

LUCAS VEIGA AYRES PIMENTA

**ESTRUTURA GENÉTICA DA POPULAÇÃO DE *Ceratocystis fimbriata*
ASSOCIADA A KIWI E AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA DO HOSPEDEIRO À
MURCHA-DE-CERATOCYSTIS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

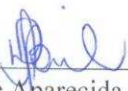
VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2018

LUCAS VEIGA AYRES PIMENTA

**ESTRUTURA GENÉTICA DA POPULAÇÃO DE *Ceratocystis fimbriata*
ASSOCIADA A KIWI E AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA DO HOSPEDEIRO À
MURCHA-DE-CERATOCYSTIS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.


APROVADA: 16 de fevereiro de 2018.




Daniele Aparecida Alvarenga Arriel




Eduardo Seiti Gomide Mizubuti



Lúcio Mauro da Silva Guimarães
(Coorientador)



Acelino Couto Alfenas
(Coorientador)



Leonardo Lopes Bhering
(Orientador)

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa

T

P644e
2018 Pimenta, Lucas Veiga Ayres, 1988-
Estrutura genética da população de *Ceratocystis fimbriata*
associada a kiwi e avaliação da resistência do hospedeiro à
murcha-de-ceratocystis / Lucas Veiga Ayres Pimenta. – Viçosa,
MG, 2018.
viii, 77 f. : il. ; 29 cm.

Inclui anexos.

Orientador: Leonardo Lopes Bhering.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Quiuí - Resistência a doenças e pragas. 2. Actinidia. 3.
Ceratocystis fimbriata - Genética. 4. Murcha-de-ceratocystis.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia
Geral. Programa de Pós-Graduação em Genética e
Melhoramento. II. Título.

CDD 22. ed. 634.72594

*“Não importa o quão estreito seja o portão
e quão repleta de castigos seja a sentença, eu sou
o dono do meu destino, eu sou o capitão da minha
alma.”*

Willian Ernest Henley.

*Aos meus pais Robinsom e Maura
À minha tia “Mãe” Tânia
Ao meu irmão Daniel, minha cunhada Nathália e à sobrinha Alice*
DEDICO

AGRADECIMENTOS

À minha Família, aos meus pais Robinsom e Maura, ao meu irmão Daniel, à minha cunhada Nathália, minha Tia Tânia e à princesa Alice pelo amor e pelo apoio durante a realização deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela disponibilização da minha bolsa de mestrado, sem a qual seria impossível a realização deste trabalho.

À empresa neozelandesa Zespri pelos recursos disponibilizados para a realização deste projeto.

Ao meu orientador, Prof. Leonardo Lopes Bhering, pela orientação, pelo apoio e pela oportunidade de realizar pós-graduação em Genética e Melhoramento.

Ao meu coorientador, Prof. Acelino Couto Alfenas, pelo esforço “*full time*”, pelos conselhos, e, pelo importante apoio prestado ao desenvolvimento deste, sem o qual não se concretizaria. Ademais, a quem muito respeito e considero, pois, meu crescimento profissional e pessoal se deve sobremaneira à sua supervisão.

Ao meu coorientador, Dr. Lúcio Mauro da Silva Guimarães, pelo grande apoio na realização dos experimentos e na redação dos artigos, e pelas valiosas sugestões.

Ao meu coorientador, Dr. Leonardo Sarno Soares Oliveira pelo apoio no planejamento e na realização dos experimentos, e, pela contribuição intelectual para a realização deste.

Ao Prof. Eduardo Seiti Gomide Mizubuti pela grande contribuição intelectual e dedicação no primeiro capítulo desta tese.

Ao Prof. Paulo Vitor Dutra de Souza e à Fepagro pela disponibilização das cultivares de kiwi estudadas.

À Clonar Resistência a Doenças Florestais pela infraestrutura e manutenção do material vegetal. Em especial, aos funcionários Andinho, Camila, Eduardo, Josnei, Paulo, Real e Solange.

À Embrapa Uva e Vinho, principalmente ao pesquisador Lucas da Ressureição Garrido, ao extensionista Alvaro Gallina da Emater/RS Farroupilha, e aos produtores de kiwi dos estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina pelo apoio na coleta dos isolados e pela disponibilização de material vegetal bem como à Klabin que viabilizou a coleta de isolados do fungo em SC..

À toda equipe do Laboratório de Patologia Florestal (PATOMOL) da Universidade Federal de Viçosa pelo apoio direto e indireto para a realização deste trabalho, e pela amizade que foi construída ao longo de todo o tempo em que estivemos juntos. Trabalhar com vocês foi gratificante.

À minha namorada Mainara pelo amor e companheirismo nesta minha jornada.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
INTRODUÇÃO GERAL	1
REFERÊNCIAS	6
CAPÍTULO 1	10
ARTIGO 1	11
HISTÓRIA EVOLUTIVA DA POPULAÇÃO DE ISOLADOS DE <i>CERATOCYSTIS FIMBRIATA</i> RESPONSÁVEL PELA EPIDEMIA DE MURCHA-DE-CERATOCYSTIS EM KIWI NO BRASIL.	11
RESUMO	11
INTRODUÇÃO.....	12
RESULTADOS	14
DIVERSIDADE E DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO	14
ESTRUTURA POPULACIONAL E DIFERENCIAÇÃO GENÉTICA ENTRE AS POPULAÇÕES	15
HISTÓRIA EVOLUTIVA	16
DISCUSSÃO.....	17
MATERIAL E MÉTODOS.....	19
ISOLADOS, EXTRAÇÃO DE DNA E GENOTIPAGEM	19
ANÁLISE DOS DADOS	21
ANÁLISE DA HISTÓRIA EVOLUTIVA.	23
REFERÊNCIAS	27
TABELAS E FIGURAS.....	33
MATERIAL SUPLEMENTAR	54
CAPÍTULO 2	55
ARTIGO 2	56
RESISTÊNCIA DE CULTIVARES E PROGÊNIES DE <i>ACTINIDIA SPP.</i> À MURCHA-DE-CERATOCYSTIS	56
RESUMO	56
INTRODUÇÃO.....	57
MATERIAL E MÉTODOS.....	59
CULTIVARES	59

PLANTAS SEMINAIS DE “BRUNO”	60
ISOLADOS DE CERATOCYSTIS FIMBRIATA	60
AVALIAÇÃO DA AGRESSIVIDADE.....	60
AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA DAS CULTIVARES E DAS PLANTAS SEMINAIS DE “BRUNO”	61
RESULTADOS	62
AVALIAÇÃO DA AGRESSIVIDADE.....	62
AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA DAS CULTIVARES E DAS PLANTAS SEMINAIS DE “BRUNO”	62
DISCUSSÃO.....	63
AGRADECIMENTOS	65
REFERÊNCIAS	66
TABELAS E FIGURAS.....	70
CONCLUSÕES GERAIS	77

RESUMO

PIMENTA, Lucas Veiga Ayres, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2018. **Estrutura genética da população de *Ceratocystis fimbriata* associada a kiwi e avaliação da resistência do hospedeiro à murcha-de-ceratocystis** Orientador: Leonardo Lopes Bhering. Coorientadores: Acelino Couto Alfenas, Lúcio Mauro da Silva Guimarães e Leonardo Sarno Soares Oliveira.

A murcha-de-ceratocystis causada por *Ceratocystis fimbriata* é a doença mais importante para a cultura do kiwi (*Actinidia* spp.) no Brasil. O emprego de material resistente é um eficiente método de controle desta doença. Entretanto, as três cultivares (Hayward, Elmwood e Monty) que foram avaliadas quanto à resistência à murcha-de-ceratocystis foram suscetíveis. Com isso, este trabalho objetivou determinar a estrutura genética, a história evolutiva e a variabilidade fisiológica do patógeno na cultura do kiwi, e ainda realizar uma triagem em cultivares e progênies de kiwi com o intuito de identificar materiais resistentes a serem utilizados como enxerto ou porta-enxerto. A população de isolados de *C. fimbriata* de kiwi apresentou níveis de diversidade gênica semelhantes a populações nativas e foi formada pela mistura de isolados de três distintas regiões, Sul do Brasil, Cerrado e Mata Atlântica. Os isolados de kiwi variaram amplamente em agressividade, sendo que os 14 isolados avaliados separaram em quatro grupos, com valores de intensidade da doença entre 10-95%. A intensidade de doença induzida em “Monty” causada pela mistura equitativa de inóculo dos cinco isolados mais agressivos não diferiu estatisticamente da intensidade da doença causada pelo isolado PG01, um dos isolados mais agressivos. Todas as oito cultivares avaliadas foram suscetíveis à murcha-de-ceratocystis. Dentre 618 plantas meio-irmãos de Bruno inoculadas, sete não apresentaram sintomas de murcha nem escurecimento dos tecidos internos do caule e foram classificadas como resistentes, constituindo potenciais porta-enxertos.

ABSTRACT

PIMENTA, Lucas Veiga Ayres, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2018. **Genetic structure of the population of *Ceratocystis fimbriata* associated with kiwi and evaluation of resistance of host to ceratocystis wilt** Advisor: Leonardo Lopes Bhering. Co-advisors: Acelino Couto Alfenas, Lúcio Mauro da Silva Guimarães and Leonardo Sarno Soares Oliveira.

Ceratocystis wilt caused by *Ceratocystis fimbriata* is the most important disease on kiwifruit (*Actinidia* spp.) in Brazil. The use of resistant material is one of the most efficient methods to control this disease. However, so far, all three kiwifruit cultivars (Hayward, Elmwood and Monty) evaluated for resistance to Ceratocystis wilt were susceptible. Therefore, the aim of this work was to assess the genetic structure, the evolutionary history and the physiological variability of the pathogen on kiwifruit crop, as well as to perform a screening in kiwifruit cultivars and progenies in order to identify resistant materials to be used as graft or rootstocks. The population of *C. fimbriata* isolates of kiwifruit showed gene diversity similar to native populations and it was formed by the mixture of isolates from three regions, South of Brazil, Cerrado and Mata Atlântica. The kiwi isolates showed great variability in aggressiveness, and the 14 isolates evaluated separated into four groups, with values of disease intensity between 10-95%. The intensity of disease induced by the equitable mixture of inoculum prepared with the five most aggressive isolates did not differ statistically from the intensity of the disease caused by PG01 isolate, one of the most aggressive isolates. All eight cultivars evaluated were susceptible to Ceratocystis wilt. Among 618 Bruno half-sibling plants inoculated, seven had no symptoms of wilt or darkening of internal stem tissues and were classified as resistant, constituting potential rootstocks.

INTRODUÇÃO GERAL

O gênero *Actinidia*, oriundo da Ásia, teve as suas primeiras plantas encontradas na China, no Nordeste da Índia e no Japão. Na China, é conhecido como “mihoutao”, mas em outras partes do mundo é mais conhecido pelos nomes “kiwi”, “quivi” e “kiwifruit”. Atualmente, 52 espécies estão classificadas dentro do gênero *Actinidia* (Testolin et al. 2016), sendo que várias delas apresentam frutos comestíveis como *A. chinensis*, *A. arguta*, *A. kolomikta*, *A. polygama* e *A. eriantha*. A espécie *A. chinensis* var. *deliciosa* (A. Chev.) foi a primeira a ser produzida em grande escala, inicialmente na Nova Zelândia, na década de 1930 e, posteriormente, exportado para países como Inglaterra, Austrália e Estados Unidos, no final da década de 1950 (Huang et al. 2016). Os maiores produtores de kiwi, atualmente, são China, Itália, Nova Zelândia, Chile e Grécia. Juntos, estes países representaram, em 2013, aproximadamente 90% da produção mundial. Outros países como França, Espanha, Japão e Irã também o produzem, porém em pequenas quantidades (Ferguson, 2015).

No Brasil, o kiwi foi introduzido em 1971 por pesquisadores do Instituto Agrônomo de Campinas (Carvalho & Lima, 2002). Devido à sua origem, o kiwi adapta-se melhor ao clima temperado ou sub-tropical (Mattiuz & Fachinello, 1996; Huang et al. 2016). São as condições ideais para o seu plantio: alta umidade relativa do ar; chuvas frequentes no período vegetativo; temperaturas do ar amenas no verão, com média de temperatura mínima de 13°C e máxima de 24°C, e baixas no inverno, com média de temperatura mínima de 5°C e máxima de 14°C. Outro fator importante para a determinação do local de plantio do kiwi é o acúmulo de frio hibernar, sendo o ideal de 500 a 700 horas de temperaturas abaixo de 7,2°C (Silveira et al. 2012). Assim, no Brasil, o kiwi tem sido cultivado principalmente nas regiões de Ibiúna, Mogi das Cruzes, Campos

do Jordão, no estado de São Paulo; Castro no Paraná; Ivoti e Farroupilha, no Rio Grande do Sul e Campo Belo do Sul e Fraiburgo, em Santa Catarina (Saquet & Brackmann, 1995).

A cultivar Hayward (*A. chinensis* var *deliciosa*), selecionada na Nova Zelândia em 1930, é a mais plantada mundialmente e a preferida pelo consumidor, por possuir frutos com melhores características palatáveis, aromáticas e de maior conservação em prateleira (Huang, 2016). Além da “Hayward”, destacam-se as cultivares Abbott, Allison, Bruno, Elmwood, Greensil, Monty, Gracie e Jones. A “Hayward”, embora seja a mais bem aceita no mercado internacional, é de difícil cultivo no Brasil, por ser muito exigente em frio para florescer e necessita de acúmulo de no mínimo 700 horas de temperaturas abaixo de 7,2 °C (Silveira et al. 2012). Por outro lado, as cultivares Abbott, Allison, Bruno, Kouryoku e Victoria são menos exigentes em frio, podendo ser cultivadas em climas amenos, como no Sul e em algumas regiões do Sudeste do Brasil (Schuck, 1992). O kiwi é uma planta dioica e, portanto, para produção dos frutos necessita da presença de cultivares masculinos e femininos. Como polinizadoras, destacam-se as cultivares Matua e Tomuri (Saquet & Brackmann, 1995).

A enxertia e a estaquia são os métodos, normalmente, empregados para a propagação de kiwi. No Brasil e na Nova Zelândia, a técnica utilizada é a enxertia, ao passo que, na maioria dos países da Europa, é utilizada a estaquia. A estaquia, segundo Lionaks (1984), Fachinello et al. (1994) e Manfroi et al. (1997), é o método de propagação mais empregado devido às seguintes razões: possuir baixo custo e é de fácil execução; ser possível obter elevado número de plantas a partir de uma única planta matriz; apresentar uniformidade e qualidade das mudas; reduzir o período juvenil das plantas; e, dispensar a utilização de um porta-enxerto específico para a sua propagação. A presença de patógenos de solo pode exigir, entretanto, que a enxertia seja empregada. Além disso, a

enxertia pode ser utilizada para: aumentar a resistência a adversidades climáticas, como baixas temperatura, melhorar a resistência à seca e salinidade do solo, controlar desordens fisiológicas e aumentar o vigor das plantas (Gotto et al. 2003).

As doenças, até recentemente, não eram limitantes para a kiwicultura brasileira. Porém, no final da primeira década de 2000, foram observadas plantas de kiwi com sintomas de amarelecimento foliar, murcha e seca dos ramos (Sonego et al. 2010) cujo agente etiológico foi posteriormente identificado como *Ceratocytis fimbriata* Ellis & Halsted, por meio de análise de DNA, características morfológicas e testes de patogenicidade (Piveta et al. 2016). Tal doença, inicialmente, leva à perda de turgescência e brilho das folhas que depois se enrolam, seguido de secamento e desfolha, culminando com a morte da planta. *C. fimbriata* é um fungo de solo e as infecções provocadas originam-se, principalmente, na raiz da planta. Nos tecidos internos do caule infectado, observam-se lesões radiais de coloração castanho-avermelhada. Podem ocorrer infecções aéreas, geralmente a partir do enxerto ou de ferimentos decorrentes da poda. Diferentemente de outros hospedeiros, mas similarmente ao que ocorre em eucalipto, não se observa atividade de insetos vetores e raramente há exsudação de goma (gomose) nas plantas infectadas. As plantas doentes concentram-se, principalmente, em reboleiras, embora possam ser encontradas distribuídas aleatoriamente no pomar. A doença reduz a produção de frutos e estes, quando produzidos em plantas infectadas, são menores e rejeitados para a comercialização (Piveta et al. 2016). A partir de 2010, na região de Farroupilha-RS, a mortalidade das plantas tem variado entre 25 a 30% ao ano, principalmente pelo emprego de enxertos e porta-enxertos altamente suscetíveis (Ferreira et al. 2017).

No Brasil, O primeiro relato de *C. fimbriata*, ocorreu em *Crotalaria juncea* nas regiões de Campinas e Tietê, no estado de São Paulo (Costa & Krug, 1935). Em manga

(*Mangifera indica*), a murcha-de-ceratocystis ou seca-da-mangueira, causada por *C. fimbriata*, foi observada pela primeira vez no final da década de 30, em Recife-PE (Carvalho, 1938). No final dos anos 90, no Sudeste da Bahia, foi relatado em eucalipto (*Eucalyptus* spp.), considerado um dos principais hospedeiros deste fungo no Brasil (Ferreira et al. 1999). Hoje, além de São Paulo e Pernambuco, já se encontram relatos do fungo nos Estados do Espírito Santo, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Bahia (Alfenas et al., 2009); Maranhão, Alagoas, Pará (Ferreira et al. 2011); Ceará, Paraíba, Rio de Janeiro (Oliveira et al. 2017) e Rio Grande do Sul (Alfenas, A. C. informação pessoal 2017). No Brasil, além das culturas citadas existem, atualmente, relatos desse fungo infectando culturas como seringueira (*Hevea brasiliensis*) (Silveira et al. 1994), taro (*Colocasia esculenta*) (Harrington et al. 2005), teca (*Tectona grandis*) (Firmino et al. 2012), acácia-negra (*Acacia mearnsii*) (Santos & Ferreira 2003) e figueira (*Ficus acarica*) (Valarini & Tokeshi, 1980). Devido à alta variabilidade genética de algumas populações brasileiras do fungo, estudos recentes têm sugerido que o fungo é nativo do Brasil (Ferreira et al. 2010; Oliveira et al. 2017).

A murcha-de-ceratocystis é, atualmente, uma das mais importantes doenças de plantas arbóreas, devido à variabilidade genética e fisiológica do patógeno (Ferreira et al. 2010; Oliveira et al. 2016), à ampla gama de hospedeiros, à natureza vascular das infecções e aos danos causados às culturas (Alfenas et al. 2009). O fato de *C. fimbriata* colonizar os tecidos internos dos hospedeiros, faz com que sua disseminação seja muito difícil de ser controlada, pois há a dispersão do patógeno por meio de material propagativo assintomático, o que resulta no aparecimento de novos surtos da enfermidade (Engelbrecht et al. 2004; Engelbrecht & Harrington, 2005; Engelbrecht et al. 2007; Johnson et al. 2005; Thorpe et al. 2005; Ferreira et al. 2011) ou no aumento da

variabilidade genética do patógeno, quando houver interação entre duas ou mais populações distintas.

Como *C. fimbriata* é um fungo de solo e sua infecção afeta os tecidos internos do hospedeiro, o emprego de porta-enxerto resistente associado a medidas fitossanitárias, tais como a execução de podas com ferramentas desinfestadas e o emprego de enxertos livres do patógeno, constituem medidas eficientes para o controle da doença (Ribeiro et al. 1986; Rossetto & Ribeiro, 1990; Alfenas et al. 2009; Galli et al. 2011). Entretanto, na seleção de genótipos resistentes deve-se considerar a variabilidade genética e fisiológica nas populações do patógeno.

Testes de patogenicidade realizados em cultivares de kiwi mostraram que todas as cultivares avaliadas, até o momento, são suscetíveis à murcha-de-ceratocystis (Piveta et al, 2016), o que demonstra a necessidade de se avaliar outras cultivares quanto a resistência a murcha-de-ceractocystis.

