

VANESSA LOPES JORGE

ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO E AGRESSIVIDADE DE ISOLADOS DE
Calonectria pteridis EM *Eucalyptus* sp.

Monografia apresentada ao Departamento de Engenharia Florestal da Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do curso de graduação em Engenharia Florestal.

VIÇOSA

MINAS GERAIS – BRASIL

SETEMBRO/2013

VANESSA LOPES JORGE

**ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO E AGRESSIVIDADE DE ISOLADOS DE
Calonectria pteridis EM *Eucalyptus* sp.**

Monografia apresentada ao Departamento de Engenharia Florestal da Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do curso de graduação em Engenharia Florestal.

APROVADA: 02 de Setembro de 2013.

Prof. Acelino Couto Alfenas

(Orientador)

Dr. Rafael Ferreira Alfenas

(Co-Orientador)

Dr. Hélivio Gledson Maciel Ferraz

AGRADECIMENTOS

A Deus por ser minha fonte de força e renovação.

Aos meus pais Waltercides Jorge e Maria da Penha Lopes pela confiança, pelo amor, pela dedicação e compreensão.

Aos meus irmãos Pablo e Paulinho e a todos os meus familiares pelo carinho.

Ao Fred pelo amor, companheirismo e paciência.

Aos queridos amigos construídos em Viçosa pelas alegrias e pela constante força e apoio, principalmente nos momentos de dificuldade.

À Thamara pelo constante incentivo à profissão e às amigas Mariana, Lays, Ana Cláudia, Thamires e Ana Luiza pela sincera amizade, pelo carinho e compreensão.

A todos os colegas de trabalho, em especial à Mara, pelo companheirismo, carinho e constante ajuda na execução de todos os trabalhos.

Ao Lúcio e HÉlvio pela significativa ajuda com a interpretação dos resultados.

Ao Rafael pela disponibilidade, pela relevante ajuda e pelo constante aprendizado.

Ao Professor Acelino pelos ensinamentos e pelas inúmeras oportunidades.

BIOGRAFIA

Vanessa Lopes Jorge nasceu em Sete Lagoas, Minas Gerais, no dia 16 de Abril de 1989.

Mudou-se com seus pais para Divinópolis, Minas Gerais, em 1996, onde concluiu o Ensino Médio no “Colégio São José e São Geraldo” em 2006.

Em 2008 ingressou no curso de graduação em Engenharia Florestal na Universidade Federal de Viçosa em Viçosa, Minas Gerais.

Em 2010 foi bolsista de Iniciação Científica da FAPEMIG no Laboratório de Interações Inseto-Microrganismos, do Departamento de Entomologia sob orientação do Professor Simmon Luke Elliot.

Em 2011 iniciou o estágio no Laboratório de Patologia Florestal e Genética da Interação Planta-Patógeno onde se tornou bolsista de Iniciação Científica do CNPq, orientada pelo Professor Acelino Couto Alfenas.

Em 2012 foi bolsista de intercâmbio do Programa Ciência Sem Fronteiras na Université Laval, em Québec, Canadá, sob orientação do Professor Louis Bernier.

Em 2013 retornou à Universidade Federal de Viçosa e graduou-se em Engenharia Florestal no mês de setembro do mesmo ano.

CONTEÚDO

LISTA DE TABELAS.....	VI
LISTA DE FIGURAS.....	VII
EXTRATO.....	VIII
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 O Eucalipto no Setor Florestal Brasileiro.....	3
2.2 <i>Calonectria pteridis</i> : Mancha foliar e desfolha em Eucalipto.....	4
2.2.1 Características do patógeno.....	4
2.2.2 Sintomas e importância da mancha-de-pteridis.....	5
2.3 Programas de Melhoramento para resistência à mancha-de-pteridis.....	6
3. OBJETIVOS.....	7
3.1 Objetivo Geral.....	7
3.2 Objetivos Específicos.....	7
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	8
4.1 Obtenção dos isolados de <i>Calonectria pteridis</i>	8
4.1.1 Coleta das amostras.....	8
4.1.2 Isolamento e Manutenção.....	9
4.2 Identificação do patógeno.....	10
4.2.1 Identificação Morfológica.....	10
4.2.2 Identificação filogenética.....	11
4.2.2.1 Extração de DNA.....	11
4.2.2.2 Amplificação de DNA.....	12
4.2.2.3 Sequenciamento e Análise filogenética.....	12

4.3	Teste de Agressividade.....	13
4.3.1	Material Vegetal e Delineamento Experimental.....	13
4.3.2	Inoculação.....	14
4.3.3	Avaliação do Período de Incubação.....	14
4.3.4	Avaliação da Agressividade.....	15
4.3.5	Análise Estatística.....	16
5.	RESULTADOS.....	17
5.1	Obtenção dos isolados e Identificação da espécie do patógeno.....	17
5.2	Agressividade dos Isolados.....	20
5.2.1	Período de Incubação.....	20
5.2.2	Progresso da mancha-de-pteridis.....	20
6.	DISCUSSÃO.....	23
7.	CONCLUSÃO.....	26
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	27

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Isolados de <i>Calonectria pteridis</i> estudados.....	18
TABELA 2: Teste de Tukey ($p \leq 0,05$) para as médias de AACPD de cada isolado.....	22

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Municípios onde foram coletadas amostras de solo e de folhas de eucalipto com sintomas característicos da mancha-de-pteridis.....	9
FIGURA 2: Sintomas da mancha-de-pteridis, isolamento e características do patógeno.....	10
FIGURA 3: Inoculação de isolados de <i>C. pteridis</i>	14
FIGURA 4: Ciclo do estabelecimento de uma doença fúngica em planta hospedeira.....	15
FIGURA 5: Equação descrita por Campbell & Madden (1990) para estimar a Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD).....	16
FIGURA 6: Estruturas reprodutivas de <i>Calonectria pteridis</i>	18
FIGURA 7: Árvore filogenética obtida através da Inferência Bayesiana usando sequências do gene Fator de Elongação 1 α	19
FIGURA 8: Período de Incubação para cada isolado avaliado.....	20
FIGURA 9: Diferença da agressividade de isolados de <i>Calonectria pteridis</i> em híbridos de <i>Eucalyptus grandis</i> x <i>E. urophylla</i>	21

EXTRATO

JORGE, Vanessa Lopes. Monografia de graduação. Universidade Federal de Viçosa, Setembro de 2013. **Isolamento, identificação e agressividade de isolados de *Calonectria pteridis* em *Eucalyptus* sp.** Orientador: Acelino Couto Alfenas. Co-orientadores: Rafael Ferreira Alfenas e Lúcio Mauro da Silva Guimarães.

Calonectria pteridis é um importante patógeno causador da mancha-de-pteridis, principalmente em regiões do nordeste e norte do Brasil. A doença é caracterizada por lesões foliares pequenas, circulares ou alongadas de coloração cinza-claro, que progridem para manchas coalescidas de coloração marrom-claro, que podem ocupar grande área do limbo foliar, resultando em intensa desfolha em genótipos suscetíveis de *Eucalyptus* spp. O plantio de genótipos resistentes é o método mais eficaz e econômico para o controle da doença no campo. Porém, muitos isolados estão associados à doença em campo e a variabilidade patogênica entre eles representa grande problema para traçar medidas eficazes no seu manejo. Foram obtidos 10 isolados das amostras de folha e solo coletadas em 4 municípios dos Estados do Pará, Maranhão e Piauí. Identificações morfológicas baseadas nas dimensões estruturais, e filogenéticas, através de comparações da região TEF-1 α , mostraram que todos os isolados pertencem a espécie *C. pteridis*. Baseando no cálculo da Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença

(AACPD), constatou-se que há variabilidade patogênica entre 10 isolados obtidos de municípios dos Estados do Pará, Maranhão e Piauí. Os isolados LPF341, LPF059, LPF340 e LPF054 foram os mais agressivos, sendo os mais indicados para inoculações artificiais visando à seleção de materiais resistentes à mancha-de-pteridis. Porém estudos sobre a diversidade genética e genotípica dos isolados devem ser feitos para selecionar entre os isolados mais agressivos os que têm maior espectro de virulência e determinar se há efeito do local de coleta na agressividade dos mesmos.

1. INTRODUÇÃO

A mancha foliar causada por *Calonectria pteridis* Crous, P.W., Wingfield, M.J. & Alfenas, A.C., 1993 (= *Cylindrocladium pteridis* Wolf, F.A., 1926), chamada mancha-de-pteridis, é uma das principais doenças fúngicas da cultura do eucalipto principalmente nas regiões nordeste e norte do país (Alfenas et al., 2009). A mancha-de-pteridis é caracterizada por incitar, na maioria das espécies de *Eucalyptus*, manchas pequenas (1 a 7 mm de diâmetro), circulares ou alongadas e de coloração inicial cinza-claro, que progridem para marrom-claro (Figura 2A). Em genótipos altamente suscetíveis, a mancha pode ocupar todo limbo foliar e conseqüentemente induzir à desfolha prematura (Alfenas, 1986; Ferreira et al., 1995). Acredita-se que a desfolha provocada pelo fungo possa causar redução do incremento volumétrico de madeira em decorrência da redução da área fotossintética (Domiciano et al, 2009) e, ainda, submeter as plantas aos efeitos da matocompetição, uma vez que a entrada de luz no sub-bosque propicia o crescimento de plantas invasoras (Alfenas et al., 2009).

