

MARCELA GALO TEODORO

ESPÉCIES DE *Mycosphaerella* E *Teratosphaeria* ASSOCIADAS À
MANCHA FOLIAR E DESFOLHA DE *Eucalyptus globulus* NO SUL
DO BRASIL

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2010

MARCELA GALO TEODORO

ESPÉCIES DE *Mycosphaerella* E *Teratosphaeria* ASSOCIADAS À
MANCHA FOLIAR E DESFOLHA DE *Eucalyptus globulus* NO SUL
DO BRASIL

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

APROVADA: 30 de Agosto de 2010.

Prof. Eduardo S. G. Mizubuti
(Co-Orientador)

Prof. Olinto Liparini Pereira
(Co-Orientador)

Pesq. Maria Alves Ferreira

Pesq. Lúcio M. da S. Guimarães

Prof. Acelino Couto Alfenas
(Orientador)

Tudo parece ousado para quem nada se atreve.

Fernando Pessoa

Ousar e fazer

Ao meu pai Pedro Lino Teodoro Neto
À minha mãe Maura Pinto Galo Teodoro
Ao meu querido irmão Pedro Henrique Galo Teodoro

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia pela oportunidade.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, pela concessão da bolsa de estudo durante o curso, a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais - Fapemig e à Fíbria pelo apoio e financiamento do projeto.

À Klabin pelo envio de amostras empregadas neste estudo.

Ao Dr. Reginaldo Mafia pela aprovação do projeto junto a Fíbria e envio de amostras para o estudo.

Ao Prof. Acelino Couto Alfenas, pelos ensinamentos, pela orientação e pelo apoio durante a realização deste trabalho.

Ao Prof. Eduardo S. G. Mizubuti por muito ter me ensinado, pela orientação e pelas sugestões.

Ao Prof. Olinto L. Pereira pela orientação e pelas sugestões.

Ao Dr. Lúcio Mauro da Silva Guimarães e à Dra. Maria Alves Ferreira pela amizade e pelo auxílio além das inúmeras revisões e críticas a este trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Biologia de Populações – Departamento de Fitopatologia/UFV, Saulo Alves Santos Oliveira e Robson do Nascimento pela ajuda e pela paciência durante a realização das análises filogenéticas.

À Márcia Brandão pela amizade e pelo carinho.

Aos amigos do Laboratório de Patologia Florestal – BIOAGRO/UFV pela ótima convivência e por terem me apoiado e muito me ensinado neste período.

Aos meus queridos amigos do Programa de Pós-graduação em Fitopatologia, Poly, Gui, Deisoca, Érica, Éder e aos colegas de curso.

Às amigas, Dani, Renatinha, Michele, Rhay e Aninha pela força durante todo o curso.

Ao meu namorado Rafael Garay por ser uma pessoa tão especial em minha vida.

E em especial aos meus pais, Pedro e Maura e ao meu irmão Pedro Henrique pelo amor incondicional.

SUMÁRIO

RESUMO	vi
ABSTRACT.....	vii
INTRODUÇÃO.....	1
MATERIAL E MÉTODOS	4
1. Obtenção de isolados monoascospóricos	4
2. Caracterização das lesões.....	4
3. Identificação das culturas	4
3.1. Padrão de germinação dos ascósporos	5
3.2. Análises de DNA	5
3.2.1. Extração e quantificação de DNA.....	5
3.2.2. Amplificação dos fragmentos ITS (espaçador interno transcrito 1, região 5.8S e espaçador interno transcrito 2 do rDNA) e LSU (grande subunidade 28S do rDNA) por PCR.....	6
3.2.3. Sequenciamento do DNA e análises	6
3.2.4. Amplificação de fragmentos utilizando primers específicos para <i>T. nubilosa</i> ..	7
3.2.5. Análises filogenéticas	7
4. Crescimento micelial e esporulação em diferentes meios de cultura	10
RESULTADOS	12
1. Isolamento e obtenção das culturas monoascospóricas	12
2. Caracterização das lesões	13
3. Padrão de germinação dos ascósporos	13
4. Análises filogenéticas.....	15
5. Crescimento micelial e esporulação em diferentes meios de cultura	18
DISCUSSÃO.....	20
CONCLUSÕES.....	24
REFERÊNCIAS	25

RESUMO

TEODORO, Marcela Galo, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Agosto de 2010. **Espécies de *Mycosphaerella* e *Teratosphaeria* associadas à mancha foliar e desfolha de *Eucalyptus globulus* no Sul do Brasil.** Orientador: Acelino Couto Alfenas. Coorientadores: Olinto Liparini Pereira e Eduardo Seiti Gomide Mizubuti.