Esta dissertação, assim, foi dividida em dois capítulos: o primeiro teve como objetivos estudar a história evolutiva e a estrutura populacional dos isolados de *C. fimbriata* que causam a epidemia de murcha-de-ceratocystis em kiwi no sul do Brasil, por meio de marcadores microsatélites e análises de genética de populações; o segundo capítulo visou a avaliar a resistência à murcha-de-ceratocystis em oito cultivares de kiwi (*Actinidia* spp.) e em 618 plantas meio-irmãos de “Bruno”, com a finalidade de identificar fontes de resistência. Acredita-se que os resultados deste trabalho poderão esclarecer ainda mais a história evolutiva dos isolados responsáveis pela epidemia de murcha-de-ceratocystis em plantios de kiwi, no Brasil; além de gerar informações valiosas para a seleção de plantas resistentes de kiwi à murcha-de-ceratocystis.

REFERÊNCIAS

- Alfenas AC, Zauza EA., Mafia RG, ASSIS TF (2009) Clonagem e doenças do eucalipto. Editora UFV. 500p.
- Carvalho AV, Lima LCO (2002) Qualidade de kiwis minimamente processados e submetidos a tratamento com ácido ascorbico, ácido cítrico e cloreto de cálcio. Pesq. agropec. bras. 33:679-685.
- Costa AS, Krug, HP (1935) Eine durch *Ceratostomella* hervorgerufene Welkekrankheit der *Crotalaria juncea* in Brasilien. Phytopathologische Zeitschrift. 8:507-513.1935.
- Engelbrecht CJB, Harrington TC, Steimel J, Capretti P (2004) Genetic variation in Eastern North American and putatively introduced populations of *Ceratocystis fimbriata* f. sp. *Platani*. Molecular Ecology. 10:2995-3005.
- Engelbrecht CJB, Harrington TC (2005) Intersterility, morphology, and taxonomy of *Ceratocystis fimbriata* on sweet potato, cacao, and sycamore. Mycology. 2005 97:57-69.
- Engelbrecht CJB, Harrington TC, Alfenas AC, Suarez C (2007) Genetic variation of populations of the cacao wilt pathogen, *Ceratocystis cacaofunesta*. Plant Pathology 56:923–933
- Johnson JA, Harrington TC, Engelbrecht CJ (2005) Phylogeny and taxonomy of the North American Clade of *Ceratocystis fimbriata* complex. Mycology. 5:1067-92.
- Fachinello JC, Hoffmann A, Nachtigal JC, Kersten E, Fortes GRL (1994) Propagação de plantas frutíferas de clima temperado. Editora e Gráfica Universitaria, Pelotas.
- Ferguson AR (2015) Kiwifruit in the World – 2014. Acta Horti 1096: 33-46.

- Ferreira FA (1999) Murcha de *Ceratocystis* em eucalipto no Brasil. Fitopatologia Brasileira. 24:284.
- Ferreira EM, Harrington TC, Thorpe DJ, Alfenas AC (2010) Genetic diversity and interfertility among highly differentiated populations of *Ceratocystis fimbriata* in Brazil. Plant Pathol 59:721–735.
- Ferreira MA, Harrington TC, Alfenas AC, Mizubuti ESG (2011) Movement of genotypes of *Ceratocystis fimbriata* within and among *Eucalyptus* plantations in Brazil. Phytopathology 101:1005–1012.
- Ferreira MA, Harrington TC, Piveta G, Alfenas AC (2017) Genetic variability suggests that three populations of *Ceratocystis fimbriata* are responsible for the Ceratocystis wilt epidemic on kiwifruit in Brazil. Trop Plant Pathol 42:86–95.
- Firmino AC, Tozze Júnior HJ, Furtado EL (2012) First report of *Ceratocystis fimbriata* causing wilt in *Tectona grandis* in Brazil. New Dis Reports, Read 25:24.
- Galli JA, Martins ALM, Ito MF, Braghini MT, Narita N, Rossetto CJ (2011) Seca-da-mangueira XXII. sobrevivência de variedades poliembriônicas. Rev Bras Frutic 33:1119-1126
- Goto R, Santos HS, Cañizares AL (2003) Enxertia em Hortaliças. 1ª ed. São Paulo, Brasil. UNESP
- Harrington TC, Thorpe DJ, Marinho V, Furtado EL (2005) First report of black rot of *Colocasia esculenta* caused by *Ceratocystis fimbriata* in Brazil. Fitopatol Bras 30:88–89.
- Huang H (2016) Kiwifruit: The genus Actinidia. 1st Ed. Beijing, China. Elsevier Academic Press.
- Lionaks SM (1984) Anatomy of root initiation in stem cuttings of the kiwifruit (*Actinidia chinensis* Planch.). Fruits 39:207-2011.
- Manfroi V, Franscioni AHD, Barradas CIN, Seibert E (1997) Efeito do AIB sobre o

- enraizamento e desenvolvimento de estacas de quiwi (*Actinidia deliciosa*). *Ciência Rural* 27:43-46.
- Mattiuz B, Fachinello JC (1996) Enraizamento de estacas de kiwi *Actinidia deliciosa* (A. Chev.) C. F. Liang & A. R. Ferguson var. *deliciosa*. *Pesq. agropec. bras.* 31:503-508.
- Oliveira LSS, Damacena MB, Guimarães LMS, Siqueira DL, Alfenas AC (2016) *Ceratocystis fimbriata* isolates on *Mangifera indica* have different levels of aggressiveness. *Eur J Plant Pathol* 145:847–856.
- Oliveira LSS, Harrington TC, Ferreira MA, Freitas RG, Alfenas AC (2017) Populations of *Ceratocystis fimbriata* on *Colocasia esculenta* and other hosts in the Mata Atlântica region in Brazil. *Plant Pathology*. 67.
- Piveta G, Ferreira MA, Muniz MF, Valdetaro DCOF, Valdebenito-Sanhueza R, Harrington TC, Alfenas AC (2016) *Ceratocystis fimbriata* on Kiwifruit (*Actinidia* spp.) in Brazil. *New Zeal J Crop Hortic Sci* 44:13–24.
- Ribeiro IJA, Rossetto CJ, Sabino JC, Gallo PB (1986) Seca-da-mangueira VIII. *Bragantia* 45:317-322.
- Rossetto CJ, Ribeiro IJA (1990) Seca da mangueira XII. Recomendações de controle. *Revista de Agricultura* 65:173-180.
- Saquet AA, Brackmann A (1995) A cultura do kiwi. *Ciência Rural* 25:177-182.
- Santos ÁF, Ferreira FA (2003) Murcha-de-Ceratocystis em Acácia-Negra no Brasil. *Fitopatologia Brasileira*. Brasília. 28:325-325.
- Schuck, E (1992) Cultivares de kiwi. *Agropecuária Catarinense* 5: 9-12.
- Silveira SV, Anzanello R., Simonetto PR., Gava R, Garrido LR, Santos R SS, Girardi CL (2012) Aspectos técnicos da produção de kiwi. Bento Gonçalves: Empresa

Brasileira de Pesquisa Agropecuária.

- Silveira AP, Oliveira DA, Cardoso RMG, Neto FB, Ortolani AA, Godoy G (1994) Caracterização do prejuízo provocado pelo mofo cinzento (*Ceratocystis fimbriata*) em painéis de seringueira (*Hevea brasiliensis*). Summa Phytopathol. 20:196–199.
- Sonego OR, Ferrera MA, Valdebenito-Sanhueza RM, Gava R, Garrido LDAR, Alfenas AC (2010) Primeiro relato da murcha-de-Ceratocystis em kiwi. Trop Plant Pathol 35:233.
- Testolin R, Huang HW, Ferguson AR, (2016) The Kiwifruit Genome. 1st Ed. Suíça. Springer Nature.
- Thorpe DJ, Harrington TC, Uchida JY (2005) Pathogenicity, internal transcribed spacer rDNA variation, and human dispersal of *Ceratocystis fimbriata* on family Araceae. Phytopathology. 3:316-23
- Valarini, PJ; Tokeshi, H (1980) *Ceratocystis fimbriata*, causal agent of fig dieback, and its control. Summa Phytopathol. 6:102–106.
- Viégas AP (1960) Seca da mangueira. Bragantia 19:163–182.

CAPÍTULO 1

ARTIGO 1

Para ser submetido à revista PLOS Pathogens

História evolutiva da população de isolados de *Ceratocystis fimbriata* responsável pela epidemia de murcha-de-ceratocystis em kiwi no Brasil.

Lucas V. A. Pimenta¹, Eduardo S. G. Mizubuti², Leonardo S. S. Oliveira², Lúcio M. S. Guimarães², Leonardo L. Bhering³, Acelino C. Alfnas²

¹Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG 36570-900, Brasil

²Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG 36570-900, Brasil

³Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG 36570-900, Brasil

Autor para correspondência: Eduardo Seidi Gomide Mizubuti mizubuti@ufv.br

Resumo

No Brasil, a murcha-de-ceratocystis causada por *Ceratocystis fimbriata* é a principal doença da cultura do kiwi (*Actinidia* spp.). Para entender a formação da população de *C. fimbriata* de kiwi do sul do Brasil, foram analisadas, por meio de análises de genética de populações, a estrutura genética e a história evolutiva de isolados de *C. fimbriata* de diferentes hospedeiros, coletados nas regiões do Cerrado, da Mata Atlântica e do Sul do Brasil. Em 280 isolados por meio de 14 marcadores microssatélites foram identificados 118 genótipos, dos quais 46 característicos da subpopulação de kiwi do Sul do Brasil (KW), 24 a isolados da Mata Atlântica (MA) e 48 a isolados do Cerrado (CE). A população KW apresentou o maior número de alelos privados, 35, comparado às populações CE e MA, que apresentaram 26 e 15, respectivamente. Todas as populações apresentaram diversidade gênica de Nei semelhantes a de populações nativas. As populações não diferiram quanto a riqueza genotípica, número de Hill de ordem 0, porém a população CE diferiu significativamente quanto aos números de Hill de ordem 1 e 2 das outras populações. Os genótipos das populações formaram uma extensa rede de

haplótipos e alguns genótipos de KW estiveram mais próximos a genótipos das populações CE e MA do que da sua própria população. Foram identificados 17 grupos homogêneos entre os 280 isolados, sendo que alguns grupos foram formados por isolados de mais de uma população. Entre os cenários evolutivos construídos, o que apresentou a maior probabilidade foi aquele em que KW é oriundo da mistura entre uma população não amostrada de isolados de *C. fimbriata* nativos do sul do Brasil com as populações CE e MA.

Palavras-chaves: *Actinidia* spp., *Ceratocystis fimbriata*, diversidade, genética, genótipos, microssatélites.

Introdução

Ceratocystis fimbriata Ellis & Halst. é um patógeno de plantas considerado no Brasil como uma relevante ameaça ao setor agrícola, em virtude da sua capacidade de infectar espécies economicamente importantes, tais como manga (*Mangifera indica*), seringueira (*Hevea brasiliensis*), eucalipto (*Eucalyptus spp.*), teca (*Tectona grandis*), figueira (*Ficus carica*) e acácia (*Acacia mearnsii*) (Baker et al. 2003; Santos & Ferreira 2003, Harrington et al. 2005; Ferreira et al. 2010; Firmino et al. 2012; Valdetaro et al. 2015) . Além da ampla gama de hospedeiros, esse fungo chama atenção pela alta variabilidade genética e fisiológica (Ferreira et al. 2010; Oliveira et al. 2016), pela natureza vascular de suas infecções e aos grandes danos causados às culturas (Alfenas et al. 2009). Ademais, o fato de o patógeno infectar tecido vascular dificulta a sua detecção rápida, o que contribui para maiores danos e torna a doença mais ameaçadora, pois facilita a disseminação inadvertida do patógeno em material propagativo assintomático (Engelbrecht et al. 2004; Engelbrecht & Harrington, 2005; Johnson et al. 2005; Thorpe et al. 2005; Engelbrecht et al. 2007, Ferreira et al. 2011). Isso pode levar a novos surtos da

doença ou então ao aumento da variabilidade genética, quando ocorrer a mistura de duas ou mais populações geneticamente distintas.

Em kiwi a murcha-de-ceratocystis foi relatada pela primeira vez, em 2010, no estado do Rio Grande do Sul e, atualmente há relatos da doença também no estado de Santa Catarina (Sonogo et al 2010; Ferreira et al. 2017). A enfermidade é caracterizada pela perda de turgescência e brilho das folhas, que posteriormente se enrolam, secam e caem, culminando com a morte da planta. Nos tecidos internos, observam-se lesões radiais de coloração castanho-avermelhada. A doença reduz a produção de frutos e estes, quando produzidos em plantas infectadas, são menores e rejeitados para a comercialização (Piveta et al. 2016). A murcha-de-ceratocystis tem causado grandes prejuízos à kiwicultura brasileira. Alguns pomares do Rio Grande do Sul tiveram entre 25-30% de mortalidade de plantas (Ferreira et al. 2017), principalmente pelo emprego de enxertos e porta-enxertos altamente suscetíveis à doença.

Recentemente, por meio de sequências *mating type* e 14 marcadores microssatélites, foi sugerido que os isolados, responsáveis pela epidemia de murcha-de-ceratocystis em kiwi no Brasil, são oriundas, possivelmente, de três populações do fungo (população de isolados de eucalipto do Cerrado, população de isolados da Mata Atlântica, e uma população de isolados nativos dos solos do sul do Brasil). A constatação da plausibilidade desta hipótese explica, em parte, alta variabilidade genética encontrada nesta população (Ferreira et al. 2017).

Análises de genética de populações têm fornecido informações confiáveis sobre a história evolutiva de populações (Giraud et al. 2008; Grunwald & Goss 2011). Para o estudo de complexos cenários evolutivos tem sido utilizada a computação bayesiana aproximada (CBA) (Beaumont et al. 2002; Wei et al. 2015). A CBA é uma abordagem estatística capaz de comparar cenários concorrentes e complexos da história evolutiva de

populações e de estimar os parâmetros demográficos dos cenários, por meio de marcadores moleculares (Bertorelle et al. 2010). Em vista disto, essa abordagem tem sido utilizada para reconstruir histórias demográficas de patógenos de plantas (Dilmaghani et al 2012; Dutech et al. 2012; Janousek et al. 2016)

Faz-se necessária, portanto, a utilização de análises de genética de populações para elucidar a estrutura genética e a história evolutiva da população responsável pela epidemia de murcha-de-ceratozystis em kiwi no Brasil, e identificar se ela é oriunda de uma mistura de populações, o que revelaria a movimentação de genótipos. Além do mais, disponibilizaria valiosas informações para os programas de melhoramento de kiwi que têm como foco principal a resistência à murcha-de-ceratozystis.

Em razão do exposto, o presente trabalho tem o objetivo de avaliar se a população de isolados de *C. fimbriata* de kiwi do Brasil é oriunda de uma mistura de isolados de diferentes populações e quais são suas populações fundadoras.

Resultados

Diversidade e desequilíbrio de ligação

Um total de 118 genótipos foram detectados entre os 280 isolados de *C. fimbriata* analisados. Destes 118 genótipos, 46 pertencem à população constituída pelos isolados de kiwi (KW), 24 à população formada pelos isolados da Mata Atlântica (MA) e 48 à população dos isolados do Cerrado (CE) (Tabela 1). Nenhum dos genótipos foi encontrado em mais de uma população (Tabela 1 e Fig 1). O genótipo mais frequente na população KW (GM.113) foi detectado em 37 isolados. Nas populações CE e MA, os genótipos mais frequentes, GM.32 e GM.1, foram detectados em 19 e 9 isolados, respectivamente. As curvas de acumulação de genótipos obtidas indicaram que todas as populações tiveram 100% dos genótipos acessados com 12 marcadores microssatélites

(Material suplementar, Fig 1S). A população KW apresentou o maior número de alelos privados, 35, e a população MA foi a que apresentou o menor número, 15 (Tabela 2). O loco CAA38 foi o mais polimórfico nas três populações, com 18 alelos na população KW, 10 na população MA e 9 na população CE. O único loco monomórfico detectado foi o CA900 (Tabela 3).

Níveis de diversidade gênica similares a de populações nativas foram encontrados nas três populações estudadas (Oliveira et al 2015, Oliveira et al. 2017, Ferreira et al. 2010), mesmo quando estas não foram corrigidas por clone (Tabela 4). A diversidade gênica da população KW aumentou significativamente, quando a sua análise utilizou os dados corrigidos por clone (Tabela 4). As populações KW e CE não diferiram quanto à riqueza genotípica, número de Hill de ordem 0, e a população CE diferiu significativamente quanto aos números de Hill de ordem 1 e 2 de KW e MA, quando calculado com rarefação para o número de isolados da menor população (MA=79) (Fig 2 e Tabela 5)

Em todas as populações, o índice de associação padronizado r_D foi significativamente diferente de zero, evidenciando que os modos de reprodução que prevalecem em CE, KW e MA é o assexuado ou por autofecundação (Tabela 6), o que era esperado já que *C. fimbriata* é um fungo homotálico com mating-type unidirecional, o que limita o acasalamento ao acaso dentro da espécie (Wilken et al. 2014).

Estrutura populacional e diferenciação genética entre as populações

A *minimum spanning network* (MSN) revelou que os genótipos das populações KW, CE e MA formam uma extensa rede de haplótipos, um demonstrativo de que as populações não estão limitadas a um pequeno grupo de genótipos muito relacionados. É possível notar, também, que, ainda não havendo compartilhamento de genótipos entre as populações, alguns genótipos de kiwi estão mais relacionados a genótipos do Cerrado e

da Mata Atlântica do que da sua própria população, o que indica possível ocorrência de algum evento de migração entre KW e as outras populações. Outra característica revelada pela MSN é que grupos de genótipos da população MA estão espalhados em três grupos com grande número de isolados ao longo da rede (Fig 1), arranjo esperado para uma população que passou por eventos de gargalo genético. Apesar de alguns genótipos de KW estarem muito relacionados a genótipos das populações CE e MA, o índice de diferenciação G''_{st} da população KW em relação as populações CE e MA atingiu altos valores, acima de 0.85 (Tabela 7), sustentando a hipótese de que houve migração de CE e MA para KW.

A análise discriminante dos componentes principais (ADCP) identificou 17 grupos entre os 218 isolados (Fig 3B e Tabela 8). Alguns grupos foram formados por isolados de mais de uma população, como exemplo mais extremo, tem-se o grupo 10, formado por isolados das três populações (Tabela 8), o que permite inferir possível evento de migração entre as populações. A população CE foi a única população que não teve isolados separados pelos eixos 1 e 2 do gráfico e a que apresentou a menor distância genética entre os isolados (Fig 3A). O grupo 11, constituído por isolados da população MA, que foram coletados no leste do estado do Rio de Janeiro, foi o grupo mais distante dos outros grupos identificados pela ADCP. Isto era esperado, já que em estudos prévios, estes isolados demonstraram ser geneticamente diferentes (Oliveira et al. 2015; Oliveira et al. 2017).

História evolutiva

Dois cenários apresentaram as maiores probabilidades posteriori, por meio da computação bayesiana aproximada (CBA): cenários V ($P=0.4512$, 95% IC 0.4590-0.7714) e VI ($P=0.4894$, 95% IC 0.4790-0.7831). A sobreposição dos intervalos de confiança dos cenários V e VI, juntamente com a influência que o cenário V apresenta

sob os erros tipo I (probabilidade de excluir o cenário selecionado, quando ele é o verdadeiro cenário) e tipo II (probabilidade de selecionar um cenário, quando ele não é o verdadeiro cenário) do cenário VI e vice-versa, se deve, possivelmente, a semelhança desses cenários (V e VI). Logo, uma segunda análise, na qual ambos foram comparados, separadamente, com os demais cenários, foi realizada para decidir qual dentre os dois cenários é o melhor. Na segunda análise, o Cenário VI foi superior, apresentando maior probabilidade à posteriori que o Cenário V, razão pela qual foi adotado como o verdadeiro cenário (Tabela 9). Para avaliar a ocorrência de gargalo genético na população MA, o cenário VI foi comparado com a sua réplica (R-VI), acrescida de um evento de gargalo genético. O cenário VI, sem o acréscimo do evento de gargalo, apresentou a maior probabilidade à posteriori (Tabela 9).