Embora outros métodos de controle tenham sido reportados na literatura (Ferreira et al., 2006; Crous et al., 2002; Phipps, 1990) , visando minimizar as perdas causadas por *Calonectria* spp., o plantio de genótipos resistentes é o método mais eficaz e econômico para o controle da doença no campo (Fonseca et al., 2010; Santos et al., 2008).

Entretanto, para obter sucesso nos programas de melhoramento com foco em resistência a doenças, é fundamental considerar a variabilidade genética na população do patógeno (Mc Donald & Linde, 2002; Bruton, 1998). Assim como já foi demonstrado para *Ceratocystis fimbriata* (Oliveira, 2010), isolados mais agressivos e com amplo espectro de virulência são os mais recomendados para inoculação em condições controladas de temperatura e umidade, possibilitando a seleção de clones resistentes. Dessa forma, é fundamental conhecer o espectro de virulência bem como os diferentes níveis de agressividade entre isolados de *Calonectria pteridis*, uma vez que esta é a espécie que ocorre com maior frequência em plantações de eucalipto no Brasil (Alfenas, 2013).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O Eucalipto no Setor Florestal Brasileiro

A crescente conscientização sobre a preservação das florestas nativas, o aumento da demanda por produtos florestais e os ganhos adquiridos pelos programas de melhoramento genético permitiram o crescimento da eucaliptocultura brasileira, que tem hoje cerca de 5,1 milhões de hectares plantados, distribuídos principalmente pelos estados de Minas Gerais, São Paulo, Bahia, Mato Grosso do Sul, Rio Grande do Sul, Espírito Santo e Paraná, tendo maior expansão ocorrido nos estados do Tocantins e do Mato Grosso do Sul (ABRAF, 2013).

Em 2012, a área ocupada por plantios com espécies florestais no Brasil chegou a 7,1 milhões de hectares, sendo 70,8% desta, correspondente aos plantios de *Eucalyptus*. Os tributos arrecadados pelos segmentos associados aos plantios de eucalipto neste ano, calculados com base no Valor Bruto da Produção, representaram 0,34% da arrecadação tributária nacional, o equivalente a 5,4 bilhões de reais (ABRAF, 2013).

O impulso do setor de base florestal no país foi propiciado significativamente pela produção de mudas de eucalipto clonadas, permitindo formar plantios homogêneos e de alta produtividade (Mora & Garcia, 2000), que variam de 30-80 m³/ha.ano, dependendo da região, do material genético e dos tratamentos culturais (Alfenas et al., 2009).

A expansão das áreas plantadas ocorreu significativamente a partir da década de 70, onde até então as plantações de eucalipto eram consideradas praticamente livres de doenças. Porém, com o emprego de materiais mais produtivos sem o prévio conhecimento de sua resistência a doenças, com a implementação de novas técnicas de manejo da eucaliptocultura e com a implantação de ciclos sucessivos numa mesma área de plantio, o surgimento de várias epidemias foi favorecido, seja por introdução acidental dos agentes etiológicos ou pela presença endêmica destes nas áreas plantadas. Dentre estas enfermidades, merece destaque a ferrugem-do-eucalipto, causada por *Puccinia psidii*, a murcha-de-ceratocystis causada por *Ceratocystis fimbriata* e a mancha foliar e desfolha causada por *Calonectria pteridis* (Alfenas et al., 2009).

2.2 *Calonectria pteridis*: Mancha foliar e desfolha em eucalipto

2.2.1 Características do patógeno

Calonectria pteridis é um fungo do filo Ascomycota, pertencente à classe Sordariomycetes, ordem Hypocreales, família Nectriaceae e gênero *Calonectria*.

O gênero *Calonectria* é caracterizado por apresentar, na fase teleomórfica, peritécio brilhante, verrugoso, contendo ascas clavadas, ascósporos uni ou multiseptados, hialinos e fusiformes (Rossman, 1979; Rossman et al., 1999).

A fase anamórfica, chamada de *Cylindrocladium*, é caracterizada por apresentar esporulação branca brilhante, com conidióforos penicilados de onde se origina uma longa estipe com vesícula terminal de formato característico de cada espécie. O conidióforo apresenta conídios cilíndricos uni ou multiseptados (Crous & Wingfield, 1994). O anamorfo *Cylindrocladium* é a fase mais comumente encontrada na natureza como agente causal de várias doenças, sendo crucial para a identificação a nível de espécie do gênero *Calonectria* (Crous, 2002; Peeraly, 1991).

Calonectria pteridis (= *Cylindrocladium pteridis*), causador da mancha-de-pteridis, é caracterizado por apresentar conídios cilíndricos a levemente curvados, com as extremidades arredondadas possuindo predominantemente um septo. O comprimento dos macroconídios varia de 70 a 100 µm e a largura de 5 a 6 µm. Além disso, outra

característica marcante da espécie é a presença de uma vesícula clavada e estreitamente elipsoidal, com o diâmetro variando de 4 a 5 μm (Crous, 2002).

2.2.2 Sintomas e importância da mancha-de-pteridis

Muitas espécies de *Calonectria* são importantes patógenos para espécies florestais, agronômicas e para algumas espécies hortícolas e ornamentais (Crous et al., 1991; Crous & Wingfield, 1993; Lombard et al., 2010). As perdas em virtude de doenças causadas por *Calonectria* spp. são relatadas em diversos países do mundo, como Brasil, Camarões, Costa Rica, Índia, Malásia, Cingapura, África do Sul, Venezuela e Estados Unidos. Em *Eucalyptus* spp., diferentes espécies de *Calonectria* podem causar podridão, mancha foliar e canela-preta em mudas ou induzir manchas foliares e desfolha em campo (Alfenas et al., 1979; Alfenas, 1986).

A mancha-de-pteridis foi diagnosticada pela primeira vez no Brasil em 1991 acarretando intensa desfolha em plantios clonais de *E. grandis* no sudeste da Bahia e no Pará (Ferreira et al., 1995). Desde então, a doença tem sido observada principalmente em procedências de *Eucalyptus camaldulensis*, *E. benthamii*, *E. cloeziana*, *E. grandis*, *E. saligna*, *E. tereticornis*, *E. urophylla* e híbridos de *E. grandis* x *E. urophylla*, entre outros (Alfenas et al., 2009).

A doença é caracterizada por causar sintomas de lesões foliares pequenas, circulares ou alongadas de coloração cinza-claro, que progridem para manchas coalescidas de coloração marrom-claro que podem ocupar grande área do limbo foliar, resultando em intensa desfolha em genótipos suscetíveis de *Eucalyptus* spp. (Ferreira et al., 1995). A penetração do fungo na planta ocorre tipicamente pelos estômatos e requer molhamento foliar (Graça et al., 2009), assim, a severidade da doença é maior em condições de temperaturas elevadas e períodos prolongados de chuva (Alfenas, 1986), o que a torna a principal doença fúngica da cultura do eucalipto no nordeste e norte do Brasil (Alfenas et al., 2009).

Acredita-se que a desfolha causada pelo fungo possa provocar redução do incremento volumétrico de madeira, por reduzir a área fotossintética (Alfenas, 1986) e,

ainda, propiciar o crescimento de plantas invasoras, devido à entrada de luz no sub-bosque (Alfenas et al., 2009).

2.3 Programas de melhoramento para resistência à mancha-de-pteridis

Para a mancha-de-pteridis já foram observadas diferenças na intensidade da doença entre genótipos de eucalipto em regiões favoráveis à infecção e em experimentos de inoculações sob condições controladas, indicando a existência de variabilidade para resistência (Fonseca et al., 2010; Santos et al., 2008; Alfenas 2013). Embora várias espécies de *Calonectria* possam estar associadas à doença, recentemente, com base em análise filogenética usando a região gênica Fator de Elongação 1- α , observou-se que *C. pteridis* é a espécie mais frequentemente encontrada em plantios de eucalipto no Brasil (Alfenas, 2013).

No entanto, estudos da variabilidade patogênica de isolados do patógeno são essenciais para obtenção de sucesso nos programas de melhoramento com foco em resistência e manejo de doenças (Mc Donald & Linde, 2002). Neste caso, primeiramente deve-se identificar a variabilidade existente na população do patógeno antes da seleção de fontes de resistência no hospedeiro (Bruton, 1998).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

O presente trabalho tem como objetivos identificar e avaliar a variabilidade patogênica de isolados de *Calonectria pteridis* isolados em diferentes regiões de plantio de clones de eucalipto no Brasil.

