Graziela Piveta. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.

E-mail: grazipiveta@yahoo.com.br

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal.**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Tese de Doutorado

**MORFOLOGIA, CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E
PATOGENICIDADE DE *Ceratocystis fimbriata* NO
RIO GRANDE DO SUL**

elaborada por
Graziela Piveta

Como requisito parcial para obtenção do grau de
Doutor em Engenharia Florestal.

COMISSÃO EXAMINADORA:

Marlove Fátima Brião Muniz, Dr^a.
(Presidente/Orientadora)

Acelino Couto Alfenas, PhD. (UFV)

Candida Eliza Manfio, Dr^a. (UNICRUZ)

Josiane Pacheco Menezes, Dr^a. (UFSM)

Auri Brackmann, Dr. (UFSM)

Santa Maria, 22 de fevereiro de 2013.

Aos meus queridos pais, **Quintino Itamar Moro Piveta** (*in memorian*) e **Cecília Camponogara Piveta**, razão de vida, carinho e sábios ensinamentos ministrados ao longo de minha existência.

Aos meus pais, **Quintino** (*in memorian*) e **Cecília**, os grandes responsáveis pela minha formação, pelo amor, carinho, compreensão, apoio e incentivo incondicionais, durante toda minha vida.

Dedico e ofereço.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Santa Maria, por meio do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, pela contribuição a minha formação acadêmica, e à CAPES, pelo fornecimento do apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

À minha família pela presença constante em minha vida. Em especial meus queridos pais, Quintino Itamar Moro Piveta (in memorian) e Cecília Camponogara Piveta, e minhas irmãs Maristela e Carol.

Ao meu namorado André, pelos anos de companhia pelo amor, carinho, compreensão, apoio, incentivos e ajuda em momentos difíceis.

À Profa. Dra. Marlove Fátima Brião Muniz, pela orientação e apoio prestado para a realização deste trabalho.

Meu agradecimento especial ao Prof. Dr. Acelino Couto Alfenas, pela incansável dedicação, orientação e sugestões pertinentes na elaboração deste trabalho e disponibilização da estrutura do Laboratório de Patologia Florestal da Universidade Federal de Viçosa – UFV para realizar parte da pesquisa.

A pesquisadora Rosa Maria Valdebenito Sanhueza pela sugestão do tema da tese.

À Rigrandense Celulose S.A. e Viveiro Silvestrin por ceder o material vegetal utilizado neste trabalho e também à Prefeitura Municipal de Farroupilha - RS, pelo apoio as coletas realizadas na região.

A todos membros da banca examinadora, por suas valiosas sugestões ao meu trabalho.

As minhas grandes amigas Andressa V. Flores, Cândida Elisa Manfio e Thais Roseli Corrêa, pelas rodas de mate e almoços divertidos nos domingos.

À equipe do Laboratório de Patologia Florestal - UFV, Marcela Galo, Leonardo (Leo), Talyta, Dani Arriel, Nicolle Araujo, Thaisa Ribeiro, Carla Rosado, Mara Souza, em especial à Denise Valdetaro pelo auxílio e principalmente pela paciência que teve comigo durante o período de trabalho no laboratório.

Aos meus colegas de longa data que com carinho, compreensão, conselhos, amizade e amor, contribuíram para a realização de mais esta etapa da minha vida: Ricardo Mezzomo, Gisele Noal, Geísa Finger, Ricardo dos Santos, Carisiane Jaroczewki, Daniele Cardoso, Emanuele Junges, Leíse Hekcler, Cláudia Dutra, Gerarda Beatriz, Fábio

Hamann, Jucéli Müller, Caciara G. Maciel, Clair Walker, Marciéli Bovolini, Marília Lazarotto, Paola Milanesi, Johnathan Rodriguese.

À Tec. Adm. Maria N. D. Weber pela paciência, amizade e pelo amparo nas atividades do laboratório.

Aos meus amigos de coração e a todas aquelas pessoas que, mesmo não mencionadas, de uma forma ou outra, contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito obrigada!

VALEU DEMAIS

Valeu demais!
As noites mal dormidas ansiando a paz
Perdida e pretendida,
Que eu já não sabia mais
Onde é que fora se esconder,
Valeu o tempo de esperar o teu querer!

Valeu demais!
Os dias mal passados caminhando atrás
De planos mal traçados,
Que eu só posso agradecer
A tua mão que me livrou,
Valeu o tempo de esperar, mas já passou!

Pois eu estou bem certo,
Breve tempo de aflição
Não pode comparar-se à nossa eterna salvação
E os dias de tristeza servem mais pra destacar
A imensa glória e honra
Com que Deus vai nos brindar.

Valeu demais!
Valeu!
O tempo e o contratempo
Que esta história traz,
E cada vão momento fica cheio de esperança
Que é a certeza da presença do Senhor
Em cada passo por onde eu for!

Guilherme Kerr.

RESUMO

Tese de Doutorado
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

MORFOLOGIA, CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E PATOGENICIDADE DE *Ceratocystis fimbriata* NO RIO GRANDE DO SUL

AUTORA: GRAZIELA PIVETA

ORIENTADORA: MARLOVE DE FÁTIMA BRIÃO MINIZ

LOCAL E DATA DA DEFESA: SANTA MARIA, 22 DE FEVEREIRO DE 2013.

Ceratocystia fimbriata Ellis & Halsted é um patógeno responsável pela doença murcha-de-ceratocistis e tem ocasionado perdas em diversas culturas importantes no Brasil, como *Eucalyptus* spp., *Ficus carica*, *Mangifera indica*, *Hevea brasiliensis*, *Acacia mearnsii* e *Gmelina arborea*. *Ceratocystis fimbriata* é considerado, atualmente, como um “complexo de espécies” contendo várias espécies crípticas, muitas das quais ainda não descritas. Deste modo, o objetivo neste trabalho foi identificar as espécies do gênero *Ceratocystis* associadas à doença murcha-de-ceratocistis em de kiwi (*Actinidia deliciosa*), relacionando características morfológicas e molecular, com isolados de diferentes hospedeiros brasileiros e outros pertencente ao clados da América do Norte e Ásia, também estudar se existe especialização por hospedeiro, por meio de inoculações em diferentes clones de eucalipto e *Eucalyptus dunnii* e cultivares de kiwi, e identificar materiais genéticos de eucalipto e cultivares de kiwi resistentes. Para isso, foram coletadas amostras de solo e material vegetal de plantas de kiwi que apresentavam sintomas típicos da doença. Para a obtenção dos isolados, utilizou-se o método isca de cenoura, logo em seguida, foi obtida a cultura monoascleróticas. Foram realizadas análises de molecular e morfológica, crescimento micelial em diferentes temperaturas, especialização por hospedeiro. O agente causal da murcha-de-kiwi é *Ceratocystis fimbriata*, pertencente ao clado da América Latina. A temperatura ideal para o seu desenvolvimento é 20-25⁰C e não ocorreu especialização por hospedeiro para os isolados de *Ceratocystis fimbriata* estudados. As cultivares de kiwi são suscetíveis e *Eucalyptus dunnii* e o clone 32864 apresentaram-se altamente resistentes a *C. fimbriata*.

Palavras-chave: Murcha-de-ceratocistis. Kiwi. Resistência. Epidemiologia. *Actinidia deliciosa*. *Eucalyptus* sp.

ABSTRACT

Doctoral Thesis
Graduate Program in Forest Engineering
Universidade Federal de Santa Maria – RS, Brazil

MORPHOLOGY, MOLECULAR CHARACTERIZATION AND PATHOGENICITY OF *Ceratocystia fimbriata* IN RIO GRANDE DO SUL

AUTHOR: GRAZIELA PIVETA

ADVISER: MARLOVE FÁTIMA BRIÃO MUNIZ

DATE AND PLACE OF THE DEFENSE: SANTA MARIA, 22TH FEBRUARY 2013.

Ceratocystia fimbriata Ellis & Halsted is a pathogen responsible for the disease wilt ceratocystis and has caused losses in many important crops in Brazil, such as *Eucalyptus* spp., *Ficus carica*, *Mangifera indica*, *Hevea brasiliensis*, *Gmelina arborea* and *Acacia mearnsii*. *Ceratocystis fimbriata* s.l. currently considered a "species complex" containing multiple cryptic species, many of which are not yet described. Thus, the objective of this study was to identify the species of the genus *Ceratocystis* associated with the disease Ceratocystis wilt in kiwi (*Actinidia deliciosa*) correlating morphological characteristics and phylogenetic isolates of *C. fimbriata* causing wilt ceratocysti in kiwifruit in Brazil with brazilian isolates from different hosts and others belonging to the clades of North America and Asia. To study whether there is host specialization, through inoculations at different eucalyptus clones and cultivars of kiwifruit, and identify eucalyptus clones and kiwi cultivars resistant. For this, samples were collected from soil and plant material of plants of kiwi with symptoms typical of the disease. To obtain the isolates, we used the method bait carrot, then immediately was obtained culture monoaspórica. Were performed phylogenetic analysis, morphological identification, mycelial growth at different temperatures, host specialization. The causal agent of wilt kiwi is *C. fimbriata*, which belongs to clade Latin America. The ideal temperature for development is 20-25⁰C. It did not occur to the host specialization of *C. fimbriata* isolates studied. The kiwifruit cultivars are susceptible to *C. fimbriata*. *Eucalyptus dunnii* and clone 32864 were highly resistant to *C. fimbriata*.

Keywords: Ceratocystis wilt. kiwi. Resistance. Epidemiology. *Actinidia deliciosa*. *Eucalyptus* sp.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Locais de coleta dos isolados de *Ceratocystis fimbriata* obtidos de plantas de kiwi do município de Farroupilha - RS. PA (Pomar Althoraus), PM (Pomar Miguel), PG (Pomar Girelli), PB (Pomar Bohn), PC (Pomar Colussi), PCT (Pomar Contini), PP (Pomar Pasa) e PL (Pomar Lodi). 25
- Figura 2 – A) isolamento das amostras de tecido vegetal, utilizando o método “isca de cenoura”; B) isolamento das amostras de solo, utilizando o método “isca de cenoura”; C) Colônia monoascospórica de *Ceratocystis fimbriata* em meio EMLA; D) Escurecimento do lenho de planta de kiwi, sintoma típico da doença causada por *C. fimbriata*. 27
- Figura 3 – Sintomas causados por *Ceratocystis fimbriata* em plantas de kiwi na região de Farroupilha - RS. A) escurecimento do sistema vascular de raízes; B) escurecimento radial do lenho; C) cancro; D) planta morta devido a doença; E) planta sadia; F) redução da qualidade dos frutos e sintomas de murcha, amarelecimento e seca dos ramos infetados por *C. fimbriata*. 37
- Figura 4 – Sintomas observados quando mudas de kiwi foram inoculadas com isolados de *Ceratocystis fimbriata*, A) planta testemunha (esquerda) e planta inoculada (direita); B) Sintoma de murcha apical ocasionada pela inoculação; C) planta testemunha; D) sintomas de escurecimento do lenho causado por *C. fimbriata*. 38
- Figura 5 – Uma das 100 árvores mais parcimoniosa baseada nas sequencias ITS-rDNA de isolados de *Ceratocystis* sp. com os valores de Bootstrap e *Ceratocystis albofundus* como outgroup. A identificação dos isolados e do hospedeiro/local (entre parênteses) está indicada à frente do nome da espécie. As barras indicam a fração de substituição por sítios. 40
- Figura 6 – Árvore baseada nas sequencias ITS-rDNA de isolados de *Ceratocystis* sp. pelo método Inferência Bayesiana. Com valores das probabilidades a posteriori (pp). Com os valores de Bootstrap e *Ceratocystis albofundus* como outgroup. A identificação dos isolados e do hospedeiro/local (entre parênteses) está indicada à frente do nome da espécie. As barras indicam a fração de substituição por sítios. 41
- Figura 8 – Características morfológicas do genótipo do grupo A: A) peritécio; B) endoconidióforo primário; C) ascósporo; D) aleuroconídios; E) hifa ostiolar divergente; F) endoconídio primário. Barras: A = 400 µm; B, C, D, E, F = 40 µm. 45
- Figura 9 – Características morfológicas do genótipo do grupo B: A) peritécio; B) hifa ostiolar divergente; C) esporos; D) endoconidióforo primário; E) endoconídio primário; F) aleuroconídio. Barras: A = 400 µm; B = 100, C, D, E, F = 40 µm. 46
- Figura 10 – Características morfológicas do genótipo do grupo C: A) peritécio; B) aleuroconídio; C) endoconidióforo primário; D) endoconídio secundário; E) hifa ostiolar divergente; F) esporos; G) endoconídio primário; H) endoconidióforo secundário. Barras: A = 400 µm; B, C, D, E, F, G, H = 40 µm. 47
- Figura 11 – Características morfológicas do genótipo do grupo D: A) peritécio; B) endoconidióforo secundário, b1) endoconídio secundário; C e F) endoconidióforo primário; D) endoconídio primário; E) Aleuroconídios; G) esporos; H) hifa ostiolar divergente. Barras: A = 400 µm; B, C, D, E, F, G, H = 40 µm. 48

Figura 7 – Crescimento micelial médio (cm). A) genótipo do grupo A; B) genótipo do grupo B; C) genótipo do grupo C e D) genótipo do grupo D.....	50
Figura 12 – A) planta de kiwi morta em decorrência da inoculação de <i>Ceratocystis fimbriata</i> ; B) planta de kiwi apresentando escurecimento do lenho causado por <i>C. fimbriata</i> e C) plantas testemunhas.....	55
Figura 13 – A) planta de Eucalipto inoculada; B e C) sintomas de escurecimento do lenho causado por <i>C. fimbriata</i> em plantas de <i>Eucalyptus</i> spp., após 60 dias da inoculação e D) presença úlceras no caule.....	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Isolados obtidos e coordenadas geográficas dos locais de coleta dos isolados de <i>Ceratocystis fimbriata</i> na região de Farroupilha-RS.....	24
Tabela 2 – Sequências da região ITS obtidas no Genbank utilizadas para a construção das árvores filogenéticas.	30
Tabela 3 – Clones de <i>Eucalyptus</i> spp. inoculados com os isolados de <i>Ceratocystis fimbriata</i> obtidos de kiwi.....	34
Tabela 4 – Médias de severidade (%) de cada combinação isolados de <i>Ceratocystis fimbriata</i> obtidos de kiwi X hospedeiros.....	51
Tabela 5 – Comprimento médio de lesão (cm) de cada combinação de isolados de <i>Ceratocystis fimbriata</i> obtidos de kiwi X kiwi.	53
Tabela 6 – Comprimento médio de lesão (cm) de cada combinação de isolados de <i>Ceratocystis fimbriata</i> obtidos de kiwi X clones <i>Eucalyptus</i> spp.....	54

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1 O fungo <i>Ceratocystis fimbriata</i>	16
2.2 Variabilidade de agentes patogênicos	18
2.3 Resistência genética	20
3 MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1 Caracterização sintomatológica da doença, coleta de amostras, isolamento e teste de patogenicidade	24
3.2 Obtenção das culturas monoascospóricas	27
3.3 Extração de DNA e amplificação por PCR	28
3.3.1 Sequenciamento de DNA e análises molecular	29
3.4 Caracterização morfológica	32
3.5 Crescimento micelial em diferentes temperaturas	32
3.6 Avaliação da especialização por hospedeiro e resistência de kiwi e de clones de <i>Eucalyptus</i> spp. a <i>Ceratocystis fimbriata</i>	33
3.6.1 Delineamento experimental e análises	35
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
4.1 Caracterização sintomatológica da doença, coleta de amostras, isolamento e teste de patogenicidade	36
4.2 Obtenção das culturas monoascospóricas	38
4.3 Caracterização molecular dos isolados	39
4.4 Caracterização morfológica	42
4.5 Crescimento micelial em diferentes temperaturas	49
4.6 Avaliação da especialização por hospedeiro e resistência genética em clones de eucaliptos e kiwi a <i>Ceratocystis fimbriata</i>	50
5 CONCLUSÃO.....	57
REFERÊNCIAS	58

1 INTRODUÇÃO

No Rio Grande do Sul, plantações de *Eucalyptus* spp. ocupam espaço importante e sustentam indústrias que utilizam sua madeira. Porém, esses plantios estão sujeitos ao ataque de patógenos, como fungos do gênero *Ceratocystis*, conhecidos por causar doenças que levam a perdas na produtividade por danos na madeira ou por morte da planta. A doença murcha-de-ceratocystis, causada por *Ceratocystis fimbriata* Ellis & Halsted, é uma das mais importantes para a cultura do *Eucalyptus* spp. O primeiro relato de *C. fimbriata* causando murcha em plantas de eucalipto foi no sudeste da Bahia, em 1999 (FERREIRA et al., 1999). A murcha-de-ceratocystis em eucalipto já foi observada também no Uruguai (BARNES et al., 2003) e em países do continente africano, como a República do Congo e na República de Uganda, onde a doença causou alta mortalidade em determinados clones de eucalipto (ROUX et al., 2004; ROUX et al., 2001; ROUX et al., 2000).

Apesar do fungo já causar danos significativos em plantios de espécies florestais cultivadas em outros estados e em outros países, ainda não existem estudos sobre materiais genéticos resistentes para os isolados presentes na região Sul do Brasil. A variabilidade genética é determinante para o potencial de adaptação do organismo às condições adversas de ambiente, e que a variabilidade patogênica dos isolados tem implicações diretas no manejo da doença (MC DONALD; LINDE, 2002). Nos estudos realizados nos programas de melhoramento com foco em resistência a doenças, os estudos de variabilidade do patógeno são de grande importância, onde, primeiramente, deve-se identificar a variabilidade existente na população do patógeno, antes da seleção de fontes de resistência no hospedeiro (BRUTON, 1998).

O controle de patógenos habitantes de solo é dificultado devido à natureza sistêmica das infecções e à variabilidade patogênica dos isolados de *C. fimbriata*. Algumas estratégias de controle podem ser utilizadas para evitar a disseminação do patógeno, como desinfestação de ferramentas utilizadas nas podas e evitar o transporte de mudas contaminadas (HARRINGTON et al., 2011; FERREIRA et al., 2010). Entretanto, a estratégia de controle mais eficiente, atualmente, é baseada na utilização de genótipos resistentes.

A doença conhecida como murcha-de-ceratocystis já está presente no Rio Grande do Sul causando grandes perdas em pomares de kiwi (*Actinidia deliciosa*) na região de Farroupilha - RS (SONEGO et al., 2010), mas ainda há poucos estudos dos isolados do gênero *Ceratocystis* provenientes de kiwi, bem como, estudos de especialização por

hospedeiro. Para definir estratégias de controle, manejo ou mesmo prevenção de doenças em espécies vegetais é fundamental que se reúnam, inicialmente, informações sobre o patógeno que as causam.

