

COMUNICAÇÃO CIENTÍFICA

OCORRÊNCIA DE *Ceratocystis fimbriata* EM KIWI (*Actinidia deliciosa*) NO SUL DO BRASIL¹

GRAZIELA PIVETA², ACELINO COUTO ALFENAS³, MARLOVE DE FÁTIMA BRIÃO MUNIZ⁴,
ROSA MARIA VALDEBENITO-SANHUEZA⁵, MARIA ALVES FERREIRA⁶

RESUMO- Em uma inspeção de rotina em uma plantação de kiwi (*Actinidia deliciosa*), constataram-se plantas com sintomas de murcha, morte e escurecimento interno dos tecidos do caule. Isolamentos a partir de tecidos infectados e do solo rizosférico permitiram a obtenção de cultura de um fungo com características morfológicas similares a *Ceratocystis fimbriata*, cuja identificação foi confirmada a partir do sequenciamento da região ITS do rDNA. O teste de patogenicidade foi realizado nas variedades Monty e Farroupilha. Constatou-se que o agente causal da doença em kiwi pertence ao complexo *Ceratocystis fimbriata* e ao clado da América Latina, e os isolados inoculados foram patogênicos às duas variedades testadas.

Palavras-chave: Murcha-de-ceratocystis, *Actinidia deliciosa*, patogenicidade.

Ceratocystis fimbriata KIWI (*Actinidia deliciosa*) IN SOUTHERN BRAZIL

ABSTRACT - In a routine inspection on a plantation of kiwi (*Actinidia deliciosa*) plants were found with wilt symptoms, internal browning and death of the stem tissues. Isolations from infected tissues and soil rhizosphere, allowed to obtain a culture of fungus with morphological characteristics similar to *Ceratocystis fimbriata* whose identification was confirmed based on the sequencing of the ITS region of rDNA. The pathogenicity test was conducted in Monty and Farroupilha varieties. It was found that the causal agent of the disease in kiwi belong to the *C. fimbriata* complex and to the group of Latin America and the isolates inoculated were pathogenic to two varieties tested.

Index terms: Ceratocystis wilt, *Actinidia deliciosa*, pathogenicity.

O kiwi, *Actinidia deliciosa* (A. Chev) C. F. Liang et A. R. Ferguson, originário da China, foi introduzido na Nova Zelândia, em 1906, e subsequentemente se expandiu em vários países, inclusive no Brasil, na década de 80. Nos últimos anos, a cultura do kiwi tem-se expandido consideravelmente devido aos altos preços alcançados no mercado nacional. Nos últimos três anos, foram observados plantas e kiwi com sintomas de amarelecimento foliar, murcha e seca dos ramos (SONEGO et al., 2010). Inicialmente, as folhas das plantas afetadas perdem a turgescência e o brilho, e enrolam-se (Figura 1A), seguindo-se de secamento, mas as folhas permanecem aderidas aos ramos (Figura 1B), mesmo após a morte da planta. Nos tecidos internos do caule, observaram-se lesões radiais de coloração castanho-avermelhada (Figura 1C). Na casca, as lesões são

de coloração marrom-clara e geralmente se iniciam a partir dos ferimentos de poda e estendem-se até as ramificações dos galhos, de onde se pode observar, algumas vezes, a exsudação de um líquido escuro. As plantas afetadas são geralmente distribuídas aleatoriamente no pomar. A doença reduz a produção, e os frutos são menores e rejeitados para a comercialização. Na região de Farroupilha - RS, a doença assumiu importância econômica devido ao plantio de material enxertado altamente suscetível, favorecida por frequentes podas de formação e enxertia que favorecem a disseminação e a penetração do patógeno.

Amostras de plantas com sintomas de doença foram examinadas no Laboratório de Patologia Florestal da Universidade Federal de Viçosa-MG, onde se procedeu ao isolamento do fungo, utilizando-se do método de sanduíche de cenoura, conten-

¹(Trabalho 258-12). Recebido em: 29-10-2012. Aceito para publicação em: 01-04-2013.