3.2 Objetivos Específicos

Coletar amostras de folhas e solo de plantios de eucalipto dos Estados do Pará, Maranhão e Piauí, com sintomas da mancha-de-pteridis e isolar dos tecidos infectados, o fungo associado à doença;

Identificar os isolados de *C. pteridis*, utilizando características morfológicas e filogenéticas;

Comprovar a existência de diferentes níveis de agressividade entre isolados de *C. pteridis* e selecionar os mais eficientes para inoculações sob condições controladas, visando à seleção de materiais resistentes à desfolha.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Obtenção dos isolados de *Calonectria pteridis*

4.1.1 Coleta das amostras

Amostras de folhas de eucalipto com sintomas característicos da doença foram coletadas em quatro municípios de três Estados do Brasil, sendo estes o Maranhão, o Pará e o Piauí (Figura 1) e armazenadas em sacos de papel, que foram enviados ao Laboratório de Patologia Florestal na Universidade Federal de Viçosa. Em cada local de coleta das amostras de folha, foram coletadas também amostras de solo (400g na camada de 0-20 cm), que foram acondicionadas em sacos plásticos e também enviadas ao Laboratório para isolamento dos patógenos.

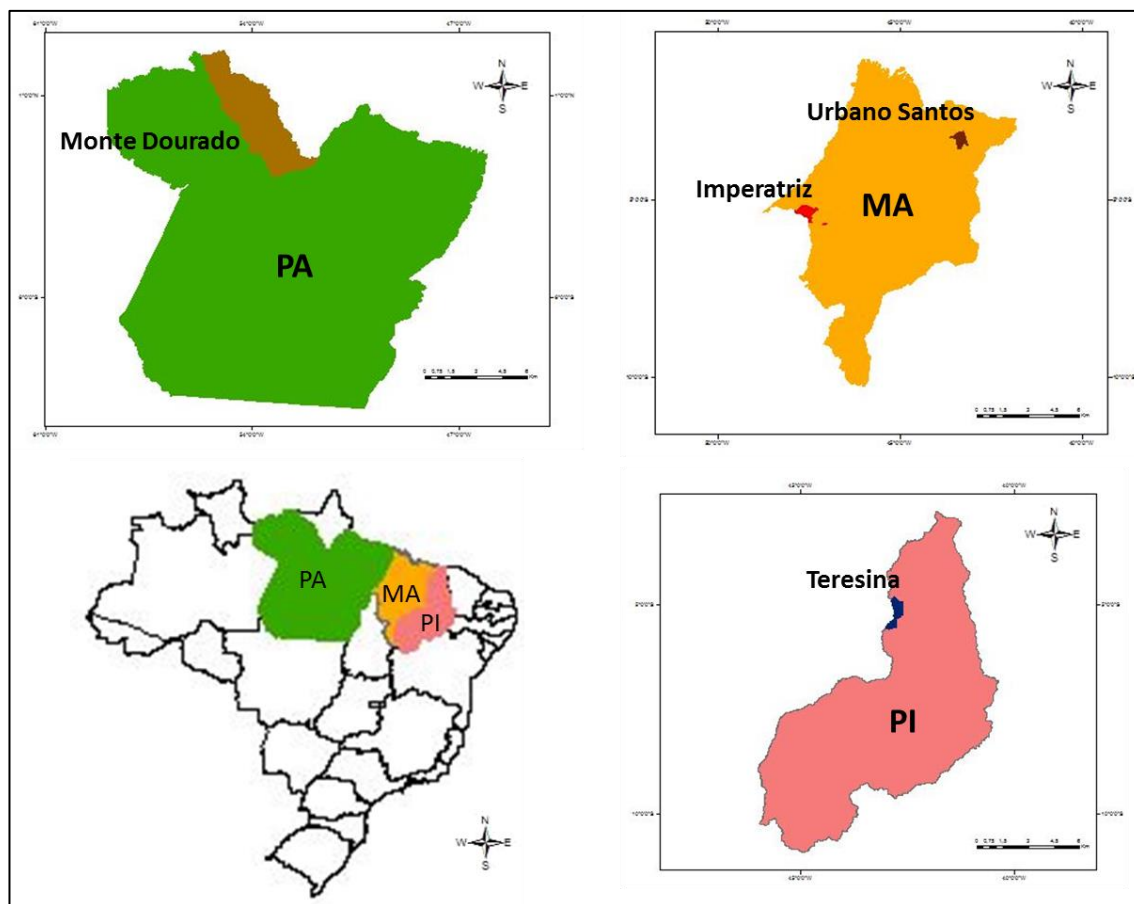


FIGURA 1: Municípios onde foram coletadas amostras de solo e de folhas de eucalipto com sintomas característicos da mancha-de-pteridis.

4.1.2 Isolamento e manutenção

As amostras de folhas foram analisadas em microscópio estereoscópico quanto à presença de conídios hialinos produzidos em conidióforos livres, que são estruturas típicas do patógeno (Figura 2B). Já as amostras de solo foram submetidas ao método de isca, utilizando segmentos de hastes de eucalipto, conforme descrito por Alfenas et al. (2007) (Figura 2C). O isolamento do fungo foi realizado pelo método direto (Alfenas et al., 2007), em Extrato de Malte-Ágar (MEA). Com o intuito de se obter culturas monoconidiais, utilizou-se a metodologia descrita por Crous et al. (2009). As placas foram mantidas a 26°C para o crescimento micelial do fungo (Figura 2D). Posteriormente esses isolados foram repicados e armazenados pelos métodos de

Castellani (Figueiredo, 1967) e óleo mineral à temperatura ambiente, e em glicerol à -80°C.

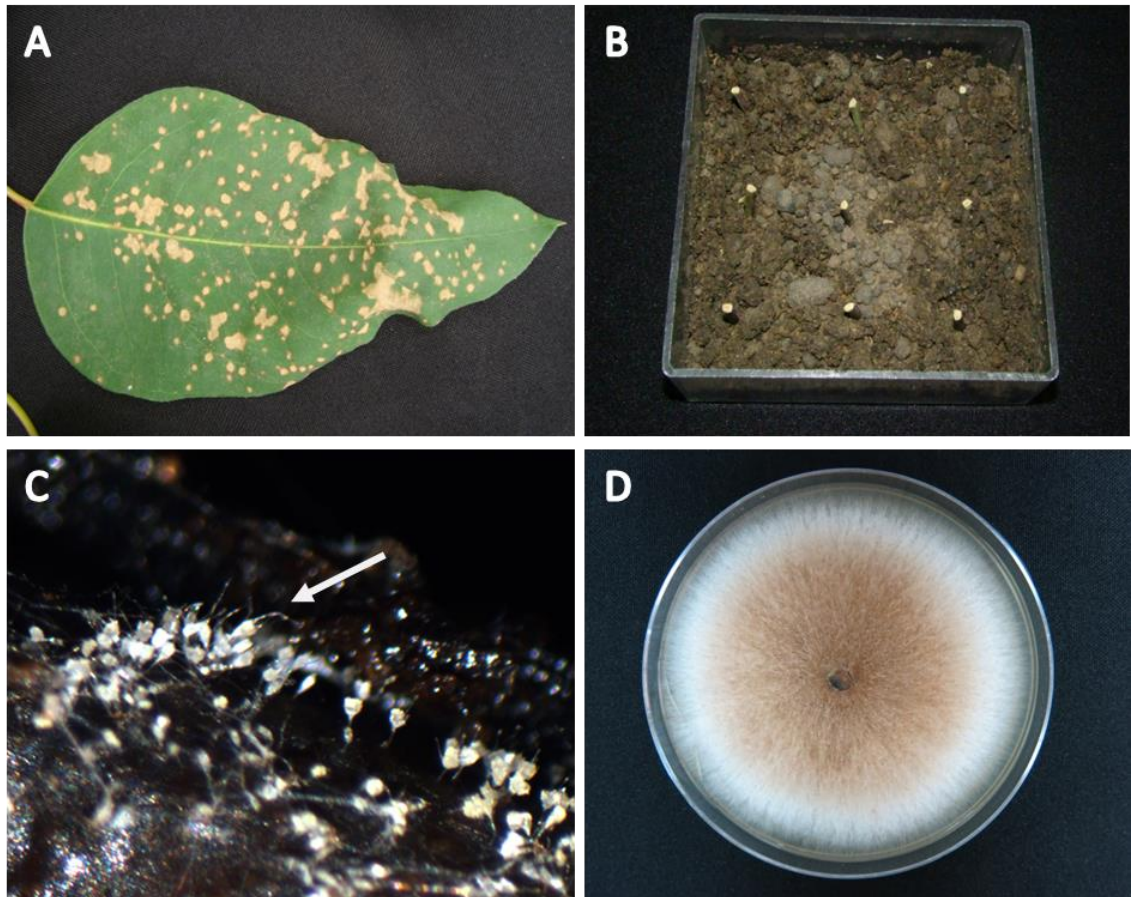


FIGURA 2: Sintomas da mancha-de-pteridis, isolamento e características do patógeno. A) Folha de *Eucalyptus* sp. com sintomas da mancha-de-pteridis; B) Solo submetido ao método de isca para isolamento do patógeno; C) Estruturas típicas do patógeno; e D) Cultura monospórica de *Calonectria pteridis* em Extrato de Malte-Ágar (MEA) com 7 dias de idade.