Estudos que busquem conhecimentos a respeito deste importante patógeno presente no Rio Grande do Sul são fundamentais, pois podem fornecer subsídios para que estratégias de controle e prevenção da doença possam ser tomadas, evitando danos e/ou perdas em plantios de espécies florestais de interesse econômico, como em eucalipto.

Portanto, o objetivo deste trabalho foi:

- a) identificar as espécies do gênero *Ceratocystis* associadas à doença murcha-de-ceratocystis em kiwi (*Actinidia deliciosa*) relacionando características morfológicas e molecular dos isolados de *C. fimbriata* causador da murcha-de-Ceratocystis em kiwi no Brasil, com isolados de diferentes hospedeiros brasileiros e outros pertencentes aos clados da América do Norte e Ásia;
- b) identificar a temperatura ideal para o desenvolvimento de *C. fimbriata*,
- c) estudar a especialização por hospedeiro, por meio de inoculações em diferentes clones de eucalipto e cultivares de kiwi;
- d) selecionar clones de eucalipto e cultivares de kiwi resistentes à doença.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O fungo *Ceratocystis fimbriata*

O gênero *Ceratocystis* pertence à classe dos Pyrenomycetes, ordem Ophiostomatales, subdivisão Ascomycotina e família *Ceratocystidaceae*. Este fungo produz peritécios superficiais, parcial ou completamente imersos no substrato, globosos, com pescoços longos e fimbriados, e com coloração castanha a preto. Os ascósporos são elipsóides, hialinos, possuindo uma espécie de bainha gelatinosa, o que lhes dá uma aparência de chapéu. São produzidos em ascas evanescentes, cujas paredes dissolvem-se facilmente, e então liberados através do ostíolo em uma substância gelatinosa. Na fase assexuada, são produzidos dois tipos de esporos: os endoconídios hialinos, cilíndricos, catenulados, e em alguns casos endoconídios barriliforme, e os clamidósporos terminais, também em cadeias, obovatos a ovais, com paredes espessas e coloração castanha (JOHNSON, HARRINGTON e ENGELBRECHT, 2005).

Ceratocystis fimbriata foi a primeira espécie descrita do gênero como agente causal da podridão negra da batata doce (*Ipomea batatas*) em Nova Jersey, EUA (HALSTED, 1890; HALSTED e FAIRCHILD, 1891). Atualmente, *C. fimbriata* tem sido considerado um complexo de espécies crípticas (VAN WYK et al., 2010). Portanto, o patógeno causador da podridão negra em batata doce tratado como *C. fimbriata sensu stricto* (s.s.), enquanto os isolados dos demais hospedeiros tratados como *C. fimbriata sensu lato* (VAN WYK et al., 2010_a). Portanto, a terminologia *Ceratocystis fimbriata sensu lato* (s.l.) foi utilizada para todos os fungos da família *Ophiostomataceae*; e *C. fimbriata sensu stricto* (s.s.) é utilizada para as espécies com fase anamórfica no gênero *Thielaviopsis* (MONTROYA, WINGFIELD, 2006).

Os patógenos do gênero *Ceratocystis* podem atacar diversas culturas, incluindo plantas lenhosas e herbáceas de importância econômica como, por exemplo, acácia-negra (*Acacia mearnsii* De Wild) (SANTOS e FERREIRA, 2003), *Acacia decurrens* Willd. (RIBEIRO, et al. 1988), *Cassia fistula* L. (GALLI, 1958), *Cassia renigera* Wall. (RIBEIRO et al., 1987), cafeeiro (*Coffea arabica* L.) (PONTIS, 1951), eucalipto (*Eucalyptus* spp) (FERREIRA et al., 1999), *Ficus carica* L. (VALARINI e TOKESHI, 1980), gmelina (*Gmelina arborea* Roxb) (MUCHOVEJ et al., 1978), mangueira (*Mangifera indica* L.) (BATISTA, 1960), seringueira

[*Hevea brasiliensis* (Willd. ex Adr. de Juss.) Muell & Arg] (ALBUQUERQUE, et al. 1972),entre outras.

A doença pode apresentar maior importância em determinados locais, dependendo da cultura afetada. Por exemplo, em café, há maior impacto econômico na Colômbia (PONTIS, 1951) enquanto que no Brasil, ocorre em diversas culturas importantes, como mangueira, nos Estados de São Paulo e Rio de Janeiro (ROSSETTO e RIBEIRO, 1990; RIBEIRO et al. 1995; SILVEIRA et al., 2006) e em gmelina somente na Amazônia (BAKER et al., 2003). A murcha-de-ceratocystis em eucalipto já foi observada também no Uruguai (BARNES et al., 2003) e em países do continente africano como a República do Congo e na República de Uganda, onde a doença causou alta mortalidade em determinados clones de eucalipto (ROUX et al., 2004; ROUX et al., 2001; ROUX et al., 2000).

O processo de disseminação da doença pode ocorrer por diversas formas dependendo do hospedeiro. Por exemplo, em árvores de *Platanus* sp. foi verificada a dispersão do patógeno via contato radicular (ACCORDI, 1986, 1989) e ferimentos nas raízes (VIGOUROUX et al., 1999; VIGOUROUX e OLIVIER, 2004). Em outro estudo, realizado por Rosseto e Ribeiro (1990), foi comprovado a infecção em *Mangifera indica* pelo inóculo do solo. Outra forma comum de dispersão do patógeno é por disseminadores secundários, como cupins e coleobrocas *Scolytidae* em *M. indica* (BATISTA, 1960; VIÉGAS, 1960). Sugere-se que coleobrocas do gênero *Xyleborus* e *Hypocryphalus*, adquirem inóculo de *C. fimbriata* e o dispersam para outras plantas suscetíveis. Além disso, verificou-se que ascósporos de *C. fimbriata* podem ser carregados sobre o corpo de coleobrocas do gênero *Xyleborus* e *Hypocryphalus* e sobreviver pela passagem do sistema intestinal do inseto (ITON, 1960; CRONE, 1963). Em estudo realizado com *Acacia mearnsii*, Santos e Ferreira (2003) relataram que os ferimentos que ocorrem na planta, nos meses quentes e chuvosos, são mais favoráveis para a infecção, devido às condições de alta umidade e temperatura. Ferreira et al (2011) comprovaram que o patógeno pode ser disseminado através de mudas contaminadas. A movimentação de material vegetal infectado por diversas regiões no mundo dificulta, em alguns casos, analisar se as populações de *C. fimbriata* são nativas ou introduzidas em uma determinada região (HARRINGTON, 2005; FERREIRA et al, 2010; 2011).

2.2 Variabilidade de agentes patogênicos

Estudos sobre a variabilidade de fungos são importantes para entender a dinâmica populacional e traçar estratégias para o estudo da patogenicidade e para o melhoramento das espécies que são atacadas, visando a resistência ao fitopatógeno. Além disso, podem ser identificados isolados mais ou menos agressivos no desenvolvimento de uma doença e ainda, ocorrer diferenças no ataque do patógeno, dependendo do hospedeiro em que este for inoculado.

Para o desenvolvimento de estudos sobre um determinado patógeno é fundamental o conhecimento de características morfológicas de colônias, micélio e endoconídios, bem como características fisiológicas, como a composição química dos meios de cultura que determinam a eficiência da esporulação e o crescimento micelial dos fitopatógenos (DHINGRA e SINCLAIR, 1995). A taxonomia e identificação de espécies de fungos fitopatogênicos pode ser baseada em caracteres morfológicos, entretanto, em muitos gêneros, tais caracteres são de difícil observação em populações naturais, além de, muitas vezes, serem afetados pelo ambiente (FALEIRO et al., 2003). Para Teixeira et al. (2004), a identificação morfológica pode ser altamente instável e dependente da composição do meio utilizado, condições de incubação e da própria variação do patógeno, ou seja, são subjetivos, pouco conclusivos e podem induzir a erros de interpretação quanto à identificação das espécies em estudo, já que muitas vezes, colônias atípicas de um dos organismos podem assemelhar-se às colônias do outro.

Uma forma considerada mais precisa para a identificação de variabilidade em patógenos, é o uso de técnicas moleculares baseadas na análise de isoenzimas que têm sido aplicadas com êxito em diversas áreas da Micologia, possibilitando o desenvolvimento de métodos rápidos, sensíveis e específicos no diagnóstico de fitopatógenos, além disso, sua ampla utilização deve-se, principalmente, a sua simplicidade de uso, rapidez, segurança e amplitude dos resultados obtidos (TEIXEIRA et al. 2004).

Métodos moleculares baseados na análise do ácido desoxirribonucléico (ADN ou DNA) têm sido ferramentas muito úteis para estudos envolvendo filogenia de fungos e diferenciação de espécies, *formae speciales*, raças e isolados (KURUMAE e SOUZA, 2002). Nisso, o DNA ribossômico é muito importante para avaliação de polimorfismos em fungos. Existem muitas cópias de rRNA como 17S, 5.8S, 25S e 5S que estão arranjadas em espaços não codificados. As sequências codificadas do rRNA são altamente conservadas entre espécies de fungos em geral. A diferenciação genética entre populações de uma espécie

constitui o primeiro estágio de que há divergência evolutiva. Essa diferenciação é resultado da ação de diferentes ambientes a que cada população está sujeita sobre a variabilidade pré-existente na espécie (MARQUES, 2003).

Uma das técnicas mais utilizadas em fungos é a amplificação da região do rDNA por reação em cadeia da polimerase (PCR), que permite a amplificação de regiões específicas do genoma conservado tais como a ITS (*Internal Transcribed Spacer*). Essa região é separada pelos genes 17S e 25S, podendo ser amplificada por oligonucleotídeos iniciadores específicos para essas duas subunidades (ITS 1 e ITS 4, por exemplo). Como é altamente conservado na espécie, o ITS é variável entre espécies e, por isso, é frequentemente utilizado para taxonomia (ANTONIOLLI, 1998; ANTONIOLLI et al., 2000; GOMES et al., 2002).

Após a PCR, o DNA poderá ser sequenciado em uma técnica que combina a PCR com métodos de terminação de cadeias de dideoxinucleotídeos (moléculas que não possuem o grupo hidroxila no carbono 3'. São eles: ddATP, ddGTP, ddCTP e ddTTP, marcados com material fluorescente). Essa metodologia tem sido utilizada na identificação de micro-organismos pela determinação da sequência de genes conservados. Após o sequenciamento e com o auxílio de sequências já publicadas no *Gene Bank* e softwares especializados, poder-se-á chegar à identificação da espécie dos organismos em estudo (MENEZES, 2007).

Do ponto de vista evolutivo, a variabilidade genética das populações é importante por determinar o potencial de adaptação do organismo às condições adversas, já do ponto de vista epidemiológico, a variabilidade patogênica tem implicações diretas no manejo da doença (MICHEREFF et al., 2003), já que quanto maior a agressividade do patógeno, maior deverá ser o uso de fungicidas ou mesmo cuidados na escolha de material genético resistente.

Para Baker et al. (2003), *Ceratocystis fimbriata* possui grande variabilidade fisiológica na sua população, o que determina se uma espécie vegetal hospedeira, pode ou não, ser infectada pelo patógeno proveniente de isolamento de outro hospedeiro.

Os estudos de especialização em nível de hospedeiro têm revelado uma diversidade genética nos isolados de *C. fimbriata*. Ribeiro et al. (1988) verificaram que os isolados obtidos de acácia-negra e de mangueira foram patogênicos para as espécies estudadas. Ribeiro et al. (1987) observaram que dois isolados de *C. fimbriata* obtidos de *Cassia renigera* e mangueira (*Mangifera indica*) foram patogênicos para as plantas de: acácia-negra (*Acacia decurrens*), crotalária (*Crotalaria juncea*), feijão-guandu (*Cajanus cajan*), figueira (*Ficus carica*), mangueira (*Mangifera indica*), seringueira (*Hevea brasilienses*), *Cassia* sp., *C. carnavall*, *C. ferruginea*, *C. moschata*, *C. multijuga*, *C. nodosa*, *C. renigera*, *C. siamea* e *C. speciosa*, porém, não infectaram plantas de cacauero (*Theobroma cacao*), gmelina (*Gmelina*

arborea) e *Cassia grandis*. Em outro estudo realizado por Coral et al. (1984) foi testada a patogenicidade dos isolados de *C. fimbriata* obtidos dos hospedeiros *Cajanus cajan*s, *Acacia decurrens*, *Crotalaria juncea* e *Mangifera indica* em mudas de cacaueteiro (*Theobroma cacao*), e foi verificado que os isolados em estudo não foram patogênicos para as plantas de cacaueteiro.

2.3 Resistência genética

A resistência genética de plantas a fitopatógenos pode ser classificada com base no número de genes envolvidos. Existem casos em que a presença de apenas um gene é suficiente para conferir resistência (resistência monogênica) e outros casos em que são necessários vários genes (resistência poligênica). Nesse caso, o hospedeiro e o patógeno são incompatíveis, em maior ou menor grau, seja devido à falta de reconhecimento químico entre os dois ou porque a planta hospedeira exerce sua autodefesa contra o patógeno, devido a vários mecanismos já existentes ou ativados em resposta aos estímulos provocados pela infecção pelo patógeno (VALE et al., 2004). Outra classificação de tipos de resistência considera o espectro de resistência contra diferentes raças do patógeno, onde, de acordo com essa abordagem tem-se a resistência horizontal e a resistência vertical (CAMARGO, 1995)

A resistência monogênica também é chamada de resistência qualitativa devido à diferença entre plantas resistentes e suscetíveis ser de fácil visualização, inexistindo reações intermediárias na ausência de outras fontes de variação que não a genética, gerando uma distribuição fenotípica descontínua. Quando cruzadas plantas suscetíveis com resistentes, a proporção de plantas suscetíveis e resistentes seguirá aquelas previstas por Mendel, de acordo com o modo de interação alélica. Ela já foi descrita em quase todos os patossistemas e tem sido usada, em muitos casos, com sucesso em programas de melhoramento, como por exemplo, alface - *Bremia lactucae*, tomate – *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, dentre outros. Quanto a sua duração, a resistência monogênica tende a ser superada pelo patógeno em um curto espaço de tempo, pois as mudanças genéticas necessárias para isso devem ocorrer em apenas um locus.

A resistência poligênica pode ser classificada como poligênica propriamente dita (muitos genes) ou oligogênica (poucos genes). Caracteriza-se pela variação contínua de graus de resistência, indo desde a extrema suscetibilidade até a extrema resistência. Por esse motivo também é chamada de resistência quantitativa, pois há necessidade de se quantificar a doença para diferenciar os materiais suscetíveis dos resistentes. Na prática, o número de genes

envolvidos na resistência poligênica pode ser estimado através de fórmulas que consideram a magnitude da variação fenotípica observada em indivíduos da geração F2 resultantes do cruzamento entre plantas pertencentes aos extremos de resistência e suscetibilidade, ou seja, quanto maior a variação entre plantas, maior o número de genes envolvidos e maiores o número de combinações diferentes entre eles, levando a um aumento do espectro fenotípico. A resistência poligênica é mais estável que a monogênica, pois para que surjam variantes do patógeno, assumindo as mesmas condições ambientais e genéticas, serão requeridas mudanças genéticas em vários loci de patogenicidade.

A resistência vertical (monogênica) confere imunidade ou hipersensibilidade contra determinadas raças do patógeno e por isso age na redução da quantidade efetiva de inóculo inicial, atrasando o início da epidemia. Já a resistência horizontal (poligênica) tem efeitos parciais e quantitativos: a eficiência de infecção é menor no material resistente, as lesões crescem mais lentamente, os esporos são produzidos mais tardiamente e em menor quantidade, afetando principalmente a taxa de desenvolvimento da doença.

Os patógenos produzem uma diversidade de sinais potenciais, e, de uma maneira análoga à produção de antígenos pelos patógenos de mamíferos, alguns destes são detectáveis por algumas plantas (BENT, 1996). No patógeno, um gene é chamado de gene de avirulência se sua expressão determina a produção de sinais que provocam uma forte resposta na planta com o apropriado gene de resistência (KEEN, 1990). No entanto, a expressão do gene de avirulência não impede o patógeno de ser virulento para hospedeiros que não tenham o correspondente gene de resistência.

Conforme Flor (1956) demonstrou a complementaridade dos sistemas gênicos do hospedeiro e do patógeno. Após investigar exaustivamente as interações entre vários genótipos de linho e do fungo *Melampsora lini*, ele propôs o modelo de relação gene-a-gene. Segundo ele, a incompatibilidade acontece quando uma planta possui um gene dominante de resistência que corresponde a um gene de avirulência em um determinado patógeno. Uma única planta pode ter muitos genes de resistência, assim como o patógeno também pode ter vários genes de avirulência. A resposta de defesa, que evita a infecção, se dá a partir do momento em que a planta “reconhece” um particular produto do patógeno controlado pelo gene de avirulência. Conforme Lindsay et al. (1993), estes produtos do gene de avirulência implicados na percepção do ataque pela planta abrangem um grupo de moléculas coletivamente chamadas elicitores.

Esse tipo de resistência é expresso por uma necrose localizada no sítio primário de infecção resultando na morte rápida de células em contato direto com o patógeno ou

adjacentes a ele, denominando-se reação de hipersensibilidade (DANGL e JONES, 2001). A proteína codificada pelo gene R desencadeia a reação de hipersensibilidade, como resultado do reconhecimento da proteína codificada pelo gene Avr do patógeno (MARTIN et al. 2003). Após o reconhecimento, ocorre uma cadeia de transdução de sinais que resulta na ativação de respostas locais e sistêmicas (NIMCHUK et al., 2003).

Outra forma de resistência conhecida é fenômeno da tolerância. Trata-se da capacidade inerente ou adquirida da planta em suportar o ataque de um patógeno. Materiais tolerantes não possuem a habilidade de prevenir e/ou restringir o crescimento do patógeno, o que a torna indistinguível do material suscetível, porém sua produtividade pode ser comparada a de um material resistente. Existem autores que não consideram a tolerância como forma de resistência, pois ela não afeta a reprodução do patógeno, tornando as plantas tolerantes reservatórios do inóculo em campo (AGRIOS, 2005).