Discussão

A abordagem computacional bayesiana aproximada (CBA) revelou que o cenário mais elucidativo da relação evolutiva entre as populações de isolados de *Ceratocystis fimbriata* CE, MA e KW é o que infere a população KW como sendo originada de uma mistura das populações CE e MA com outra nativa dos solos do sul do Brasil (Cenário VI). Resultados de estudo anteriores, nos quais foram realizadas análises filogenéticas de sequências de DNA das regiões *mating type* e ITS rDNA, e de análises com os mesmos 14 marcadores microssatélites, também sugerem que essas três populações são responsáveis pela epidemia de murcha-de-ceratocystis em kiwi no Brasil (Piveta et al. 2016, Ferreira et al. 2017).

A rede de haplótipos (MSN) revelou que determinados genótipos, detectados na população de isolados de kiwi (KW), estão mais relacionados a genótipos do Cerrado (CE) e da Mata Atlântica (MA) do que a genótipos da sua própria população, o que pode

estar associado à eventos de migração de indivíduos das populações CE e MA para a área dos pomares de kiwi do Brasil. A existência de grupos, cuja a formação apresenta isolados de mais de uma população na ADCP (Tabela 8), e a combinação dos resultados encontrados para a diversidade gênica de Nei (1978) e do índice de associação padronizado r_D das populações também são um indício de ter existido um evento de migração entre as populações.

A consistência desses resultados é, ainda, mais acentuada, quando conflitados com informações históricas e geográficas. Os primeiros plantios de kiwi no Brasil foram implantados próximos ao município de Campinas, estado de São Paulo, pelo Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) (Carvalho et al. 2002). Posteriormente, a kiwicultura foi introduzida nos estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina; boa parte do material vegetal implantado nestes estados veio de viveiros do estado de São Paulo. Uma vez que os viveiros do estado de São Paulo já foram associados ao patógeno, acredita-se que alguns dos genótipos do Cerrado e da Mata Atlântica possam ter sido disseminados para os plantios de kiwi por meio desses materiais (Ferreira et al. 2017). Este não seria o primeiro relato de plantios que implantaram material vegetal infectado oriundo de viveiros de São Paulo, já que alguns genótipos encontrados em plantios de manga também foram detectados em viveiros localizados no município de Limeira (Oliveira et al. 2015).

Por outro lado, alguns plantios de kiwi estão localizados no extremo sul da Mata Atlântica, o que explicaria a detecção de alguns genótipos típicos dessa região entre os isolados obtidos de kiwi (Ferreira et al. 2017). É importante salientar que, no Brasil, isolados de *C. fimbriata* de hospedeiros cultivados ou exóticos não apresentam especialização por hospedeiro (Ito et al. 1988; Baker et al. 2003; Harrington et al. 2011; Valdetaro et al. 2015), o que permite a introdução de genótipos do fungo de uma cultura em outra.

A população MA apresentou alta diversidade gênica e fração clonal, baixos valores de diversidade genotípica, além do arranjo peculiar dos genótipos na rede de haplótipos. Tais padrões levam a supor ocorrência de gargalo genético, o que coincide com resultados encontrados em um estudo anterior, no qual foram utilizadas sequências ITS rDNA, sequências *Mating type* e os mesmos 14 marcadores microssatélites utilizados neste estudo (Oliveira et al. 2017). No entanto, quando realizada a comparação por meio da CBA do melhor cenário, com e sem gargalo genético na população MA, o cenário sem o acréscimo do gargalo foi o que obteve a maior probabilidade à posteriori.

Os resultados encontrados neste estudo alertam para a necessidade de melhorias das práticas utilizadas para conter a dispersão do patógeno. A disseminação de cepas de *C. fimbriata* de uma região para outra por meio de material propagativo infectado tem sido sugerida, frequentemente, como a causa de novos surtos da doença (Engelbrecht et al. 2004; Engelbrecht & Harrington, 2005; Johnson et al. 2005; Thorpe et al. 2005; Engelbrecht et al. 2007, Ferreira et al. 2011). Além disso, outra consequência da disseminação de cepas do fungo é a mistura de genótipos de distintas populações, que leva ao aumento da variabilidade genética, dificultando o trabalho dos melhoristas, quando o objetivo é encontrar um material resistente à doença. Logo, pelos motivos expostos, maiores cuidados devem ser tomados para evitar a dispersão de *C. fimbriata* em materiais propagativos assintomáticos.

Material e Métodos

Isolados, extração de DNA e genotipagem

Para o estudo foram analisados isolados representativos de populações brasileiras de *C. fimbriata* de eucalipto (*Eucalyptus spp.*) (Harrington et al 2011; Oliveira et al. 2017), manga (*Mangifera indica*) (Harrington et al. 2005; Harrington et al. 2011; Ferreira

et al. 2010; Oliveira et al. 2015; Oliveira et al. 2017), taro (*Colocasia esculenta*) (Thorpe et al. 2005; Oliveira et al. 2017) e kiwi (*Actinidia* spp.) (Piveta et al. 2016; Ferreira et al. 2017). Além dos isolados de *C. fimbriata* de kiwi, avaliados por Piveta et al. (2016) e Ferreira et al. (2017), foram acrescentados 46 novos isolados (Fig 4 e Tabela 10). Os novos isolados foram coletados de plantas de kiwi doentes, em pomares localizados nos municípios de Campo Belo do Sul, Fraiburgo e São Joaquim no estado de Santa Catarina, e, no município de Farroupilha no estado do Rio Grande do Sul, no ano de 2015 (Fig 4 e Tabela 10).

Para obtenção dos isolados, amostras de caule de plantas doentes foram encaminhadas para o laboratório de Patologia Florestal, Universidade Federal de Viçosa, onde foi realizado isolamento indireto com iscas de cenoura (Moller & Devay, 1968). Após o isolamento, foi obtida a cultura monoascospórica dos isolados. Para isto, uma massa de ascósporo por colônia foi transferida para placa de Petri (9 cm), contendo meio de cultura EMLA (2% extrato de malte, 0,2% extrato de levedura e 2% de ágar), e espalhada utilizando óleo mineral e uma alça de Drigalski. Posteriormente, as placas foram mantidas a 28 °C, com fotoperíodo de 12 h sob 20 $\mu\text{mols m}^{-2} \text{s}^{-1}$, por 24 horas. Após isto, um único esporo germinado foi transferido para outra placa de Petri, contendo o mesmo meio de cultura. As culturas monoascospóricas foram armazenadas no Laboratório de Patologia Florestal, da Universidade Federal de Viçosa, em glicerol 15% a -80 °C.

O DNA dos isolados foi extraído, utilizando-se o Kit WizardGenomic® DNA Purification (Promega Inc), com pequenas modificações (Valdetaro et al. 2015). A genotipagem foi realizada com 14 marcadores microssatélites (AAG8, AAG9, CAA9, CAA10, CAA15, CAA38, CAA80, CAT1, CAT12, CAG5, CAG15, CAG900, GACA60 e GACA6K), desenvolvidos para um isolado de *C. cacaofunesta* (Steimel et al. 2004) e

que foram, recentemente, mapeados no genoma de *C. fimbriata* (Simpson et al. 2013). Cada par de primer teve um dos primers etiquetado com fluorescência. As ampliações por PCR foram realizadas, utilizando-se o termociclador ‘Veriti® 96-well thermal cycler’ (Applied Biosystems Inc., EUA), seguindo o protocolo anteriormente descrito por Ferreira et al. 2010. O tamanho da banda do produto da PCR foi determinado por eletroforese capilar, para o qual foi utilizado analisador ‘ABI Prism 3500-Avant Genetic Analyzer’ (Applied Biosystems Inc., EUA) e o software GeneMapper v4.1 Software (Applied Biosystems Inc.). A maioria dos loci microssatélites possui repetições de trinucleotídeos com exceções dos locus GACA6K e GACA60, que possuem repetições de bi e tetranucleotídeos, respectivamente.

Análise dos dados

Populações e calibragem dos dados. Os isolados foram separados em três populações. Uma população foi constituída por isolados de eucalipto e manga, coletados no Cerrado (CE); uma segunda população foi composta por isolados de manga e taro, coletados na Mata Atlântica (MA); e a última população foi formada por isolados de kiwi, do sul do Brasil (KW) (Tabela 1). Como nem todos os genótipos foram obtidos no mesmo equipamento, todos os isolados tiveram seus alelos sincronizados de acordo com o analisador ‘ABI Prism 3500- Genetic Analyzer’ (Applied Biosystems Inc., EUA) do Laboratório de Patologia Florestal/Bioagro da Universidade Federal de Viçosa. Posteriormente, foi acessado o poder de discriminação de indivíduos do conjunto de marcadores utilizados, por meio de curvas de acumulação de genótipos em cada população, construídas com 1.000 reamostragens, através do pacote *poppr* (Kamvar et al. 2014) para o software R (R Development Core Team). Os genótipos foram construídos para cada isolado, combinando-se os alelos identificados em cada um dos locus SSR,

com exceção do locus CAG900, que foi monomórfico. A fração clonal de cada população foi calculada como $1 - [(\text{número de diferentes genótipos}) / (\text{número total de isolados})]$.

Diversidade genética e desequilíbrio de ligação. A frequência alélica, os alelos privados por população e a diversidade gênica não viesada de Nei (1978) (H_E) foram obtidos com o emprego do pacote *poppr* para o software R (Kamvar et al. 2014). Para a obtenção dos alelos privados, os dados foram corrigidos por clone, processo que remove isolados geneticamente idênticos, de modo que cada genótipo de cada população seja representado por apenas um indivíduo. A diversidade gênica não viesada de Nei (1978) foi estimada com e sem correção por clone. O índice de associação padronizado r_D , que testa se as populações estão em desequilíbrio de ligação ou não, foi mensurado com correção por clone, utilizando-se 999 permutas para a obtenção do p-valor, por meio do pacote *poppr* para o R.

A diversidade genotípica das populações foi estimada pelos números de Hill de ordem 0 (Q0), 1 (Q1) e 2 (Q2). Os números de Hill correspondem às estimativas de riqueza de genótipos (Q0), do exponencial do índice de Shannon (Q1) e do inverso do índice de concentração de Simpson (Q2), respectivamente (Chao et al. 2014). Conforme aumenta-se a ordem de “Q” maior ênfase se dá aos genótipos dominantes. Curvas que permitem a visualização do número de Hill, com rarefação ou extrapolação, foram empregadas para comparar a diversidade genotípica entre amostras de diferentes tamanhos, a partir de uma abordagem não assintótica. Um intervalo de confiança de 95% (95% IC) foi estimado e plotado para cada curva e a comparação da diversidade genotípica das populações se deu com base na sobreposição dos intervalos de confiança. As análises de diversidade genotípica foram realizadas com o pacote *iNEXT* para o software R (Chao et al. 2014).

Estrutura populacional e diferenciação genética entre as populações. O índice de diferenciação G''_{ST} (Meirmans et al. 2011) entre as populações foi calculado com o uso do pacote *diveRsity* do software R (Keenan et al. 2013). Para acessar a relação evolutiva entre os isolados, construiu-se uma *minimum spanning network* (MSN), utilizando a distância genética de Bruvo (Bruvo et al. 2004). A obtenção das matrizes de distância e a geração da MSN deram-se com a utilização do pacote *poppr* do software R (Kamvar et al. 2014). Para investigar a estrutura das populações, por meio de agrupamentos, realizou-se uma análise discriminante dos componentes principais (ADCP), empregando-se os pacotes *poppr*, *ade4* e *adegenet* (Excoffier et al. 1992; Jombart et al 2010; Kamvar et al 2014) do R. Como o ADCP é muito sensível ao número de componentes principais usados na análise, utilizou-se a função *xvalDapc* do pacote *adegenet* (Jombart et al. 2010) para acessar o número mais provável de componentes principais a partir de 100 réplicas. Para isto, empregou-se um conjunto de dados treinamento constituído por 90% dos dados totais. Para definir o número correto de grupos homogêneos entre os isolados, foi utilizado o algoritmo K-means, através do comando *find.clusters* do pacote *poppr* do software R (Kamvar et al. 2014). O número de grupos mais provável foi definido por meio do critério de informação Bayesiana (BIC). Para interpretar com maior clareza a estrutura das populações, foi construído um gráfico personalizado da ADCP, no qual os indivíduos foram representados por sua população e não por seu respectivo grupo, o que implicou a utilização da função *s.class* do pacote *ade4* no software R (Dray & Dufour 2007).

Análise da história evolutiva.

A comparação dos possíveis cenários que descrevem a relação ancestral entre as populações deu-se pela abordagem de computação bayesiana aproximada (CBA) presente no software DIYABC v2.0.4 (Cornuet et al., 2014). Sendo breve, a comparação dos cenários com a utilização da CBA ocorre da seguinte maneira: primeiro, define-se a

distribuição à priori dos valores dos parâmetros das populações (tamanho das populações, tempo dos eventos populacionais e taxa de mixtura) e do modelo mutacional. Posteriormente, um grande número de conjuntos de dados simulados são produzidos a partir de cenários estabelecidos pelo usuário. Após isto, a probabilidade à posteriori de um determinado cenário é estimada, aplicando-se um procedimento de regressão logística sobre a frequência desse cenário entre os conjuntos de dados simulados mais próximos dos dados observados (Fagundes et al. 2007). As análises CBA neste estudo foram realizadas com os dados microsatélites corrigidos por clone.

Definindo cenários. Seis cenários foram construídos, baseados em informações históricas e genéticas de estudos prévios (Piveta et al. 2016; Ferreira et al. 2017; Oliveira et al. 2017), e nos resultados dos ensaios descritos acima (Fig 5) O primeiro cenário construído (Cenário I) foi o mais simples possível, no qual as três populações se divergiam de um ancestral comum a um tempo T_f (divergência inicial das populações, ou seja, o tempo da separação das três populações CE, MA e KW do ancestral comum mais recente) e evoluíram separadamente, sem ocorrer qualquer evento demográfico (gargalo genético ou mistura entre as populações). O próximo cenário (Cenário II) caracteriza-se por uma topologia que parte da inferência de que a população KW é derivada de um evento de mistura entre as outras duas populações. Cenários, nos quais a população KW é resultado de uma mistura de uma das outras populações amostradas (CE ou MA) com outra população não amostrada, natural da região Sul do Brasil (NA), também foram testados (Cenários IV e V). O Cenário VI simboliza o nascimento da população KW, como um evento derivado de uma mistura entre a população NA com as outras duas populações (CE e MA). Por último, devido ao resultado da ADCP (Fig 3 e Tabela 8), em que muitos isolados de KW e MA estão agrupados ou muito próximos de grupos de isolados do cerrado, foi testado um outro cenário, no qual a população CE é derivada de

um evento de mistura entre as populações MA e KW (Cenário III). E, para verificar se a população MA passou por algum evento de gargalo genético, construiu-se uma réplica do melhor cenário, incrementada com evento de gargalo genético. O melhor cenário e sua réplica foram comparados separadamente.

Distribuições à priori, estatísticas sumárias. Devido à falta de informação sobre o tamanho das populações analisadas, uma distribuição ampla (10-100.000) e uniforme foi adotada como distribuição à priori para o tamanho efetivo das populações. Como, possivelmente, o fungo realiza mais de um ciclo sexual por ano, o tempo de fundação de cada população seguiu uma distribuição log-uniforme, com um intervalo entre 16-500 gerações. Para o tempo de divergência das populações, a partir do seu ancestral comum mais recente (T_f), foi adotada uma distribuição uniforme com amplitude de 600-100.000 gerações. Para finalizar, as taxas de mistura entre duas populações, quando necessárias, seguiram distribuição uniforme (0.001-0.999). Os parâmetros do modelo de mutação foram definidos de acordo com a configuração padrão do software DIYABC. Estas configurações são amplamente usadas para organismos eucariotos (Cornuet et al. 2014). Todos os loci seguiram o modelo mutacional *stepwise* (Tabela 11). Como estatísticas sumárias, utilizaram-se a média do número de alelos por população, a média da diversidade genética por população, a variância média do tamanho dos alelos por população, assim como o índice de diferenciação F_{ST} (Weir & Cockerham 1984), o índice médio de classificação (Rannala and Mountain, 1997; Pascual et al. 2007) e a distância genética ($\delta\mu^2$) (Goldstein et al. 1995), tomados entre pares de população.

Escolhendo o melhor cenário. Um milhão de conjunto de dados foram simulados para cada cenário, como recomendado em Cornuet et al. (2014). Subsequentemente, obtiveram-se as probabilidades posteriores de cada cenário por meio de uma regressão logística politômica sobre o 1% dos dados simulados mais próximos dos dados

observados. O cenário com a maior probabilidade à posteriori foi escolhido como o mais provável. Em seguida, a distribuição à posteriori dos parâmetros do cenário mais provável foi avaliada por meio de uma regressão local linear sobre o 1% dos conjuntos de dados simulados mais próximos dos dados observados e aplicando-se uma transformação logit sobre os valores encontrados dos parâmetros (Beaumont et al. 2002; Cornuet et al. 2008; Barres et al. 2012).

Confiança na escolha do cenário e a adequação do modelo. Avaliou-se a confiança na escolha do cenário, a partir de uma estimativa dos erros tipo I e tipo II como descrito em Cornuet et al. (2010). Para isto, 1000 pseudo conjuntos de dados foram simulados, com base em cada um dos cenários. A probabilidade à posteriori de cada cenário foi então avaliada para cada um dos pseudo conjuntos de dados. O erro tipo I - probabilidade de excluir o cenário selecionado, quando ele é o verdadeiro cenário - foi medido através da proporção dos pseudo conjuntos de dados simulados, a partir do cenário selecionado, que apresentaram maior probabilidade à posteriori de ocorrer em outros cenários. O erro tipo II - probabilidade de selecionar um cenário, quando ele não é o verdadeiro cenário - foi estimado, através da proporção de pseudo conjuntos de dados que possuíam maior probabilidade à posteriori para o cenário selecionado, embora simulados em outros cenários.

Conferiu-se a qualidade do ajuste do melhor cenário (adequação), acessando-se a opção “model-checking” do software DIYABC (Cornuet et al. 2014). Essa análise avalia a capacidade de um cenário produzir um conjunto de dados similares aos conjuntos de dados observados. As estatísticas sumárias, que não foram usadas em análises anteriores, foram adicionadas para checar a adequação do modelo, como recomendado por Cornuet et al. (2010).

Referências

1. Baker CJ, Harrington TC, Krauss U, Alfenas AC. Genetic variability and host specialization in the Latin American clade of *Ceratocystis fimbriata*. *Phytopathology*. 2003;93: 1274–1284.
2. Santos AF, Ferreira FA. Murcha-de-Ceratocystis em Acácia-negra no Brasil. *Fitopatol Bras*. 2003;28:S325.
3. Harrington TC, Thorpe DJ, Marinho V, Furtado EL. First report of black rot of *Colocasia esculenta* caused by *Ceratocystis fimbriata* in Brazil. *Fitopatol Bras*. 2005;30: 88–89.
4. Ferreira EM, Harrington TC, Thorpe DJ, Alfenas AC. Genetic diversity and interfertility among highly differentiated populations of *Ceratocystis fimbriata* in Brazil. *Plant Pathol*. 2010;56: 721–735.
5. Firmino AC, Tozze Júnior HJ, Furtado EL. First report of *Ceratocystis fimbriata* causing wilt in *Tectona grandis* in Brazil. *New Dis Reports*. 2012;5: Read 25:24.
6. Valdetaro DCOF, Oliveira LSS, Guimarães LMS, Harrington TC, Ferreira MA, Freitas RG, et al. Genetic variation, morphology and pathogenicity of *Ceratocystis fimbriata* on *Hevea brasiliensis* in Brazil. *Trop Plant Pathol*. 2015;40: 184–192.
7. Oliveira LSS, Damacena MB, Guimarães LMS, Siqueira DL, Alfenas AC. *Ceratocystis fimbriata* isolates on *Mangifera indica* have different levels of aggressiveness. *Eur J Plant Pathol*. 2016;145: 847–856.
8. Alfenas AC, Zauza EA, Mafia RG & Assis TF. Doenças causadas por agente bióticos e infecciosos. In: Alfenas AC, Zauza EA, Mafia RG & Assis TF. *Clonagem e doenças do eucalipto*. Viçosa. Editora UFV. 2009. pp. 207-319.
9. Engelbrecht CJB, Harrington TC, Steimel J, Capretti P. Genetic variation in Eastern North American and putatively introduced populations of *Ceratocystis fimbriata* f.