4.2 Identificação da espécie do patógeno

4.2.1 Identificação morfológica

A identificação morfológica da espécie dos isolados foi feita conforme a chave de identificação proposta por Crous (2002), a partir de medições estruturais feitas em culturas cultivadas em meio sintetic-nutriente-agar (SNA), mantidas a 26°C por sete dias.

4.2.2 Identificação filogenética

4.2.2.1 Extração de DNA

Para a confirmação filogenética, foi feita a extração de DNA utilizando o Kit de Purificação de DNA genômico da Promega (Wizard Genomic DNA Purification Kit).

Para cada amostra, aproximadamente 40 mg de micélio dos isolados monoconidiais crescidos em Extrato de Malte-Ágar (MEA) com 10 dias de idade (Figura 2D) foram transferidos para tubo Eppendorf de 2 mL contendo esferas de aço inoxidável de 5 mm de diâmetro (Qiagen – Sample & Assay Technologies), quando então 600 µL da solução de lise (Nuclei Lysis Solution) foram adicionados e agitados em Tissulyser® (Qiagen) por 2 min a 30 Hz. Em seguida as amostras foram incubadas em freezer a -20°C por 5 min, para facilitar a ruptura das células. Posteriormente, foram adicionados 400 µL da solução para precipitação de proteínas (Precipitation Protein Solution) e os tubos foram invertidos cuidadosamente e centrifugados a 13.200 rpm por 10 min. Após a centrifugação, a fase aquosa (sobrenadante) foi transferida para um novo tubo Eppendorf de 1,5 mL, ao qual foram adicionados 500 µL de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) e agitados cuidadosamente invertendo os tubos manualmente por várias vezes. Foi feita nova centrifugação a 13.200 rpm por 10 min a 4°C. Após a centrifugação, foram transferidos 500 µL da solução para um novo tubo de 1,5 mL, ao qual foram adicionados 600 µL de isopropanol gelado à solução e misturados invertendo os tubos várias vezes. Após a agitação, os tubos foram mantidos por 30 min em água gelada e centrifugados por 10 min a 13.200 rpm e 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado, deixando apenas o pellet de DNA. O pellet foi lavado por duas vezes em 600 µL de etanol a 70% frio. Em cada lavagem, os tubos foram centrifugados 12.000 rpm por 10 min. A secagem dos pellets foi realizada em estufas a 37°C por 30 min. Após a secagem o pellet de DNA foi ressuscitado em 50 µL da solução de reidratação (DNA rehydration) contendo 2 µL de Rnase. Em seguida as amostras foram mantidas em banho-maria a 37°C por 30 min e armazenadas a -20°C (Sambrook et al., 1989; Crous et al., 2009). A concentração de DNA de cada amostra foi quantificada utilizando-se NanoDrop®.

4.2.2.2 Amplificação de DNA

Os primers EF1-728F (5'-CATCGAGAAGTTCGAGAA-3') e EF2 (5'-GGARGTACCAGTSATCATGTT-3') foram utilizados para amplificar parte da região do gene Fator de alongação (TEF-1 α) (Carbone & Kohn, 1999). A amplificação dos genes foi feita por reações PCR, realizadas usando Dream Taq PCR Master Mix Kit para um volume final de 25 μ L. A PCR foi realizada com 12,5 μ L de Dream Taq PCR Master Mix, 1,25 μ L de cada primer, 2 μ L de DNA genômico (30 ng) e 8 μ L de H₂O (Water, nuclease-free). As amplificações foram realizadas em Veriti 96 Well ThermalCycler da Applied Biosystems seguindo a sequência de um ciclo de 5 min a 96 °C, seguido por 35 ciclos de 30 seg a 96 °C, 30 seg a 50 °C e 60 seg a 72 °C e uma etapa final para extensão a 72 °C por 5 min para completar a reação (Crous et al., 2004, 2006). Os produtos resultantes foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% e contrastados em brometo de etídeo. Os produtos amplificados foram purificados com o kit de purificação de PCR ExoSap-IT[®], misturando 5 μ L do produto de PCR com 2 μ L do reagente ExoSap-IT. Em seguida, as amostras foram levadas ao termociclador a 37°C por 30 min e 80°C por 15 min.

4.2.2.3 Sequenciamento e Análise Filogenética

As reações de sequenciamento de DNA foram realizadas com o BigDye[®] Terminator Cycle Sequencing Kit v. 3.1 (Applied Biosystems Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) seguindo o protocolo do fabricante. Usaram-se os mesmos primers usados nas reação PCR para as reações de sequenciamento do DNA. As sequências foram purificadas através de colunas Sephadex[®] G-50 Superfine (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) em placas MultiScreen HV (Millipore, Billerica, MA) e rodadas no sequenciador ABI Prism 3730xl DNA Sequencer (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA).

A qualidade das sequências foi verificada usando Sequence Scanner Software v. 1.0 (Applied Biosystems) e editadas usando o pacote de softwares Seqman da DNASTar Inc. Todas as sequências foram corrigidas manualmente e o arranjo de nucleotídeos em posições ambíguas foi corrigido usando as sequências de primers na direção forward

para reverse. Para completar as sequências geradas no presente estudo, outras sequências foram obtidas a partir do banco de dados de nucleotídeos NCBI GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) e adicionadas às bases de dados das sequências de DNA.

As sequências foram alinhadas utilizando o programa MAFFT Online version v. 7.0 (Kato & Toh, 2010) e quando necessários foram corrigidas manualmente usando o programa MEGA v.5 (Tamura et al., 2011).

A análise de Inferência Bayesiana (BI) foi realizada para o alinhamento do conjunto de dados TEF-1 α com 31 sequências incluindo o grupo externo (outgroup) no MrBayes v. 3.1.1 (Ronquist & Heulsenbeck, 2003) usando o algoritmo da cadeia de Markov Monte Carlo (MCMC) com dois conjuntos de quatro cadeias (uma quente e uma fria). A análise foi realizada com a opção stoprule, sendo a análise finalizada quando o desvio padrão atingisse um valor menor que 0,01. A sequência da amostragem para um conjunto de dados foi de 1.000 sendo que 25% das primeiras árvores foram descartadas.

4.3 Teste de Agressividade

4.3.1 Material Vegetal e Delineamento Experimental

Foram utilizadas folhas destacadas do clone 6021, híbrido de *Eucalyptus urophylla* x *E. grandis*, anteriormente utilizado por Graça (2009) para estudos visando à determinação de condições favoráveis a infecção de *C. pteridis* em eucalipto. As folhas da parte basal das plantas foram coletadas de um banco clonal de aproximadamente três anos, estabelecido em área da Clonar Resistência a Doenças Florestais[®]. Essas folhas, tendo um chumaço de algodão umedecido na base, foram colocadas com a parte abaxial voltada para cima em bandejas forradas com papel toalha umedecido e tela, foram inoculadas, cobertas com filme plástico e mantidas a 25°C (Figura 3A).

O experimento foi realizado em pseudorepetições, com cinco repetições, sendo que cada folha representou uma unidade amostral. Cada isolado obtido de *Calonectria pteridis* foi utilizado como tratamento.

4.3.2 Inoculação

A inoculação se deu por discos (7 mm de diâmetro) de cultura de isolados monospóricos do fungo em meio de batata-dextrose-ágar (BDA) aos 10 dias de incubação a 25°C e fotoperíodo de 12 h. Dois discos de cultura foram depositados na parte abaxial de cada folha destacada (Figura 3A). As folhas foram mantidas em câmara úmida, a fim de manter sua turgescência (Figura 3B) e à temperatura ambiente (25°C ± 3°C). Discos de meio de cultura sem o fungo serviram como testemunha.



FIGURA 3: Inoculação de isolados de *C. pteridis*. A) Folha inoculada com discos de micélio de *C. pteridis*; B) Material vegetal preparado para inoculação.

4.3.3 Avaliação do Período de Incubação

O Período de Incubação (PI) corresponde ao período de tempo gasto pelo patógeno para completar parte do ciclo de infecção correspondente às fases de deposição, germinação, penetração, colonização e expressão dos sintomas (lesão) (Amorim, 1995; Alfenas et al., 2009) (Figura 4).

Para avaliar o PI, verificou-se o número de folhas que apresentaram sintomas da mancha-de-pteridis a cada 6 h a partir da inoculação, por um período de 72 h, sendo que o PI foi considerado o período de tempo até que pelo menos uma das repetições apresentasse o sintoma da doença e o PI₅₀ foi considerado o tempo necessário para que 50% das repetições apresentassem sintomas.