²Universidade Federal de Santa Maria - UFSM. E-mail: grazipiveta@yahoo.com.br

³Universidade Federal de Viçosa - UFV. E-mail: aalfenas@ufv.br

⁴Universidade Federal de Santa Maria - UFSM. E-mail: marlove@smail.ufsm.br

⁵Proterra. E-mail: rosamaria@cipnet.com.br

⁶Universidade Federal de Lavras - UFLA. E-mail: ferreiraem@yahoo.com.br

do pedaços de tecido infectados, incubados a 25 °C (ALFENAS et al., 2007). Aos 10 dias de incubação, foi observada a presença de peritécios típicos de *C. fimbriata*, contendo massa de ascósporos. *Ceratocystis fimbriata* é uma das espécies do gênero *Ceratocystis* na área florestal, é um fungo polífago, com ampla distribuição geográfica, causando doenças em diversas plantas lenhosas. No Brasil, são afetados por esse patógeno vários hospedeiros como *Eucalyptus*, *Hevea*, *Ipomoea*, *Mangifera*, *Platanus*, *Populus*, *Prunus*, *Coffea*, entre outros, causando murcha, descoloração dos tecidos internos do caule e até morte da planta (ALFENA et al., 2009). A partir da massa de ascósporos formada no ápice peritecical, obteve-se uma suspensão de inóculo, a qual foi semeada em placas de Petri, contendo meio de MEA (20 g/L de Ágar (Vetec) e 20 g/L de extrato de malte (Himedia) mantidas no escuro por 22 h. Ascósporos isolados foram individualmente repicados para tubos de ensaio contendo o meio de cultura a fim de obter culturas monoascospóricas. Características morfológicas, como dimensões, forma, presença de conídios primário e secundário, conidióforos primários e secundários, entre outras, foram utilizadas para a identificação dos isolados em estudo. Trinta estruturas foram mensuradas por isolado. Foram calculados para cada estrutura o mínimo, o máximo, a média e o desvio-padrão, e estes são apresentados como (mínimo-) desvio-padrão menos a média desvio-padrão mais a média (-máxima). Para confirmar a patogenicidade do fungo, 500 mL de uma suspensão a $2,5 \times 10^6$ esporos/mL de dois isolados (PA04 e PM20) de *C. fimbriata* foram depositados em um corte transversal realizado no caule de mudas enxertadas das variedades Monty e Farroupilha, e no porta-enxerto da variedade Bruno. A área inoculada foi recoberta com filme de PVC (Rolopack), e as plantas inoculadas foram incubadas a 28°C. Aos 60 dias de incubação, foram avaliadas as seguintes variáveis: altura da planta e diâmetro do coleto no porta-enxerto e no enxerto, e comprimento da lesão nos tecidos internos do caule. A partir dos dados obtidos, calculou-se a severidade (S) da doença, dada pela equação : $S = CL \times HP^{-1} \times 100$, em que: CL = comprimento da lesão, e HP = altura da planta.

Para a identificação molecular, primeiramente foi realizada extração de DNA, conforme descrito por Sambrook et al. (1989). Após a extração do DNA genômico, os oligonucleotídeos ITS1 (5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') foram empregados para a amplificação da região ITS (*Internal Transcribed Spacer do DNA ribossômico*) do

rDNA. As Condições de amplificação foram temperatura inicial de aquecimento de 85°C, por 2 min, e desnaturação inicial de 95°C, por 95 s, seguido de 35 ciclos de 58°C, por 60 s, 72°C por 72 s e 94°C por 30 s, seguido de 58°C por 1 min, com uma extensão final de 72°C por 30 min. Os produtos resultantes foram separados em gel de agarose a 1 % a 150 V, durante 40 min, contrastados em brometo de etídio a 1%. Em seguida, os produtos de PCR foram purificados usando o Kit GFX™ PCR DNA (GE Healthcare). Logo em seguida, foi sequenciado. Para as análises filogenéticas, além dos isolados obtidos neste trabalho, foram escolhidas no GenBank (Tabela 1) sequências de DNA dos genes pertencentes ao complexo *C. fimbriata* dentro do clado da América Latina, América do Norte e Ásia. A análise de NJ foi realizada no programa MEGA 4.1, empregando-se o modelo Kimura-2-parâmetros (KIMURA, 1980) para calcular a distância evolutiva, e a consistência dos grupos foi analisada por 1.000 pseudorrepetições bootstrap. As árvores filogenéticas foram visualizadas e editadas no programa Fig-Tree 1.3.1. (<http://tree.bio.ac.uk/software>).