- sp. *Platani*. *Molecular Ecology*. 2004;13: 2995-3005.
10. Engelbrecht CJB, Harrington TC. Intersterility, morphology, and taxonomy of *Ceratocystis fimbriata* on sweet potato, cacao, and sycamore. *Mycology*. 2005;97: 57-69.
 11. Johnson JA, Harrington TC, Engelbrecht CJ. Phylogeny and taxonomy of the North American Clade of *Ceratocystis fimbriata* complex. *Mycology*. 2005;97: 1067-92.
 12. Thorpe DJ, Harrington TC, Uchida JY. Pathogenicity, internal transcribed spacer rDNA variation, and human dispersal of *Ceratocystis fimbriata* on family Araceae. *Phytopathology*. 2005;95: 316-23
 13. Engelbrecht CJB, Harrington TC, Alfenas AC, Suarez C. Genetic variation of populations of the cacao wilt pathogen, *Ceratocystis cacaofunesta*. *Plant Pathology*. 2007;56: 923–933
 14. Ferreira MA, Harrington TC, Alfenas AC, Mizubuti ESG. Movement of genotypes of *Ceratocystis fimbriata* within and among *Eucalyptus* plantations in Brazil. *Phytopathology*. 2011;101: 1005-1012.
 15. Sonogo OR, Ferrera MA, Valdebenito-Sanhueza RM, Gava R, Garrido LDAR, et al. Primeiro relato da murcha-de-Ceratocystis em kiwi. *Trop Plant Pathol*. 2010;35: 233.
 16. Ferreira MA, Harrington TC, Piveta G, Alfenas AC. Genetic variability suggests that three populations of *Ceratocystis fimbriata* are responsible for the *Ceratocystis* wilt epidemic on kiwifruit in Brazil. *Trop Plant Pathol*. 2017;42: 86–95.
 17. Piveta G, Ferreira MA, Muniz MF, Valdetaro DCOF, Valdebenito-Sanhueza R, et al. *Ceratocystis fimbriata* on Kiwifruit (*Actinidia* spp.) in Brazil. *New Zeal J Crop Hortic Sci*. 2016;44: 13–24.
 18. Giraud T, Enjalbert J, Fournier E, Delmotte F, Dutech C. Population genetics of fungal diseases of plants. *Parasite*. 2008;15: 449-454.

19. Grünwald NJ, Goss EM. Evolution and population genetics of exotic and reemerging pathogens: Novel tools and approaches. *Annu. Rev. Phytopathol.* 2011;49: 249-267.
20. Beaumont MA, Zhang W, Balding DJ. Approximate Bayesian Computation in population genetics. *Genetics.* 2002;162: 2025-2035.
21. Wei SJ, Cao LJ, Gong YJ, Shi BA, Wang S, et al. Population genetic structure and approximate Bayesian computation analyses reveal the southern origin and northward dispersal of the oriental fruit moth *Grapholita molesta* (Lepidoptera: Tortricidae) in its native range. *Mol. Ecol.* 2015, 24: 4094-4111.
22. Bertorelle G, Benazzo A, Mona, S. ABC as a flexible framework to estimate demography over space and time: Some cons, many pros. *Mol. Ecol.* 2010;19: 2609-2625.
23. Dilmaghani A, Gladieux P, Gout L, Giraud T, Brunner PC, et al. Migration patterns and changes in population biology associated with the worldwide spread of the oilseed rape pathogen *Leptosphaeria maculans*. *Mol. Ecol.* 2012;21: 2519-2533.
24. Dutech C, Barrès B, Bridier J, Robin C, Milgroom MG, et al. The chestnut blight fungus world tour: Successive introduction events from diverse origins in an invasive plant fungal pathogen. *Mol. Ecol.* 2012;21: 3931-3946.
25. Janousek J, Wingfield MJ, Marmolejo Monsivais JG, Jankovsky L, Stauffer C, Konecny A, et al. Genetic analyses suggest separate introductions of the pine pathogen *Lecanosticta acicola* into Europe. *Phytopathology.* 2016;106: 1413-1425
26. Oliveira LSS, Harrington TC, Ferreira MA, Damaceno MB, Al-Sadi AM, et al. Species or genotypes? Reassessment of four recently described species of the *Ceratocystis fimbriata*, on *Mangifera indica*. *Phytopathology.* 2015;105: 1229-1244.
27. Oliveira LSS, Harrington TC, Ferreira MA, Freitas RG, Alfenas AC. Populations of *Ceratocystis fimbriata* on *Colocasia esculenta* and other hosts in the Mata Atlântica

- region in Brazil. *Plant Pathology*. 2017;67.
28. Wilken PM, Steenkamp ET, Wingfield MJ, de Beer ZW, Wingfield BD. DNA Loss at the *Ceratocystis fimbriata* mating locus results in self-sterility. *Plos One* 9(3): e92180. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092180>
 29. Carvalho AV, Lima LCO. Qualidade de kiwis minimamente processados e submetidos a tratamento com ácido ascórbico, ácido cítrico e cloreto de cálcio. 2002;37: 679-685.
 30. Ito MF, Bergamin Filho A. Metodologia de inoculação de *Ceratocystis fimbriata* Ell. & Halst. em acácia-negra, crotalária, figueira, mangueira e patogenicidade a diferentes hospedeiros. *Summa Phytopathologica* 1988;14: 117-135.
 31. Harrington TC, Thorpe DJ, Alfenas AC. Genetic variation and variation in aggressiveness to native and exotic hosts among brazilian populations of *Ceratocystis fimbriata*. *Phytopathology*. 2011;101: 555-566.
 32. Moller WJ, DeVay JE. Carrot as a species-selective isolation medium for *Ceratocystis fimbriata*. *Phytopathology*. 1968;58: 123-124
 33. Steimel J, Engelbrecht CJB, Harrington TC. Development and characterization of microsatellite markers for fungus *Ceratocystis fimbriata*. *Molecular Ecology Notes*. 2004;4: 215-218.
 34. Simpson MC, Wilken PM, Coetzee MPA, Wingfield MJ, Wingfield BD. Analysis of microsatellite markers in the genome of plant pathogen *Ceratocystis fimbriata*. *Fungal Biology*. 2013;117: 545-555.
 35. Kamvar ZN, Tabima JF, Grunwald NJ. *Poppr*: na R package for genetic analysis of populations with clonal, partially clonal, and/or sexual reproduction. *PeerJ*. 2014; 2-e281.
 36. Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance a small number of

- individuals. *Genetics*. 1978;89: 583-590.
37. Chao A, Gotelli NJ, Hsieh TC, Sander EL, Ma KH, et al. Rarefaction and extrapolation with Hill numbers: a framework for sampling and estimation in species diversity studies. *Ecological Monographs*. 2014;84: 45-67.
 38. Meirmans PG, Hedrick PW. Assessing population structure: *Fst* and related measures. *Molecular Ecology*. 2011;11: 5-18.
 39. Keenan K, McGinnity Philip, Cross TF, Crozier WW, Prodohl PA. *diveRsity*: an R package for the estimation and exploration of population genetics parameters and their associated errors. *Methods in Ecology and Evolution*. 2013;4: 782-788.
 40. Bruvo R, Michiels NK, D'souza TG, Schulenburg H. A simple method for calculation of microsatellite genotypes distances irrespective of ploidy level. *Molecular Ecology*. 2004;13: 2101-2106.
 41. Excoffier L, Smouse P, Quattro J. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*. 1992;131: 479-491.
 42. Jombart T, Devillard S, Balloux F. Discriminant analysis of principal components: A new method for the analysis of genetically structured populations. *BMC genetics*. 2010; 11:94.
 43. Dray S, Duffuor AB. The *ade4* Package: implementing the duality diagram for ecologists. 2007;22: 1-20.
 44. Cornuet JM, Pudlo P, Veyssier J, Dehne-Garcia A, Gautier M, et al. DIYABC v2.0: a software to make approximate Bayesian computation inferences about population history using single nucleotide polymorphism, DNA sequence and microsatellite data. 2014;30: 1187-1189.
 45. Fagundes NJR, Ray N, Beaumont M, Neuenschwander S, Salzano FM, Bonatto SL

- et al. Statistical evaluation of alternative models of human evolution. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007;104: 17614–17619.
46. Weir BS, Cockerham CC. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*. 1984;38: 1358–1370.
 47. Rannala B, Mountain JL. Detecting immigration by using multilocus genotypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1997;94: 9197–9201.
 48. Pascual M, Chapuis MP, Mestres F, Balanya J, Huey RB, et al. Introduction history of *Drosophila subobscura* in the New World: a microsatellite based survey using ABC methods. *Mol. Ecol*. 2007;16: 3069-3083.
 49. Goldstein DB, Linares AR, Cavalli-Sforza LL, Feldman MW. An evaluation of genetic distances for use with microsatellite loci. *Genetics*. 1995;139: 463-471.
 50. Cornuet JM, Santos F, Beaumont MA, Robert CP, Marin JM, et al. Inferring population history with DIYABC: a user-friendly approach to Approximate Bayesian Computations. *Bioinformatics*. 2008;24: 23713-2719.
 51. Barres B, Carlier J, Seguin M, Fenouillet C, Cilas C, et al. Understanding the recent colonization history of a plant pathogenic fungus using population genetic tools and Approximate Bayesian Computation. 2012. *Heredity* E-pub ahead of print. doi:10.1038/hdy.2012.37.

Tabelas e Figuras

Tabela 1 Informações descritivas sobre os genótipos (identificação do genótipo, população, hospedeiro e isolados representativos) das populações do Cerrado (CE), da Mata Atlântica (MA) e de *Actinidia* spp. do sul do Brasil (KW).

Genótipo	População	Hospedeiro	Isolados
GM.1	MA	<i>Mangifera indica</i>	RJIT1, RJIT2, RJIT4, 1554, 1555, 1556, 1557, 1558, 1559, 1588, 1589, 1590, 2112, 1658, 1659, 1660, 1661, 1664, 1671
GM.2	CE	<i>Mangifera indica</i>	SPLIM7.7, SPLIM7.11
GM.3	CE	<i>Mangifera indica</i>	CEBS8
GM.4	CE	<i>Mangifera indica</i>	SPLIM7.8, SPLIM7.9, SPLIM7.10, SPLIM7.12, SPLIM7.18, SPLIM7.16
GM.5	KW	<i>Actinidia</i> spp.	JO01
GM.6	KW	<i>Actinidia</i> spp.	JO13
GM.7	CE	<i>Mangifera indica</i>	PBCN6
GM.8	CE	<i>Mangifera indica</i>	PBCN8
GM.9	CE	<i>Mangifera indica</i>	CEBS13
GM.10	CE	<i>Mangifera indica</i>	PBCN9, PBCN10
GM.11	CE	<i>Mangifera indica</i>	PBCN7
GM.12	CE	<i>Mangifera indica</i>	PBCN2
GM.13	KW	<i>Actinidia</i> spp.	FI21, FI25
GM.14	KW	<i>Actinidia</i> spp.	FI22
GM.15	KW	<i>Actinidia</i> spp.	FI20, CE04
GM.16	KW	<i>Actinidia</i> spp.	A32
GM.17	CE	<i>Mangifera indica</i>	CEBS3, CEBS15
GM.18	CE	<i>Mangifera indica</i>	CEBS4
GM.19	CE	<i>Mangifera indica</i> .	CEBS5, CEBS6, CEBS7
GM.20	CE	<i>Mangifera indica</i> .	CEBS1
GM.21	CE	<i>Mangifera indica</i> .	CEBS2, CEBS12
GM.22	CE	<i>Eucalyptus</i> spp.	CAV47

Tabela 1 Continuação...

GM.23	CE	<i>Mangifera indica.</i>	PBCN3, PBCN12, PBCN15, PBCN18
GM.24	CE	<i>Eucalyptus</i> spp.	PT18
GM.25	CE	<i>Eucalyptus</i> spp.	PT13
GM.26	CE	<i>Eucalyptus</i> spp.	CAV30, CAV33
GM.27	CE	<i>Eucalyptus</i> spp.	CAV26
GM.28	CE	<i>Eucalyptus</i> spp.	CAV28, CAV41
GM.29	CE	<i>Eucalyptus</i> spp.	PT12, PT18
GM.30	CE	<i>Eucalyptus</i> spp.	2062
GM.31	CE	<i>Eucalyptus</i> spp.	2066, 2069, 2070, 2072, 2073
GM.32	CE	<i>Eucalyptus</i> spp.	2063, 2067, 2076, 2078, 2079, 2081, 2082, 2083, 2084
GM.33	CE	<i>Eucalyptus</i> spp.	2068
GM.34	MA	<i>Colocasia esculenta</i>	C2005
GM.35	MA	<i>Colocasia esculenta</i>	C2008, C2009, C2010, C2011, C2012, C2013
GM.36	MA	<i>Colocasia esculenta</i>	C2006
GM.37	MA	<i>Colocasia esculenta</i>	C1916
GM.38	MA	<i>Colocasia esculenta</i>	C1864
GM.39	MA	<i>Colocasia esculenta</i>	C1861
GM.40	MA	<i>Colocasia esculenta</i>	C1860, C1865
GM.41	MA	<i>Colocasia esculenta</i>	C1876, C1900, C1901, C1904, C1913, C1905, C1910, C1917, C1918, C1923,
GM.42	MA	<i>Colocasia esculenta</i>	C1875, C1902, C1903, C1911, C1912, C1905, C1915, C1924, C1926, C1930
GM.43	MA	<i>Colocasia esculenta</i>	C1914
GM.44	CE	<i>Eucalyptus</i> spp.	2085, 2086
GM.45	MA	<i>Mangifera indica</i>	2054, 2055, 2056, 2057, 2060
GM.46	MA	<i>Mangifera indica</i>	2095
GM.47	CE	<i>Eucalyptus</i> spp.	2064
GM.48	CE	<i>Eucalyptus</i> spp.	2065
GM.49	MA	<i>Mangifera indica</i>	2059
GM.50	CE	<i>Eucalyptus</i> spp.	2075

Tabela 1 Continuação...

GM.51	CE	<i>Eucalyptus</i> spp.	2077
GM.52	CE	<i>Eucalyptus</i> spp.	2080
GM.53	MA	<i>Mangifera indica</i>	2093
GM.54	CE	<i>Eucalyptus</i> spp.	PT5
GM.55	CE	<i>Eucalyptus</i> spp.	PT2
GM.56	CE	<i>Eucalyptus</i> spp.	PT17
GM.57	CE	<i>Eucalyptus</i> spp.	PT11
GM.58	CE	<i>Mangifera indica</i>	SPLIM7.6
GM.59	KW	<i>Actinidia</i> spp.	JO03
GM.60	CE	<i>Eucalyptus</i> spp.	PT22, PT3, PT6, PT7
GM.61	CE	<i>Eucalyptus</i> spp.	2074
GM.62	CE	<i>Eucalyptus</i> spp.	2061
GM.63	KW	<i>Actinidia</i> spp.	PB25
GM.64	KW	<i>Actinidia chinensis</i>	PB01, PB02, PB09, PB12, PB57
GM.65	CE	<i>Eucalyptus</i> spp.	PT23
GM.66	CE	<i>Eucalyptus</i> spp.	PT10
GM.67	CE	<i>Eucalyptus</i> spp.	PT19
GM.68	CE	<i>Eucalyptus</i> spp.	PT24
GM.69	CE	<i>Eucalyptus</i> spp.	PT21
GM.70	CE	<i>Mangifera indica</i>	SPLIM7.15, SPLIM7.3
GM.71	KW	<i>Actinidia chinensis</i>	A11
GM.72	KW	<i>Actinidia chinensis</i>	P2A1
GM.73	KW	<i>Actinidia chinensis</i>	P1A1
GM.74	CE	<i>Eucalyptus</i> spp.	PT15
GM.75	KW	<i>Actinidia chinensis</i>	FI12
GM.76	KW	<i>Actinidia chinensis</i>	FI13
GM.77	KW	<i>Actinidia chinensis</i>	FI05, FI08, FI09, FI14
GM.78	KW	<i>Actinidia chinensis</i>	CE07

Tabela 1 Continuação...

GM.79	KW	<i>Actinidia chinensis</i>	FI16
GM.80	KW	<i>Actinidia chinensis</i>	FI11
GM.81	KW	<i>Actinidia chinensis</i>	FI03
GM.82	KW	<i>Actinidia chinensis</i>	A26
GM.83	KW	<i>Actinidia chinensis</i>	A44
GM.84	KW	<i>Actinidia chinensis</i>	A30
GM.85	KW	<i>Actinidia chinensis</i>	A17, CE10
GM.86	KW	<i>Actinidia chinensis</i>	A10, A13, A15, A18, A23, A31, A35, A36, A37
GM.87	KW	<i>Actinidia chinensis</i>	A19, P3A1, P3A2, P3A5, CE01, JO04
GM.88	KW	<i>Actinidia chinensis</i>	PL01
GM.89	KW	<i>Actinidia chinensis</i>	PC03, PC17
GM.90	MA	<i>Mangifera indica</i>	2092
GM.91	CE	<i>Eucalyptus spp.</i>	2071
GM.92	MA	<i>Mangifera indica</i>	2058
GM.93	KW	<i>Actinidia chinensis</i>	A8
GM.94	KW	<i>Actinidia chinensis</i>	PP05, PP14
GM.95	KW	<i>Actinidia chinensis</i>	PP01, PP02, PP03
GM.96	KW	<i>Actinidia chinensis</i>	PP06, PP08
GM.97	MA	<i>Mangifera indica</i>	RJSF7
GM.98	MA	<i>Mangifera indica</i>	1591
GM.99	MA	<i>Mangifera indica</i>	RJSF10, RJIT6, RJIT7, RJIT8, RJIT9, RJIT10
GM.100	MA	<i>Mangifera indica</i>	1662
GM.101	MA	<i>Mangifera indica</i>	1663
GM.102	MA	<i>Mangifera indica</i>	RJSF4, RJSF8
GM.103	MA	<i>Mangifera indica</i>	RJSF2, RJSF5, RJSF6, RJIT5
GM.104	KW	<i>Actinidia chinensis</i>	PCT24
GM.105	KW	<i>Actinidia chinensis</i>	PM12, PM18
GM.106	KW	<i>Actinidia chinensis</i>	PCT26, PM17, PM21, PM25

Tabela 1 Continuação...