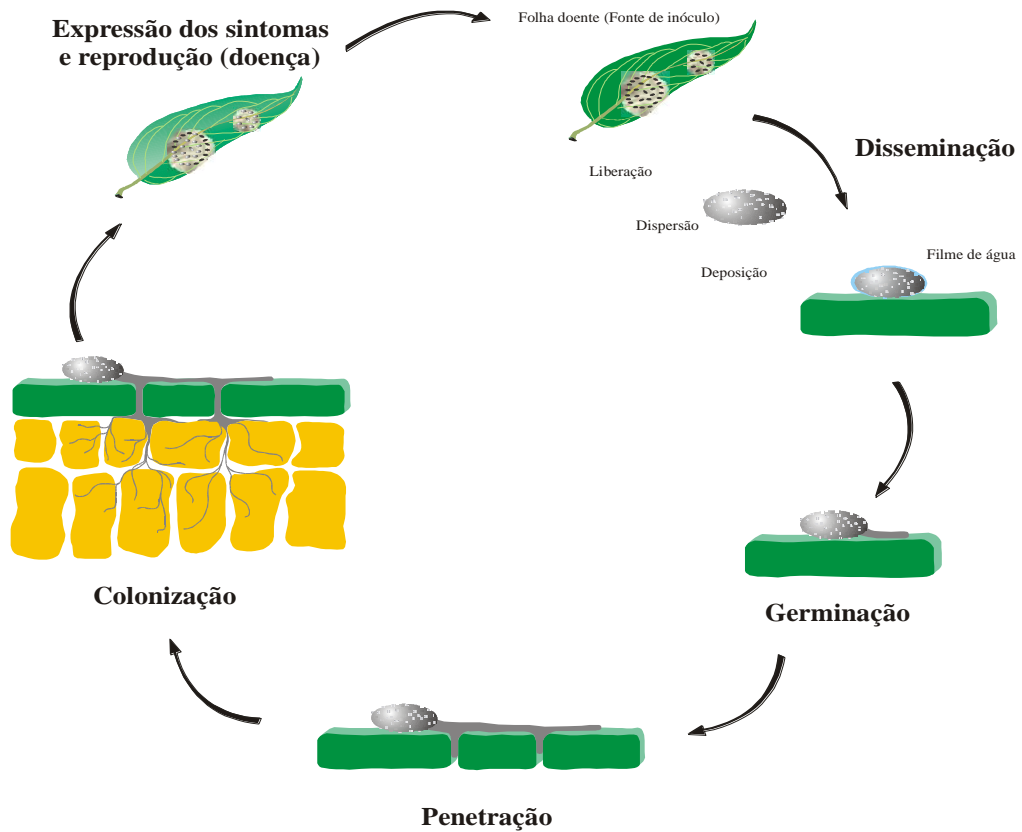


FIGURA 4: Ciclo do estabelecimento de uma doença fúngica em planta hospedeira (Alfenas et al., 2009).

4.3.4 Avaliação da Agressividade

A relação entre hospedeiro suscetível, patógeno e condições de ambiente favorável pode ser estabelecida através da Curva de Progresso da Doença (CPD). Dessa forma, pode-se inferir a severidade da doença durante um intervalo de tempo, sendo esta interpretada por meio do estabelecimento da Área Abaixo da Curva de Progresso da

Doença (AACPD), estimada pela equação descrita por Campbell & Madden (1990) (Figura 5).

O percentual de área foliar lesionada foi determinado nos períodos de 72, 96 e 120 h após a inoculação usando o software QUANT (Vale et al., 2003), pelo método de seleção de cor por paleta. Com os valores de percentagem de área foliar lesionada de cada folha calculou-se a Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD).

Além disso, foi possível avaliar descritivamente o progresso da doença, com base no percentual médio de área foliar lesionada que as repetições apresentavam sintomas em cada período de tempo.

$$\text{AACPD} = \sum_{i=1}^n \left[\frac{Y_i + Y_{i+1}}{2} \right] \times [(t_{i+1} - t_i)]$$

FIGURA 5: Equação descrita por Campbell & Madden (1990) para estimar a Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD), onde Y_i = porcentagem de doença na i -ésima observação; t_i = tempo na i -ésima observação; n = número de observações e Σ = somatório.

4.3.5 Análise Estatística

Submeteram-se os valores de AACPD à análise de variância (ANOVA) e verificaram-se as pressuposições da análise pelo gráfico de resíduos. Para comparação das médias foi utilizado o teste de médias Tukey a 5% de probabilidade, usando o software Statistica 7.0. Dessa forma classificaram-se os isolados quanto a sua agressividade.

5. RESULTADOS

5.1 Obtenção dos isolados e identificação da espécie do patógeno

Foram obtidos 10 isolados de *Calonectria pteridis* das amostras de folha e solo dos 4 municípios em que se fizeram coletas. Estes foram armazenados na micoteca do Laboratório de Patologia Florestal (LPF) (Tabela 1).

Morfologicamente, os isolados apresentaram macroconídios cilíndricos a levemente curvados, uniseptados, com as extremidades arredondadas, de comprimento variando entre 70 e 100 μm e largura de 5 a 6 μm ; vesícula clavada a estreitamente elipsoidal, com o diâmetro variando de 4 a 5 μm (Figura 6).

Todos os isolados agruparam no mesmo clado da espécie tipo de *C. pteridis* CBS111793 com alto valor de probabilidade posterior (0,99). Entretanto observou-se variabilidade genética no grupo de isolados coletados no Brasil bem como entre os isolados dos USA (CBS111793) e Espanha (CBS111871), diferenciando dos complexos formados por outras espécies de *Calonectria* (Figura 7).

TABELA 1: Isolados de *Calonectria pteridis* estudados.

Isolado	Local de coleta	Hospedeiro	Material
LPF054	Monte Dourado, Pará	<i>Eucalyptus</i> sp.	Folha
LPF059	Monte Dourado, Pará	<i>Eucalyptus</i> sp.	Folha
LPF338	Monte Dourado, Pará	<i>Eucalyptus</i> sp.	Folha
LPF340	Monte Dourado, Pará	<i>Eucalyptus</i> sp.	Folha
LPF341	Monte Dourado, Pará	<i>Eucalyptus</i> sp.	Folha
LPF409	Imperatriz, Maranhão	<i>Eucalyptus</i> sp.	Folha
LPF410	Imperatriz, Maranhão	<i>Eucalyptus</i> sp.	Folha
LPF416	Teresina, Piauí	<i>E. pellita</i>	Folha
LPF417	Teresina, Piauí	<i>E. pellita</i>	Folha
LPF444	Urbano Santos, Maranhão	<i>Eucalyptus</i> sp.	Solo

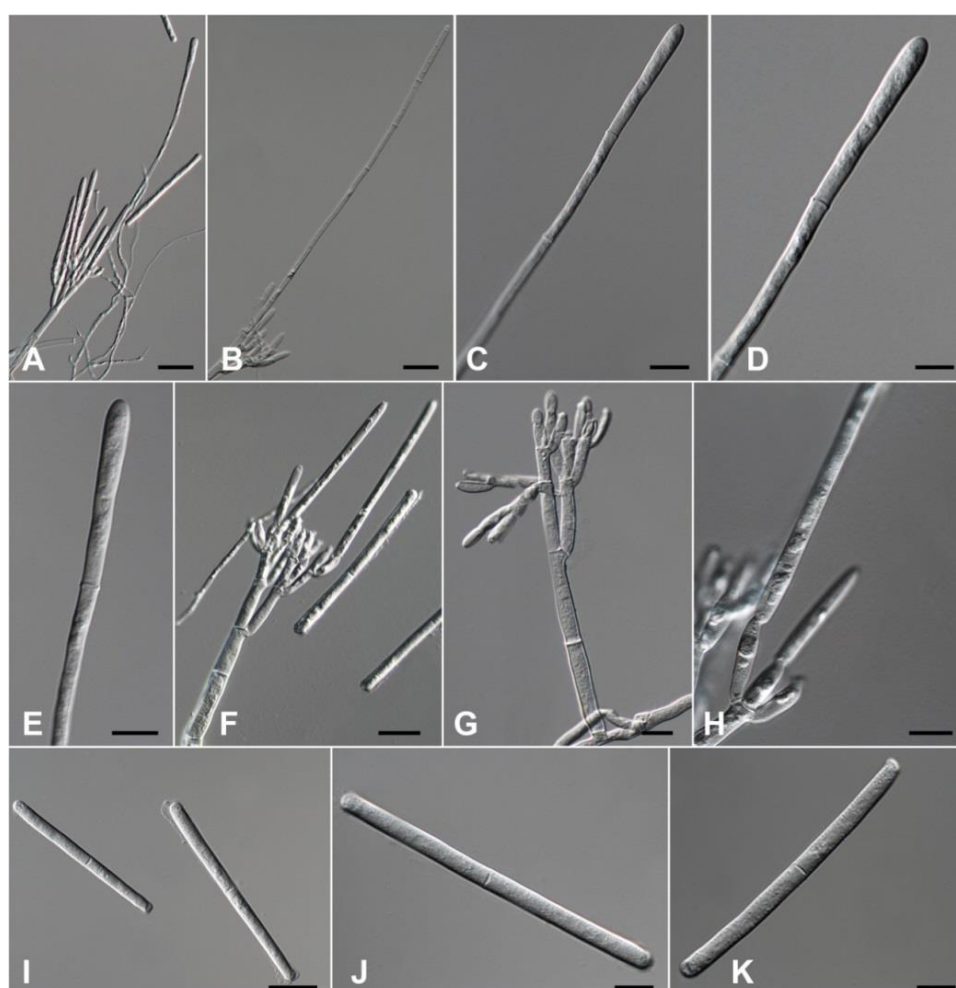


FIGURA 6: Estruturas reprodutivas de *Calonectria pteridis*. A – B) Macroconidióforo apresentando vesícula clavada; C – E) Vesícula clavada; F – G) Macroconidióforos; H) Fiálides e I – K) Macroconídios uniseptados. Barras: A, B = 30 μ m; C, D, E, G, H, J, K = 10 μ m; e F, I = 20 μ m (Alfenas et al., 2013).