A mancha foliar e desfolha de teratosphaeria é uma das doenças foliares mais severas de *Eucalyptus globulus*. Tendo em vista a importância dessa espécie para a produção de celulose e papel e a recente constatação da doença no Brasil, procurou-se no presente estudo identificar as espécies do patógeno associadas à doença em Santa Catarina e no Rio Grande do Sul e avaliar a influência de meios de cultura sobre o crescimento micelial e a esporulação das espécies identificadas. As seguintes espécies foram identificadas: *Mycosphaerella scytalidii*, *M. lateralis*, *Teratosphaeria ohnowa*, *T. perpendicularis*, *T. pseudaficana*, *T. flexuosa* e *T. nubilosa*. Baseado no padrão de germinação dos ascósporos encontraram-se mais de uma espécie do fungo em uma mesma lesão ou em uma mesma folha. Na segunda fase do estudo, avaliaram-se o crescimento micelial e a esporulação das culturas identificadas. *Mycosphaerella scytalidii*, *T. ohnowa* e *T. flexuosa* apresentaram maior área abaixo da curva de crescimento micelial nos meios água de coco-ágar (ACA), extrato de malte-ágar (MEA), batata-dextrose-ágar (BDA), micophil-ágar (MIC) e aveia-sacarose-ágar (AVSA). *Teratosphaeria nubilosa* apresentou maior área abaixo da curva de crescimento micelial nos meios BDA, AVSA e MEA. Nenhum dos meios testados propiciou a esporulação das espécies testadas.

ABSTRACT

TEODORO, Marcela Galo, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, August, 2010. **Species of *Mycosphaerella* and *Teratosphaeria* associated with leaf spot and e defoliation of *Eucalyptus globulus* in southern Brazil.** Advisor: Acelino Couto Alfenas. Co-advisors: Olinto Liparini Pereira and Eduardo Seiti Gomide Mizubuti.

The leaf blight and defoliation of *teratosphaeria* is one of the most important leaf diseases of *Eucalyptus globulus*. Due to the importance of this specie for production of pulp and paper and the recent report of the leaf disease in Brazil, this study was carried out aiming the identification of the pathogen in Santa Catarina and Rio Grande do Sul and to test the mycelial growth and sporulation of the fungus under different culture media. The following species were identified: *Mycosphaerella scytalidii*, *M. lateralis*, *Teratosphaeria ohnowa*, *T. perpendicularis*, *T. pseudafriicana*, *T. flexuosa* and *T. nubilosa*. Based on ascospore germination patterns, more than one species of the fungus was found concurrently in a single lesion or in a single leaf. Slow growth and lack of sporulation of the fungus species are limiting factors for the production of inoculum to be used in inoculation under controlled conditions. Thus in the second phase of this study, we tested the mycelial growth and sporulation of the identified cultures in several culture media. *Mycosphaerella scytalidii*, *Teratosphaeria ohnowa* and *Teratosphaeria flexuosa* presented a higher growth rate in coconut water-agar (CWA), malt extract-agar (MEA), potato-dextrose-agar (PDA), mycophil-ágar (MA), and oatmeal-sacarose-agar (OSA); *Teratosphaeria nubilosa* presented higher growth rate in PDA, OSA, and MEA. No sporulation was obtained for all species tested.