GM.107	KW	<i>Actinidia chinensis</i>	PM09
GM.108	KW	<i>Actinidia chinensis</i>	PM30
GM.109	KW	<i>Actinidia chinensis</i>	PA11
GM.110	KW	<i>Actinidia chinensis</i>	PG24
GM.111	KW	<i>Actinidia chinensis</i>	PB13, PB22, PCT27, PG18, PG19
GM.112	KW	<i>Actinidia chinensis</i>	PC09
GM.113	KW	<i>Actinidia chinensis</i>	PA05, PA12, PA18, PA20, PA25, PA28, PA29, PA30, PA32, PA33, PA34, PA50, PB14, PB67, PC11, PC12, PC14, PC16, PC19, PC20, PCT01, PCT05, PCT09, PCT15, PCT28, PG01, PG05, PG07, PG09, PG11, PG17, PG29, PL06, PL11, PM08, PM28, PM29
GM.114	KW	<i>Actinidia chinensis</i>	PM15
GM.115	KW	<i>Actinidia chinensis</i>	PG21
GM.116	KW	<i>Actinidia chinensis</i>	PM20
GM.117	KW	<i>Actinidia chinensis</i>	A16
GM.118	KW	<i>Actinidia chinensis</i>	A2, P2A2

*Os 46 novos isolados de *Ceratocystis fimbriata* de *Actinidia* spp. estão representados com letras azuis.

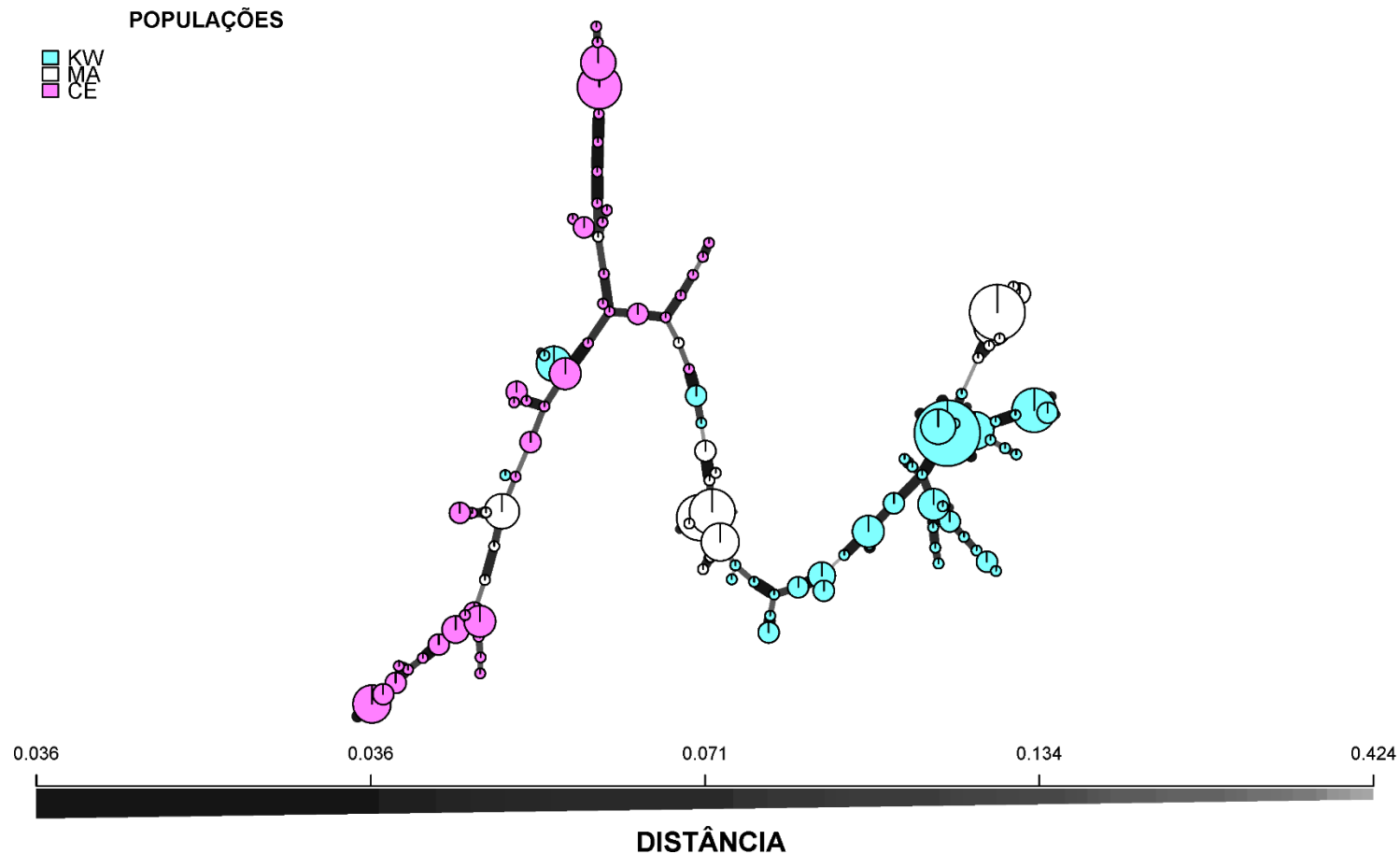


Fig 1. *Minimum spanning network* baseada na distância genética de Bruvo e 14 marcadores microssatélites para os isolados de *Ceratocystis fimbriata* das populações do Cerrado (CE), da Mata Atlântica (MA) e de *Actinidia* spp. do sul do Brasil (KW). Cada nó (círculo) representa um único genótipo multilocus (GM). O tamanho dos nós foram padronizados para $\log_{1.75} n$, em que n é o número de amostras. As conexões (linhas) representam a distância genética mínima entre os indivíduos determinados pelo algoritmo de Prim. Os nós mais próximos têm conexões mais espessas e escuras, enquanto os nós mais distantes apresentam conexões mais finas e claras ou nenhuma conexão entre eles. A reticulação foi introduzida após o processamento do algoritmo de Prim. A distância mínima ($d=0.036$) representa um passo mutacional.

Tabela 2 – Alelos privados das populações de *Ceratocystis fimbriata* das populações do Cerrado (CE), da Mata Atlântica (MA) e de *Actinidia spp* (kiwi) do sul do Brasil (KW).

Populações								
KW			CE			MA		
Locus	Alelo	Intensidade	Locus	Alelo	Intensidade	Locus	Alelo	Intensidade
CAA9	266	8	CAA9	202	3	AAG8	195	1
CAA9	284	1	CAA9	175	9	CAA9	206	7
CAA9	211	2	CAA9	169	3	CAA9	188	3
CAA9	218	32	CAA9	223	1	CAA9	220	7
CAA10	128	38	CAA9	245	2	CAA9	194	1
CAG15	298	1	CAA9	208	1	CAT1	248	8
CAG15	283	9	CAA80	329	3	CAA15	327	5
CAT1	246	5	CAA80	288	1	CAG5	323	11
CAT1	249	33	CAA80	326	2	CAG5	320	7
CAT1	255	2	CAG15	295	4	CAT12X	370	7
CAT1	252	1	CAG15	268	2	CAA38	250	2
CAA15	324	30	CAG15	262	5	CAA38	168	7
CAA15	361	2	CAT1	257	11	CAA38	211	1
CAG5	315	7	CAT1	254	1	GACA60	210	2
CAG5	324	38	CAA15	303	1	GACA60	216	1
CAG5	326	1	CAG5	317	7			
GACA6K	201	30	CAA38	202	5			
GACA6K	222	3	CAA38	183	1			
GACA6K	198	3	CAA38	174	6			
CAA38	226	6	CAA38	214	3			
CAA38	201	1	CAA38	162	1			
CAA38	299	12	CAA38	267	1			
CAA38	296	3	CAA38	192	1			
CAA38	281	1	CAA38	229	7			
CAA38	315	1	CAA38	200	2			
CAA38	309	2	GACA60	180	1			
CAA38	198	1	AAG9	406	1			
CAA38	186	2						
CAA38	232	1						
CAA38	366	2						
CAA38	302	1						
CAA38	353	1						
CAA38	253	1						
GACA60	195	7						
GACA60	191	34						

Tabela 3 – Frequência alélica das populações de isolados de *Ceratocystis fimbriata* do Cerrado (CE), da Mata Atlântica (MA) e de *Actinidia* spp (kiwi) do sul do Brasil (KW).

População								
KW			MA			CE		
Locus	Alelo	Frequência (%)	Locus	Alelo	Frequência (%)	Locus	Alelo	Frequência (%)
AAG8	183	50.42%	AAG8	183	20.25%	AAG8	180	2.44%
	180	34.45%		180	2.53%		177	60.98%
	177	8.40%		177	53.16%		174	24.39%
	174	5.04%		195	24.05%		171	12.20%
	171	1.68%		CAA9	172		12.66%	CAA9
CAA9	266	10.92%	206		32.91%	202	10.98%	
	284	0.84%	188		10.13%	175	26.83%	
	172	5.88%	220		43.04%	169	6.10%	
	211	2.52%	194		1.27%	223	2.44%	
	218	79.83%	CAA80	314	41.77%	245	2.44%	
CAA80	314	11.76%		302	1.27%	208	1.22%	
	317	61.34%		323	1.27%	CAA80	317	19.51%
	302	11.76%		311	45.57%		302	1.22%
	308	5.88%		320	8.86%		308	20.73%
	323	9.24%	333	1.27%	323		15.85%	
CAA10	128	89.08%	CAA10	134	11.39%		311	10.98%
	137	5.04%		131	88.61%	320	15.85%	
	134	3.36%	CAG15	286	20.25%	329	10.98%	
	131	2.52%		280	10.13%	333	1.22%	
CAG15	286	2.52%	CAG15	277	25.32%	288	1.22%	
	298	0.84%		274	26.58%	326	2.44%	
	283	11.76%		265	6.33%	CAA10	137	14.63%
	271	5.04%		292	10.13%		134	40.24%
	280	61.34%		259	1.27%		131	45.12%
CAT1	277	18.49%	CAT1	261	55.70%	CAG15	286	26.83%
	246	5.88%		248	44.30%		271	6.10%
	261	8.40%	CAA900	194	100.00%		280	1.22%
	249	83.19%		321	51.90%		274	7.32%
	255	1.68%		318	12.66%		265	2.44%
CAA900	194	100%	CAG5	327	35.44%	295	6.10%	
	CCAA15	321		15.13%	323	67.09%	292	4.88%
315		5.04%	320	20.25%	268	2.44%		
324		78.15%	314	12.66%	259	31.71%		
361		1.68%	GACA6K	215	15.19%	262	10.98%	
CAG5		315		10.92%	219	44.30%	CAT1	261
	324	88.24%		213	32.91%	257		21.95%
	326	0.84%	221	7.59%	254	1.22%		
GACA6K	215	10.08%	CAT12X	368	2.53%	CAA900	194	100.00%
		374		2.53%	CCAA15		321	70.73%
		201		74.79%		371	16.46%	315

Tabela 3 Continuação...

	222	2.52%		377	40.51%		318	26.83%
	219	5.88%		370	37.97%		303	1.22%
	213	0.84%	CAA38	223	37.97%	CAG5	317	15.85%
	198	5.88%		238	2.53%		314	84.15%
CAT12X	368	11.76%		241	1.27%	GACA6K	215	81.71%
	374	83.19%		250	3.80%		219	2.44%
	371	3.36%		168	41.77%		221	15.85%
	377	1.68%		211	2.53%	CAT12X	368	7.32%
CAA38	223	5.88%		146	10.13%		374	59.76%
	247	5.04%	GACA60	183	60.76%		371	32.93%
	238	2.52%		210	13.92%	CAA38	247	13.41%
	226	10.08%		216	24.05%		238	14.63%
	201	1.68%		196	1.27%		202	7.32%
	299	52.10%	AAG9	403	11.39%		183	2.44%
	296	9.24%		391	46.84%		174	10.98%
	281	1.68%		397	10.13%		214	9.76%
	315	0.84%		400	31.65%		162	4.88%
	309	1.68%					146	8.54%
	198	0.84%					267	1.22%
	186	1.68%					192	1.22%
	232	1.68%					229	23.17%
	241	0.84%					200	2.44%
	366	1.68%				GACA60	183	87.80%
	302	0.84%					196	10.98%
	353	0.84%					180	1.22%
	253	0.84%				AAG9	397	80.49%
GACA60	195	10.08%					400	18.29%
	183	8.40%					406	1.22%
	191	81.51%						
AAG9	403	10.92%						
	391	81.51%						
	397	7.56%						

Tabela 4 – Diversidade gênica de Nei (1978) (H_E) das populações de isolados de *Ceratocystis fimbriata* da Mata Atlântica (MA), do Cerrado (CE) e de *Actinidia* spp. (kiwi) do sul do Brasil (KW).

População	Número de isolados	Número de genótipos	Fração clonal	Diversidade gênica de Nei (1978) (H_E)	
				Todos isolados	Clone-correct
KW	119	46	0.613	0.378	0.505
MA	79	24	0.696	0.557	0.604
CE	82	48	0.414	0.489	0.492

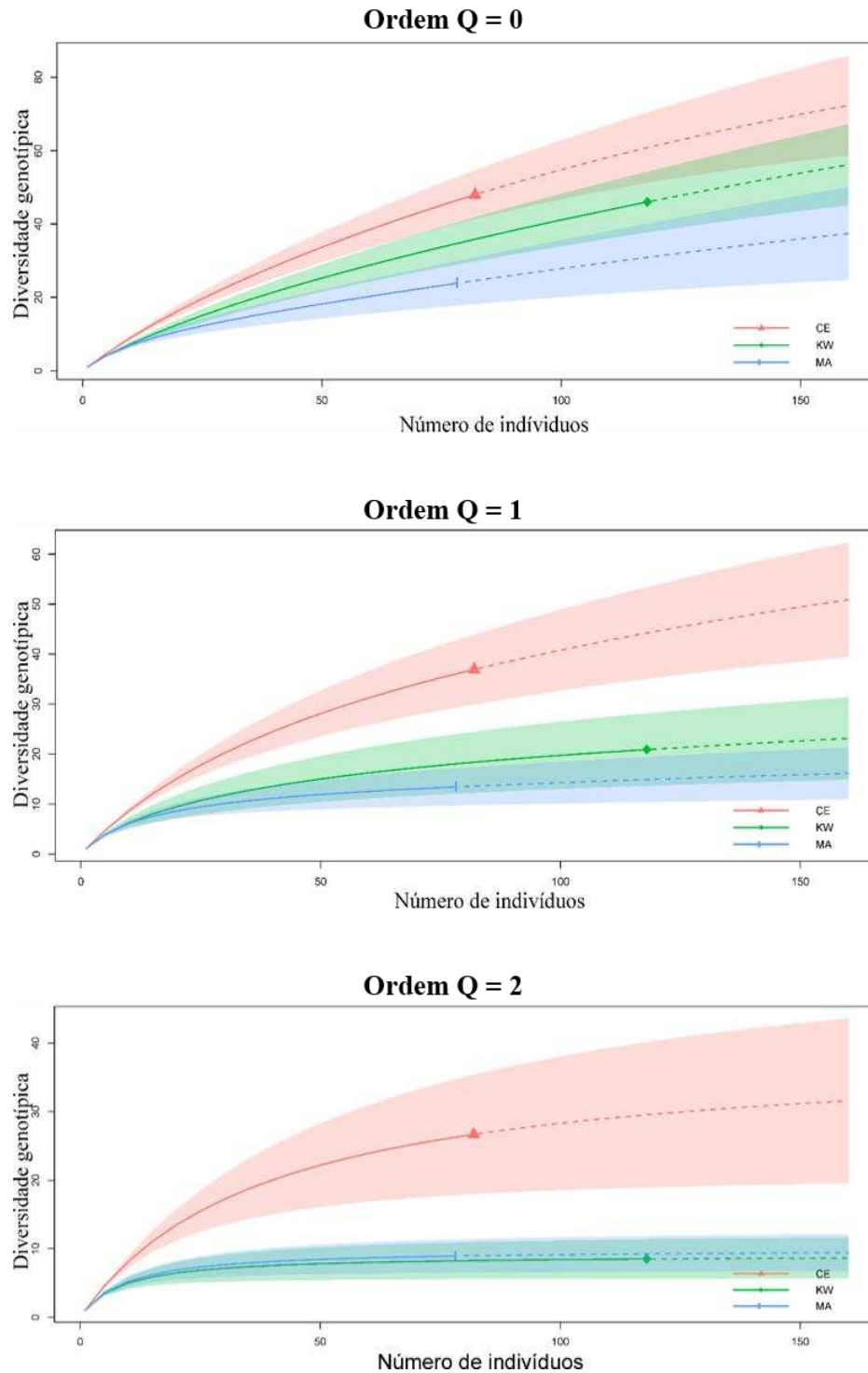


Fig 2. Curvas de acumulação de diversidade para diferentes tamanhos de amostra com intervalo de confiança de 95% (áreas sombreadas) dos números de Hill de ordem 0 (Q0), 1 (Q1) e 2 (Q2) estimados para populações de *Ceratocystis fimbriata* do Cerrado (CE), Mata Atlântica (MA) e de *Actinidia* spp. (kiwi) do sul do Brasil (KW). Os índices Q0, Q1 e Q2 correspondem, respectivamente, à riqueza genotípica, ao exponencial da entropia de Shannon e ao inverso da concentração de Simpson. As linhas contínuas correspondem à rarefação (interpolação) e as linhas tracejadas à extrapolação, que vai até o limite de 158 indivíduos, o que representa o dobro do tamanho da menor amostras (MA = 79). O nível de confiança de 95% foi obtido por método de bootstrap baseado em 500 reamostragens.

Tabela 5 – Valores encontrados para os números de Hill de ordem 0 (Q0), 1 (Q1) e 2 (Q2) para as populações de *Ceratocystis fimbriata* do Cerrado (CE), da Mata Atlântica (MA) e de *Actinidia* spp. (kiwi) do sul do Brasil (KW).

População	Número de isolados	Número de genótipos	Índice de associação (rd)	
			r_D (clone-correct)	P-valor*
KW	119	46	0.326	0.001
MA	79	24	0.291	0.001
CE	82	48	0.078	0.001

População	Q = 0	Q = 1	Q = 2
CE	46.78 (95% CI 40.493-52.07)	36.22 (95% CI 29.59-42.86)	26.36 (95% CI 17.77-34.96)
KW	34.94 (95% CI 28.98-40.89)	18.10 (95% CI 13.53-22.68)	8.25 (95% CI 5.45-11.04)
MA	24.00 (95% CI 17.23-30.76)	13.45 (95% CI 10.03-16.86)	8.95 (95% CI 6.45-11.45)

Tabela 6 – Índice de associação padronizado (r_D) das populações de isolados de *Ceratocystis fimbriata* do Cerrado (CE), da Mata Atlântica e de *Actinidia* spp. (kiwi) do sul do Brasil (KW).