O controle dos agentes causais de murchas é bastante difícil, sendo a utilização de materiais resistentes obtidos através de programas de melhoramento genético o melhor método de controle devido à especificidade apresentada na relação patógeno-hospedeiro. Para diversas culturas foram desenvolvidas variedades resistentes, tanto no caso de murchas de natureza fúngicas como bacteriana, tornando viável o controle da doença (BEDENDO, 1995).

Para Alfenas et al. (2009), a ampla variabilidade genética inter e intra-específica do hospedeiro quanto à resistência à doença possibilita a seleção e o plantio de genótipos resistentes, e estudos sobre herança e base genética da resistência são essenciais para os programas de melhoramento genético, visando a obtenção de plantas resistentes. O desenvolvimento e o sucesso de programas de melhoramento visando resistência as doenças depende do conhecimento sobre a variabilidade do patógeno.

O sucesso de programas de melhoramento visando à resistência depende do conhecimento sobre a variabilidade do patógeno, motivo pelo qual esse aspecto deve ser investigado antes da seleção de fontes de resistência no hospedeiro (BRUTON, 1998, FERREIRA et al., 2011).

Segundo Oliveira e Luz (2005), ainda não existe um controle eficiente para a murcha-de-ceratocystis em cacauero, porém, os autores ressaltam que uma das melhores opções de controle desta doença é a utilização da resistência genética. De acordo com Silva et al. (2007), o fungo *Ceratocystis cacaofunesta*, responsável pela doença murcha-de-ceratocystis em cacauero, só penetra na planta por ferimentos e, devido ao curto espaço de tempo entre o sintoma aparente da doença e a morte da planta, o controle é praticamente impossível.

Portanto, o uso de cultivares resistentes e o tratamento preventivo representam as medidas mais eficientes, econômica e ecologicamente corretas no manejo da doença.

Em estudo realizado por Zauza et al. (2004), testando 18 clones de híbridos de *Eucalyptus grandis* × *E. urophylla* comercializados no Brasil quanto à resistência a dois isolados patogênicos de *Ceratocystis fimbriata*, destes, quatro clones tiveram sintomatologia igual aos do tratamento controle, oito tiveram resistência intermediária e os outros seis foram altamente suscetíveis. Em outro estudo de resistência efetuado por Mafia et al. (2011), onde avaliaram sete espécies de eucaliptos, *E. camaldulensis*, *E. dunni*, *E. grandis*, *E. pellita*, *E. saligna*, *E. tereticornis* e *E. urophylla* quanto à resistência a isolados patogênicos de *Ceratocystis fimbriata*, foi concluído que apenas *E. dunni* e *E. saligna*, das sete espécies testadas, apresentaram resistência.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Caracterização sintomatológica da doença, coleta de amostras, isolamento e teste de patogenicidade

Para realizar as coletas, utilizou-se o método de caminhar em zigue-zague (ALFENAS et al., 2009), onde foram coletadas amostras de solo e material vegetal de plantas de kiwi (cultivares Monty, Elmwood e Hayward) que apresentavam sintomas típicos da doença, em oito pomares localizados na região de Farroupilha - RS (Figura 1 e Tabela 1) no mês de julho de 2010. As amostras de material vegetal foram acondicionadas em sacos de papel e as de solo em sacos plásticos e enviadas ao Laboratório de Patologia Florestal da Universidade Federal de Viçosa – UFV, onde foram processadas.

Tabela 1 – Isolados obtidos e coordenadas geográficas dos locais de coleta dos isolados de *Ceratocystis fimbriata* na região de Farroupilha-RS.

Pomar/Sigla	Nº de isolados obtidos	Coordenadas
Pomar Althoraus (PA)	6	S 29 ⁰ 15'.235" W 51 ⁰ 26'.393"
Pomar Miguel (PM)	5	S 29 ⁰ 14'.242" W 51 ⁰ 23'.187"
Pomar Girelli (PG)	5	S 29 ⁰ 07'.407" W 51 ⁰ 24'.009"
Pomar Bohn (PB)	6	S 29 ⁰ 09'.022" W 51 ⁰ 24'.805"
Pomar Colussi (PC)	6	S 29 ⁰ 09'.505" W 51 ⁰ 22'.783"
Pomar Contini (PCT)	4	S 29 ⁰ 10'.571" W 51 ⁰ 24'.009"
Pomar Pasa (PP)	4	S 29 ⁰ 11'.751" W 51 ⁰ 24'.118"
Pomar Lodi (PL)	2	S 29 ⁰ 07'.469" W 51 ⁰ 24'.438"
Total	38	

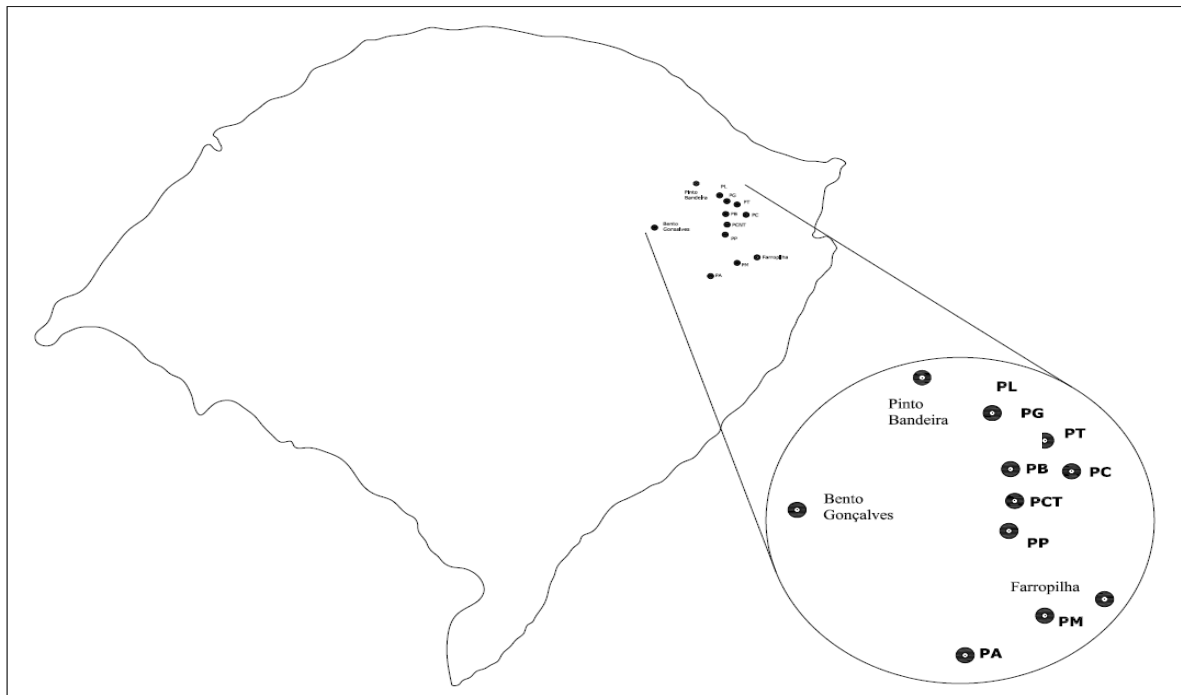


Figura 1 – Locais de coleta dos isolados de *Ceratocystis fimbriata* obtidos de plantas de kiwi do município de Farroupilha - RS. PA (Pomar Althoraus), PM (Pomar Miguel), PG (Pomar Girelli), PB (Pomar Bohn), PC (Pomar Colussi), PCT (Pomar Contini), PP (Pomar Pasa) e PL (Pomar Lodi).

Para a obtenção dos isolados, fragmentos do caule e raízes (Figura 2 D) do hospedeiro e de amostras de solo foram utilizados. As amostras foram processadas utilizando o método “isca de cenoura” descrito por Moller e Devay (1968) e Laia et al (2000). Para tanto, segmentos de caule infectado foram depositados sobre discos de cenoura crua, desinfestados superficialmente com álcool 70%, hipoclorito de sódio (2,0% de cloro ativo) e lavagem com água destilada estéril; adicionalmente foi realizado “sanduíche” dos tecidos infectados com discos de cenoura. As amostras foram incubadas em gerbox desinfestado a 25 °C por, aproximadamente, 10 dias. Foram realizadas quatro repetições de cinco sanduíches de cenoura com fragmentos de tecido infectados (Figura 2 A). Para o isolamento do patógeno de amostras de solo (Figura 2 B), foram realizadas quatro repetições de aproximadamente 200 g de solo que foram depositados em caixas tipo gerbox, e subsequentemente, nove iscas de cenoura (2 cm x 1 cm) foram colocadas no solo e incubadas a 25 °C por 10 dias. Após esse período, massas de ascósporos (ascósporos) foram transferidas para placas de petri contendo meio EMLA (Extrato-Malte-Levedura-Ágar) acrescido de antibiótico (rifamicina) na concentração de 100 µl mL⁻¹.

Logo em seguida, foi testada a patogenicidade dos isolados, através do teste de patogenicidade em kiwi foram selecionados dois isolados (PA11 e PM01). Foram utilizadas duas plantas para cada cultivar testada (Farroupilha, Monty, Elmwood e Hayward). Os isolados foram transferidos para placas de Petri de 9 cm diâmetro contendo 20 mL de meio de cultura EMLA e mantidos em incubadora com fotoperíodo de 12 horas a 25 °C durante 10 dias. Após esse período, foram adicionados 10 mL de água destilada esterilizada às placas e, após raspagem da superfície da colônia com alça de Drigalski, a suspensão de ascósporos (endoconídios, ascósporos e aleuroconídios) foi filtrada em camada dupla de gaze. A concentração da suspensão de inóculo foi determinada sob microscópio de luz com o auxílio de um hemacitômetro. A suspensão foi calibrada para $2,5 \times 10^6$ esporos mL⁻¹ (LAIA et al., 2000). A inoculação das plantas foi realizada por meio de uma incisão longitudinal superficial no enxerto das plantas de kiwi, com aproximadamente 2 cm de comprimento. A abertura do corte foi feita com auxílio de um estilete e em seguida, foram depositados 500 µl da suspensão de esporos com o auxílio de uma pipeta automática. O ferimento foi coberto com filme de PVC para evitar o secamento e a entrada de outros microrganismos. Para as plantas controle foi empregada água destilada esterilizada no lugar da suspensão de inóculo. Após a inoculação, as plantas foram mantidas em casa de vegetação por 60 dias, em temperatura média de 28°C, quando se procedeu a avaliação.

Para a avaliação, considerou-se apenas o sintoma típico de escurecimento do lenho causado pelo patógeno, quando coloniza o sistema vascular da planta.

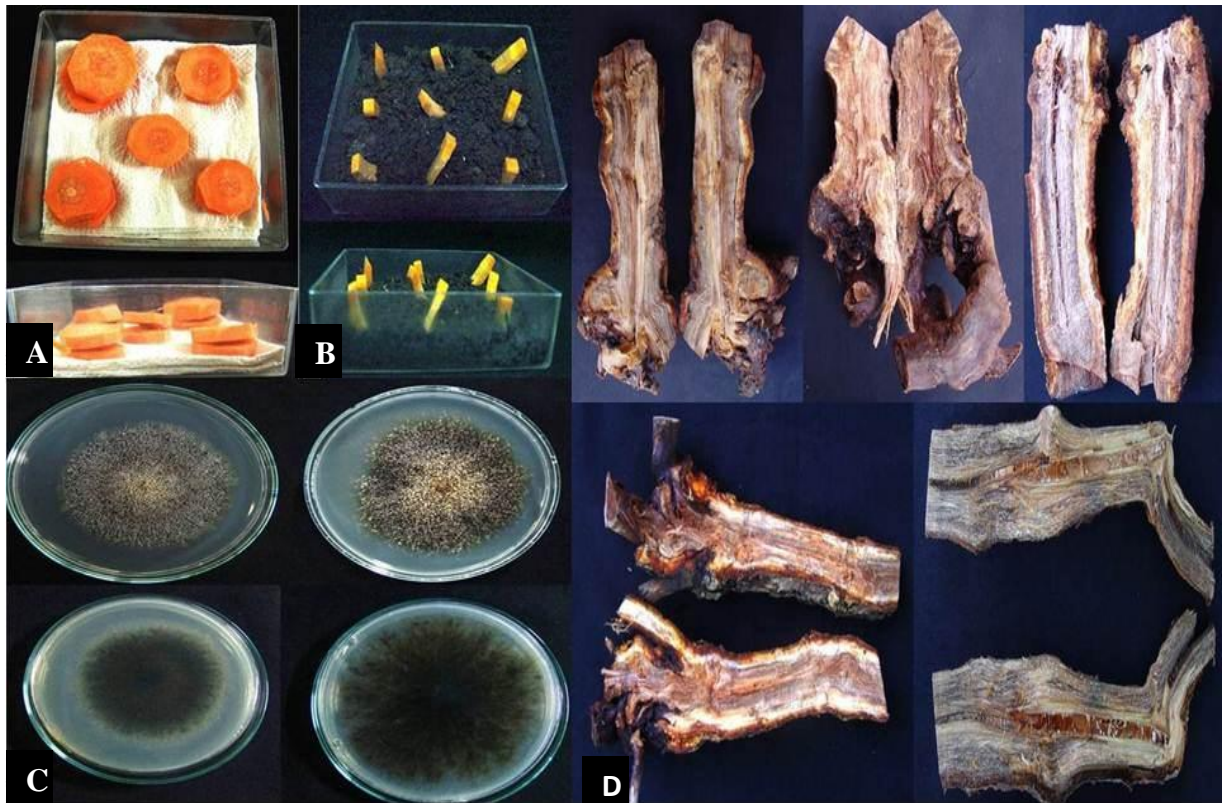


Figura 2 – A) isolamento das amostras de tecido vegetal, utilizando o método “isca de cenoura”; B) isolamento das amostras de solo, utilizando o método “isca de cenoura”; C) Colônia monoascospórica de *Ceratocystis fimbriata* em meio EMLA; D) Escurecimento do lenho de planta de kiwi, sintoma típico da doença causada por *C. fimbriata*.

3.2 Obtenção das culturas monoascospóricas

De cada cultura parental de *C. fimbriata* de 10 dias de idade, crescidas em meio EMLA, foi retirada, com auxílio de uma agulha flambada e resfriada, uma massa de ascósporos de um único peritécio e transferida para outra placa contendo meio ágar-água (20g de ágar e um litro de água destilada) acrescido de antibiótico (rifamicina), na concentração de $100 \mu\text{l mL}^{-1}$. Após a transferência, com auxílio de uma alça de Drigalski esterilizada, a massa de ascósporos foi espalhada em uma placa de petri. Posteriormente, as placas foram incubadas a 25°C no escuro por 24 horas. Após esse período, os ascósporos germinados foram visualizados, perpendicularmente à placa, sob microscópio estereoscópico. Após a visualização dos ascósporos germinados, os endoconídios aderidos à agulha flambada e resfriada foram transferidos para o centro de outra placa de Petri contendo meio EMLA suplementado com antibiótico (rifamicina). As placas foram colocadas novamente para

incubar nas mesmas condições por 15 dias (Figura 2C). Cada isolado foi armazenado em solução salina 0,85% e glicerol 15% a -80 °C.

3.3 Extração de DNA e amplificação por PCR

O micélio dos isolados monoascospóricos (PB01, PB09, PB12, PB14, PB25, PB67, PC03, PC11, PC12, PC16, PC19, PC20, PM08, PM17, PM20, PM25, PM29, PA11, PA12, PA20, PA25, PA29, PA50, PCT01, PCT09, PCT14, PCT28, PG01, PG17, PG21, PG24, PG29, PP01, PP05, PP08, PP14, PL01 e PL11), foi crescido em placas de Petri contendo meio EMLA forradas com papel celofane, incubados à 28 °C por um período que variou de 14 a 21 dias, dependendo do isolado. Após a incubação, extraiu-se o DNA utilizando o kit de extração Wizard Genomic DNA Purification Kit® (Promega Inc.) com as seguintes modificações: inicialmente transferiu-se o micélio para um tubo de 2 mL contendo 200 µL de solução de lise de núcleos. Em seguida, o micélio foi macerado no “Tissuelyser III” (Quiagen®) a 30HZ por 2 min. Posteriormente, incubou-se à -20 °C por 5 min. Após esse período, acrescentaram-se 400 µL de solução de lise de núcleos, e macerou-se novamente no “Tissuelyser III” a 30HZ por 2 min, seguindo-se de uma nova incubação a 65 °C por 15 min. Os tubos foram invertidos a cada 5 min. Em seguida, centrifugaram-se as amostras por 5 min a 13000 rpm. O sobrenadante foi então transferido para um novo tubo de 1,5 mL e as amostras incubadas por 5 min à temperatura ambiente. Após a incubação adicionaram-se 300 µL de solução de precipitação de proteína. Os tubos foram agitados, invertendo-os cuidadosamente, e centrifugados a 13000 rpm por 10 min. Em seguida, transferiram-se 500 µL da fase aquosa (sobrenadante) para um novo tubo de 1,5 mL e adicionaram-se a esse 500 µL de Fenol:Clorofórmio:Álcool Isoamílico (25:24:1) agitando-os cuidadosamente. As amostras foram centrifugadas a 13000rpm por 5 min e a fase superior (aquosa) transferida para um novo tubo de 1,5 mL contendo 600 µL de isopropanol gelado. Após incubar as amostras por 12 horas à -20 °C, procedeu-se uma centrifugação por 7 min a 13000 rpm e o sobrenadante foi descartado. Em seguida, adicionaram-se 600 µL de etanol gelado 70%, agitou-se cuidadosamente os tubos e centrifugou-se as amostras a 13000 rpm por 5 min. Essa etapa de lavagem foi repetida três vezes para remover o etanol. O pellet resultante foi seco à temperatura ambiente. O DNA foi ressuspendido em 50 µL de solução de reidratação de DNA acrescido de 1 µL de solução de RNase e incubado a 37 °C “overnight” e, posteriormente a 65°C por 10 min. O DNA obtido de cada isolado foi quantificado e a concentração ajustada para 10 ng µL⁻¹ utilizando-se o Nanodrop® 2000c (Thermo Fisher Scientific Inc.).

3.3.1 Sequenciamento de DNA e análises molecular

O sequenciamento dos fragmentos de DNA foi realizado usando sequenciador AB 3730xl (Applied Biosystems Inc.). As sequências foram analisadas e editadas usando o software Sequence Navigator (Applied Biosystems Inc.) e, posteriormente, alinhadas usando o Clustal W v.1.5 (THOMPSON et al., 1992) seguido de ajustes manuais no software MEGA 5.00 (TAMURA et al., 2011), quando necessário.