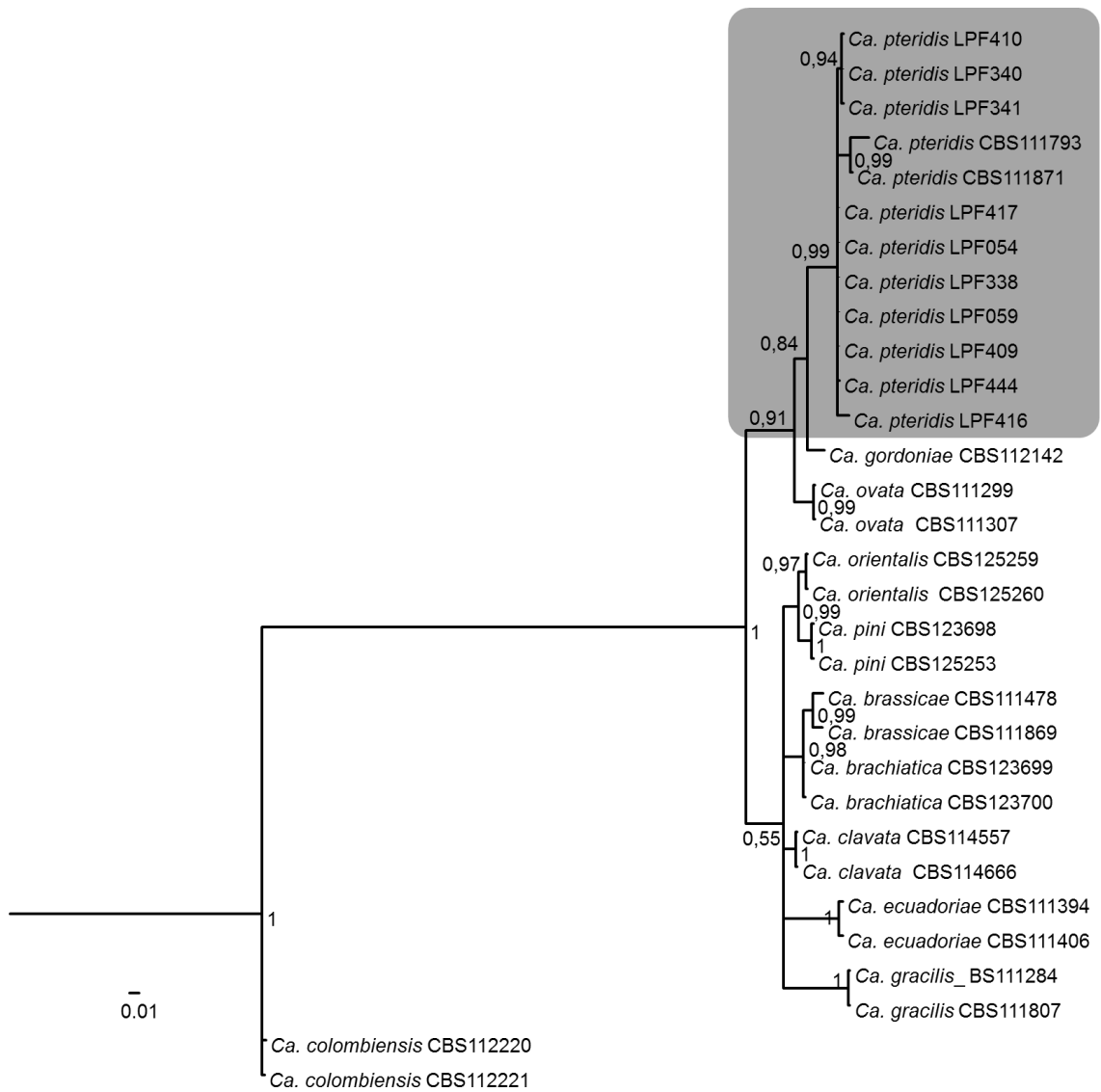


FIGURA 7: Árvore filogenética obtida através da Inferência Bayesiana usando sequências do gene Fator de Elongação 1 α . Valores de probabilidade posterior (IB) são indicados nos nós.

5.2 Agressividade dos isolados

5.2.1 Período de Incubação (PI)

O PI variou de acordo com o isolado, sendo o menor e o maior PI apresentado, respectivamente pelos isolados LPF 341 e LPF 409. Por outro lado, à exceção de LPF 409, que apresentou o maior PI_{50} , todos os demais isolados tiveram um mesmo PI_{50} de 42 h.

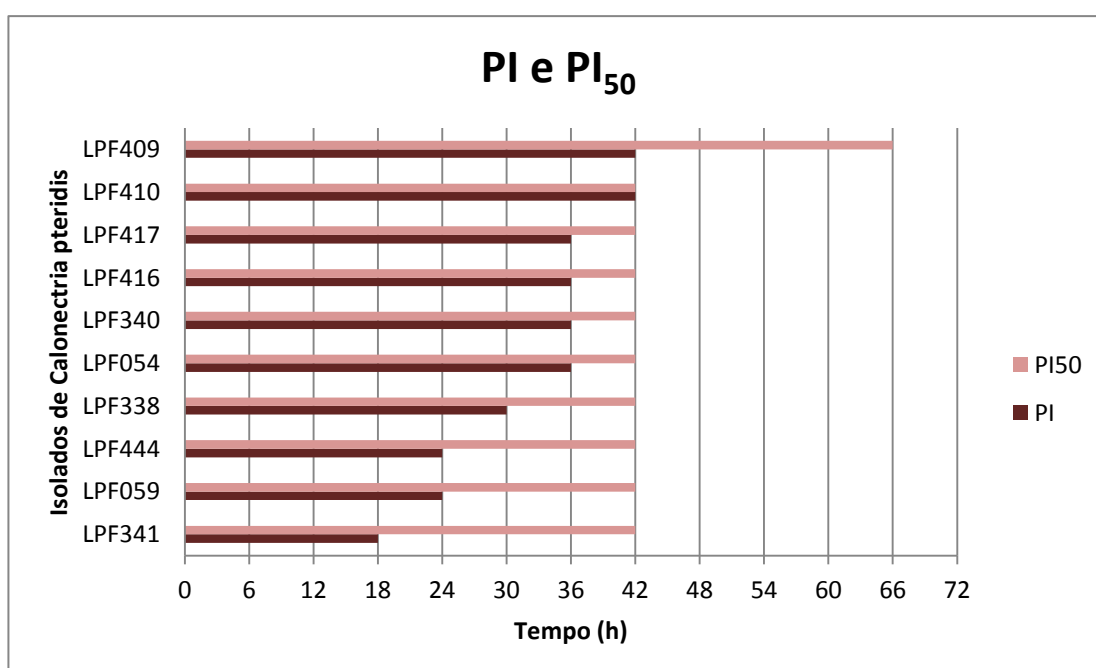


FIGURA 8: Período de Incubação (PI) de cada isolado avaliado.

5.2.2 Progresso da mancha-de-pteridis

A maioria das lesões cresceu radialmente a partir do disco inoculado e observou-se que, para todos os isolados, as áreas das lesões aumentaram com o tempo. As menores e maiores áreas de lesões foram observadas, respectivamente, para os isolados LPF409 e LPF341, sendo estes os isolados mais e menos agressivos, respectivamente (Figura 9).