*Probabilidade de o índice de associação não diferir de uma população realiza acasalamento ao acaso

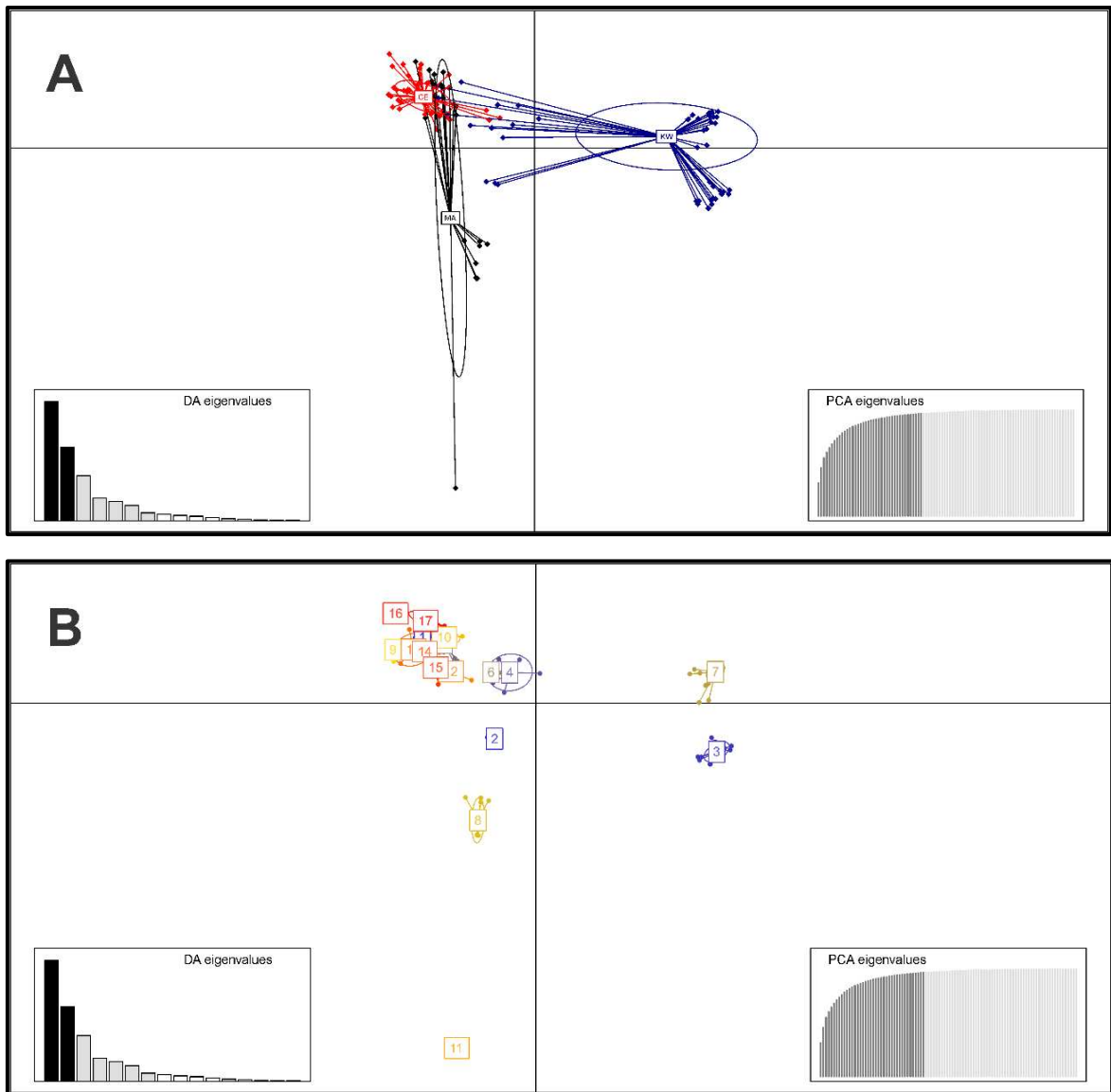


Fig 3. Gráficos de dispersão da análise discriminante dos componentes principais (ADCP) dos dois principais componentes discriminantes dos isolados de *Ceratocystis fimbriata* do Cerrado (CE), da Mata Atlântica (MA) e de *Actinidia* spp. (kiwi) do sul do Brasil (KW) No gráfico **A**, os isolados estão classificados por suas respectivas populações e, no gráfico **B**, por seus respectivos grupos. Os indivíduos são representados pelos pontos enquanto que os grupos (**B**) e as populações (**A**) são representados por elipses de diferentes cores.

Tabela 7 – Índice de diferenciação Gst das populações de isolados de *Ceratocystis fimbriata* do Cerrado (CE), Mata Atlântica (MA) e de *Actinidia* spp. (kiwi) do sul do Brasil (KW)

População	CE	KW	MA
CE	0.000	-	-
KW	0.857	0.000	-
MA	0.593	0.852	0.000

Tabela 8 – Grupos formados para os isolados de *Ceratocystis fimbriata* das populações do Cerrado (CE), Mata Atlântica (MA) e de *Actinidia* spp. (kiwi) do sul do Brasil (KW), por meio da análise discriminante dos componentes principais (ADCP).

Grupo	População(s)	Isolados
1	CE	PBCN2 PBCN7 PBCN9 PBCN10 PT13 PT18 PT5
2	KW	PP01 PP02 PP03 PP05 PP14 PP06 PP08 PCT24 PCT26 PM17 PM21 PM25 PM12 PM18 PM20 PA11 PM09 PM30 JO01 FI20 CE04 FI21 FI25 FI22 FI05 FI08 FI09 FI14 FI12 FI13 FI03 FI11
3	KW	FI13 FI03 FI11
4	KW	A2 P2A2 A8 A16 A11 P1A1 P2A1 C1904 C1913 C1914 C1915 C1926 C1905 C1906 C1916 C1917 C1918 C1930 C1875 C1876 C1910 C1923 C1924 C1900 C1901 C1902 C1903 C1911 C1912 C1860 C1861 C1864 C1865 C2005 C2006 C2008 C2009 C2010 C2011 C2012 C2013
5	MA	C1904 C1913 C1914 C1915 C1926 C1905 C1906 C1916 C1917 C1918 C1930 C1875 C1876 C1910 C1923 C1924 C1900 C1901 C1902 C1903 C1911 C1912 C1860 C1861 C1864 C1865 C2005 C2006 C2008 C2009 C2010 C2011 C2012 C2013
6	CE	CEBS8 SPLIM7.8 SPLIM7.12 SPLIM7.7 SPLIM7.18 SPLIM7.9 SPLIM7.10 SPLIM7.11 SPLIM7.16 PC09 A32 A10 A13 A15 A18 A23 A26 A31 A35 A36 A37 A17 A19 A44 P3A1 P3A2 P3A5 A30 PG21 PA05 PA12 PA18 PA20 PA25 PA28 PA29 PA30 PA32 PA33 PA34 PA50 PB14 PB67 PC11 PC12 PC14 PC16 PC19 PC20 PCT01 PCT05 PCT09 PCT15 PCT28 PG01 PG05 PG07 PG09 PG11 PG17 PG24 PG29 PL06 PL11 PM08 PM28 PM29 PM15 PB13 PB22 PCT27 PG18 PG19 JO13 FI16 CE10 CE01 JO04 CE07
7	KW	CE10 CE01 JO04 CE07
8	MA	RJSF2 RJSF4 RJSF5 RJSF6 RJSF7 RJSF8 RJSF10 RJIT5 RJIT6 RJIT7 RJIT8 RJIT9 RJIT10 1591 1662 1663
9	CE	2061 2062 2063 2065 2066 2067 2068 2069 2070 2072 2073 2074 2075 2076 2078 2079 2081 2082 2083 2084
10	CE KW E MA	PC03 PC17 PL01 PT15 2092
11	MA	RJIT1 RJIT2 RJIT4 1554 1555 1556 1557 1558 1559 1588 1589 1590 2112 1658 1659 1660 1661 1664 1671
12	CE e KW	PB01 PB02 PB09 PB12 PB57 PB25 PT22 PT3 PT6 PT7
13	CE e KW	JO03 SPLIM7.15 SPLIM7.3 PT10 PT21 PT24 2080
14	CE	CEBS1 CEBS2 CEBS12 CEBS13 PBCN3 PBCN6 PBCN8 PBCN12 PBCN15 PBCN18
15	CE e MA	CAV26 CAV28 CAV30 CAV33 CAV41 CAV47 PT11 PT12 PT17 PT19 PT2 PT23 PT8 2064 2077 2059
16	CE	CEBS3 CEBS4 CEBS5 CEBS6 CEBS7 CEBS15
17	CE e MA	SPLIM7.6 2071 2085 2086 2054 2055 2056 2057 2060 2058 2095 2093

*Isolados identificados em letras vermelhas pertencem à população do Cerrado (CE), isolados identificados em letras pretas pertencem à população da Mata Atlântica (MA) e isolados identificados em azul pertencem a população de kiwi (*Actinidia* spp.) do sul do Brasil (KW)

Tabela 9 – Comparação entre os cenários pré-definidos das populações de isolados de *Ceratocystis fimbriata* do Cerrado (CE), da Mata Atlântica (MA) e de *Actinidia* spp. (kiwi) do sul do Brasil (KW).

Cenário	Probabilidade do cenário	Intervalo de Confiança
Primeira rodada		
Cenário I	0.0226	0.0000-0.3000
Cenário II	0.0000	0.0000-0.4780
Cenário III	0.0001	0.0000-0.2354
Cenário IV	0.0366	0.0000-0.4300
Cenário V	0.4512	0.4590-0.7714
Cenário VI	0.4894	0.4790-0.7831
Segunda rodada		
Cenário V	0.8554	-
Cenário VI	0.9056	-
Comparação com a réplica		
Cenário VI	0.7058	-
Cenário R-VI	0.2942	-



Fig 4. Mapa dos municípios, onde os isolados de *Ceratocystis fimbriata* utilizados foram coletados. O número entre parênteses indica o número de isolados obtidos por município.

Tabela 10 – Informações geográficas e os respectivos hospedeiros dos isolados de *Ceratocystis fimbriata*.

Região	Hospedeiro	Estado	Município	Isolados
Cerrado	<i>Eucalyptus</i>	Bahia	Eunápolis	2061, 2062, 2063, 2064, 2065, 2066, 2067, 2068, 2069, 2070, 2071, 2072, 2073, 2074, 2075, 2076, 2077, 2078, 2079, 2080, 2081, 2082, 2083, 2084, 2085, 2086
		Bahia	Caravelas	CAV26, CAV28, CAV30, CAV33, CAV41, CAV47
		Minas Gerais	Curvelo	PT2, PT3, PT5, PT6, PT7, PT8, PT10, PT11, PT12, PT13, PT15, PT17, PT18, PT19, PT21, PT22, PT23, PT24
	<i>Mangifera</i>	Ceará	Brejo Santo	CEBS1, CEBS2, CEBS3, CEBS4, CEBS5, CEBS6, CEBS7, CEBS8, CEBS12, CEBS13, CEBS15
		Paraíba	Conde	PBCN2, PBCN3, PBCN6, PBCN7, PBCN8, PBCN9, PBCN10, PBCN12, PBCN15, PBCN18
		São Paulo	Limeira	SPLIM7.3, SPLIM7.6, SPLIM7.7, SPLIM7.8, SPLIM7.9, SPLIM7.10, SPLIM7.11, SPLIM7.12, SPLIM7.15, SPLIM7.16, SPLIM7.18
Mata Atlântica	<i>Colocasia</i>	São Paulo	Sorocaba	C1905, C1906, C1916, C1917, C1918, C1930
		São Paulo	Tapiraí	C1904, C1913, C1914, C1926
		São Paulo	Ubatuba	C1875, C1876, C1910, C1923, C1924
		Bahia	Porto Seguro	C2005, C2006, C2008, C2009, C2010, C2011, C2012, C2013
		Rio de Janeiro	Rio de Janeiro	C1860, C1861, C1864, C1865
	<i>Mangifera</i>	Distrito Federal	Brasília	C1900, C1901, C1902, C1903, C1911, C1912
		Rio de Janeiro	Itaocara	RJIT1, RJIT2, RJIT4, RJIT5, RJIT6, RJIT7, RJIT8, RJIT9, RJIT10
		Rio de Janeiro	Seropédica	2054, 2055, 2056, 2057, 2058, 2059, 2060, 2092, 2093, 2094, 2095
		Rio de Janeiro	São Fidelis	1554, 1555, 1556, 1557, 1558, 1559, 1588, 1589, 1590, 1591, 1658, 1659, 1660, 1661, 1662, 1663, 1664, 1671, 2112, RJSF2, RJSF4, RJSF5, RJSF6, RJSF7, RJSF8, RJSF10
		Santa Catarina	Fraiburgo	FI03, FI05, FI08, FI09, FI11, FI12, FI13, FI14, FI16, FI20, FI21, FI22, FI25
KW	<i>Actinidia</i>	Santa Catarina	Campo Belo do Sul	JO01, JO03, JO04, JO13
		Santa Catarina	São Joaquim	CE01, CE04, CE07, CE10
		Rio Grande do Sul	Farroupilha	A2, A8, A10, A11, A13, A15, A16, A17, A18, A19, A23, A26, A30, A31, A32, A35, A36, A37, A44, P1A1, P2A1, P2A2, P3A1, P3A2, P3A5, PA05, PA11, PA12, PA18, PA20, PA25, PA28, PA29, PA30, PA32, PA33, PA34, PA50, PB01, PB02, PB09, PB12, PB13, PB14, PB22, PB25, PB57, PB67, PC03, PC09, PC11, PC12, PC14, PC16, PC17, PC19, PC20, PCT01, PCT05, PCT09, PCT15, PCT24, PCT26, PCT27, PCT28, PG01, PG05, PG07, PG09, PG11, PG17, PG18, PG19, PG21, PG24, PG29, PL01, PL06, PL11, PM08, PM09, PM12, PM15, PM17, PM18, PM20, PM21, PM25, PM28, PM29, PM30, PP01, PP02, PP03, PP05, PP06, PP08, PP14

*Os 46 novos isolados de *C. fimbriata* de *Actinidia* spp. estão representados com letras azuis

Tabela 11 –Definição e distribuição à priori dos parâmetros usados na definição dos cenários testados.

	Identificação do Parâmetro	Distribuição	
		Tipo	Intervalo
Tamanho efetivo da população ancestral	N	Uniforme	10-100.000
Tamanho da população KW	N1	Uniforme	10-100.000
Tamanho efetivo da população CE	N2	Uniforme	10-100.000
Tamanho efetivo da população MA	N3	Uniforme	10-100.000
Tamanho efetivo da putativa população natural dos solos do sul do Brasil	NA	Uniforme	10-100.000
Tamanho da população MA durante o gargalo genético	N2b	log-uniforme	1-100
Tempo da divergência da mais recente população ancestral	T_f	Uniforme	600-100.000
Período de ocorrência dos eventos de gargalo genético em MA	T_g	log-uniforme	16-500
Período do evento de mistura	T_b	log-uniforme	16-500
Taxa de mistura	ra/rb	Uniforme	0.001-0.999
Parâmetros do modelo mutacional			
Taxa média de mutação	Mmmic	Uniforme	10^{-4} - 10^{-3}
Parâmetro médio da distribuição geométrica do número de repetições	MP	Uniforme	0.1-0.3
Taxa média de inserção/deleção de um único nucleotídeo	Mmsni	Log-uniforme	10^{-8} - 10^{-4}

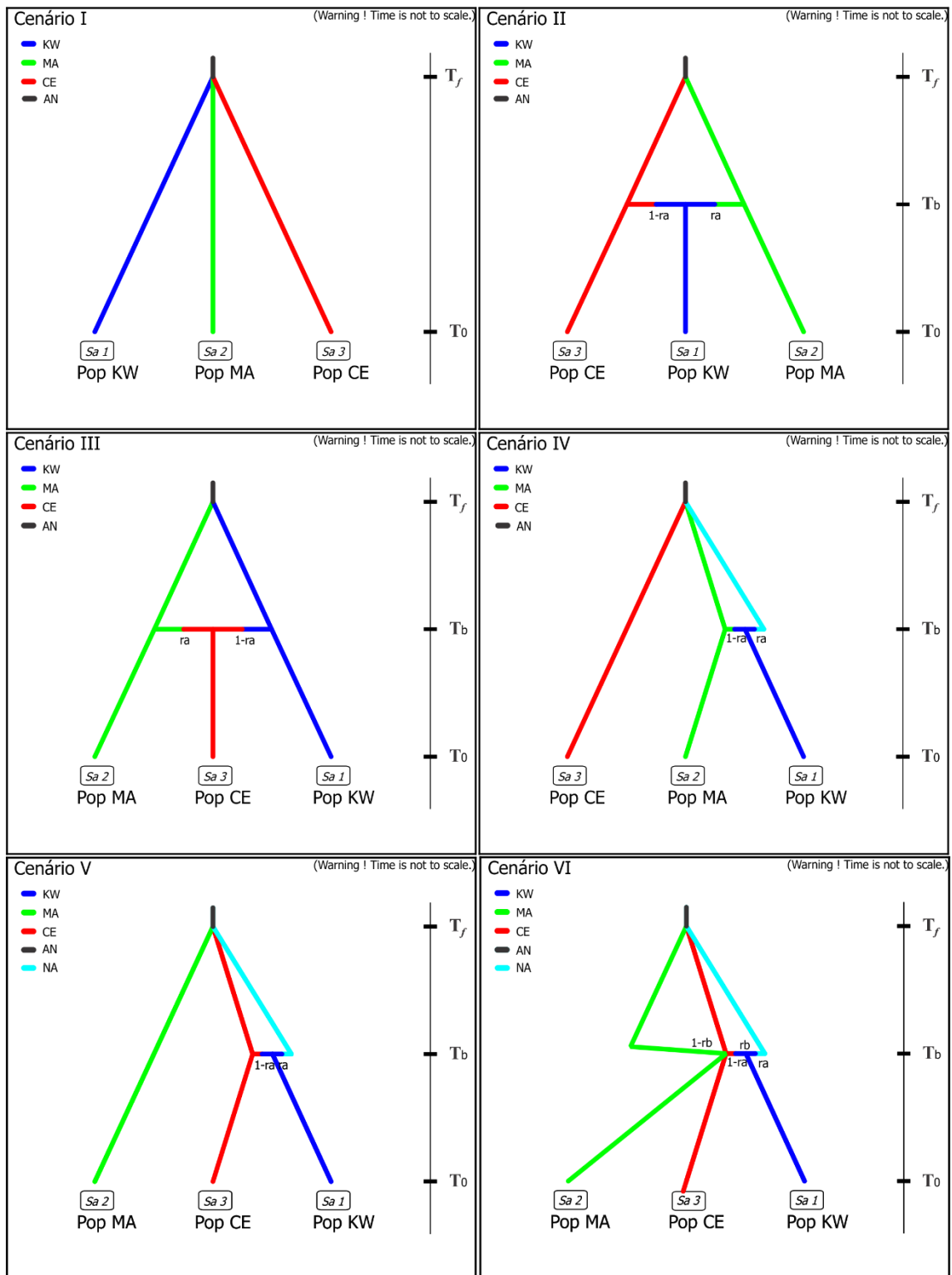


Fig 5. Cenários representativos da relação evolutiva das populações de isolados de *Ceratocystis fimbriata* do Cerrado (CE), da Mata Atlântica (MA) e de *Actinidia* spp. (kiwi) do sul do Brasil (KW). A população ancestral (AN) está respresentada em preto e a população natural do sul do Brasil (NA) está representada em azul claro.