INTRODUÇÃO

Eucalyptus globulus é uma das espécies mais importantes para a produção de celulose e papel, sua madeira possui alto teor de celulose, baixo teor de lignina, densidade elevada e conseqüentemente baixo consumo específico e menor consumo de cloro no branqueamento da polpa celulósica (Fonseca et al., 2010). A espécie exige clima frio e inverno chuvoso, mas não tolera geadas (Eldridge et al., 1993) por isso não se adapta a climas tropicais e subtropicais como no Brasil. No entanto, os híbridos de *E. globulus* com outras espécies ou com híbridos interespecíficos cultivados no Brasil, como *E. grandis*, *E. urophylla*, *E. camaldulensis*, *E. grandis* x *E. urophylla* dentre outras, apresentam maior potencial para a produção de celulose e adaptabilidade às condições brasileiras (Alfenas et al., 2009).

Atualmente, no Brasil, tem-se introduzido *E. globulus* nos programas de melhoramento genético, seja como espécie pura ou como genitor em cruzamentos com *E. grandis*, *E. urophylla* dentre outras. Essa estratégia tem sido denominada de “globulização” da eucaliptocultura nacional e visa à obtenção de ganhos em rendimento de celulose (Alfenas et al., 2009). Entretanto, a alta suscetibilidade de *E. globulus* à desfolha incitada por *Teratosphaeria* spp. e *Mycosphaerella* spp. pode ser limitante ao sucesso destes programas. A doença foi recentemente relatada em *E. globulus* no Rio Grande do Sul e atribuída a *Teratosphaeria nubilosa* (Perez et al., 2009b), embora outras espécies tenham sido encontradas em *Eucalyptus* spp. no Brasil (Alfenas et al., 2009).

Em um recente e detalhado estudo taxonômico, Crous et al. (2007a) transferiram várias espécies de *Mycosphaerella* para o gênero *Teratosphaeria* Syd. & P. Syd., pertencente à família Teratosphaeriaceae Crous & Braun. Mais de 80 espécies de *Mycosphaerella* e *Teratosphaeria* já foram descritas em *Eucalyptus* spp., incluindo espécies patogênicas e saprofíticas. Dentre as espécies descritas, *T. cryptica* e *T. nubilosa* são as mais importantes em virtude da severidade da doença e intensa desfolha em *E. globulus* em todo o mundo (Carnegie et al., 2007; Hunter et al., 2008). *Teratosphaeria nubilosa* pode causar 95% de desfolha das árvores (Carnegie, 2007).

Várias espécies de *Mycosphaerella* e *Teratosphaeria* podem infectar folhas de *Eucalyptus* e frequentemente mais de uma espécie pode ser encontrada em uma única folha e até mesmo em uma mesma lesão (Crous & Wingfield, 1996). As espécies *Mycosphaerella lateralis*, *M. grandis* e *M. parva* têm sido comumente encontradas em associação com outras espécies de *Mycosphaerella* e *Teratosphaeria* que causam manchas foliares (Milgate et al., 2001; Crous et al., 2006). Desta maneira, infecções múltiplas podem ocorrer, o que aumenta o impacto da doença e torna complexa a identificação de seu agente etiológico e o controle da doença (Gezahgne et al., 2006).

A doença caracteriza-se por numerosas lesões inicialmente arredondadas de cor palha e com o progresso da infecção, as lesões coalescem, adquirem formatos variáveis e atinge grande área do limbo foliar, provocando intensa desfolha, o que reduz a capacidade fotossintética da planta (Crous, 1998; Pinkard & Mohammed, 2006). A intensidade da doença varia com o estágio fenológico das folhas de *E. globulus*, incidindo mais severamente nas folhas juvenis (Alfenas et al., 2009). O fungo produz inúmeros pseudotécios em ambas as faces do limbo foliar, mas predominantemente na face abaxial. Em folhas molhadas, os ascósporos são ativamente ejetados dos pseudotécios e disseminados pelo vento como inóculo primário ou secundário até as folhas sadias onde germinam, penetram por estômatos e causam infecção (Park & Keane 1982; Park & Keane 1984).

Estudos sobre o processo infeccioso e o desenvolvimento da doença são baseados em *T. cryptica* e *T. nubilosa*. Ambos, ascósporos e conídios de espécies de *Mycosphaerella* e *Teratosphaeria* são infectivos. Em geral, ascósporos, constituem inóculo para a doença causada por essas espécies, embora conídios possam também iniciar a infecção (Park & Keane, 1987). A fonte de ascósporos é predominantemente a partir de folhas infectadas, onde o fungo sobrevive por vários meses, produzindo inóculo suficiente para sucessivos ciclos de infecção (Park & Keane, 1987; Crous et al., 2007a).