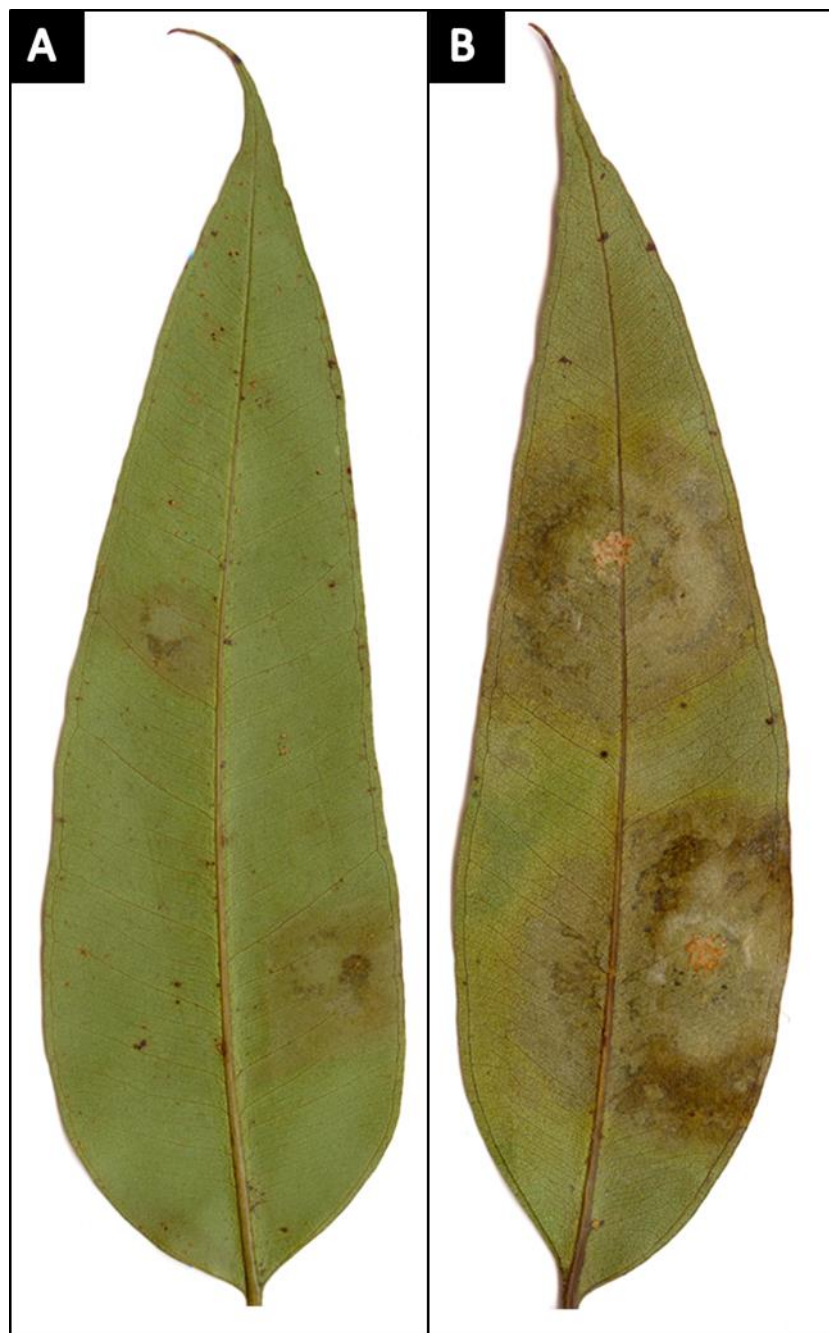


FIGURA 9: Diferença da agressividade de isolados de *Calonectria pteridis* em híbridos de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*. A) Folha com lesões provocadas pelo isolado LPF409 e B) Folha com lesões provocadas pelo isolado LPF341.

Os isolados de *Calonectria pteridis* apresentaram diferentes níveis de agressividade. Os tratamentos diferiram significativamente entre si pelo teste Tukey com $p \leq 0,05$, no entanto os isolados LPF054, LPF340, LPF059 e LPF341 não diferiram

estatisticamente e proporcionaram maior Área Abaixo da Curva de Progresso da mancha-de-pteridis (AACPD), ou seja, proporcionaram maior severidade da doença e, portanto, foram os isolados mais agressivos (Tabela 2).

TABELA 2: Teste de Tukey ($p \leq 0,05$) para as médias de AACPD de cada isolado.

TRAT	AACPD						
LPF409	244,999	a	-	-	-	-	-
LPF444	349,789	a	b	-	-	-	-
LPF417	607,956	a	b	c	-	-	-
LPF338	612,127	a	b	c	-	-	-
LPF410	856,473	-	b	c	d	-	-
LPF416	1017,284	-	-	c	d	-	-
LPF054	1079,857	-	-	c	d	e	-
LPF340	1281,416	-	-	-	d	e	-
LPF059	1382,045	-	-	-	d	e	-
LPF341	1620,305	-	-	-	-	e	-

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

*médias seguidas por letras diferentes na horizontal diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

6. DISCUSSÃO

No presente trabalho a identificação a nível de espécie foi realizada por meio de características morfológicas e análises filogenéticas usando parte da região gênica TEF-1 α . Dessa forma, conseguiu-se uma identificação mais consistente da espécie dos isolados, o que minimiza problemas em experimentos de seleção de resistência à mancha-de-pteridis. Embora a mancha-de-pteridis possa ser causada por várias espécies de *Calonectria* (Chen et al., 2011; Alfenas & Ferreira, 1979), *C. pteridis* é a espécie mais comum em plantios de eucalipto no Brasil (Alfenas, 2013). A identificação do patógeno a nível de espécie é extremamente importante para embasar a seleção de genótipos resistentes em condições controladas, porém, a identificação baseada apenas em características morfológicas do anamorfo do patógeno pode levar a erros de identificação taxonômica, sendo necessária também a identificação por meio de análises filogenéticas.

Com base nos diferentes valores de severidade observados, constatou-se que existe variabilidade na agressividade dos isolados de *Calonectria pteridis* obtidos de clones de *Eucalyptus* sp. no Brasil. Segundo McDonald & Linde (2002) a variabilidade patogênica encontrada nos isolados de um patógeno representa grande problema para traçar medidas eficazes no manejo da doença. No caso da mancha-de-pteridis, a maior agressividade implica em maior índice de redução da área fotossintética e, portanto, maior diminuição significativa do incremento volumétrico em madeira das plantas

infectadas. Assim, é necessário fazer uma revisão das estratégias de um programa de melhoramento com foco em resistência à mancha-de-pteridis, já que a resistência genética é a principal estratégia de controle desta doença (Alfenas et al., 2009).

Os isolados mais agressivos selecionados neste trabalho devem ser utilizados para seleção de plantas resistentes para plantios em regiões favoráveis à doença. Uma vez que a seleção de genótipos resistentes ao patógeno fica comprometida quando se emprega um isolado pouco agressivo, o conhecimento da variabilidade patogênica dos isolados é fundamental para a seleção de plantas resistentes a partir de inoculações sob condições controladas. Entretanto, estudos sobre a amplitude do espectro de virulência também devem ser feitos, para se constatar os isolados que causam maior severidade em um maior número possível de clones e espécies de Eucalipto.

Como já foi constatado para *Ceratocystis fimbriata* (Baker et al., 2003; Harrington, 2000; Ferreira et al., 2010), a diferença na agressividade dos isolados pode ser atribuída à variabilidade genética do patógeno. Assim sendo, para *C. pteridis* também se pode dizer que há possibilidade da variação do nível de agressividade estar relacionada à sua variabilidade genética. Para isso, estudos sobre a diversidade genética e genotípica devem ser feitos para constatação dessa relação.

Ferreira et al. (2010) discutiu que a maioria da variação genética vista em *C. fimbriata* é atribuível à variação de regiões dos isolados, através da técnica de aplicação de marcadores moleculares baseados na amplificação de microssatélites. Essa técnica também pode ser empregada para estudo genético da população de *C. pteridis* de diferentes regiões do Brasil, possibilitando determinar o grau de relação entre os isolados (Blouin et al., 1996) e a relação do número de genótipos que ocorrem em cada região, assim como Wright et al. (2010) verificou a estrutura populacional de *Calonectria iliciola* (= *Cylindrocladium parasiticum*) em amendoim, na Geórgia, EUA.

Em relação ao efeito do local de coleta na agressividade, os quatro isolados selecionados como mais agressivos são todos do estado do Pará e os dois isolados que apresentaram menor AACPD foram isolados de amostras de folha do Maranhão. Assim como Overmeyer et al. (1996) verificou a variabilidade genética para isolados de *Calonectria morganii* de diferentes hospedeiros e regiões e Victor et al. (1997) para

isolados de *C. kyotensis* (= *Cylindroladium floridanum*) e outras espécies morfológicamente similares do gênero, usando o método de Amplificação ao Acaso de DNA Polimórfico (RAPD - Bases Random Amplification of Polymorphism), a variabilidade dos isolados do presente estudo tem possibilidade de ser verificada através da mesma técnica, uma vez que os marcadores moleculares utilizados se mostraram eficientes para o gênero.

7. CONCLUSÕES

Os 10 isolados obtidos de amostras de folha e solo de plantios de *Eucalyptus* sp. pertencem a *Calonectria pteridis*.

Existe variabilidade na agressividade entre os isolados de *C. pteridis*.

O menor PI (18h) foi observado para o isolado LPF341 em folhas destacadas do clone 6021, híbrido de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*.

Os isolados LPF054, LPF059, LPF340 e LPF341 foram os mais agressivos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAF, Associação Brasileira de Produtores de Florestas Plantadas. **Anuário Estatístico da ABRAF, 2013, ano base 2012**. Brasília, 2013. 148p.

ALFENAS, A.C. Fungos do gênero *Cylindrocladium* como patógenos florestais no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 11, p. 275-277, 1986.

ALFENAS, A.C.; FERREIRA, F. A. Mancha de folha do eucalipto no Brasil causada por três espécies de *Cylindrocladium* - Uma revisão da descrição da doença. **Revista Árvore**, v. 3 (1), p. 47-56, 1979.

ALFENAS, A.C.; FERREIRA, F.A.; MAFIA, R.G.; GONÇALVES, R.C. **Métodos em fitopatologia**. Editora UFV. Viçosa, 2007. 382 p.