Para as análises filogenéticas, além dos isolados obtidos neste trabalho, foram selecionadas no GenBank (Tabela 2) sequências de DNA dos genes pertencentes ao complexo *C. fimbriata* dentro do clado da América Latina, América do Norte e Ásia.

Foram utilizadas sequências de 30 isolados selecionados no GenBank para o gene estudado, além de uma sequência de *Ceratocystis albofundus*, utilizada como outgroup.

Os métodos da Máxima Parcimônia (MP) e Inferência Bayesiana (IB) foram utilizados para construir as árvores filogenéticas. A análise de Máxima Parcimônia foi realizada no programa PAUP* 4.0b10 (SWOFFORD, 2003) pelo método de busca heurística usando o algoritmo TBR (*Tree Bisection Reconnection*) para troca de ramos. As sequências foram adicionadas pelo método de *stepwise* de forma aleatória com 1000 repetições. A estabilidade dos ramos foi verificada com um *bootstrap* com 1000 repetições. A inferência Bayesiana foi realizada utilizando o programa MrBayes 3.1.2 (Bayesian Inference of Phylogeny) (RONQUIST e HUELSENBECK, 2003). O modelo de substituição foi escolhido com base no critério de informação de Akaike (AIC) do MrModelTest 3.2 (NYLANDER, 2004). A probabilidade *posteriori* (PP) na distribuição de árvores foi criada usando algoritmo MCMC (*Metropolis-coupled Markov Chain Mont Carlo*) de duas cadeias iniciadas a partir de uma árvore ao acaso, com 25 milhões de gerações executadas, sendo descartadas as 25% das primeiras árvores. A convergência do MCMC e o tamanho efetivo da amostra foram checados usando o programa Tracer 1.4 (RAMBAUT e DRUMMOND, 2007). As árvores filogenéticas foram visualizadas e editadas no programa FigTree 1.3.1. (<http://tree.bio.ac.uk/software>).

Tabela 2 – Sequências da região ITS obtidas no Genbank utilizadas para a construção das árvores filogenéticas.

(continua)

Espécies	Isolado	Acesso	Hospedeiro	Local	Referência
<i>C. fimbriata</i>	C1688	AY526291	<i>Mangifera</i>	Brasil	THORPE, D.J. et al.; 2005.
<i>C. fimbriata</i>	C994	AY157964	<i>Mangifera</i>	Brasil	BAKER, et al., 2003
<i>C. fimbriata</i>	C1558	AY157965	<i>Mangifera</i>	Brasil	BAKER, et al.; 2003
<i>C. fimbriata</i>	C1889	HQ157547	<i>Mangifera</i>	Brasil	HARRINGTON, T. C., et al.; 2011.
<i>C. fimbriata</i>	C2055	HQ157548	<i>Mangifera</i>	Brasil	HARRINGTON, T. C., et al.; 2011.
<i>C. cacaofinesta</i>	CMW15051	DQ520636	Cacau	Brasil	VAN WYK, M. et al., 2006.
<i>C. cacaofinesta</i>	CMW14809	DQ520637	Cacau	Brasil	VAN WYK, M. et al., 2006.
<i>C. fimbriata</i>	C1476	EF042607	<i>Ipomoea batatas</i>	EUA	COMPARINI, C., et al., 2009.
<i>C. fimbriata</i>	C1418	AF264904	<i>Ipomoea batatas</i>	Papua Nova Guiné	BARNES, et al., 2001.
<i>C. fimbriata</i>	C1865	AY526286	<i>Colocasia</i>	Brasil	THORPE, D.J. et al., 2005.
<i>C. fimbriata</i>	C1905	AY526288	<i>Colocasia</i>	Brasil	THORPE, D.J., et al., 2005
<i>C. fimbriata</i>	C1926	HQ157541	<i>Colocasia</i>	Brasil	THORPE, D.J., et al., 2005
<i>C. fimbriata</i>	C1914	HQ157540	<i>Colocasia</i>	Brasil	THORPE, D.J., et al., 2005
<i>C. fimbriata</i>	C1782	AY526292	<i>Ficus carica</i>	Brasil	THORPE, D.J., et al., 2005
<i>C. fimbriata</i>	C1857	HQ157542	<i>Ficus carica</i>	Brasil	HARRINGTON, T. C., et al.; 2011.
<i>C. fimbriata</i>	C925	AY157967	<i>Gmelina</i>	Brasil	BAKER, C. J., et al.; 2003.
<i>C. fimbriata</i>	C924	HQ157539	<i>Gmelina</i>	Brasil	BAKER, C.J., et al.; 2003.
<i>C. fimbriata</i>	C1440	HQ157544	<i>Eucalyptus</i> spp.	Brasil	HARRINGTON, T. C., et al.; 2011.

(conclusão)

<i>C. fimbriata</i>	C1442	HQ157545	<i>Eucalyptus</i> spp.	Brasil	HARRINGTON, T. C., et al.; 2011.
<i>C. fimbriata</i>	C1888	HQ157543	<i>Eucalyptus</i> spp.	Brasil	HARRINGTON, T. C., et al.; 2011.
<i>C. neglecta</i>	CMW18194	EF127991	<i>Eucalyptus grandis</i>	Colombia	RODAS, C., et al.; 2008.
<i>C. neglecta</i>	CMW17808	EF127990	<i>Eucalyptus grandis</i>	África do Sul	RODAS, C., et al.; 2008.
<i>C. albofundus</i>	CMW4068	CMW4068	<i>Acacia mearnsii</i>	África do Sul	VAN WYK, M. et al.; 2006.
<i>C. populicula</i>	C89	AY907027	<i>Populus tremuloides</i>	USA	VAN WYK, M. et al., 2006.
<i>C. populicula</i>	C685	AY907028	<i>Populus tremuloides</i>	Canadá	VAN WYK, M. et al., 2006.
<i>C. caryae</i>	C1827	AY907034	<i>Carya ovata</i>	USA	JOHNSON, J. A.; et al., 2005.
<i>C. caryae</i>	C1829	AY907035	<i>Carya cordiformis</i>	USA	JOHNSON, J. A.; et al., 2005.
<i>C. smalleyi</i>	C684	AY907030	<i>Carya cordiformis</i>	USA	JOHNSON, J. A.; et al., 2005.
<i>C. smalleyi</i>	C1410	AY907031	<i>Carya cordiformis</i>	USA	JOHNSON, J. A.; et al., 2005.
<i>C. pirilliformis</i>	CMW6579	AF427105	<i>Eucalyptus nitens</i>	Austrália	BARNES, I.; et al., 2003.
<i>C. pirilliformis</i>	CMW6574	AF427106	<i>Eucalyptus nitens</i>	Austrália	BARNES, I.; et al., 2003.

3.4 Caracterização morfológica

Características morfométricas como dimensões, forma, presença de endoconídios primário e secundário, endoconidióforos primários e secundários, entre outras, foram utilizadas para caracterização dos isolados em estudo. Para isto, foi selecionado um isolado monoascospóricas de cada grupo de genótipos de ITS obtidos pelas análises filogenéticas (PM08, PP08, PC03 e PB01) cultivado em placas de Petri contendo meio EMLA acrescido de antibiótico (rifamicina). Posteriormente, as placas foram incubadas a 25 °C por 20 dias. Foram utilizadas quatro placas de cada isolado.

O comprimento e a largura dos ascósporos, hifa ostiolar, ascósporos, endoconídios, endoconidióforos e aleuroconídios foram mensurados sob microscópio (Olympus BX41, software de captura de imagem Images Plus 2.0) e as médias e amplitudes das mensurações foram empregadas para identificação dessas espécies, sendo mensuradas trinta estruturas para cada característica taxonômica por isolado. Foram calculadas para cada estrutura o mínimo e o máximo, e estes são apresentados como mínimo-máxima.

3.5 Crescimento micelial em diferentes temperaturas

Para a avaliação do crescimento micelial, foram utilizados os mesmos isolados da identificação morfológica, ou seja, foi selecionado um isolado monoascospóricas de cada grupo de genótipos de ITS (PM08, PP08, PC03 e PB01). A avaliação foi realizada em diferentes temperaturas e meio EMLA acrescido de antibiótico (rifamicina) na concentração de 100 µl mL⁻¹. Discos de cultivo de 3 mm de diâmetro foram retirados das bordas dessas colônias crescida em meio MEA por 15 dias e transferidas para placas de 6 cm de diâmetro, contendo 5 mL de meio EMLA. As placas foram mantidas a temperatura de 15, 20, 25, 30 e 35 °C, por um período de 15 dias, efetuando-se avaliações a cada três dias.

Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado com cinco repetições para cada temperatura testada. Realizou-se análise de regressão polinomial, onde foram testados os modelos linear, quadrático e cúbico, sendo selecionado para explicar os resultados, o modelo significativo de maior ordem utilizando-se o software *Assistat 7.6* Betas (SILVA, 2011).

3.6 Avaliação da especialização por hospedeiro e resistência de kiwi e de clones de *Eucalyptus* spp. a *Ceratocystis fimbriata*

Para a avaliação da especialização por hospedeiro dos isolados de *C. fimbriata*, foram utilizados quatro clones híbridos de *Eucalyptus* spp. (Tabela 3) e três cultivares de kiwi. As mudas clonais foram produzidas em tubetes e, com aproximadamente, 70 dias de idade, foram transplantadas para sacos plásticos, com capacidade de 2 L, contendo substrato comercial (mistura de turfa sphagno, vermiculita, calcário, gesso agrícola e NPK). As cultivares de kiwi utilizadas para o teste foram Monty, Elmwood e Hayward. Mudas enxertadas foram produzidas em sacos plásticos de 2 L de capacidade, e inoculadas com 13 meses de idade. A inoculação foi realizada 60 dias após o transplante.

Os isolados selecionados (PB01, PC03, PP08 e PM08) foram transferidos para placas de Petri contendo 20 mL de meio de cultura EMLA e mantidos em incubadora com fotoperíodo de 12 horas a 25°C durante 10 dias. Após esse período, foram adicionados 10 mL de água destilada esterilizada às placas e, após a raspagem da superfície da colônia com alça de Drigalski, a suspensão de ascósporos (endoconídios, ascósporos e aleuroconídios) foi filtrada em camada dupla de gaze. A concentração da suspensão de inóculo foi determinada sob microscópio de luz com o auxílio de um hemacitômetro. A suspensão foi calibrada para $2,5 \times 10^6$ esporos mL⁻¹ (LAIA et al., 2000). A inoculação das plantas foi realizada por meio de uma incisão transversal superficial no caule de, aproximadamente, 2 cm de comprimento no enxerto, para as plantas de kiwi e de 5 cm acima da área do coleto para as plantas de *Eucalyptus* spp. A abertura do corte foi feita com auxílio de um estilete e em seguida, foram depositados 500 µl da suspensão de esporos com o auxílio de uma pipeta automática. O ferimento foi coberto com filme de PVC para evitar o secamento e a entrada de outros microrganismos. Para as plantas controle foi utilizada água destilada esterilizada no lugar da suspensão de inóculo. Após a inoculação, as plantas foram mantidas em casa de vegetação por 60 dias em temperatura média de 28 °C, quando se procedeu a avaliação.

Tabela 3 – Clones de *Eucalyptus* spp. inoculados com os isolados de *Ceratocystis fimbriata* obtidos de kiwi.

Clone	Espécie
32864*	<i>Eucalyptus saligna</i>
37423	<i>E. urophylla</i> X <i>E. globulos</i>
35878	<i>E. urophylla</i> X <i>E. grandis</i>
Muda seminal	<i>Eucalyptus dunnii</i>

*Híbridos com polinização não controlada com apenas mãe conhecida.

Para a avaliação da severidade, considerou-se a altura das plantas e o comprimento das lesões (sintoma típico de escurecimento do lenho causado pelo patógeno, quando coloniza o sistema vascular da planta). Com esses dados, calculou-se a severidade (percentagem de tecido doente), conforme descrito por Oliveira (2010), dado pela equação;

$$S (\%) = CL \times HP^{-1} \times 100,$$

Onde:

S = severidade

CL = comprimento da lesão e

HP = altura da planta.

Para a classificação da resistência genética, utilizou-se a medida do comprimento médio das lesões. As médias obtidas para cada combinação entre as cultivares de kiwi, clones de eucalipto e isolados foram agrupadas conforme a descrição de Mafia et al. (2011), que utilizaram o comprimento médio da lesão, de acordo com as classes:

- altamente resistente (0,1 - 3,0 cm),
- resistente (3,1 - 6,0 cm),
- moderadamente resistente (6,1 - 9,0 cm),
- moderadamente suscetível (9,1 - 12,0 cm),
- suscetível (12,1 - 15,0 cm) e
- altamente suscetível (> 15,1 cm).

3.6.1 Delineamento experimental e análises

Para a avaliação da severidade, o experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial composto de dois fatores (hospedeiro X isolado). No teste de resistência, o experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial composto de dois fatores (kiwi X isolado e *Eucalyptus* spp. X isolado). Utilizou-se cinco repetições, sendo que cada planta representou uma unidade amostral. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e o teste de comparação de médias utilizado foi o teste de Tukey a 5% de significância, utilizando-se o software *Assistat* 7.6 Beta (SILVA, 2011).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização sintomatológica da doença, coleta de amostras, isolamento e teste de patogenicidade

Nos pomares de kiwi visitados (Figura 1 e Tabela 1) foram observados sintomas típicos da doença causada por fungos do gênero *Ceratocystis*. Na parte aérea, estes sintomas foram murcha, amarelecimento e seca dos ramos (Figura 3 F). As folhas perdem a turgidez, ocorrendo o enrolamento e o secamento, permanecendo aderidas aos ramos, esses sintomas se processam rapidamente (Figura 3 F), mesmo após a morte da planta (Figura 3 D). Nos tecidos lenhosos, observou-se a presença de lesões necróticas, resultantes da penetração do fungo através de ferimentos provocados, provavelmente durante as práticas de poda, limpeza do solo, rebrota e colheita de frutos. As lesões sobre a casca, de coloração marrom clara, iniciaram-se a partir do ferimento estendendo-se até as ramificações dos galhos, assumindo, normalmente, uma coloração escura, de onde se observou, algumas vezes, a exsudação de um líquido escuro em decorrência da colonização dos tecidos internos por *Ceratocystis fimbriata* (Figura 3 C). Na região do lenho, as lesões apresentaram coloração castanha avermelhada (Figura 3 A e B) no sentido radial do lenho. Nos pomares, as plantas doentes estavam distribuídas em linhas. Como sintoma reflexo, a doença, também provocou a redução no tamanho e quantidade de frutos (Figura 3 F), resultando também, em perda de qualidade.

Esses sintomas relatados acima também foram evidenciados quando os isolados PA11 e PM01 foram inoculados (Figura 4 A e B) nas diferentes cultivares de kiwi, mostrando murcha apical (Figura 4 C) e escurecimento do lenho (Figura 4 D e E).



Figura 3 – Sintomas causados por *Ceratocystis fimbriata* em plantas de kiwi na região de Farroupilha - RS. A) escurecimento do sistema vascular de raízes; B) escurecimento radial do lenho; C) cancro; D) planta morta devido a doença; E) planta sadia; F) redução da qualidade dos frutos e sintomas de murcha, amarelecimento e seca dos ramos infectados por *C. fimbriata*.

Em estudos realizados com outras espécies de plantas atacadas pelo gênero *Ceratocystis*, também foram verificados sintomas semelhantes aos observados em pomares de kiwi. Na doença murcha-de-ceratocystis em *Eucalyptus* spp., o fungo coloniza o xilema e, em seguida, as células do parênquima radial, culminando com o escurecimento dos tecidos infectados, murcha e morte da planta inteira ou de seus ramos (ALFENAS et al., 2009). Também foi observado por Ferreira et al. (1999) em eucaliptos, sintomas típicos de escurecimento radial que são observados em seções transversais ao longo do caule infectado, o escurecimento do xilema pode se estender por longas distâncias a partir das raízes, chegando até mesmo na parte aérea. Bastos e Evans (1978) estudando a doença em cacauieiro (*Theobroma cacao* L.) constataram os sintomas de murcha e escurecimentos do lenho ao realizar um corte na parte afetada, e observaram que os tecidos apresentam uma coloração que varia de roxa à púrpura. Santos (2004), estudando o gênero *Ceratocystis* em acácia-negra (*Acacia mearnsii* De Wild.) observou sintomas de murcha seguida da morte das árvores, e quando os caules são cortados transversalmente, observaram-se estrias internas de cor marrom no cerne. Em outro estudo realizado por Albuquerque et al. (1972) em seringueira (*Hevea*

brasiliensis), os sintomas apresentam-se de forma diferente das outras espécies lenhosas citadas acima, caracterizando-se por renovação desuniforme da casca, permanecendo parte do caule com o lenho exposto em alternância com o tecido renovado; desenvolvimento de camada branca acinzentada semelhante a mofo, sobre os tecidos mais jovens em franca regeneração.



Figura 4 – Sintomas observados quando mudas de kiwi foram inoculadas com isolados de *Ceratocystis fimbriata*, A) planta testemunha (esquerda) e planta inoculada (direita); B) Sintoma de murcha apical ocasionada pela inoculação; C) planta testemunha; D) sintomas de escurecimento do lenho causado por *C. fimbriata*.

4.2 Obtenção das culturas monoascospóricas

Foram obtidos 38 isolados monoascospóricas, sendo seis isolados dos pomares Althoraus (PA), Bohn (PB) e Colussi (PC); cinco isolados dos pomares Girelli (PG) e Miguel

(PM); quatro isolados dos pomares Pasa (PP) e Contini (PCT), e dois isolados do pomar Lodi (PL). Das amostras de solo não foi obtido nenhum isolado.

4.3 Caracterização molecular dos isolados

Os produtos amplificados com os oligonucleotídeos ITS 1 e ITS 2, apresentaram aproximadamente 683 pares de bases para os isolados em estudo. O alinhamento ITS continha 69 táxons incluindo a sequência *outgroup*, 683 caracteres foram usados nas análises filogenéticas, destes, 482 foram conservadas, 147 foram de parcimônia-informativa e 180 foram variáveis. O melhor método evolucionário selecionado pelo Mrmodeltest 2.3 para a Análise Inferência Bayesiana pelo método AIC foi HKY + I + G e os parâmetros I + G com os valores 0,4381 e 0,7045, respectivamente.