Os isolados avaliados caracterizaram-se por: base do peritécio, globosa de coloração escura, submerso no meio de cultura, aéreo (70-)125-214(-234) µm de comprimento e 86-250 µm de largura de 81-259 µm (Figura 2 A). Pescoço, ereto de coloração escura e (143-)349-631(-721) µm de comprimento, por 22- 48 µm na base e 10-34 µm no ápice. Pescoços do peritécio encerrando em hifas divergentes (Figura 2 E), hialinas e (29-)51-86(-98) µm de comprimento. Ambos os isolados apresentaram conidióforos primários (Figura 2 Fa) e secundários (Figura 2 Fb), ocorrendo isoladamente em micélio submerso ou aéreo. Os conidióforos primários (Figura 2 B) são mais largos na base, afinando-se em direção ao ápice, comprimento de: (29-)60-87(-88) µm, largura de 2-7 µm na base e 3-4 µm no ápice. Conidióforos secundários (Figura 2 G) em forma reta (29-)112-115(-114) µm, base e ápice de 5-6 µm. Conídios primários hialinos são asseptados, cilíndricos, (9)14-20(-21) µm de comprimento e 3-5 µm de largura. Os conídios secundários são hialinos, asseptados, barriliformes, apresentando (5)7-9(-11) µm de comprimento e 3-6 µm de largura. Aleuroconídios (Figura 2 D) marrom-escuros, piriformes (9)10-13(-14) µm de comprimento e 6-11 µm de largura. Ambos os isolados inoculados foram patogênicos às duas variedades de kiwi e induziram sintomas de murcha, escurecimento dos tecidos internos do caule e morte das plantas após 60 dias da inoculação (Figura 1 D), analogamente ao encontrado sob condições de infecção natural. A variedade

Monty foi a mais suscetível, apresentando índice de severidade de 50 % no enxerto e de 69 % no porta-enxerto. Já a variedade Farroupilha apresentou índice de severidade de 24 % no enxerto e de 16% no porta-enxerto (Figura 3). A amplificação da região ITS resultou em produtos de aproximadamente 600 pb para ambos os isolados analisados. Constatou-se que o patógeno isolado de plantas de kiwi pertenc-

ce ao complexo *C. fimbriata* e ao clado da América Latina. Em estudo de filogenia de diversas espécies cultivadas no Brasil, como *Gmelina arborea*, *Colocasia esculenta*, *Ficus carica*, *Eucalyptus* spp., e *Mangifera indica* realizado por Harrington et al. (2011), foi concluído que os isolados em estudo pertencem ao clado América Latina.

TABELA 1- Sequências da região ITS obtidas no Genbank.

| Número de acesso (Genbank) | Hospedeiro | Local |
|---|----------------------------|--------|
| <i>Ceratocystis fimbriata</i> AY157964 | <i>Mangifera</i> | Brasil |
| <i>Ceratocystis fimbriata</i> AY157965 | <i>Mangifera</i> | Brasil |
| <i>Ceratocystis fimbriata</i> AY953382 | <i>Mangifera</i> | Brasil |
| <i>Ceratocystis fimbriata</i> EF433298 | <i>Mangifera</i> | Brasil |
| <i>Ceratocystis cacaofunesta</i> DQ520636 | Cacau | Brasil |
| <i>Ceratocystis cacaofunesta</i> DQ520637 | Cacau | Brasil |
| <i>Ceratocystis fimbriata</i> AY526287 | <i>Colocasia</i> | Brasil |
| PM20 KC595884 | <i>Actinidia deliciosa</i> | Brasil |
| PA04 KC595885 | <i>Actinidia deliciosa</i> | Brasil |
| <i>Ceratocystis virescens</i> DQ061281 | Out group | |



FIGURA 1- A) Sintomas de murcha, amarelecimento e seca dos ramos infectados por *Ceratocystis fimbriata*; B) Plantas apresentando secamento em decorrência da colonização fúngica; C) Escurecimento do lenho; D) Planta de kiwi, variedade Monty, não inoculada (esquerda) e inoculada com um isolado de *Ceratocystis fimbriata* (direita).