O plantio de genótipos resistentes constitui a melhor alternativa de controle de doenças em plantas, principalmente em espécies florestais em condições de campo. Na seleção de plantas resistentes é fundamental determinar os protocolos de produção de inóculo, inoculação e quantificação da doença. Todavia, o crescimento lento de *Mycosphaerella* spp. e *Teratosphaeria*

spp. e as dificuldades de esporulação do fungo em cultura constituem os maiores obstáculos para inoculação, visando à seleção de plantas resistentes.

Os objetivos foram identificar as espécies de *Mycosphaerella* e *Teratosphaeria* associadas à mancha foliar e desfolha de *E. globulus* no sul do Brasil e determinar as condições ótimas para o crescimento micelial e esporulação do fungo em cultura.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Obtenção de isolados monoascospóricos

Amostras de folhas infectadas de *E. globulus* coletadas no Sul do Brasil foram empregadas para isolamento e identificação do agente etiológico da doença. Para o isolamento, empregou-se a técnica de ejeção ativa de ascósporos (Crous, 1998). Para tal, lesões contendo pseudotécios foram mantidas em água destilada durante 2h, a fim de estimular a ejeção ativa dos ascósporos. Após esse período, cada lesão foi aderida à tampa de uma placa de Petri contendo meio de extrato de malte - ágar (MEA). As placas foram mantidas a 25°C por 12 h. Culturas monoascospóricas foram obtidas a partir da transferência de um único ascósporo para placa de Petri contendo meio MEA, seguindo-se incubação a 15°C por 15 dias e posteriormente a 20°C durante 30 dias.

2. Caracterização das lesões

Para a caracterização das lesões, as amostras foram analisadas sob microscópio estereoscópico. Avaliou-se o tamanho, a forma, a cor das lesões bem como a distribuição dos pseudotécios na lesão. Avaliaram-se 30 lesões por amostra.

3. Identificação das culturas

Para a identificação das culturas, empregou-se o padrão de germinação e análises de DNA.

3.1. Padrão de germinação dos ascósporos

O padrão de germinação dos ascósporos (Crous, 1998) foi utilizado para identificação prévia das culturas.

3.2. Análises de DNA

3.2.1. Extração e quantificação de DNA

Discos das culturas monoascospóricas com 45 dias de idade foram transferidos para placas de Petri contendo meio de batata - dextrose - ágar (BDA), com um papel celofane estendido sobre o meio e incubados a 20°C por 60 dias. Após incubação, o micélio foi raspado com o auxílio de uma espátula e triturado em almofariz, contendo nitrogênio líquido, com o auxílio de pistilo até a formação de um pó micelial fino. Posteriormente, as amostras foram individualmente transferidas para tubos de microcentrifuga (1,5 mL), e tratadas com 750 µL de tampão de extração por grama de micélio (CTAB 2x; NaCl 1,4 M; EDTA 20 mM, pH 8,0; Tris HCl 100 mM, pH 8,3 e PVP), 15 µL de 2-β-mercaptoetanol. A seguir, as amostras foram homogeneizadas em agitador do tipo vortex e incubadas a 65°C por 30 min. Após incubação, adicionaram-se às amostras, 500 µL de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1), cuja homogeneização se deu pela inversão manual dos tubos por várias vezes. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 12.000 g por 5 min. Após centrifugação, o sobrenadante foi recolhido e transferido para um novo tubo de microcentrifuga. Em seguida, foram adicionados 500 µL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) por tubo e as amostras homogeneizadas mediante inversão manual dos tubos e centrifugadas novamente a 12.000 g por 5 min. O sobrenadante (aproximadamente 500 µL) foi recolhido e transferido para um novo tubo de microcentrifuga contendo 0,9 volumes (450 µL) de isopropanol frio. Subsequentemente, as amostras foram novamente centrifugadas a 12.000 g por 7 min e o *pellet* foi lavado por duas vezes em 500 µL de etanol 70% frio. Após cada lavagem, as amostras foram centrifugadas a 12.000 g por 5 min. Após a última centrifugação os *pellets* foram mantidos em temperatura ambiente para secagem por 30 min. Após a secagem, o *pellet* de DNA foi

ressuspensão em 50 µL de TE (Tris 10mM e EDTA 1mM, pH 8,0) a 37°C por 2-4 h e armazenados a -20°C. Posteriormente, o DNA foi diluído em água destilada esterilizada na proporção de 1:10 e quantificado em espectrofotômetro.