A árvore filogenética para a região gênica estudada, tanto pelo método de Máxima Parcimônia (Figura 5) quanto pela Inferência Bayesiana (Figura 6), apresentou a mesma topologia, com os isolados em estudo agrupando-se com isolados brasileiros de *C. fimbriata* de mangueira, eucaliptos, gmelina, fícus e com isolados de *C. cacaofunesta*, *C. neglecta* de eucalipto, da Colômbia, e *C. fimbriata* S.S. de batata doce, pertencente ao clado da América Latina. Portanto, de acordo com as sequências de ITS r-DNA analisadas, os isolados de *C. fimbriata* de kiwi pertencem ao clado da América Latina. Ainda de acordo com essas análises verificou-se a existência de quatro grupos genótipos de ITS, sendo que o grupo A foi composto pelo maior número de isolados, e foi sustentado por um ramo com valor alto de *bootstrap* (98) e nenhum valor de suporte de PP. O grupo B e D não apresentaram nenhuma sustentação de ramo. O grupo C genótipo de ITS apresentou valor moderado de PP (0,82) e nenhum valor de *bootstrap*. Também, foi observado que dentro do clado, que os isolados do genótipo do grupo A agruparam-se distantes dos outros genótipos. O genótipo do grupo B agrupou-se próximo aos isolados de Eucalipto da Bahia, o genótipo do grupo C agrupou-se próximo ao isolado *Colocasia* do Rio de Janeiro e São Paulo, enquanto que o genótipo do grupo D mais próximo dos isolados de mangueira de São Paulo e Rio de Janeiro.

Os resultados obtidos no presente estudo, corroboram com outras pesquisas em diversas espécies cultivadas no Brasil como, *Gmelina arborea*, *Colocasia esculenta*, *Ficus carica*, *Eucalyptus* spp., e *Mangifera indica* realizado por Harrington et al. (2011), que concluíram que os 61 isolados em estudo pertencem ao clado da América Latina. Também a região ITS r- DNA é suficiente para determinar o clado pertencente dos isolados *C. fimbriata*, conforme Harrington et al. (2011), devido aos seus *indels* hipervariáveis, especialmente na

região ITS1. Outros genes como Fator de alongação (*EFL*) e Beta-tubulina (*βt*) vem sendo utilizados para separação de espécies dentro do complexo *C. fimbriata* (RODAS et al., 2008; VAN WYK et al., 2009; VAN WYK et al., 2010_a), porém estes genes não possuem resolução suficiente para separar espécies do complexo *fimbriata* dentro do clado da América Latina, principalmente para a população brasileira de *C. fimbriata* (VALDETARO, 2012).

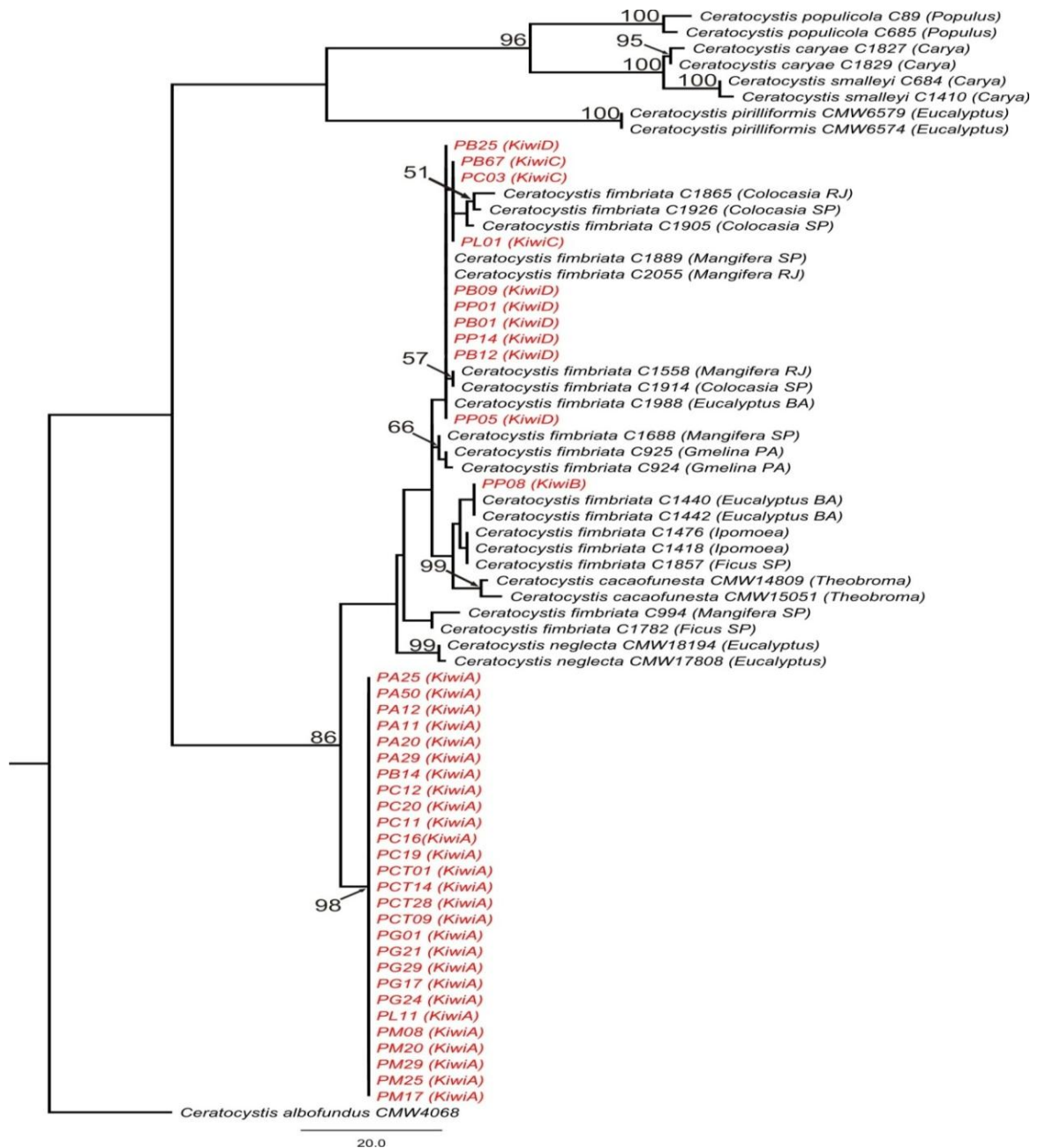


Figura 5 – Uma das 100 árvores mais parcimoniosas baseada nas sequências ITS-rDNA de isolados de *Ceratocystis* sp. com os valores de Bootstrap e *Ceratocystis albofundus* como outgroup. A identificação dos isolados e do hospedeiro/local (entre parênteses) está indicada à frente do nome da espécie. As barras indicam a fração de substituição por sítios.

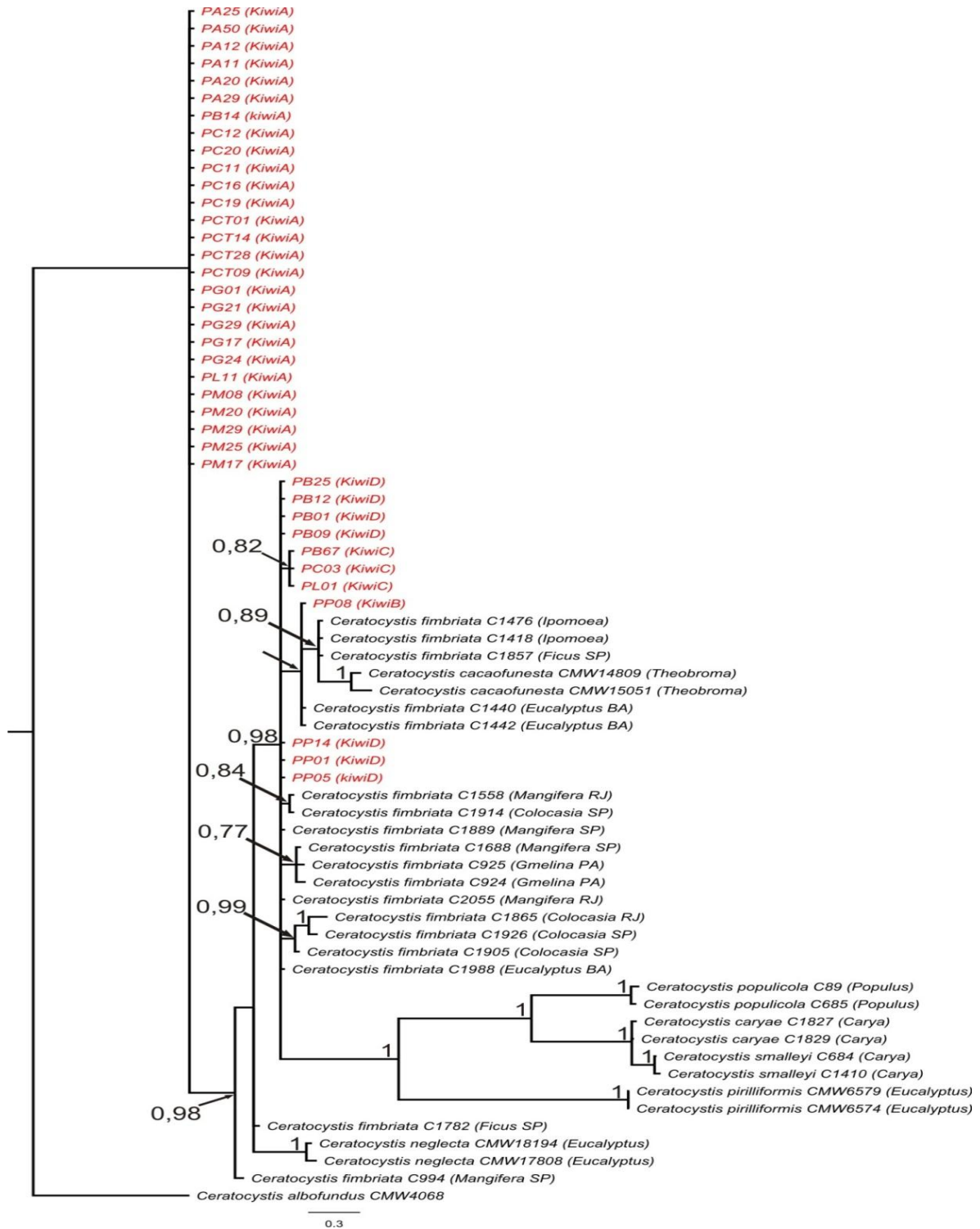


Figura 6 – Árvore baseada nas sequências ITS-rDNA de isolados de *Ceratocystis* sp. pelo método Inferência Bayesiana. Com valores das probabilidades a posteriori (pp). Com os valores de *Bootstrap* e *Ceratocystis albofundus* como *outgroup*. A identificação dos isolados e do hospedeiro/local (entre parênteses) está indicada à frente do nome da espécie. As barras indicam a fração de substituição por sítios.

4.4 Caracterização morfológica

Quatro isolados monoascospóricas foram utilizados para a avaliação morfométrica e do crescimento micelial. O período para o desenvolvimento de peritécio/endoconídios em meio EMLA foi de 15 dias.

De acordo com as características morfológicas, observou-se que as colônias dos isolados em estudo apresentaram odor de “banana”, característico do gênero *Ceratocystis*. Verificou-se que os isolados podem ser divididos em dois grupos, com base nas características morfológicas, os que apresentam endoconídio primário e secundário (genótipo do grupo C e D) e os que apresentam apenas endoconídio primário (genótipo do grupo A e B). As colônias apresentaram cor escura e na extremidade uma coloração mais clara (Figura 2 C).

O genótipo do grupo A (Figura 8) apresentou peritécio de forma globosa, aéreo e submerso no meio de cultura, coloração escura, de comprimento 94-256 μm , pescoço reto de mesma coloração da base, comprimento 348-635 μm , a hifa ostiolar divergente, sem septo, hialina, divergente, comprimento 49-93 μm . Ascósporos hialinos, em forma de elipse, comprimento 4-6 μm . Endoconidióforo primário catenulado, hialino, de forma reta, comprimento 43-177 μm ; endoconídios primários de forma cilíndrica, hialina, asseptado, comprimento 10-24 μm . Aleuroconídio ocorrem sozinhos ou em cadeias curtas, apresentam coloração marrom escuro, forma globosa a piriforme, de parede espessa, comprimento 9-16 μm .

Habitat: Actinidia deliciosa

Distribuição conhecida: Estado do Rio Grande do Sul, Brasil.

Material utilizado para a descrição morfológica: Município de Farroupilha, Rio Grande do Sul, amostra de tecido vegetal de *Actinidia deliciosa* infectados, 2010, G. Piveta, M. F. B. Muniz e A. C. Alfenas, 27 isolados.

Os resultados mostraram que o genótipo do grupo B (Figura 9) apresentou peritécio de forma globosa, submerso no meio de cultura, coloração escura, comprimento 187-343 μm . Pescoço de forma reta, comprimento 380-781 μm ; encerrando em hifas ostiolar divergentes, hialinas com comprimento 67-97 μm . Ascósporos hialinos, forma globosa a elíptico, comprimento 4-7 μm . Endoconidióforo primário de forma reta, mais larga na base, afinando em direção ao ápice, comprimento 25-119 μm ; endoconídio primário catenulado, de forma cilíndrica, hialina, asseptado, comprimento 11-22 μm . Aleuroconídios apresentam paredes espessas, coloração castanha a marrom escura, forma globosa a subglobosa, comprimento 11-16 μm , ocorrendo em cadeias curtas e longas.

Habitat: Actinidia deliciosa

Distribuição conhecida: Estado do Rio Grande do Sul, Brasil.

Material utilizado para a descrição morfológica: Município de Farroupilha, Rio Grande do Sul, amostra de tecido vegetal de *Actinidia deliciosa* infectados, 2010, G. Piveta, M. F. B. Muniz e A. C. Alfenas, um isolado.

O genótipo do grupo C (Figura 10) exhibe peritécio de forma globosa, submerso ou superficial no meio de cultura, coloração escura, comprimento 67-192 μm . Pescoço de forma reta, comprimento 584-638 μm , encerrando em hifa ostiolar divergente, hialina com comprimento 35-79. Ascósporo hialino, em forma de globoso, comprimento 3-6 μm . Endoconidióforo primário hialino, forma reta, mais fina na base, alargando em direção ao ápice, comprimento 41-97 μm ; endoconídio primário catenulado, de forma cilíndrica, hialina, asseptado, comprimento 9-24 μm . Apresentando também endoconidióforo secundário hialino, de forma reta, mais fina na base, alargando em direção ao ápice, comprimento 33-105 μm ; endoconídio secundário catenulado, hialino, forma barriliforme, comprimento 5-12 μm . Os aleuroconídios apresentam paredes espessas, coloração castanha a marrons, catenulado, forma globosa a piriforme, comprimento 11-18 μm .

Habitat: Actinidia deliciosa

Distribuição conhecida: Estado do Rio Grande do Sul, Brasil.

Material utilizado para a descrição morfológica: Município de Farroupilha, Rio Grande do Sul, amostra de tecido vegetal de *Actinidia deliciosa* infectados, 2010, G. Piveta, M. F. B. Muniz e A. C. Alfenas, três isolados.

No genótipo do grupo D (Figura 11), o peritécio apresentou-se de forma submersa e/ou aérea no meio de cultura, com forma globosa a piriforme, coloração escura, comprimento 87-156 μm . Pescoço de forma reta, comprimento 305-518 μm , encerrando em hifas ostiolar divergentes, hialinas, com comprimento 37-80 μm . Ascósporos hialinos, com formato globoso, comprimento 4-5 μm o endoconidióforo primário apresentou-se de forma reta, mais larga na base, afinando em direção ao ápice, comprimento 43-89 μm ; endoconídio primário catenulado, de forma cilíndrica, hialina, asseptado, comprimento 8-24 μm . Os endoconidióforos secundários são hialinos, de forma reta, de mesmo comprimento na base e no ápice, comprimento 45-84 μm . Endoconídio secundário catenulado, forma barriliforme, comprimento 5-10 μm . Os aleuroconídios apresentam paredes espessas, catenulado, coloração castanha a marrom escura, forma globosa, comprimento 10-17 μm .

Habitat: Actinidia deliciosa

Distribuição conhecida: Estado do Rio Grande do Sul, Brasil.

Material utilizado para a descrição morfológica: Município de Farroupilha, Rio Grande do Sul, amostra de tecido vegetal de *Actinidia deliciosa* infectados, 2010, G. Piveta, M. F. B. Muniz e A. C. Alfenas, sete isolados.

A ausência de endoconidióforo e endoconídio secundário nos isolados do genótipo do grupo A e B podem ser ecologicamente significativas, pois pequenas diferenças morfológicas podem ser o resultado que provém dos cruzamentos, separação geográfica ou ocorrência da especialização por hospedeiros, portanto, o estudo de morfologia é uma ferramenta importante para diagnóstico de espécies (ENGELBRECHT e HARRINGTON, 2005). As pequenas diferenças morfológicas, mas significativas encontradas entre os isolados em estudo enfatizam ainda mais a divergência dessas linhagens. Em estudo realizado por Van Wyk et al. (2007) com isolados de *C. fimbriata* obtidos de mangueira de países como Sultanato de Omã e República Islâmica do Paquistão, são descrito como nova espécie, *C. manginecans*, com base na identificação de conídios secundários em forma barriliforme, pois os isolados obtidos da batata-doce não produzem conídios em forma barriliforme (ENGELBRECHT & HARRINGTON, 2005), mas estas características podem ser variável entre os isolados do clado Latino-Americana de *C. fimbriata*.

A descoberta de um número relativamente grande de novas espécies do gênero *Ceratocystis* spp. (KILE 1993; ROUX e WINGFIELD, 2009), mostra que este não é um grupo bem conhecido, refletindo fortemente o fato de que esse gênero têm sido pouco estudado. Suas descobertas em diversos hospedeiros melhoram a compreensão da diversidade do gênero, e sua descrição aumenta o entendimento do grupo de novas espécies, as quais são ecologicamente importantes.