Material suplementar

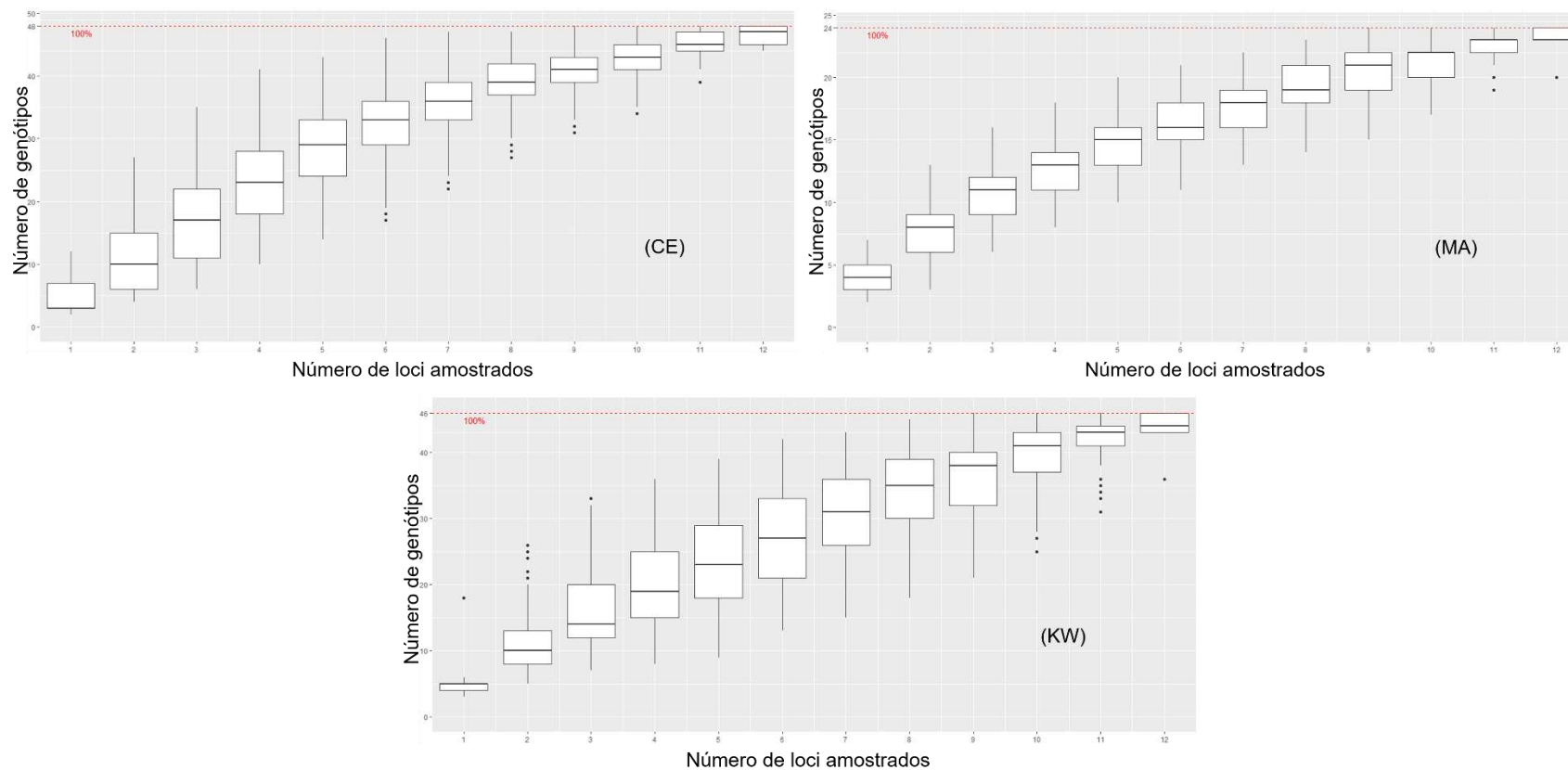


Fig 1S. - Curvas de saturação de marcas para as populações de isolados de *Ceratocystis fimbriata* da Mata Atlântica (MA), Cerrado (CE) e *Actinidia spp.* (kiwi) do sul do Brasil (KW). O número de loci foi aleatoriamente amostrado (1.000 vezes) sem substituição de até n-1 loci; 100% dos genótipos, identificados em cada população, estão indicados pela linha tracejada

CAPÍTULO 2

ARTIGO 2

Para ser submetido a revista Tropical Plant Pathology

Resistência de cultivares e progênies de kiwi à murcha-de-ceratocystis

Lucas V. A. Pimenta¹, Leonardo S. S. Oliveira², Lúcio M. S. Guimarães², Paulo V. D. Souza³, Leonardo L. Bhering⁴, Acelino C. Alfenas²

¹Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG 36570-900, Brasil

²Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG 36570-900, Brasil

³Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS 15100, Brasil

⁴Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG 36570-900, Brasil

Autor para correspondência: Acelino C. Alfenas; E-mail: aalfenas@ufv.br

Resumo

O kiwi (*Actinidia* spp.), originário do Sul da China, encontra-se atualmente difundido em todos os continentes. O acelerado crescimento da produção mundial associado à expansão do seu plantio tem levado ao surgimento de enfermidades. Entre essas, a murcha-de-Ceratocystis, causada por *Ceratocystis fimbriata*, tem despertado a atenção dos produtores devido às grandes perdas causadas à kiwicultura no Brasil. O emprego de material resistente é um dos métodos mais eficientes de controle de doenças em plantas. Assim, neste trabalho, avaliou-se a resistência à murcha-de-ceratocystis em oito cultivares de kiwi (Arguta Vermelha, Arguta Verde, Allison, Bruno, Chieftain, Hayward, Monty e Tomury) e 618 plantas seminais meio-irmãos de “Bruno”. Inicialmente, avaliou-se a agressividade de 14 isolados do fungo, genotipicamente distintos, obtidos de diferentes regiões de Santa Catarina e do Rio Grande do Sul, a fim de selecionar os

isolados mais agressivos a serem empregados na avaliação de resistência. Subsequentemente, avaliou-se a agressividade de uma mistura equitativa de inóculo dos isolados mais agressivos em relação a estes inoculados individualmente. Os isolados PG01, FI05, CE10, FI22 e A15 foram os mais agressivos e não houve diferença significativa entre a intensidade da doença da mistura de inóculo em relação ao isolado PG01. Todas as cultivares avaliadas foram suscetíveis à doença, com severidade de 38% a 100%. As cultivares Bruno e Chieftain apresentaram os menores níveis de severidade, 38% e 40%, respectivamente, e foram as únicas que não apresentaram plantas mortas após a inoculação, possuindo resistência moderada em relação às demais cultivares. Entre as 618 plantas meio-irmãos de “Bruno”, sete não apresentaram sintomas e foram classificadas como resistentes.

Palavras-chaves: agressividade, *Ceratocystis fimbriata*, *Actinidia* spp., melhoramento, porta-enxerto, severidade.

Introdução

O kiwi (*Actinidia* spp.), originário do Sul da China, encontra-se atualmente difundido em praticamente todo o mundo, devido ao elevado valor nutricional e às qualidades organolépticas de seus frutos (Saquet & Brackmann 1995). O acelerado crescimento da produção mundial, associado à expansão do seu plantio, tem favorecido o surgimento de enfermidades (Huang 2016). Entre essas, a murcha-de-Ceratocystis, causada pelo fungo *Ceratocystis fimbriata* Ellis & Halst., tem despertado a atenção dos produtores devido aos prejuízos que tem causado à kiwicultura brasileira (Piveta et al. 2016). A doença foi relatada pela primeira vez em 2010, no estado do Rio Grande do Sul (Sonego et al. 2010) e, atualmente, há relatos de sua ocorrência no estado de Santa Catarina (Ferreira et al. 2017).

A enfermidade é caracterizada pela perda de turgescência e brilho das folhas, que posteriormente se enrolam, secam e caem, culminando com a morte da planta. Por se tratar de um patógeno de solo, as plantas afetadas concentram-se, principalmente, em reboleiras. Nos tecidos internos, observam-se lesões radiais de coloração castanho-avermelhada. A doença reduz a produção de frutos e estes, quando produzidos em plantas infectadas, são menores e rejeitados para a comercialização (Piveta et al. 2016).

Além de kiwi, *C. fimbriata* infecta várias importantes culturas arbóreas como mangueira (*Mangifera indica*) (Viegas 1960), eucalipto (*Eucalyptus* spp) (Ferreira et al. 1999), teca (*Tectona grandis*) (Firmino et al. 2012), acácia (*Acacia mangium*) (Santos & Ferreira 2003) entre outras. Alguns pomares do Rio Grande do Sul apresentaram entre 25-30% de mortalidade de plantas (Ferreira et al. 2017), principalmente pelo emprego de enxertos e porta-enxertos altamente suscetíveis à murcha-de-ceratocystis.

A utilização de genótipos resistentes é altamente eficiente para o controle da doença em algumas culturas como eucalipto (Fonseca et al. 2010) e mangueira (Arriel et al. 2016). Entretanto, resultados de inoculações, em condições controladas, demonstraram que as cultivares de kiwi Elmwood, Hayward e Monty foram suscetíveis à murcha-de-ceratocystis (Piveta et al. 2016). Assim, é fundamental avaliar outras cultivares, por meio de inoculações de isolados altamente agressivos, a fim de buscar fontes de resistência para serem empregadas como enxerto ou porta-enxerto. Como existe grande divergência entre os fitopatologistas sobre o termo agressividade (Vanderplank 1963; Shaner et al. 1992; Andrivon 1993; Bos & Parlevliet, 1995), é importante destacar que, neste trabalho, agressividade refere-se à intensidade da doença causada por um isolado (Vanderplank 1963), quanto mais agressivo for o isolado mais intensa será a doença causada por ele.

No Brasil, a produção de mudas de kiwi é realizada por enxertia, empregando-se mudas seminais de “Bruno” como porta-enxerto. Como *C. fimbriata* é um fungo de solo

e se houver plantas seminais de “Bruno” resistentes à doença, elas podem ser multiplicadas vegetativamente e utilizadas como porta-enxerto de outras cultivares comerciais suscetíveis, desde que sejam empregados enxertos livres do patógeno e que outras medidas fitossanitárias sejam adotadas para impedir a disseminação da doença. Portanto, neste estudo, avaliou-se a resistência à murcha-de-ceratocystis de oito cultivares de kiwi (*Actinidia* spp.) e 618 plantas seminais meios-irmãos da cultivar Bruno.

Material e métodos

Cultivares

Foram avaliadas oito cultivares de kiwi, sendo seis femininas (Allison, Arguta Verde, Arguta Vermelha, Bruno, Hayward e Monty) e duas polinizadoras (Chieftain e Tomury). À exceção de ‘Arguta Verde’ e ‘Arguta Vermelha’ que pertencem à espécie *A. arguta*, as demais são *A. chinensis* var. *deliciosa*. As mudas foram disponibilizadas pela Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária (FEPAGRO), do Estado do Rio Grande do Sul, e enviadas à empresa Clonar Resistência a Doenças Florestais, Cajuri, Minas Gerais, para serem multiplicadas. Mini estacas de cada cultivar foram tratadas com ácido indolbutírico (AIB) a 6.000 ppm (Ferri et al. 1996) e enraizadas em tubetes (55 cm³), contendo substrato Carolina® (Carolina Soil do Brasil Ltda., Santa Cruz do Sul, Brasil), complementado com 70g de Osmocote® Plus (Scotts Company, Marysville, USA) e 150g de super fosfato simples por 8 kg de substrato. Após o enraizamento, as plantas foram mantidas durante 20 dias em casa de aclimação e, a seguir, por 30 dias em casa de crescimento e rustificação. Subsequentemente, as mudas foram transplantadas para sacos de polietileno 15 x 20 cm, contendo o mesmo substrato e mantidas em casa de vegetação, com médias de temperatura e umidade relativa do ar de 24 ± 8°C e 80 ± 19%, respectivamente.

Plantas seminais de “Bruno”

Sementes colhidas de frutos da cultivar Bruno foram semeadas em tubetes (55 cm³), contendo o mesmo substrato utilizado para a produção das cultivares, e mantidas em casa de crescimento e rustificação até 90 dias após a germinação das sementes. Em seguida, 618 mudas foram transferidas para sacolas de polietileno 15 x 20 cm, contendo substrato Carolina®, e então mantidas em casa de vegetação.

Isolados de *Ceratocystis fimbriata*

Os isolados de *C. fimbriata*, utilizados neste estudo, foram obtidos de plantas de kiwi infectadas, durante os anos de 2010 e 2015 nos estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina. Da coleção de 119 isolados de *C. fimbriata*, obtidos de kiwi (Micoteca do Laboratório de Patologia Florestal, UFV), foram selecionados 14 isolados genotipicamente distintos e de diferentes pomares (Tabela 1).

Avaliação da agressividade

Inicialmente, avaliou-se a agressividade dos 14 isolados pré-selecionados, com o intuito de selecionar os cinco mais agressivos a serem utilizados como inóculo na avaliação da resistência. Para isso, os isolados foram multiplicados separadamente em placas de Petri (9 cm), contendo meio de cultura Extrato-Malte-Levedura-Ágar (EMLA) (2% extrato de malte, 0,2% extrato de levedura e 2% de ágar) e incubados a 28°C, com fotoperíodo de 12 h sob 20 $\mu\text{mol s}^{-1}$, por 15 dias. Após a incubação, foram adicionados às placas 10 mL de água destilada autoclavada e, então, a superfície das colônias foi raspada com auxílio de um pincel de cerdas macias. A suspensão foi filtrada em uma dupla camada de gaze e a concentração de inóculo ajustada para 1×10^7 esporos por mL⁻¹.

Os isolados foram inoculados individualmente em mudas clonais, com três meses de idade, da cultivar Monty, previamente caracterizada como suscetível à murcha-de-

ceratocystis (Piveta et al. 2016). A inoculação foi realizada por meio de ferimento na base do caule das plantas, seguindo-se da deposição de 200 µL da suspensão de inóculo. Para as plantas-testemunha, utilizou-se o mesmo volume de água destilada em vez da suspensão de inóculo. Empregou-se o delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições para cada isolado. Aos 45 dias após a inoculação, avaliou-se o comprimento da lesão e determinou-se a severidade da doença [(comprimento da lesão/altura da planta)*100]. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de agrupamento Scott & Knott ($p < 0,01$) (Scott & Knott 1974), usando-se o software ASSISTAT versão 7.7 (Silva & Azevedo 2016). Posteriormente, avaliou-se a agressividade de uma mistura equitativa de inóculo dos cinco isolados mais agressivos (PG01, FI05, CE10, FI22, A15) em relação aos isolados inoculados individualmente em “Monty”. Todos os procedimentos de preparo de inóculo, inoculação, incubação e avaliação dos resultados foram realizados como previamente descrito, exceto o fato que as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Diferença Mínima Significativa (DMS) de Fisher, por meio do pacote *agricolae* do software R (R Development Core Team).

Avaliação da resistência das cultivares e das plantas seminais de “Bruno”

Para determinar a resistência, empregou-se a mistura dos cinco isolados mais agressivos, selecionados com base nos resultados do ensaio anterior. Os procedimentos de inoculação e avaliação dos resultados foram realizados como previamente descritos, exceto para as plantas seminais de “Bruno” cuja avaliação da intensidade da doença foi feita por incidência e as plantas assintomáticas foram re-inoculadas. A avaliação da resistência das cultivares foi repetida duas vezes. Como comparador de suscetibilidade foi utilizada a cultivar Monty.

Resultados

Avaliação da agressividade

A intensidade da doença variou significativamente entre os isolados de *C. fimbriata* inoculados na cultivar Monty (Tabela 2). Os 14 isolados separaram-se em quatro grupos, com valores de severidade variando entre 10 e 95% (Fig. 1). As plantas tratadas apenas com água destilada permaneceram assintomáticas, contendo apenas uma discreta lesão (+/- 2 cm) em resposta ao ferimento. O isolado A16 foi o menos agressivo e não diferiu das plantas-testemunha (Fig. 1). Os isolados PG01, FI05, CE10, FI22 e A15 (grupo a) foram os mais agressivos e, por isto, foram escolhidos para compor a mistura de isolados (Fig. 1).

Não houve diferença significativa quanto à intensidade da doença obtida com a mistura de inóculo em relação ao isolado PG01 (Tabela 3).

Avaliação da resistência das cultivares

Não houve interação significativa entre as cultivares e as duas avaliações de resistência ($F = 0.9120$, $p = 0.511$), assim as médias mostradas na Tabela 4 são referentes aos dados das duas avaliações combinados. Todas as cultivares avaliadas foram suscetíveis, com severidade da doença variando de 38% a 100% (Tabela 4). As cultivares diferiram significativamente quanto à intensidade da doença (Tabela 5). “Arguta Vermelha”, “Monty”, “Tomury” e “Hayward” não diferiram significativamente entre si e foram as cultivares mais suscetíveis (85% a 100%). Murcha e morte das plantas de “Arguta Vermelha” foram observados, precocemente, em até 15 dias após a inoculação. Além disso, essa cultivar atingiu o maior nível de severidade da doença e foi a única em que todas as plantas inoculadas morreram.

Avaliação da resistência das plantas seminais de “Bruno”

Das 618 plantas meio-irmãos de “Bruno” inoculadas, sete, classificadas como resistentes, não apresentaram os sintomas de murcha e escurecimento do lenho (Fig. 2B e 2F) e estão sendo multiplicadas por estaquia para testes em campo. As plantas-testemunha apresentaram apenas uma pequena lesão nos tecidos internos do caule (+/- 2 cm) em resposta ao ferimento (Fig 2A e 2E).

Discussão

Os diferentes níveis de agressividade entre os isolados testados demonstram a existência de variabilidade fisiológica, como já descrito em outros patossistemas, envolvendo *C. fimbriata* (Baker et al. 2003; Marin et al. 2003; Oliveira et al. 2015). Na avaliação de resistência a doenças, é fundamental empregar isolados altamente agressivos e que sejam compatíveis com o maior número de genótipos do hospedeiro.

Neste trabalho, optou-se por utilizar como inóculo uma mistura dos cinco isolados mais agressivos (PG01, FI05, CE10, FI22 e A15), obtidos a partir de inoculações na cultivar Monty. Assim como em outras culturas (Harrington et al. 2011; Oliveira et al. 2016), há também em kiwi interação isolado-cultivar (Piveta et al. 2016). Portanto, a utilização de uma mistura de inóculo de isolados altamente agressivos pode constituir uma alternativa eficiente para a seleção de genótipos resistentes. Outra razão para utilizar a mistura de isolados, é que, devido à alta variabilidade genética nas populações do patógeno na região produtora de kiwi no Brasil (Ferreira et al. 2013; Pimenta et al. cap 1), a inoculação da mistura representaria melhor a situação que, provavelmente, ocorre em campo.

Os dados obtidos mostraram a existência de variabilidade genética para a resistência à murcha-de-ceratocystis entre as cultivares testadas. Enquanto “Arguta Vermelha”, “Hayward”, “Monty” e “Tomury” foram altamente suscetíveis, havendo plantas mortas e

com elevados níveis de severidade, acima de 85%; as cultivares Bruno e Chieftain apresentaram os menores níveis de severidade, 38% e 40%, respectivamente, e não apresentaram plantas mortas pela doença. Assim, pode-se inferir que as cultivares Bruno e Chieftain possuem resistência moderada à doença em relação às demais cultivares. A variabilidade em resistência tem sido encontrada em outros patossistemas envolvendo *C. fimbriata*. Em *Eucalyptus* spp. (Rosado et al. 2010), *Mangifera indica* (Arriel et al. 2016) e em *Acacia mangium* (Brawner et al. 2015) a resistência a *C. fimbriata* foi descrita como uma característica quantitativa. A variação contínua no grau de resistência entre as cultivares de kiwi avaliadas e o modelo genético encontrado em outros patossistemas envolvendo *C. fimbriata* sugerem que a resistência em kiwi seja, provavelmente, quantitativa. Porém, um estudo mais detalhado sobre o modelo de herança da resistência à murcha-de-ceratocystis em kiwi deve ser realizado para comprovar essa hipótese.

Como *C. fimbriata* é um fungo de solo, acredita-se que a utilização de porta-enxertos resistentes, associada a práticas de manejo que envolvam o emprego de enxertos livres do patógeno e a execução de podas com ferramentas desinfestadas constituam medidas eficientes para o controle da doença. Essa estratégia tem sido recomendada para o controle do fungo na mangueira (Ribeiro et al. 1986; Rossetto & Ribeiro, 1990; Galli et al. 2011). No Brasil, mudas seminais da cultivar Bruno têm sido utilizadas como porta-enxerto. Portanto, as plantas resistentes selecionadas no presente estudo podem servir como porta-enxertos e assim constituir uma das alternativas mais eficientes para o controle da doença. Para a confirmação da resistência, os sete indivíduos classificados como resistentes estão sendo clonados e serão inoculados com outros isolados antes de serem testados em campo.

De acordo com os resultados das inoculações em plantas seminais de ‘Bruno’ e se a resistência for aditiva, será possível reunir alelos favoráveis à resistência em um

indivíduo por meio de cruzamentos (segregantes transgressivos) entre genótipos suscetíveis, sendo essa uma estratégia importante na seleção de plantas resistentes à doença. Além disso, acredita-se ser possível empregar introgressão de genes, a partir de acessos de germoplasma selvagem como uma alternativa para o controle da doença. Sendo a maioria das cultivares comerciais pertencentes à mesma espécie (*Actinidia chinense*), essa estratégia deve ser considerada nos programas de melhoramento, a fim de expandir a base genética da cultura e favorecer o desenvolvimento de cultivares comerciais resistentes à murcha-de-ceratocystis.