3.2.2. Amplificação dos fragmentos ITS (espaçador interno transcrito 1, região 5.8S e espaçador interno transcrito 2 do rDNA) e LSU (grande subunidade 28S do rDNA) por PCR

As reações de PCR foram realizadas em 25 µL de solução contendo 5-10 ng/µL de DNA genômico, 2 µL a 10 mM de dNTP, 1,5 µL a 0,2 mM de cada primer, 1,75 U taq polimerase (Promega®), 5 µL de tampão 5x (Promega®), 2 µL de MgCl₂ a 25 mM e água esterilizada para completar o volume final. Os *primers* utilizados para amplificação da região ITS foram ITS1-ITS4 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG/TCCTCCGCTTATTGATATGC), (White, 1990) e para a amplificação da região LSU os *primers* LR0R-LR5 (ACCCGCTGAACTTAAGC/TCCTGAGGGAACTTCG), (Cheewangkoon et al., 2008). As amplificações foram realizadas em termociclador nas seguintes condições: 5 min a 96°C, seguidos por 30 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a 50°C e 1 min e 30 s a 72°C, seguidos de 4 min a 72°C de extensão final para os primers ITS1 e ITS4 e 4min a 95°C, seguidos de 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1min e 30 s a 53°C e 2 min a 72°C, seguidos de 4 min a 72°C de extensão final para os primers LR0R e LR5. Os produtos resultantes foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2%, contrastados em brometo de etídeo. Os produtos de PCR foram purificados usando o Kit High Pure PCR Product Purification-Roche Diagnostics®.

3.2.3. Sequenciamento do DNA e análises

O sequenciamento do DNA foi realizado em sequenciador (Applied BioSystems, Foster City, CA). Os primers ITS1-ITS4 e LR0R-LR5 usados para amplificação do DNA foram usados no sequenciamento. Para o sequenciamento da região LSU foram utilizados também os *primers* internos

LR3R (GTCTTGAAACACGGACC) e LR16 (TTCCACCCAAACACTCG), (Cheewangkoon et al., 2008). As sequências foram determinadas usando um auto-sequenciador ABI PRISM 3100 (AppliedBioSystems) e as sequências de dados foram analisadas usando o Sequence Navigator version 1.0.1 (Applied BioSystems). As sequências ITS e LSU dos isolados estudados foram comparadas com sequências do GenBank de outras regiões e países através do algoritmo BLASTn.

3.2.4. Amplificação de fragmentos utilizando *primers* específicos para *T. nubilosa*

As reações de PCR foram realizadas em 25 µL de solução contendo 5 µL de tampão para PCR 5X (Promega®), 2 µL de MgCl₂ a 25mM (Promega®), 2 µl dNTP a 10 mM, 1,75 U de taq polimerase (Promega®), 1,5 µL dos *primers* específicos a 0,2mM MNF-MNR (CGTCGGAGTAATACAACC/AGGCTGGAGTGGTGAAATG) (Geetha et al., 2004) e MN1F-MN1R (GCGCCAGCCCGACCTCC/ GGTCCCCGTCAGCGAAACAGT) (Maxwell et al., 2005) e 2 µL de DNA genômico (5-10 ng/µL) e água esterilizada suficiente para completar o volume final. As amplificações foram realizadas em termociclador nas seguintes condições: desnaturação inicial de 10 min a 94°C seguida por 35 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a 50°C, 1 min a 72°C e extensão final por 10 min a 72°C para os primers MNF-MNR e 2 min a 85°C, seguidos de 30 ciclos de 2 min a 96°C, 30 s a 94°C e 30 s a 55°C, 2 min a 72°C e extensão final por 7 min a 72°C para os primers MN1F-MN1R. Os produtos amplificados (5 µL) foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2% e contrastados com brometo de etídeo.