ALFENAS, A.C.; MATSUOKA, A.K.; FERREIRA, F.A.; HODGES, C.S. Identificação, características culturais e patogenicidade de três espécies de *Cylindrocladium*, isolados de manchas de folha de *Eucalyptus* spp. **Fitopatologia Brasileira**, v. 4, p. 445-459, 1979.

ALFENAS, A.C.; ZAUZA, E.A.; MAFIA, R.G.; ASSIS, T.F. **Clonagem e doenças do eucalipto**. 2 ed. Editora UFV. 2009. 442p.

ALFENAS, R.F. **Taxonomia e Biologia de *Calonectria* no Brasil**. 2013. 142p. Dissertação (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

AMORIM, L. Disseminação. In: BERGAMIM-FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Eds.). **Manual de Fitopatologia** 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. p. 268-293.

BAKER, C.J.; HARRINGTON, T.C.; KRAUS, U.; ALFENAS, A.C. Genetic variability and host specialization in the Latin American clade of *Ceratocystis fimbriata*. **Phytopathology**, v. 93, p. 1274-1284, 2003.

BLOUIN, M.S., PARSONS, M., LACAÏLLE, V.; LOTZ, S. Use of microsatellite loci to classify individuals by relatedness. **Mol. Ecol.**, v. 5, p. 393-401, 1996.

BRUTON, B.D. Soilborne diseases in cucurbitaceae: pathogen virulence and host resistance. **International Society of Horticultural Science**, p. 143-166, 1998.

CAMPBELL, CL; MADDEN, LV. **Introduction to plant disease epidemiology**. New York: John Wiley & Sons, 1990. 532 p.

CARBONE, I.; KOHN, L.M. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. **Mycologia**, v. 91, p. 553-5, 1999.

CHEN, S.F.; LOMBARD, L.; ROUX, J.; XIE, Y.J.; WINGFIELD, M.J.; ZHOU, X.D. Novel species of *Calonectria* associated with Eucalyptus leaf blight in Southeast China. **Persoonia**, v. 26, p. 1-12, 2011.

CROUS, P.W. **Taxonomy and pathology of *Cylindrocladium* (*Calonectria*) and allied genera**. APS Press, St. Paul, Minnesota, U.S.A., 2002. 278 p.

CROUS, P.W.; GROENEWALD, J.Z.; RISÈDE, J-M.; SIMONEAU, P.; HYDE, K. D. *Calonectria* species and their *Cylindrocladium* anamorphs: species with clavate vesicles. **Studies in Mycology**, v. 55, p. 213-226, 2006.

CROUS, P.W.; PHILLIPS, A.J.L.; WINGFIELD, M.J. The genera *Cylindrocladium* and *Cylindrocladiella* in South Africa, with special reference to forestry nurseries. **South African Forestry Journal**, 1991. 157:69-85.

CROUS, P.W.; VERKLEY, G. J. M.; GROENEWALD, J. Z.; SAMSON, R. A. **CBS Laboratory Manual Laboratories 1: Fungal Biodiversity**. Centraal bureau voor Schimmelcultures, Ultrch, The Netherlands, 2009. 269p.

CROUS, P.W.; WINGFIELD, M.J. A monograph of *Cylindrocladium*, including anamorphs of *Calonectria*. **Mycotaxon**, v. 51, p. 341-435, 1994.

CROUS, P.W.; WINGFIELD, M.J. *Calonectria gracilis*. IMI descriptions of Fungi and Bacteria. **Mycopathology**, v. 122 p. 47-48, 1993.

DOMICIANO, G.P.; RESENDE, R.S.; RODRIGUES, F.A.; DAMATTA, F.M. Alteração na fotossíntese de plantas infectadas por patógenos. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 17, p. 305-339, 2009.

FERREIRA E.M.; HARRINGTON T.C.; THORPE D.J.; ALFENAS A. C. Genetic diversity and interfertility among highly differentiated populations of *Ceratocystis fimbriata* in Brazil. **Plant Pathology**, v. 59, p. 721-735, 2010.

FERREIRA, E.M.; ALFENAS, A.C.; MAFFIA, L.A.; MAFIA, R.G. Eficiência de fungicidas sistêmicos para o controle de *Cylindrocladium candelabrum* em eucalipto. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31(5), p. 468-475, 2006.

FERREIRA, F.A.; ALFENAS, A.C.; MOREIRA, A.M.; DEMUNER, N.L. Mancha-de-pteridis doença foliar de eucalipto em áreas tropicais brasileiras. **Fitopatologia brasileira**, v. 20, p. 107-110, 1995.

FIGUEIREDO, M. B. **Estudos sobre a aplicação do método de Castellani para conservação de fungos patógenos em plantas**. O Biológico, São Paulo, v. 33, n. 1, p. 9-13, 1967.

FONSECA, S.M.; RESENDE, M.D.V.; ALFENAS, A.C.; GUIMARÃES, L.M.S.; ASSIS, T.F.; GRATTAPLAGLIA, D. **Manual Prático de Melhoramento Genético do Eucalipto**. Editora UFV. Viçosa, 2010. 200p.

GRAÇA, R.N.; ALFENAS, A.C.; MAFFIA, L.A.; TITON, M.; ALFENAS, R.F.; LAU, D.; ROCABADO, J.M.A. Factors influencing infection of eucalypts by *Cylindrocladium pteridis*. **Plant Pathology**, v.58 (5), p. 971-981, 2009.

HARRINGTON, T.C. Host specialization and speciation in the American wilt pathogen *Ceratocystis fimbriata*. **Tropical Plant Pathology**, v. 25, p. 262-263, 2000.

KATOH, K; TOH, H. Parallelization of the MAFFT multiple sequence alignment program. **Bioinformatics**, v. 26, p. 1899-1900, 2010.

LOMBARD, L.; CROUS, P.W.; WINGFIELD, B.D.; WINGFIELD, M.J. Phylogeny and systematic of the genus *Calonectria*. **Studies in Mycology**, v. 66, p. 31-69, 2010.

MC DONALD, B.A., LINDE, C. Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. **Annual Review of Phytopathology**, v. 40, p. 349-379, 2002.

MORA, A.L.; GARCIA, C.H. **A cultura do eucalipto no Brasil**. São Paulo: SBS, 2000. 112 p.

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

OVERMEYER, C.; LÜNNEMANN, S.; WALLBRUNN, C.; MEINHARDT, F. Genetic Variability Among Isolates and Sexual Offspring of the Plant Pathogenic Fungus *Calonectria morganii* on the Basis of Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD) and Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP). **Current Microbiology**, v. 33, p. 249-255, 1996.

PEERALLY, A. The classification and phytopathology of *Cylindrocladium* species. **Mycotaxon**, v. 40, p. 367-366, 1991.

PHIPPS, P.M. Control of *Cylindrocladium* black rot of peanut with soil fumigants having methyl isothiocyanate as the active ingredient. **Plant disease**, v. 74, p. 438-441, 1990.

RONQUIST, F.; HUELSENBECK, JP. MrBayes: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics**, v. 19, p. 1572-1574, 2003.

ROSSMAN, A.Y. *Calonectria* and its type species, *C. daldiniana*, a later synonym of *C. pyrochroa*. **Mycotaxon**, v. 8, p. 321-328, 1979.

ROSSMAN, AY; SAMUELS, GJ; ROGERSON, CT; LOWEN, R. Genera of Bionectriaceae, Hypocreaceae and Nectriaceae (Hypocreales, Ascomycetes). **Studies in Mycology**, v. 91, p. 286-298, 1999.

SAMBROOK, J.; FRITSCHI, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989.

SANTOS, M.R.; GUIMARÃES, L.M.S.; MAFIA, R.G.; ALFENAS, A.C. Avaliação da resistência à ferrugem (*Puccinia psidii*), mancha-bacteriana (*Xanthomonas axonopodis*), murcha-de-ceratocystis (*Ceratocystis fimbriata*) e mancha-de-pteridis (*Cylindrocladium pteridis*) em clones comerciais de *Eucalyptus* spp. **Tropical Plant Pathology**, v. 33, p. S269, 2008.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using Maximum Parsimony Methods. **Molecular Biology and Evolution**, v.28, p. 2731-2739, 2011.

VALE, FXR; FERNADES FILHO, EI; LIBERATO, JR. **Quant. A software plant disease severity assessment**. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF PLANT PATHOLOGY, 8., New Zealand, 2003. Christchurch, v. 8, p. 105, 2003. (Abstract).

VICTOR, D.; CROUS, P.W.; JANNE, B.J.H.; WINGFIELD, M.J. Genetic Variation in *Cylindrocladium floridanum* and other Morphologically Similar *Cylindrocladium* Species. **System. Appl. Microbiol**, v. 20, p. 268-285, 1997.

WRIGHT, L.P.; DAVIS A.J.; WINGFIELD, B.D.; CROUS, P.W.; BRENNEMAN, T.; WINGFIELD, M.J. Population structure of *Cylindrocladium parasiticum* infecting peanuts (*Arachis hypogaea*) in Georgia, USA. **Eur J Plant Pathol**, 2010. DOI 10.1007/s10658-010-9584-2.