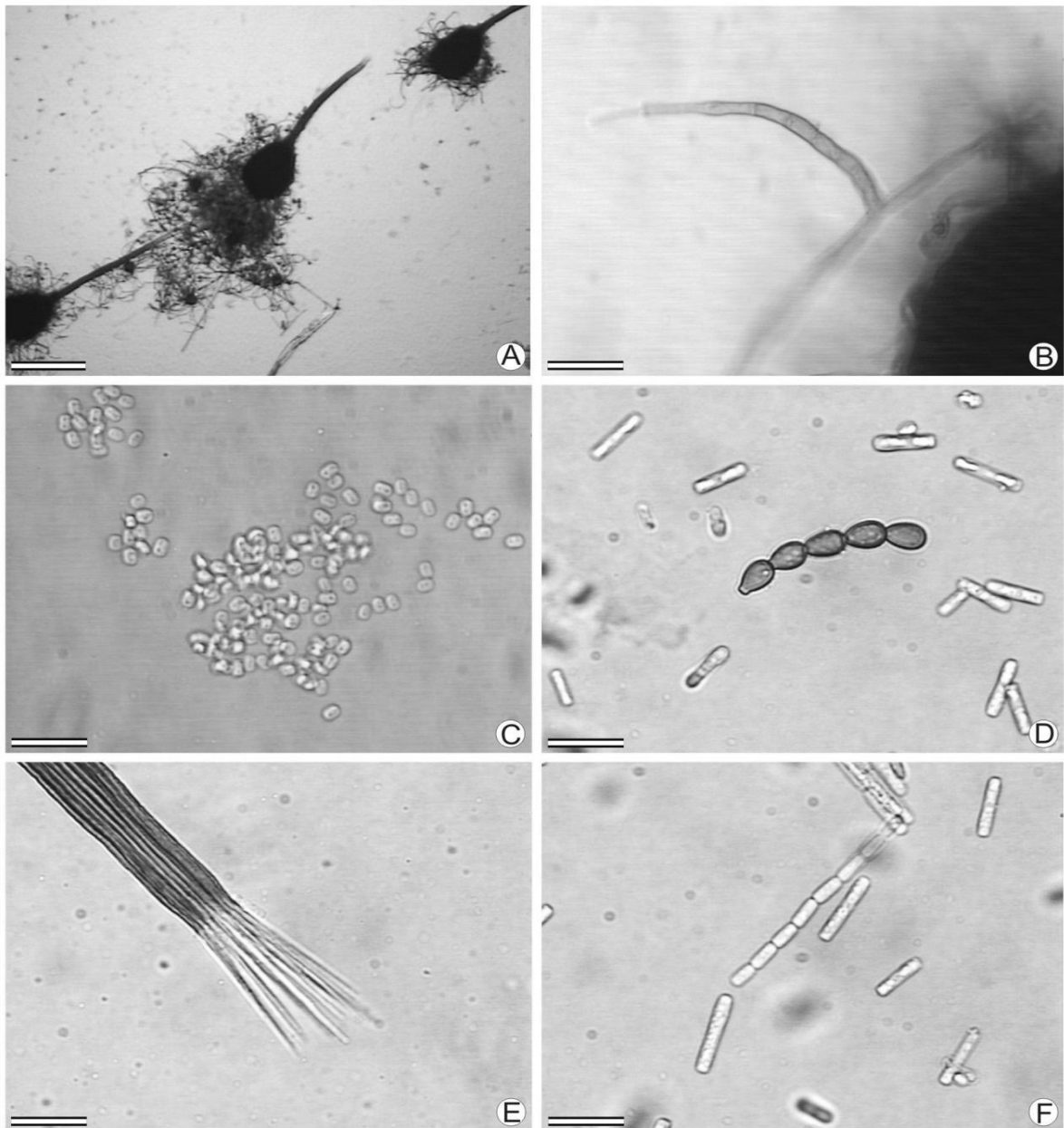


Figura 7 – Características morfológicas do genótipo do grupo A: A) peritécio; B) endoconidióforo primário; C) ascósporo; D) aleuroconídios; E) hifa ostiolar divergente; F) endoconídio primário. Barras: A = 400 μm ; B, C, D, E, F = 40 μm .

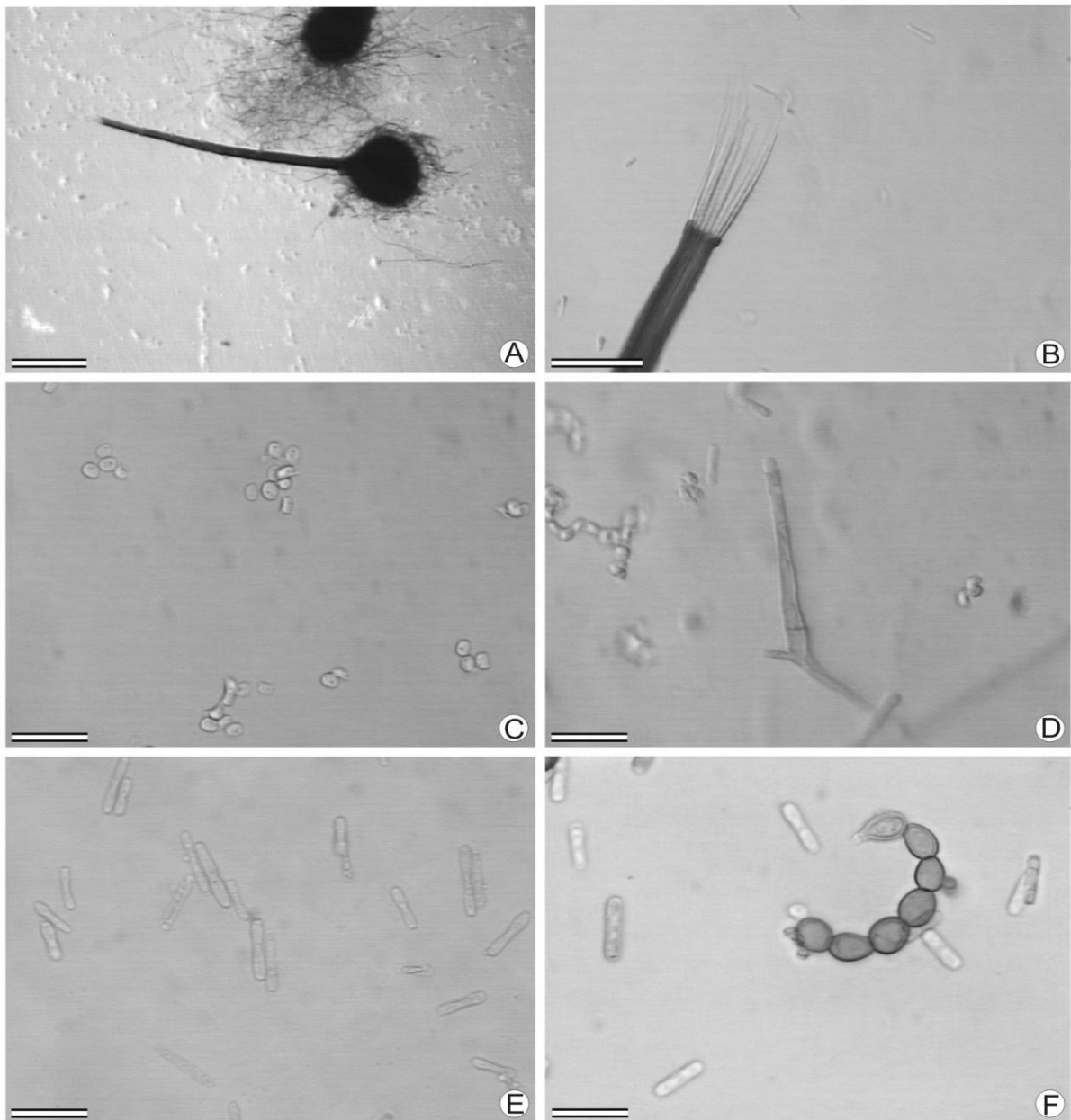


Figura 8 – Características morfológicas do genótipo do grupo B: A) peritécio; B) hifa ostiolar divergente; C) esporos; D) endoconidióforo primário; E) endoconídeo primário; F) aleuroconídeo. Barras: A = 400 μm ; B = 100, C, D, E, F = 40 μm .

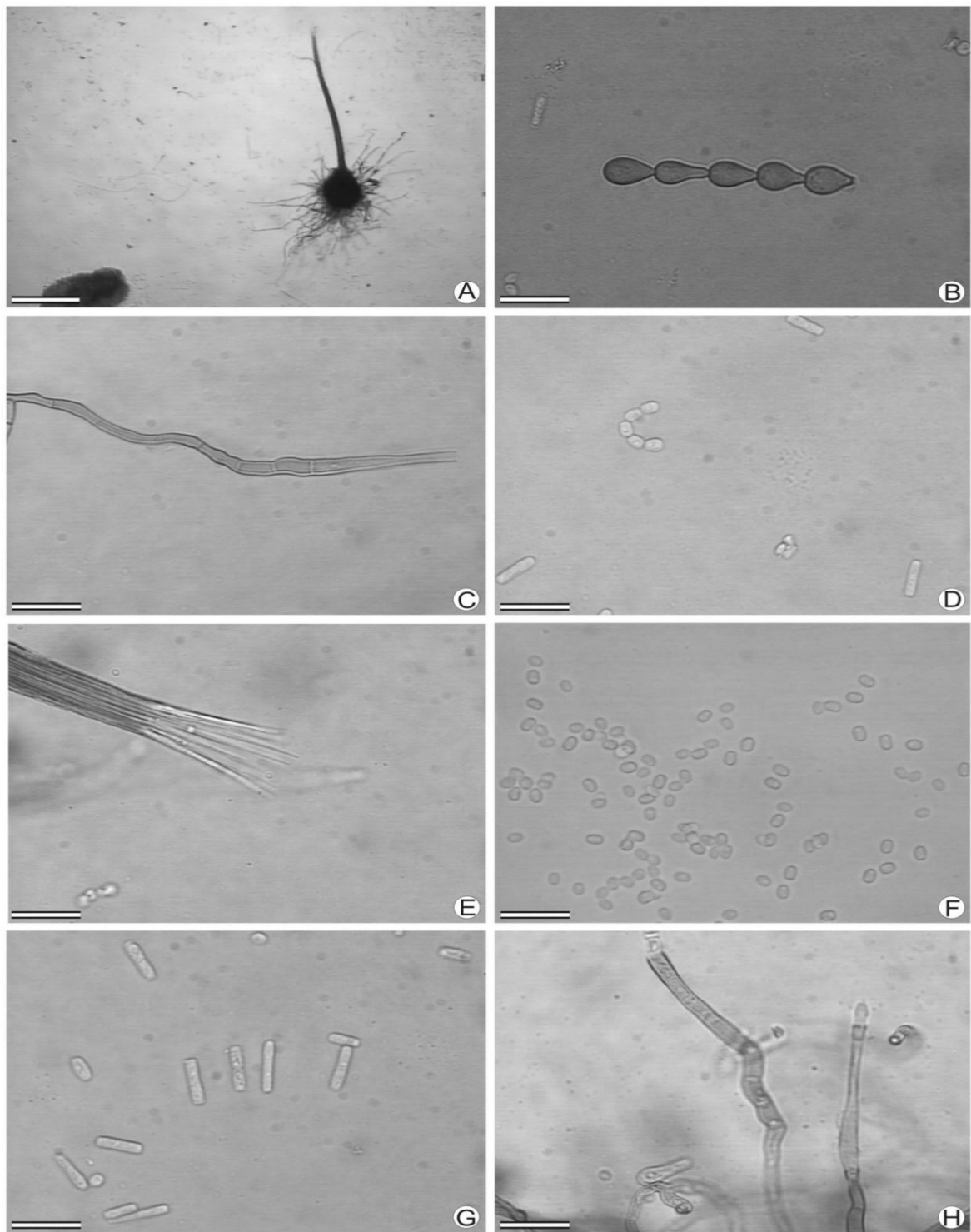


Figura 9 – Características morfológicas do genótipo do grupo C: A) peritécio; B) aleuroconídio; C) endoconidióforo primário; D) endoconídio secundário; E) hifa ostiolar divergente; F) esporos; G) endoconídio primário; H) endoconidióforo secundário. Barras: A = 400 μm ; B, C, D, E, F, G, H = 40 μm .

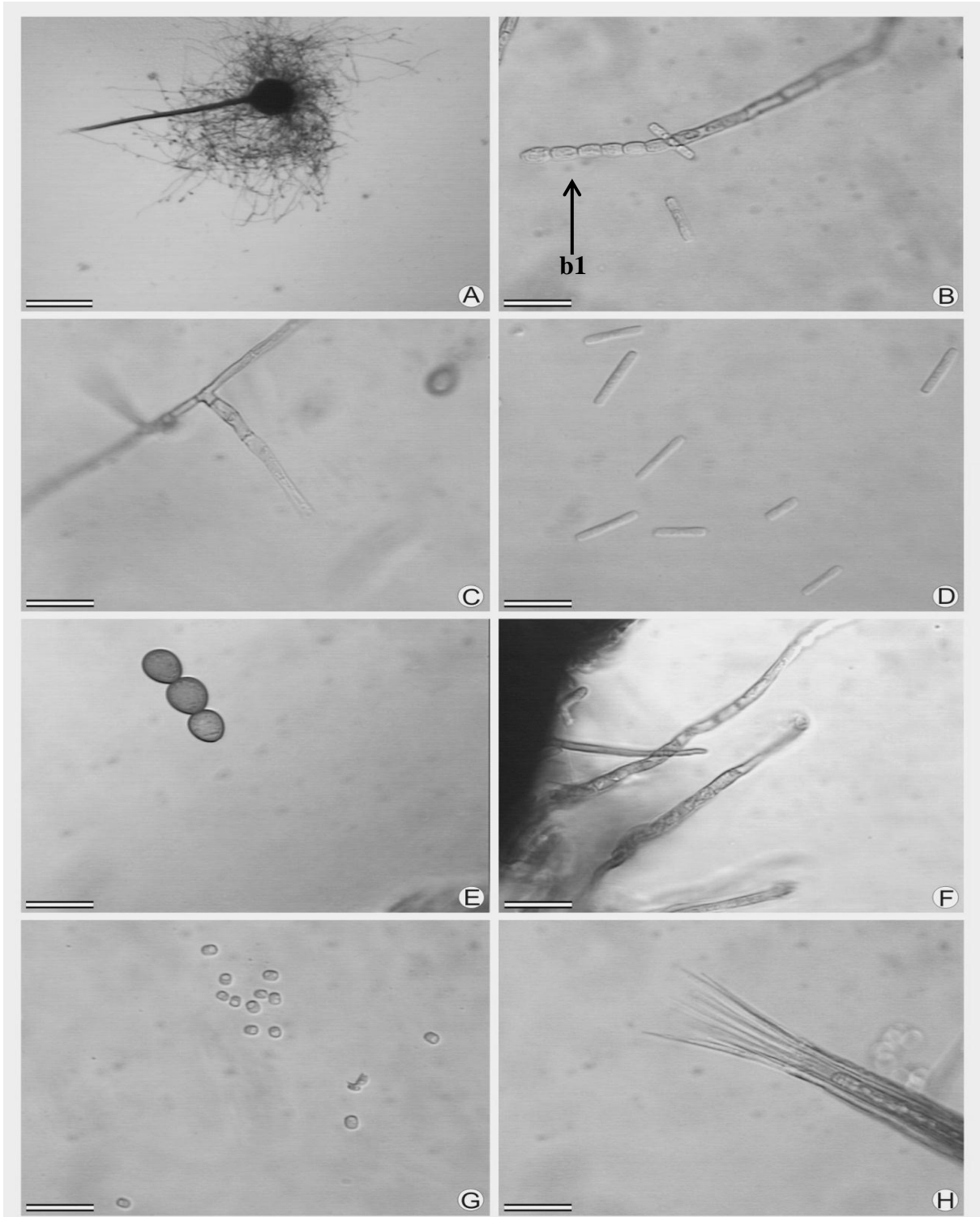


Figura 10 – Características morfológicas do genótipo do grupo D: A) peritécio; B) endoconidióforo secundário, b1) endoconídio secundário; C e F) endoconidióforo primário; D) endoconídio primário; E) Aleuroconídios; G) esporos; H) hifa ostiolar divergente. Barras: A = 400 μm ; B, C, D, E, F, G, H = 40 μm .

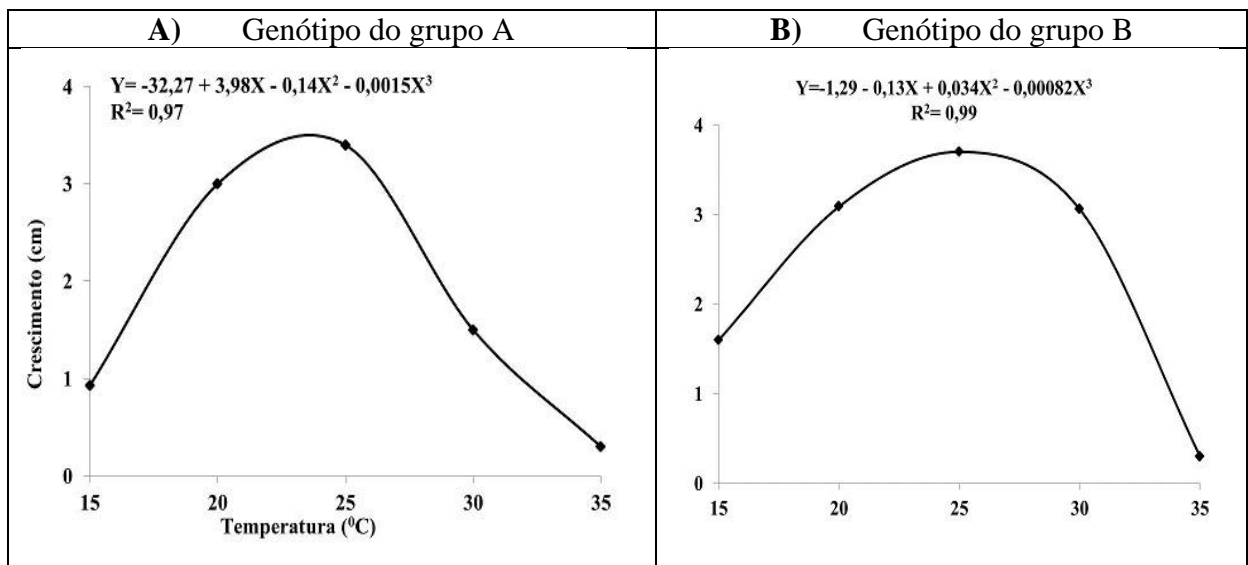
4.5 Crescimento micelial em diferentes temperaturas

A temperatura ideal para o crescimento do patógeno foi entre 20-25 °C. Na temperatura de 35 °C, não ocorreu crescimento micelial, independente do isolado em estudo, portanto, essa temperatura não favoreceu o desenvolvimento patógeno. Verificou-se que cada isolado do estudo apresenta uma temperatura ideal para o seu desenvolvimento (Figura 7).