3.2.5. Análises filogenéticas

Alinhamentos separados foram feitos para as regiões ITS e LSU. As análises filogenéticas incluíram sequências dos isolados obtidos a partir deste estudo, 33 sequências obtidas do GenBank para a região ITS (Tabela 1) e 43 sequências para a região LSU (Tabela 2). Os táxons utilizados como *outgroup* foram *Dothidea insculpta* e *D. sambuci*. As sequências de DNA foram alinhadas

e adicionadas as sequências GenBank e *outgroup* utilizando o Sequencer Alignment Editor v. 2.0a11 (Rambaut, 2002) e ajustadas manualmente quando necessário. As análises filogenéticas das sequências de dados foram feitas no Paup*v.4.0b10 (Swofford, 2003). Para a análise de parcimônia, os gaps de alinhamento foram tratados como um carácter de quinto estado e todos os caracteres eram desordenados e de peso igual. A análise de máxima parcimônia foi realizada utilizando a opção de busca heurística com taxa de adição aleatória de 100 para a região LSU e 50 para a região ITS e TBR (árvore de bissecção e reconstrução) com o algoritmo *branch-swapping*. As ramificações de comprimento zero foram colapsadas e todas as múltiplas árvores igualmente parcimoniosas foram salvas. A robustez das árvores obtidas foi avaliada em 1000 replicações de *bootstrap* (Hillis & Bull 1993). Comprimento de ramo (CR), índice de consistência (IC), índice de retenção (IR) e índice de consistência redimensionado (RC) foram calculados e as árvores resultantes foram construídas e editadas com TreeView v. 1.6.6 (Page, 1996). Todas as novas seqüências geradas neste estudo foram depositadas no banco de dados de nucleotídeos do NCBI GenBank.

Tabela 1 – Espécies incluídas no estudo para análises de comparação de sequência da região ITS.

Espécie	Acesso	Genbank	Referência
<i>Teratosphaeria destructans</i>	CBS 111370	GQ852800	Crous et al., 2009c
<i>T. parva</i>	CBS122894	EU707877	Crous et al., 2008a
<i>T. molleriana</i>	CBS 120746	EF394844	Crous et al., 2007c
<i>T. cryptic</i>	CBS 111679	DQ302951	Crous et al., 2006
<i>T. Mexicana</i>	CBS 110502	AY725558	Crous et al., 2004
<i>T. fibrillosa</i>	CBS121707	EU707862	Crous et al., 2008a
<i>T. ohnowa</i>	CBS 110949	AY725575	Crous et al., 2004
	CMW9102	AF468880	Hunter et al., 2004
	CMW9103	AF468881	Hunter et al., 2004
	CBS120745	EF394845	Crous et al., 2007c
<i>T. flexuosa</i>	CBS 111048	FJ493194	Crous et al., 2009a
	-	AF309603	Crous et a., 2001
<i>T. juvenalis</i>	CBS111163	DQ302957	Crous at al., 2006
	CBS 111149	AY725514	Crous et al., 2004
<i>T. nubilosa</i>	CBS 116005	AY725572	Crous et al., 2004
	-	EU255901	-
	CPC933	AY725548	Crous et al., 2004
	CPC934	AY725549	Crous et al., 2004