Alguns isolados de *C. fimbriata* são capazes de infectar múltiplas culturas (Ribeiro et al. 1987; Ribeiro et al. 1988; Baker et al. 2003; Thorpe et al. 2004; Silveira et al. 2006; Harrington et al. 2011). Isso pode representar um potencial risco à kiwicultura mundial, pois em países como China e Nova Zelândia, dois dos maiores produtores mundiais de kiwi, *C. fimbriata* já foi relatado causando doença em outras culturas (Slade et al. 1960; Huang et al. 2008, Li et al. 2014; Li et al. 2016). Na China, por exemplo, *C. fimbriata* foi relatado na província de Yunnan, centro de biodiversidade de *Actinidia* e uma das províncias produtoras de kiwi (Huang, 2016). Portanto, a identificação de materiais resistentes à murcha-de-ceratocystis, além de ser importante para o Brasil, é relevante para os grandes polos produtores mundiais de kiwi.

Agradecimentos

O desenvolvimento deste estudo contou com o apoio do CNPq, da FAPEMIG, da Fepagro e das empresas Zespri® e Clonar Resistência a Doenças Florestais. Os autores são gratos ao Sr. Gervásio Silvestrim, por disponibilizar frutos de “Bruno” para a produção das plantas seminais de “Bruno”.

Referências

- Andrivon D (1993) Nomenclature for pathogenicity and virulence: the need for precision. *Plant Dis* 30:361-68.
- Arriel DAA, Guimarães LMS, Resende MDV, Neto FPL, Silva DFSHS, Siqueira DL, Alfenas AC (2016) Genetic control of resistance on *Mangifera indica* to *Ceratocystis* wilt. *Scientia Horticulturae* 211:312-318.
- Baker CJ, Harrington TC, Krauss U, Alfenas AC (2003) Genetic variability and host specialization in the Latin American clade of *Ceratocystis fimbriata*. *Phytopathology* 93:1274–1284.
- Bos L, Parlevliet JE (1995) Concepts and terminology on Plant/Pest relationships: toward consensus in plant pathology and crop protection. *Annu. Rev. Phytopathol.* 33:269-102.
- Brawner J, Japaridin Y, Lapammu M, Raulf R, Boden D, Wingfield MJ (2015) Evaluating the inheritance of *Ceratocystis acaccivora* symptom expression in a diverse *Acacia mangium* breeding population. *South For.* 77:83-90.
- Ferreira FA, Demuner AM, Demuner NL, Pigatto S (1999). Murcha-de-Ceratocystis em eucalipto no Brasil. *Fitopatologia Brasileira*, 24:284.
- Ferreira MA, Harrington TC, Piveta G, Alfenas AC (2013) Genetic variability suggest that *Ceratocystis fimbriata* is native to Rio Grande do Sul, Brazil, where it is causing a new wilt disease on kiwifruit. *Phytopathology* 103:S2.43.
- Ferreira MA, Harrington TC, Piveta G, Alfenas AC (2017) Genetic variability suggests that three populations of *Ceratocystis fimbriata* are responsible for the *Ceratocystis* wilt epidemic on kiwifruit in Brazil. *Trop Plant Pathol* 42:86–95.
- Ferri VC, Kersten E, Machado AA (1996) Efeito do ácido indolbutírico no enraizamento de estacas semilenhosas de kiwi (*Actinidia deliciosa*, A Chev) cultivar Hayward. *Revista Brasileira de Agrociência* 2:63-66.

- Firmino AC, Tozze Júnior HJ, Furtado EL (2012) First report of *Ceratocystis fimbriata* causing wilt in *Tectona grandis* in Brazil. New Dis Reports, Read 25:24.
- Fonseca SM, Resende MDV, Alfenas AC, Guimarães LMS, Assis TF, Grattapaglia (2010) Manual Prático de Melhoramento Genético do Eucalipto. Viçosa, Brasil. Editora UFV
- Galli JA, Martins ALM, Ito MF, Braghini MT, Narita N, Rossetto CJ (2011) Seca-da-mangueira XXII. sobrevivência de variedades poliembriônicas. Rev Bras Frutic 33:1119-1126
- Harrington TC, Thorpe DJ, Alfenas AC (2011) Genetic variation and variation in aggressiveness to native and exotic hosts among Brazilian populations of *Ceratocystis fimbriata*. Phytopathology 101:555-566.
- Huang H (2016) Kiwifruit: The genus Actinidia. 1st Ed. Beijing, China. Elsevier Academic Press.
- Huang Q, Wang YY, Zhao YY, Jiao YX, Li XF, Chen HR, Zhu YY (2008) First report of taro black rot caused by *Ceratocystis fimbriata* in China. Plant Pathology 57:780.
- Li J, Yang JY, Xu KC, Sun YX, Huang Q (2016) First report of *Ceratocystis fimbriata* causing leaf blight on *Alocasia macrorrhiza* in China. Plant Disease 100:2172-2173.
- Li J, Zhang Y, Xu KC, Yang JY, Han YH, Sun YX, Huang Q (2014) First report of wilt of Eucalyptus caused by *Ceratocystis fimbriata* in China. Plant Disease 98:1744.
- Marin M, Castro B, Gaitan A, Preisig O, Wingfield BD, Wingfield MJ (2003) Relationships of *Ceratocystis fimbriata* isolates from Colombian coffee-growing regions based on molecular data and pathogenicity. J Phytopathol 151:395-405.
- Oliveira LSS, Damacena MB, Guimarães LMS, Siqueira DL, Alfenas AC (2016) *Ceratocystis fimbriata* isolates on *Mangifera indica* have different levels of aggressiveness. Eur J Plant Pathol 145:847–856.
- Oliveira LSS, Guimarães LMS, Ferreira MA, Nunes AS, Pimenta LVA, Alfenas AC (2015) Aggressiveness, cultural characteristics and genetic variation of *Ceratocystis*

- fimbriata* on *Eucalyptus* spp. Forest Pathology 45:505-514.
- Piveta G, Ferreira MA, Muniz MF, Valdetaro DCOF, Valdebenito-Sanhueza R, Harrington TC, Alfenas AC (2016) *Ceratocystis fimbriata* on Kiwifruit (*Actinidia* spp.) in Brazil. New Zeal J Crop Hortic Sci 44:13–24.
- Ribeiro IJA, Ito MF, Filho OP, Castro JL (1988) Gomose da Acácia-negra causada por *Ceratocystis fimbriata* Ell. & Halst. Bragantia 47:71-74.
- Ribeiro IJA, Ito MF, Rossetto CJ (1987) *Cassia renigera* Wall.: novo hospedeiro de *Ceratocystis fimbriata* Ell. & Halst. Bragantia 46:417-423.
- Ribeiro IJA, Rossetto CJ, Sabino JC, Gallo PB (1986) Seca-da-mangueira VIII. Bragantia 45:317-322.
- Rosado CCG, Guimarães LMS, Titon M, Douglas L, Resende MDV, Alfenas AC (2010) Resistance to ceratocystis wilt (*Ceratocystis fimbriata*) in parents and progenies of *Eucalyptus grandis* X *E. urophylla*. Silvae Genetica 3:99-106.
- Rossetto CJ, Ribeiro IJA (1990) Seca da mangueira XII. Recomendações de controle. Revista de Agricultura 65:173-180.
- Santos AF, Ferreira FA (2003) Murcha-de-Ceratocystis em Acácia-negra no Brasil. Fitopatol Bras 28:S325.
- Scott AJ, Knott M (1974) A Cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. Biometrics 30:507-512.
- Shaner G, Stromberg EL, Lacy G, Baker KR, Pirone TP (1992) Nomenclature and concepts of pathogenecity and virulence. Annu. Rev. Phytopathol 30:47-66.
- Silva FAZ, Azevedo CAV (2016) The Assistat software version 7.7 and its use in the analysis of experimental data. Afr J Agric Res 11:3733-3740.
- Silveira SF, Harrington TC, Mussi-Dias V, Engelbrecht CJB, Alfenas AC, Silva CR (2006) *Annona squamosa*, a new host of *Ceratocystis fimbriata*. Fitopatol Bras 31:394-397.

- Saquet AA, Brackmann A (1995) A cultura do kiwi. *Ciência Rural* 25:177-182.
- Slade DA (1960) Black rot na important disease of Kumaras. *New Zealand Journal of Agriculture* 100:375-378.
- Sonego OR, Ferrera MA, Valdebenito-Sanhueza RM, Gava R, Garrido LDAR, Alfenas AC (2010) Primeiro relato da murcha-de-Ceratocystis em kiwi. *Trop Plant Pathol* 35:233.
- Steimel J, Engelbrecht CJB, Harrington TC (2004) Development and characterization of microsatellite markers for fungus *Ceratocystis fimbriata*. *Molecular Ecology Notes* 4:215-218.
- Thorpe DJ (2004) Phylogenetics, Intersterility and Host Specialization of *Ceratocystis fimbriata* from Brazil and the Family Araceae. Ms Thesis, Iowa State University. Ames, IA, USA.
- Vanderplank (1963) *Plant Diseases: Epidemics and Control*. New York, USA. Academic Press.
- Viégas AP (1960) Seca da mangueira. *Bragantia* 19:163–182.

Tabelas e figuras

Tabela 1. Origem geográfica e genótipos dos isolados selecionados de *Ceratocystis fimbriata* de kiwi (*Actinidia* spp.)

ISOLADO	GENÓTIPO*	CIDADE E ESTADO	COORDENADAS GEOGRÁFICAS
A8	DEDBFEABAAADCA	Farroupilha-RS	29°07'40''S 51°24'00''W
A11	CDDBDEABBCADBC		
A15	DCDBCBCBACLBA		
A16	EDCBDAABACADCC		
A32	BCDBCBCBACLBA		
PG01	ECDBCBCBACMBA		
CE07	DCDBCBCBACJBA	São Joaquim-SC	28°17'38''S 49°55'54''W
CE10	DCEBCCACBACMBA		
FI05	DCEBBBACBACMBA	Fraiburgo-SC	27°01'34''S 50°55'17''W
FI11	DCDBBDADBACQBA		
FI13	DCEBBBACBACRBA		
FI22	BCABDBACBACHBA		
JO03	CAEDEDABAECBAA	Campo Belo do Sul-SC	27°53'57''S 50°45'39''W
JO04	DCDBCBCBACMBA		

* Baseado em análises com marcadores microssatélites (Steimel et al. 2004), cada letra representa um genótipo distinto.

Tabela 2. Análise de variância da agressividade dos 14 isolados de *Ceratocystis fimbriata* inoculados em plantas da cultivar Monty

FV	GL	SQ	QM	valor <i>F</i>	<i>P</i>-valor
Isolados	14	4,33	0,31	16,07**	<0,0001
Resíduo	30	0,58	0,02		
Total	44	4,90			

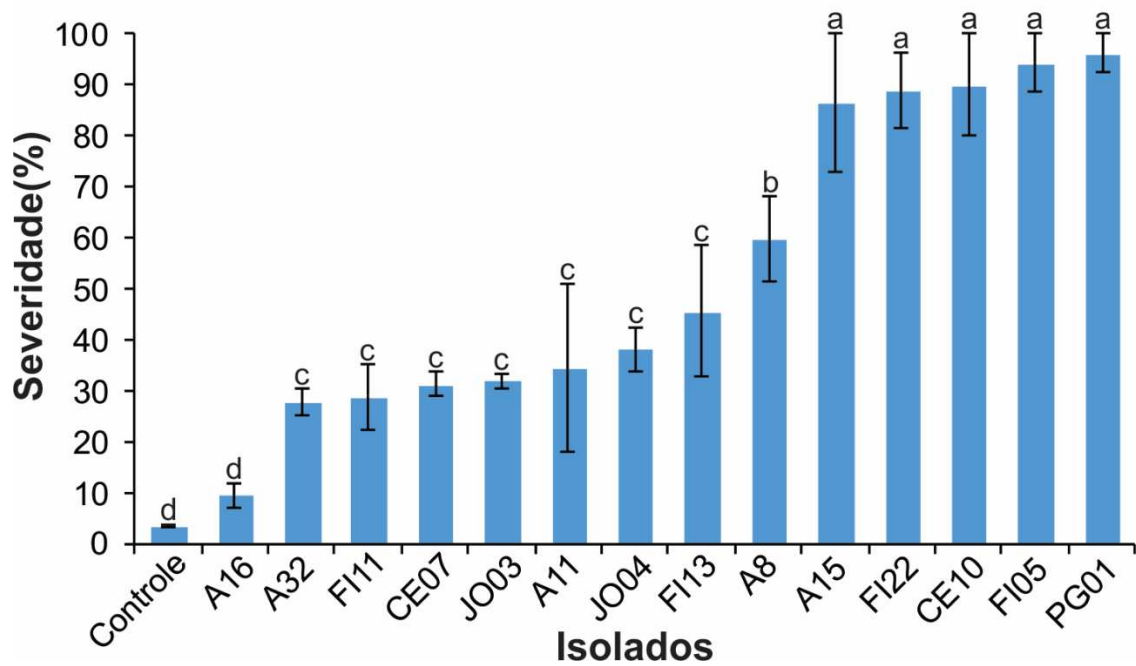


Fig. 1. Agressividade de 14 isolados de *Ceratocystis fimbriata* de kiwi na cultivar Monty (*Actinidia chinensis* var. *deliciosa*). Grupos de médias seguidas pela mesma letra, não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,01$). Os Traços sobre as colunas das médias representam o erro padrão das médias.

Tabela 3. Análise de variância da intensidade da doença obtida com a inoculação da mistura dos isolados mais agressivos e o isolado PG01 de *Ceratocystis fimbriata*.

FV	GL	SQ	QM	valor F	P-valor
Inóculo	1	63,3	63,3	0,222	<0,65
Resíduo	8	2276,9	284,6		
Total	9	2340,2			

Tabela 4. Número de plantas mortas (NPM), média da altura das plantas (MAP), média do comprimento da lesão (CL) e severidade média da doença em oito cultivares de kiwi, inoculadas com a mistura de inóculo dos isolados de *Ceratocystis fimbriata*.

CULTIVAR	NPM	MAP	CL(cm)	SEVERIDADE (%)
Arguta Vermelha	10/10	13	11,0	100 a*
Monty	6/10	16,6	14,8	90,5 ab
Hayward	5/10	11,3	10,3	86,2 abc
Tomury	5/10	13,6	11,8	85,4 abc
Allison	1/10	16,6	11,5	73,2 bc
Arguta Verde	3/10	16,8	10,3	70,0 c
Chieftain	0/10	21,1	8,4	40,3 d
Bruno	0/10	14,5	6,5	38,5 d
Controle	0/10	20,4	2,0	9,7 e

* Médias, seguidas pela mesma letra, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de diferenças mínimas de Fisher (DMS = 17.77; $p < 0,01$).

Tabela 5. Análise de variância da severidade da doença em oito cultivares de kiwi (*Actinidia* spp.)

FV	GL	SQ	QM	F valor	P-valor
Tratamentos	8	39382,40	49222,79	39,60**	<0,0001
Resíduo	36	4474,94	124,30		
Total	44	43857,34			

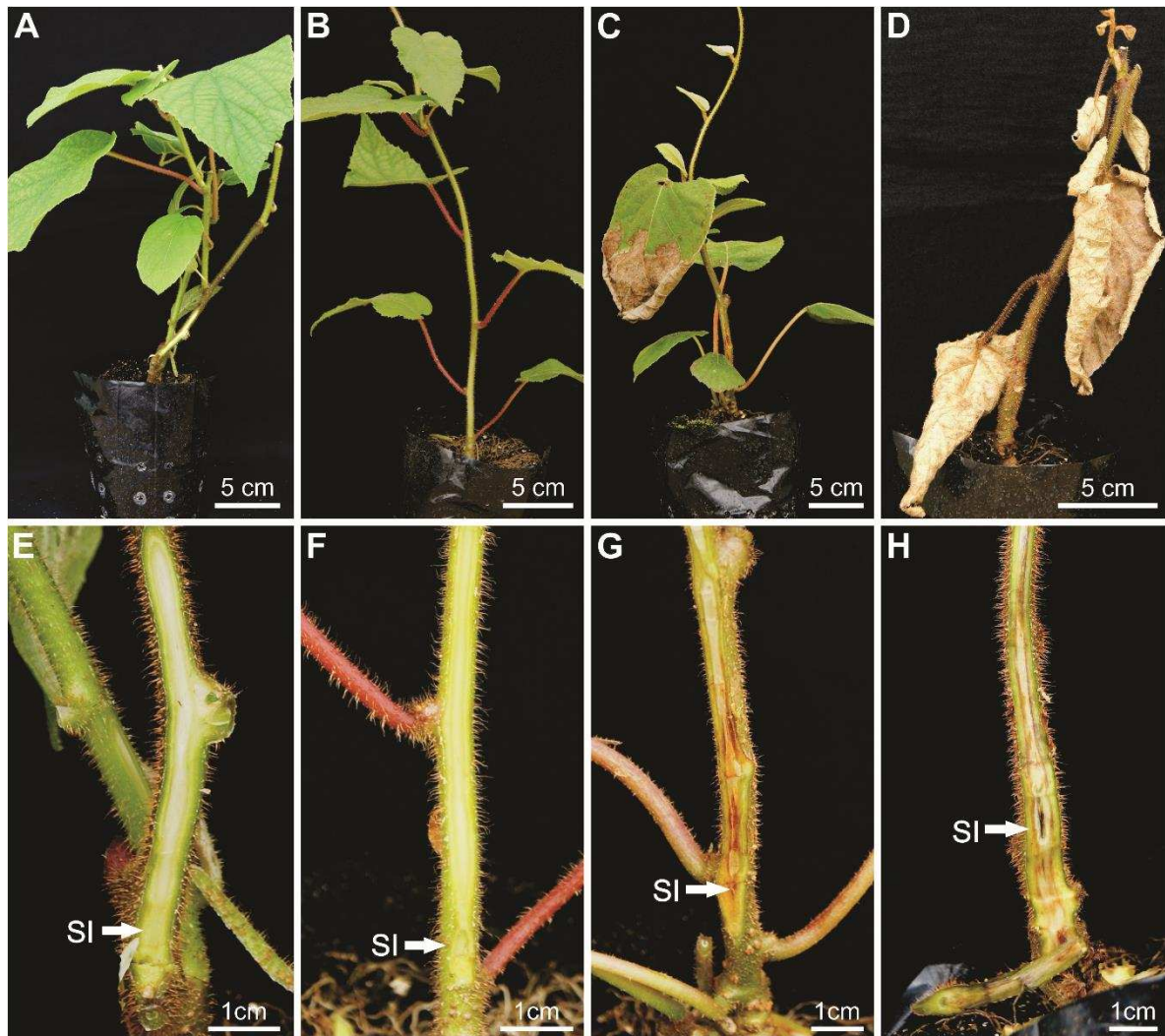


Fig. 2 Plantas meios-irmãos suscetíveis e resistentes à murcha-de-ceratocystis oriundas da cultivar Bruno (*Actinidia chinensis* var. *deliciosa*). **A e E** - Planta controle; **B e F** - Planta resistente, sem murcha e escurecimento longitudinal do lenho; **C e G** - Planta suscetível, com início de murcha e com escurecimento longitudinal do lenho; **D e H** - Planta altamente suscetível, morta e com escurecimento longitudinal do lenho; **SI** - Ponto de inoculação.

CONCLUSÕES GERAIS

1. A população de isolados responsáveis pela epidemia de murcha-de-ceratocystis foi formada, a partir da mistura de isolados do Cerrado, da Mata Atlântica e de nativos do Sul do Brasil;
2. Há variabilidade no grau de agressividade entre os isolados de *Ceratocystis fimbriata* de kiwi;
3. As cultivares Allison, Arguta Verde, Argutar Vermelha, Bruno, Chieftain, Hayward, Monty e Tomury foram suscetíveis à murcha-de-ceratocystis;
4. Há variabilidade genética para a resistência à murcha-de-ceratocystis em kiwi.