Nos trabalhos realizados com isolados do gênero *Ceratocystis*, a temperatura utilizada para o crescimento *in vitro* tem sido 28 °C (RIBEIRO et al., 1987; ZAUZA et al., 2004; OLIVEIRA, 2010). Assim, esse estudo contribui para um estudo mais preciso da temperatura ideal para o crescimento e desenvolvimento do gênero *Ceratocystis*.

Em estudo realizado por Oliveira et al. (2011) com diferentes isolados de *C. fimbriata* obtidos de *Eucalyptus* spp., os autores concluíram que o melhor crescimento ocorre na temperatura de 25 °C. Van Wyk et al. (2010b) estudando isolados do gênero *Ceratocystis* presentes no Equador, obtiveram o melhor crescimento à 25 °C, e também observaram que os isolados não se desenvolveram quando utilizaram a temperatura de 35 °C. Em outro estudo, realizado por Van Wyk et al. (2010a), foi concluído que a temperatura ideal para o incremento do gênero *Ceratocystis*, na Colômbia, é de 25 °C.

(Continua)



(conclusão)

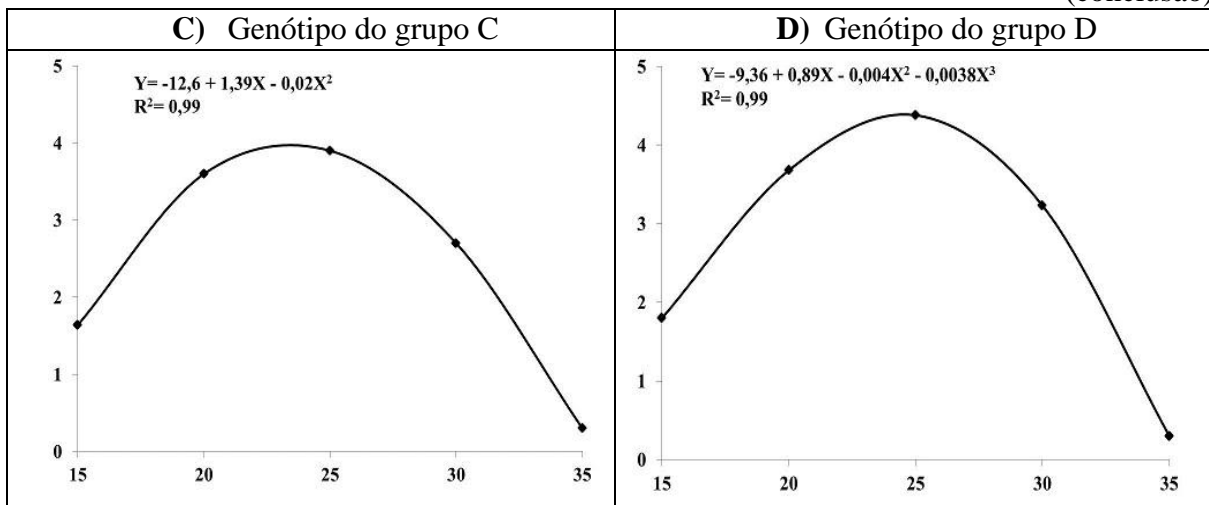


Figura 11 – Crescimento micelial médio (cm). A) genótipo do grupo A; B) genótipo do grupo B; C) genótipo do grupo C e D) genótipo do grupo D.

4.6 Avaliação da especialização por hospedeiro e resistência genética em clones de eucalptos e kiwi a *Ceratocystis fimbriata*

Na Tabela 4 apresentam-se as médias de severidade (%) para cada combinação de isolado de *Ceratocystis fimbriata* X hospedeiro. Os isolados de *C. fimbriata* apresentaram diferentes níveis de agressividade e variaram de acordo com as cultivares de kiwi e clones de *Eucalyptus* spp. A interação isolados e hospedeiro foi significativa, confirmando que os isolados não são hospedeiros-específicos. Harrington et al. (2011) verificaram que isolados brasileiros variam amplamente em agressividade para diferentes hospedeiros, mas não mostram forte especialização com o hospedeiro. Os resultados obtidos por Oliveira (2010) também mostram que há diferentes níveis de agressividade entre isolados de *C. fimbriata* oriundos de clones de *Eucalyptus* sp. no Brasil.

As plantas utilizadas como testemunha, inoculadas com água, não exibiram sintoma de escurecimento do lenho ou de murcha. Já as plantas de kiwi (Figura 12 A, B e C) inoculadas com a suspensão de esporos, exibiram sintomas típicos causados por *C. fimbriata*, como lesão escurecida no sentido longitudinal do caule e, em alguns casos, murcha apical progredindo para murcha generalizada e morte de planta. As plantas de *Eucalyptus* spp. (Figura 13) apresentaram “úlceras” (Figura 13 D) ao longo do caule e também o sintoma típico da doença, de escurecimento do lenho, mas de forma descontínua (Figura 13 B, C e D). Ao final do experimento, foi realizado o reisolamento de cada isolado e as colônias apresentavam o

mesmo padrão anterior à inoculação, confirmando a presença de *C. fimbriata* associado às lesões. Zauza et al. (2004) também relataram que não ocorreu sintomas de murcha e/ou mortalidade de plantas de eucalipto, segundo os autores observou-se apenas o escurecimento do lenho.

O isolado PB01 exibiu porcentagem de severidade maior para todas as cultivares de kiwi e para os clones 37423 e 35878 de eucalipto, sendo a menor porcentagem de severidade para o clone 32864 e *Eucalyptus dunnii*. O isolado PC03 foi altamente agressivo para as cultivar Monty e Hayward, com 100 e 87,7% de severidade, respectivamente. O isolado PP08 foi mais agressivo para o clone de eucalipto 37423 e para as cultivares de kiwi Monty e Hayward. Enquanto que para o isolado PM08, não houve diferença significativa entre os hospedeiros quanto à severidade (Tabela 4).

Verificou-se que todos os isolados em estudo causaram sintomas nos hospedeiros inoculados. Porém, cada isolado teve uma resposta diferente para as cultivares de kiwi e clones de eucalipto. Constatou-se que o isolado PC03 é capaz de causar altos níveis de severidade em todas as cultivares de kiwi e também nos clones 32864 e 35878, e podemos inferir, pelos resultados obtidos, que o isolado PM08 é o menos agressivo.

Tabela 4 – Médias de severidade (%) de cada combinação isolados de *Ceratocystis fimbriata* obtidos de kiwi X hospedeiros.

Hospedeiro/ Isolado		Testemunha	PB01	PC03	PP08	PM08
Cultivares de kiwi	Monty	4,06 c A*	27,22 c AB	100 a A	58,8 b A	29,5 bc A
	Hayward	3,8 c A	36,6 b AB	87,8 a AB	40,8 b AB	31,0 bc A
	Elmwood	3,3 c A	46,6 ab A	66,7 a B	24,5 bc BCD	36,3 ab A
Clones de <i>Eucalyptus</i>	37423	2,2 c A	36,2 ab AB	31,5 abc C	40,6 a ABC	6,12 bc A
	32864	2,4 a A	7,8 a B	8,4 a C	7,8 a CD	7,14 a A
	35878	2,84 a A	23,3 a AB	14,5 a C	5,6 a D	6,7 a A
	<i>E. dunnii</i>	2,32 a A	7,52 a B	6,6 a C	5,5 a D	6,4 a A

*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na vertical e minúscula na horizontal não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Na Tabela 5 verifica-se que as diferentes cultivares de kiwi variaram no grau de suscetibilidade e que não apresentaram nenhum grau de resistência aos isolados testados. A interação isolados e kiwi não foi significativa.

O isolado PB01 foi mais agressivo para os cultivares Monty e Hayward de kiwi, atingindo lesão de 100 cm e de 87,8 cm, respectivamente. Para o cultivar de kiwi Elmwood, os isolados PC03 e PB01 foram agressivos, com 46,6 e 66,7 cm, respectivamente.

Na Tabela 6, avaliam-se os diferentes clones de eucaliptos inoculados com os isolados em estudo e verificou-se que ocorreu interação significativa entre isolados e clones de eucalipto. A espécie *E. dunnii* e o clone 32864 destacaram-se como fonte importante de resistência (Tabela 7). Mafia et al. (2011) estudando resistência de sete espécies de *Eucalyptus* spp. a *C. fimbriata*, concluíram que a espécie de *E. dunnii* é fonte de resistência importante para este patógeno. O clone 37423 apresentou-se altamente suscetível quando inoculado com os isolados, PC03, PB01 e PP08. O clone 35878 também foi altamente suscetível quando inoculado com os isolados PC03 e suscetível quando inoculado com o isolado PB01. Zauza et al (2004), utilizando clones de *Eucalyptus* spp., verificaram que os diferentes clones de *Eucalyptus* spp. utilizados apresentam diferentes níveis de resistência a *C. fimbriata*, e que os níveis de resistência variavam de acordo com o isolado utilizado.

É importante ressaltar que os isolados utilizados para inocular os diferentes clones de *Eucalyptus* spp. foram obtidos de kiwi, portanto, esses isolados também são capazes de causar doença em *Eucalyptus* spp. Deste modo, os isolados obtidos no presente estudo não apresentam especialização por hospedeiro. BAKER e colaboradores (2003) observaram que apenas isolados de *C. fimbriata* oriundos do cacau infectaram e sobreviveram em mudas de cacau e indicaram que sublinhagens de *C. fimbriata* são adaptadas ao cacau. Nesse mesmo estudo, os autores verificaram também que um isolado do fungo obtido de eucalipto foi patogênico à mangueira e crotalária, e outro isolado não foi patogênico à cacau, mangueira e gmelina.

Constatou-se a existência de variabilidade patogênica dos isolados de *C. fimbriata* em estudo devido aos diferentes níveis de agressividade e valores de severidade observados na Tabela 4, 5 e 6. Ferreira et al. (2010) atribuíram a diferença na agressividade dos isolados devido à variabilidade genética de *C. fimbriata*. No entanto, as evidências, até agora, sugerem que há pouca variabilidade patogênica dos isolados, no Brasil, é encontrada entre populações isoladas geograficamente de uma única espécie, e essas populações variam em agressividade para determinados hospedeiros (HARRINGTON et al., 2005).

Segundo Mc Donald e Linde (2002), a variabilidade patogênica encontrada nos isolados de um patógeno representa grandes problemas para traçar medidas eficazes no manejo da doença, sendo que a maior agressividade implica em maior consumo de fungicidas ou mesmo, fazendo com que seja necessário revisar as estratégias de um programa de melhoramento com foco em resistência à doença. A resistência genética, segundo Alfenas et al. (2009), é a principal forma de controle de *C. fimbriata*. Contudo, a seleção de genótipos resistentes ao patógeno fica comprometida quando se emprega um isolado pouco agressivo, fazendo com que a seleção dos genótipos resistentes seja equivocada. O conhecimento da variabilidade patogênica dos isolados empregados nos programas de melhoramento pode minimizar os problemas de seleção de plantas resistentes, no sentido de obtenção de isolados com maior espectro de ação e altamente agressivos às diversas plantas.

A movimentação desses isolados em material propagativo constitui uma ameaça para as regiões do Brasil isenta da doença e até mesmo outros países, como se tem visto com o transporte de outras espécies do gênero *Ceratocystis*, como *C. cacaofunesta*, *C. platani* e *C. populicola*, para áreas isentas da doença (BARNES et al., 2001). Portanto, é importante conhecer a gama de hospedeiros desse patógeno, de modo a facilitar o manejo da doença e o desenvolvimento de medidas quarentenárias para minimizar o risco de introdução de formas especializadas do patógeno em plantios livres da doença.

Tabela 5 – Comprimento médio de lesão (cm) de cada combinação de isolados de *Ceratocystis fimbriata* obtidos de kiwi X kiwi.

	Monty	Hayward	Elmwood
Testemunha	4,0 c A*	3,8 b A	3,2 b A
PC03	27,2 bc A	36,6 b A	46,6 a A
PB01	100,0 a A	87,8 a A	66,7 a A
PP08	58,8 ab A	40,9 b A	24,5 ab A
PM08	29,5 bc A	32,9 b A	26,3 ab A

*Médias seguidas pela mesma letra minúscula na vertical e maiúscula na horizontal não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Tabela 6 – Comprimento médio de lesão (cm) de cada combinação de isolados de *Ceratocystis fimbriata* obtidos de kiwi X clones *Eucalyptus* spp.

	37423	32864	35878	<i>E. dunnii</i>
Testemunha	2,2 b A *	2,4 a A	2,85 b A	2,4 a A
PC03	36,2 a A	8,2 a B	23,4 a AB	7,5 a B
PB01	31,6 a A	8,6 a B	14,9 ab AB	6,8 a B
PP08	41,0 a A	7,8 a B	7,6 ab B	5,4 a B
PM08	6,4 b A	7,2 a A	5,6 ab A	6,6 a A

*Médias seguidas pela mesma letra minúscula na vertical e maiúscula na horizontal não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).



Figura 12 – A) planta de kiwi morta em decorrência da inoculação de *Ceratocystis fimbriata*; B) planta de kiwi apresentando escurecimento do lenho causado por *C. fimbriata* e C) plantas testemunhas.

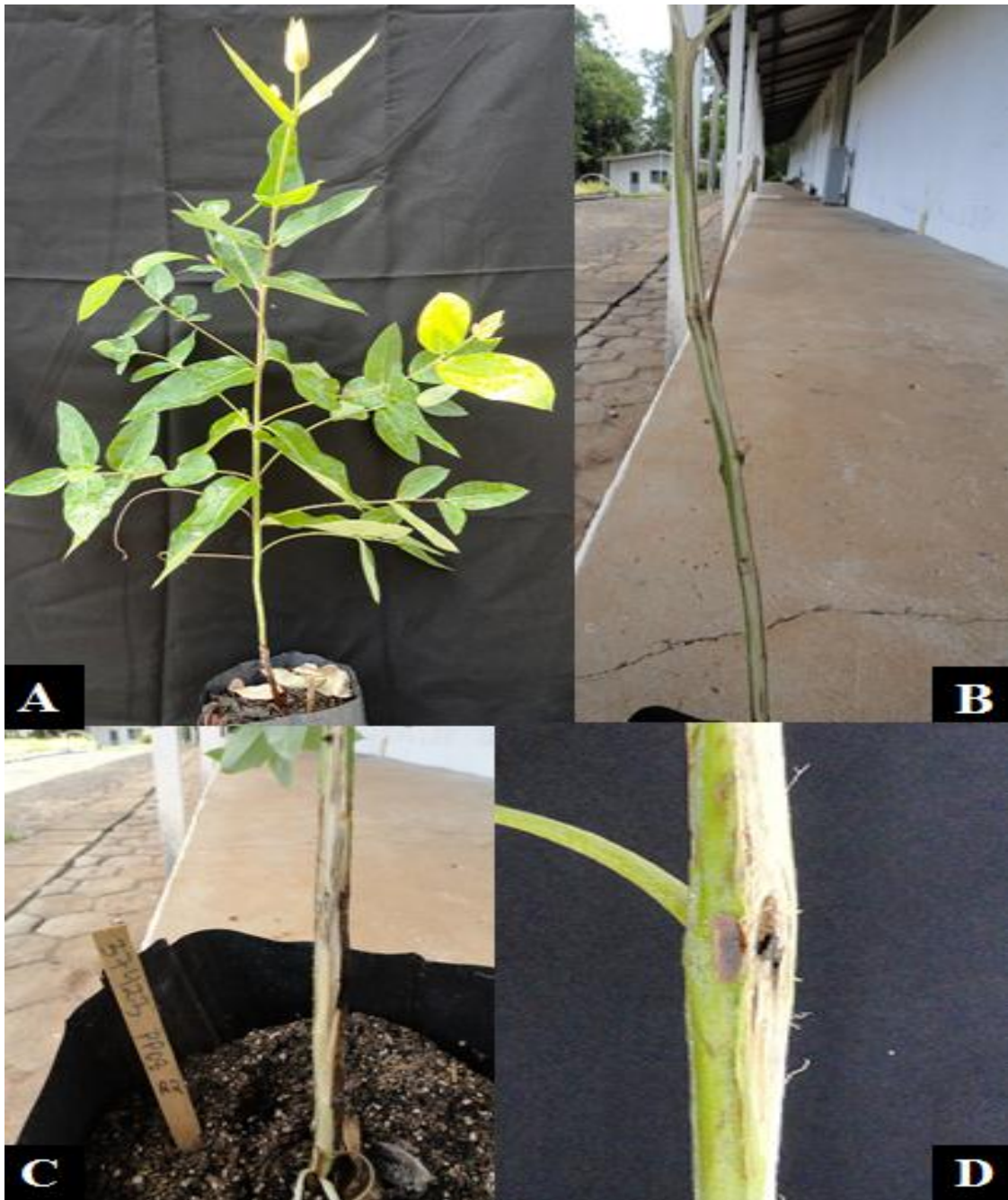


Figura 13 – A) planta de Eucalipto inoculada; B e C) sintomas de escurecimento do lenho causado por *C. fimbriata* em plantas de *Eucalyptus* spp., após 60 dias da inoculação e D) presença úlceras no caule.

5 CONCLUSÃO

- O agente causal da murcha-de-kiwi é *Ceratocystis fimbriata* pertencente ao clado da América Latina;
- os isolados do genótipo do grupo A e B não apresentaram endoconidióforo e endoconídio secundário;
- a temperatura ideal para o desenvolvimento de *C. fimbriata* é entre 20-25 °C;
- não ocorre especialização por hospedeiro para os isolados de *Ceratocystis fimbriata* estudados.
- As cultivares de kiwi Farroupilha, Monty, Elmwood e Hayward são suscetíveis à *C. fimbriata*;
- *Eucalyptus dunnii* e o clone 32864 apresentaram-se altamente resistentes à *C. fimbriata*.