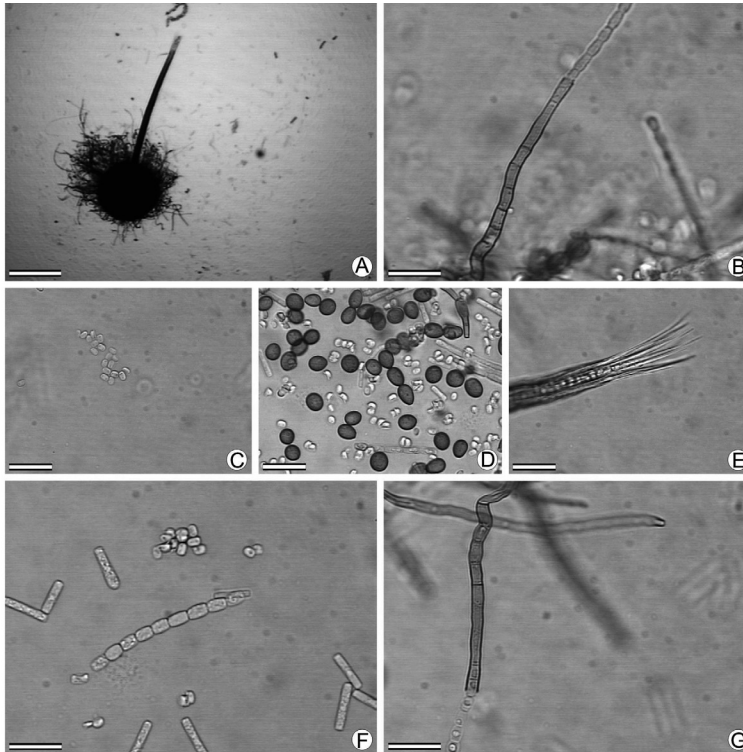


FIGURA 2 - Características morfológicas de *Ceratocystis fimbriata*. A) peritécio; B) conidióforo primário; C) ascósporos; d) aleuroconídios; E) hifa estiolada divergente; F) conídios primários (a) e conídio secundário (b); G) conidióforo secundário (Escala A= 200 μ m, B, C, D, E, F, G, H = 20 μ m).

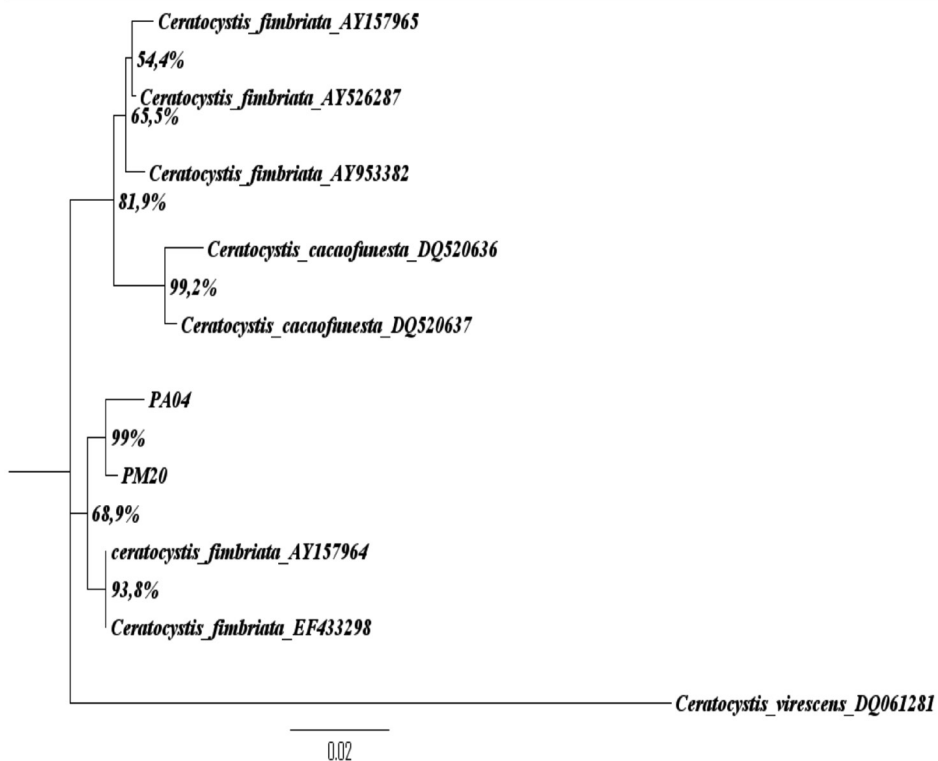


FIGURA 3 - Árvore gerada a partir de seqüências da região ITS de espécies de *Ceratocystis*, pelo método NJ.

REFERÊNCIAS

- ALFENAS, A. C.; FERREIRA, F. A.; MAFIA, R. G.; GONÇALVES, R. C. Isolamento de fungos fitopatogênicos. In: ALFENAS, A.C.; MAFIA, R.G. (Ed.). **Métodos em fitopatologia**. Viçosa: Ed. UFV, 2007. 382 p.
- ALFENAS, A. C.; ZAUZA, A. A. V.; MAFIA, R. G.; ASSIS, T. F. **Clonagem e doenças do eucalipto**. 2. ed. Viçosa: Editora UFV, 2009. 442 p.
- HARRINGTON, T.C.; THORPE, D.J.; ALFENAS, A.C. Genetic variation and variation in aggressiveness to native and exotic hosts among Brazilian populations of *Ceratocystis fimbriata*. **Phytopathology**, St Paul, v.101, n.5, p.555-566, 2011.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 1659 p.
- SONEGO, O. R. et al. Primeiro relato da murcha-de-ceratocystis em kiwi. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 42., 2010, Cuiabá. CD-ROM.