REFERÊNCIAS

- ACCORDI, S. M. Spread of *Ceratocystis fimbriata* f.sp. *platani* root anastomoses. **Informatore Fitopatologico**, Italy, n. 36, p. 53-58. 1986.
- ACCORDI, S. M. The survival of *Ceratocystis fimbriata* f.sp. *platani* in the soil. **Informatore Fitopatologico**, Italy, n. 39, p. 57-62. 1989.
- AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. San Diego: Elsevier Academic Press, 5. ed. 2005. 922p.
- ALBUQUERQUE, F. C.; DUARTE, M. L. R.; SILVA, H. M. Ocorrência de mofo-cinzento (*Ceratocystis fimbriata*) da seringueira. In: 1^o Seminário Nacional de Seringueira, Cuiabá – MT, SUD Hevea, p. 125-128. 1972.
- ALFENAS, A. C. et al. **Clonagem e doenças do eucalipto**. 2 ed. Editora UFV. 2009. 442p
- ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. **Métodos em fitopatologia**. Ed: UFV, Viçosa, 2007. 382p.
- ANTONIOLLI, Z. I. et al. **Assessment of variation in sequences of ribosomal DNA internal transcribed spacers in *Glomus mosseae* and *Gigaspora margarita* from a pasture community**. In: Second International Conference on Mycorrhiza. Uppsala, 1998.
- ANTONIOLLI, Z. I. et al. Variation in ribosomal internal transcribed spacer sequences in *Glomus mosseae* and *Gigaspora margarita* spores from a permanent pasture. **Mycological Research**, Corballis, v. 104, n. 6, p. 708-715. 2000.
- BAKER, C. J. et al. Genetic Variability and Host Specialization in the Latin American Clade of *Ceratocystis fimbriata*. **Plant Pathology**, Malden, v. 93, n. 10, p. 1274-1284, 2003.
- BARNES, I. et al. Microsatellite markers reflect intra-specific relationships between isolates of the vascular wilt pathogen *Ceratocystis fimbriata*. **Plant Pathology**, Malden, n. 2, v. 6, p. 319-325. 2001.
- BARNES, I. et al. Comparison of populations of the wilt pathogen *Ceratocystis albifundus* in South Africa and Uganda. **Plant Pathology**, Malden, n. 54, p. 189-195. 2003.

BASTO, C. N.; EVANS, H. C. Ocorrência de *Ceratocystis fimbriata* Ell & Halst. na Amazônia brasileira. **Acta amazônica**, Manaus, v. 4, n. 8, p. 543-544. 1978.

BATISTA, A. C. *Ceratocystis fimbriata* Ell. & Halst. **sobre Mangifera indica L.** Instituto de Micologia da Universidade de Recife. Publicação 244. p. 1-46, 1960.

BEDENDO, I. P. Doenças vasculares. In: AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H. (Eds.). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 3. ed. São Paulo: Ceres, 1995. v. 1, p. 838-847.

BENT, A. F. Plant disease resistance genes: functions meets structure. **The Plant Cell**, Rockville, v. 8, n. 10, p. 1757-1771, 1996.

BRUTON, B. D. Soilborne diseases in cucurbitaceae: pathogen virulence and host resistance. In: MCCreight, J. (Ed.) **Cucurbitaceae '98**. Alexandria: International Society for Horticultural Science, 1998. p. 143-166.

COMPARINI, C. et al. New proteínas ortólogos a *cerato-platanin* *Ceratocystis* em vários espécies e da purificação e caracterização de *cerato-populin* de *Ceratocystis populicola*. **Microbiol. Biotechnol**, [S.l.], v. 84, n. 2, p. 309-322, 2009.

CORAL, F. J.; BOVI, O. A.; RIBEIRO, I. J. A. Ação do fungo *Ceratocystis fimbriata* Ell. & Halst., isolados de diversos hospedeiros, sobre mudas de cacaueteiro. **Bragantia**, Campinas, v. 43, n. 2; p. 245-248. 1984.

CRONE, J. L. **Symptoms, spread, and control of canker stain of plane trees**. Ed. Rutgers; The State University, 1963. 86 p.

CAMARGO, L. E. A. Análise genética da resistência e da patogenicidade. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 3. ed. São Paulo: Ceres, 1995. v. 1. p. 470-492.

DANGL, J. L.; JONES, J. D. Plant pathogens and integrated defense responses to infection. **Nature**, Nova York, v. 411, n. 6839, p 826-833, 2001.

DHINGRA, O. D.; SINCLAIR, J. B. **Basic Plant Pathology Methods**. Ed. Lewis Publishers. 1995. 434p.

ENGELBRECHT, C. J. B.; HARRITON, T. C. Intersterility, morphology and taxonomy of *Ceratocystis fimbriata* on sweet potato, cacao and sycamore. **Mycologia**, Corballis, v. 97, p. 57-69, 2005.

FALEIRO, F. G. et al. **Metodologia para operacionalizar a extração de DNA de espécies nativas do cerrado**. (Comunicado Técnico, 92). Planaltina: Embrapa Cerrados, 2003. 6p.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEM, 1998, 220p.

FERREIRA, F. A. et al. Murcha-de-ceratocysti em eucalipto no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, n. 24, p. 284. 1999.

FERREIRA, F. A. et al. Sintomatologia da murcha de *Ceratocystis* em eucalipto. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 30, n. 2, p. 155-162, 2006.

FERREIRA, M. A. **Estrutura genética de populações de *Ceratocystis fimbriata* e padrão espaço-temporal da murcha-de-caratocystis**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2009. 107p. (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Viçosa, 2009.

FERREIRA, E. M. et al. Genetic diversity and interfertility among highly differentiated populations of *Ceratocystis fimbriata* in Brazil. **Plant pathology**, Malden, n. 59, p. 721-735. 2010.

FERREIRA, M. A. et al. Movement of genotypes of *Ceratocystis fimbriata* within and among *Eucalyptus* plantations in Brazil. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 101, p. 1005-1012. 2011.

FLOR, H. H. The complementary genic systems in flax and flax rusts. **Advance Genetic**, New York, v. 8, p. 29-54, 1956.

GALLI, F. Nota sobre a ocorrência de *Ceratostomella fimbriata* (E. e H.) Elliot em *Crotalaria retusa* L. e *Cassia fistula* L. **Revista de Agricultura**, Piracicaba, n. 33, p. 225-227. 1958.

GOMES, E.A. et al. Polymorphism in the internal transcribed spacer (ITS) of the ribosomal DNA of 26 isolates of ectomycorrhizal fungi. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 25, n. 4, p. 477-483. 2002.

HARRINGTON, T. C. Hot specialization and speciation in the American wilt pathogen *Ceratocystis fimbriata*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, 25S, p. 262-263. 2000.

HARRINGTON, T. C. et al. First reporter of black rot of *Colocasia esculenta* by *Ceratocystis fimbriata* in Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, p. 88-89, 2005.

HARRINGTON, T. C.; THORPE, D. J.; ALFENAS, A. C. Genetic variation and variation in aggressiveness to native and exotic hosts among Brazilian populations of *Ceratocystis fimbriata*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 101, n. 5, p. 555-566, 2011.

ITON, M. F.; FILHO, A. B. Metodologia de inoculação de *Ceratocystis fimbriata* Ell. & Halst. em Acácia-negra, Crotalária, Figueira e Mangueira e patogenicidade a diferentes hospedeiros. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, n. 14, p. 117-135. 1988.

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

KEEN, N. T. Gene-for-gene complementarity in plant-pathogen interactions. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v. 24, p. 447-463, 1990.

KILE, G. A. Plant diseases caused by species of *Ceratocystis* sensu stricto and *Chalara*. In: WINGFIELD, M. J.; SEIFERT, K. A.; WEBBER, J. A. (eds) ***Ceratocystis and Ophiostoma: taxonomy, ecology and pathogenicity***. Aps Press, St. Paul, p. 173-183.

KIMURA M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**, [S.l.], v. 16, p.111-120. 1980.

KURAMAE, E.E.; SOUZA, N.L. Variabilidade genética entre *formae speciales* de *Fusarium oxysporum* e raças 1 e 2 de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* através de RAPD e sequências de regiões ITS e rDNA. **Acta Scientiarum**, (ISHS), v. 24, p. 1481-1485. 2002.

LAIA, M. L., ALFENAS, A. C.; HARRINGTON, T. C. Isolation, detection in soil, and inoculation of *Ceratocystis fimbriata*, causal agent of wilting, die-back and canker in Eucalyptus. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 25, p. 384. 2000.

LINDSAY, W. P.; LAMB, C. J.; DIXON, R. Microbial recognition and activation of plant defense systems. **Trends in Microbiology**, Amsterdam, v. 1, n. 5, p. 181-186, 1993.

- MAFFIA, R. G. et al. Métodos de seleção e identificação de fontes de resistência a murcha do eucalipto causada por *Ceratocystis fimbriata*. **Revista árvore**, Viçosa, v. 35, n. 4, p. 817-824. 2011.
- MCDONALD, B. A., LINDE, C. Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 40, p. 349-379. 2002.
- MARQUES, E. K. **Diagnóstico genético molecular**. Canoas: Ed. ULBRA. 2003. 372p.
- MARTIN, G. B.; BOGDANOVA, A. J.; SESSA, G. Understanding the function of plant disease resistance proteins. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 54, p. 23-61, 2003.
- MENEZES, J. P. **Caracterização populacional e molecular, e seleção de *Trichoderma* spp. para biocontrole de *Fusarium* sp. em crisântemo**. 2007. 111p. (Tese doutorado). Santa Maria: UFSM. 2007.
- MICHEREFF, S. J. et al. Variabilidade de isolados de *Alternaria brassicicola* no estado de Pernambuco. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.6, n. 28, p. 656-663. 2003.
- MOLLER, W. J.; DEVAY, J. E. Carrot as a species-selective medium for *Ceratocystis fimbriata*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 58, p. 123-124. 1968.
- MONTOYA, M. M.; WINGFIELD, M. J. A review of *Ceratocystis sensu stricto* with special reference to the species complexes *C. coerulescens* and *C. fimbriata*. **Revista Facultad Nacional de Agronomía**, Medellín, Vol. 59, n. 1, p. 3045-3075. 2006.
- MUCHOVEJ, J. J.; ALBUQUERQUE, F. C.; RIBEIRO, G. T. Gmelina arbórea – a new host of *Ceratocystis fimbriata*. **Plant Diseases Reporter**, Minnesota, n. 62, p. 717-719. 1978.
- NYLANDER, J. A. A. **MrModeltest Version 2**. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University. 2004.
- NIMCHUK, Z. et al. Recognition and response in plant immune system. **Annual Review Genetics**, Palo Alto, v. 37, p. 579-609, 2003.
- OLIVEIRA, M. L.; LUZ, E. D. M. N. **Identificação e Manejo das Principais Doenças do Cacaueiro no Brasil**. Ilhéus, 2005. CEPLAC/CEPEC/SEFIT. 132p.

OLIVEIRA, L. S. S **Agressividade de isolados de *Ceratocystis fimbriata* em clones de *Eucalyptus spp.*** 2010. 26p. (Mestrado em Fitopatologia) UFV -Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2010.

OLIVEIRA, M. L.; LUZ, E. D. M. N. **Identificação e Manejo das Principais Doenças do Cacaueiro no Brasil.** Ilhéus, 2005. CEPLAC/CEPEC/SEFIT. 132p.

OLIVEIRA, L. S. S. et al. Efeito da temperatura no crescimento micelial de isolados de *Ceratocystis fimbriata* obtidos de *Eucalyptus sp.* In: 43º CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 2011, Bento Gonçalves-RS, CD... Suplemento - TROPICAL PLANT PATHOLOGY. 36. 2011.

PARLEVLIET, J. E. Components of resistance that reduce the rate of epidemic development. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 17, p. 203-222, 1979.

PONTIS, R. E. A canker disease of the coffee tree in Colombia and Venezuela. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 41, p. 178-184, 1951.

RAMBAUT, A., DRUMMOND, A. J. **Tracer v. 14.** Disponível em: <<http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>. 2007. >Acesso em: 26 set. 2012

RAVA, C. A.; ROMEIRO, R. S. Variabilidade de isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* quanto à patogenicidade em cultivares de *Phaseolus vulgaris*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 16, n. 3/4, p. 225-232, 1990.

RIBEIRO, I. J. A.; ITO, M. F.; ROSSETTO, C. J. *Cassia renigera* Wall.: novo hospedeiro de *Ceratocystis fimbriata* Ell. & Halst. **Bragantia**, Campinas, v. 46, n. 2, p. 417-423. 1987.

RIBEIRO, I. J. A. et al. Gomose da acácia-negra causada por *Ceratocystis fimbriata* Ell. & Halst. **Bragantia**, Campinas, v. 47, n. 1, p. 71-74, Campinas, 1988.

RIBEIRO, I. J. A. et al. Mango wilt. Selection of mango (*Mangifera indica* L.) rootstocks resistant to the mango wilt fungus *Ceratocystis fimbriata* Ell. & Halst. **Acta horticultrae**, (ISHS), v. 370, p. 159-161, 1995.

RODAS, C. et al. *Ceratocystis neglecta* sp. Nov., infecting *Eucalyptus* tree in Colombia. **Fungal Divers**, [S.l.], n. 28, p. 73-84. 2008.

RONQUIST, F.; HUELSENBECK, J. P. **MrBayes 3**: Bayesian phylogenetic interference under mixed models. *Bioinformatics*, v. 19, p. 1572-1574, 2003.

ROSSETTO, C. J.; RIBEIRO, I. J. A. Seca da mangueira. XII. Recomendações de controle. **Revista de Agricultura**, Piracicaba, v. 65, p. 173-180, 1990.

ROUX, J. et al. A serious new wilt disease of Eucalyptus caused by *Ceratocystis fimbriata* in Central Africa. **South African Journal of Science**, Pretoria, v.30, p. 175-184. 2000

ROUX, J. et al. Diseases of plantation Eucalyptus in Uganda. **South African Journal of Science**, Pretoria, n. 97, p. 16-18, 2001.

ROUX, J. et al. Gentic variation in the wattle wilt pathogen *Ceratocystis albofundus*. **Mycoscience**, Pretoria, n. 42, p. 327-332. 2004.

ROUX, J.; WINFIELD, M. J. *Ceratocystis* species: emerging pathogens of non-native plantation *Eucalyptus* and *Acacia* species. **South African Journal of Science**, Pretoria, n. 71. p. 115-120. 2009.

SANTOS, A. F.; FERREIRA, F. A. Murcha-de-ceratocystis em Acácia-negra no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, n. 28, p. 325, 2003.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning**: a laboratory manual. 2nd ed. N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 1659 p. ISBN 0-87969-309-6.

SILVA, S. D. V. M. et al. Reação de genótipos de cacauzeiros a isolados de *Ceratocystis cacaofunesta*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 6, p. 504-506, 2007.

SILVEIRA, S. F. et al. *Annona squamosa*, a new host of *Ceratocystis fimbriata*. (Comunicações/ Comunicações) **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, n. 4, p. 394-397, 2006.

SILVA, F. A. S. E. **The ASSISTAT Software**: statistical assistance. – ASSISTAT 7.6 Beta. Campinas Grande: UFCG, 2011. Registro INPI 0004051-2.

SONEGO, O. R. et al. Primeiro relato da murcha-de-ceratocystis em kiwi. In: 42º CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 2010, Cuiabá - MT, CD... Suplemento - TROPICAL PLANT PATHOLOGY. 35. 2010.

SWOFFORD, D. L. **PAUP** * Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and other Methods) Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts. 2003.

TAMURA, K. et al. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* (**In Press**). 2011.

TEIXEIRA, H.; VIEIRA, M. G. G. C.; MACHADO, J. C. Marcadores morfofisiológicos e isoenzimáticos na análise da diversidade genética de isolados de *Acremonium strictum*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 4, July/Aug. 2004.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D.; GIBSON, T. J. **Clustal**. version W: a novel multiple sequence alignment program. *Nucleic Acids Research*. v. 22, 4673–4680. 1992

THORPE, D. J.; HARRINGTON, T. C.; UCHIDA, J. Y. Pathogenicity, Internal Transcribed Spacer-rDNA Variation, and Human Dispersal of *Ceratocystis fimbriata* on the Family Araceae. **Pathology**, Saint Paul, v. 95, n. 3, p. 316-323, 2005.

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

VALARINI, P. J.; TOKESHI, H. *Ceratocystis fimbriata*, causal agente of fing dieback, and its control. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, n. 6, p. 102-106. 1980.

VALDETARO, D. C. O. F. **Morfologia, variabilidade genética e patogenicidade de *Ceratocystis fimbriata* em *Hevea brasiliensis***. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2012. 28p. (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Viçosa, 2012.

VALE, F. X. R.; JESUS JÚNIOR, W. C.; LIBERATO, J. R.; SOUZA, C. A. Manejo integrado – Medidas de controle. In: VALE, F. X. R.; JESUS JÚNIOR, W. C.; ZAMBOLIM, L (Ed.). **Epidemiologia aplicada ao manejo de doenças de plantas**. Belo Horizonte: Perfífil, 2004. v. 1, cap.12, p.465-520.

VAN WYK, M. et al. *Ceratocystis polychroma* sp. nov., from *Syzygium aromaticum* in Sulawesi. **Mycologi**, Corballis, n. 50, p. 273-282. 2004

VAN WYK, M. et al. DNA based characterization of *Ceratocystis fimbriata* isolates associated with mango decline in Oman. **Australasian Plant Pathology**, Australia, Box 34, p. 587-590. 2005.

VAN WYK, M.; ROUX, J.; WINGFIELD, B. D. Population genetic analyses suggest that the eucalyptus fungal pathogen *Ceratocystis fimbriata* has been introduced into South Africa. **South African Journal of Science**, South Africa, n. 102, p. 259-263. 2006.

VAN WYK, M. et al. *Ceratocystis manginecans* sp. nov., causal agent of a destructive mango wilt disease in Oman and Pakistan. **Fungal Diversity**, [S.l.], n. 27, p. 213-230. 2007.

VAN WYK, M. et al. *Ceratocystis fimbriatomima*, a new species in the *C. fimbriata sensu lato* complex isolated from *Eucalyptus* trees in Venezuela. **Fungal Diversity**, v. 34, p. 175-185, 2009.

VAN WIK, M. et al. New *Ceratocystis* species infecting coffee, cacao, citrus and native trees in Colombia. **Fungal Diversity**, [S.l.], n. 40, p.103-117, 2010a.

VAN WIK, M. et al. Four new *Ceratocystis* spp. associated with wounds on *Eucalyptus*, *Schizolobium* and *Terminalia* tree in Ecuador. **Fungal Diversity**, [S.l.], v. 46, n. 1. p. 111-131. 2010b.

VIÉGAS, A. P. Seca da mangueira. **Bragantia**, Campinas, v. 19, p. 163-182, 1960.

VIGOUROUX, A. et al. Canker stain of plane tree, last advances in genetic improvement for resistance. **Acta Horticulture**, (ISHS), v. 496, p. 99-101, 1999.

VIGOUROUX, A.; OLIVIER, R. First hybrid plane trees to show resistance against canker stain (*Ceratocystis fimbriata* f. sp. *platani*). **Forest Pathology**, Hoboken, v. 34, p. 307-319, 2000.

ZAUZA, E. A.V. et al. Resistance of Eucalyptus clones to *Ceratocystis fimbriata*. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 88, n. 7, july, 2004.