	CPC12830	GQ852809	Crous et al., 2009c
	CPC13828	GQ852812	Crous et al., 2009c
	CPC13849	GQ852819	Crous et al., 2009c
<i>T. perpendicularis</i>	CPC10983	DQ303006	Crous et al., 2006
<i>T. pseudaficana</i>	CBS114782	DQ303008	Crous et al., 2006
<i>Mycosphaerella lateralis</i>	CBS 111282	AY725552	Crous et al., 2004
<i>M. acaciigena</i>	CBS120740	EF394822	Crous et al., 2007c
<i>M. ellipsoidea</i>	CBS110483	AY725545	Crous et al., 2004
<i>M. scytalidii</i>	CBS51693	DQ303014	Crous et al., 2006
	CPC10998	DQ303016	Crous et al., 2006
<i>M. africana</i>	CBS68095	AY626981	Glen et al., 2007
<i>M. endophytica</i>	CBS114662	DQ302953	Crous et al., 2006
<i>M. heimii</i>	CBS120741	EF394837	Crous et al., 2007c
<i>M. heimioides</i>	CBS111364	DQ267586	Hunter et al., 2006a
<i>M. marksii</i>	CBS116316	DQ302980	Crous et al., 2006
<i>M. parkii</i>	CBS38792	AY626979	Glen et al., 2007
<i>M. communis</i>	CBS112890	AY725540	Crous et al., 2004
<i>Dissoconium dekkeri</i>	-	AF173309	Crous et al., 1999
	CBS111282	AY725552	Crous et al., 2004
<i>D. commune</i>	CPC10440	AY725541	Crous et al., 2004
<i>Ramularia endophylla</i>	CBS113265	AY490763	Verkley et al., 2004
<i>R. uredinicola</i>	CPC10813	GU214694	Crous et al., 2009d
<i>R. aplospora</i>	CBS54582	EU040238	Crous et al., 2007b
<i>R. proteae</i>	CBS112161	EU0707899	Crous et al., 2008a
<i>R. miae</i>	CBS120121	DQ885902	Crous & Groenewald, 2006
<i>R. eucalypti</i>	CBS120726	EF394860	Crous et al., 2007c
<i>Dothidea insculpta</i>	CBS 18958	AF027764	Jacobs & Rehner, 1998
<i>D. sambuci</i>	CBS 19858	AY930109	Shoemaker & Hambleton, 2005

Tabela 2 – Espécies incluídas no estudo para análises de comparação de seqüência da região LSU.

Espécie	Acesso	Genbank	Referência
<i>Teratosphaeria sp.</i>	CPC14997	FJ372419	Crous et al., 2008b
<i>T. destructans</i>	CBS111370	GQ852690	Crous et al., 2009b
<i>T. parva</i>	CBS122892	EU0707875	Crous et al., 2008a
<i>T. molleriana</i>	CBS116370	GU214508	Crous et al., 2009d
<i>T. cryptica</i>	CBS110975	GQ852682	Crous et al., 2009b
<i>T. mexicana</i>	CBS110502	GU214507	Crous et al., 2009d
<i>T. fibrillosa</i>	CBS121707	GU323213	Schoch et al., 2009
<i>T. ohnowa</i>	CBS112896	EU019305	Crous et al., 2007a
<i>T. flexuosa</i>	CBS111048	FJ493216	Crous et al., 2009a
	CMW5224	DQ246232	Hunter et al., 2006a
<i>T. juvenalis</i>	CBS111149	EU019294	Crous et al., 2007a
<i>T. nubilosa</i>	CBS116005	EU019304	Crous et al., 2007a
	CPC13849	GQ852707	Crous et al., 2009b
<i>T. secundaria</i>	CBS115608	EU019306	Crous et al., 2007a
<i>M. acaciigena</i>	CBS112516	GQ852600	Crous et al., 2009b

<i>M. africana</i>	CBS116154	GQ852601	Crous et al., 2009b
<i>M. ellipsoidea</i>	CBS110843	GQ852602	Crous et al., 2009b
<i>M. endophytica</i>	CBS114662	GQ852603	Crous et al., 2009b
	Cbs111519	DQ246255	Hunter et al., 2006a
<i>M. heimii</i>	CBS110682	GQ852604	Crous et al., 2009b
<i>M. heimioides</i>	CBS111364	DQ204752	Hunter et al., 2006b
<i>M. marksii</i>	CBS110942	GQ852612	Crous et al., 2009b
<i>M. parkii</i>	CBS38792	GQ852616	Crous et al., 2009b
<i>M. stromatosa</i>	CBS101953	EU167598	Simon et al., 2009
<i>M. pyri</i>	CPC3677	GU214495	Crous et al., 2009d
<i>Dissoconium commune</i>	CBS114239	GQ852590	Crous et al., 2009b
	CPC825	GU214422	Crous et al., 2009d
<i>D. dekkeri</i>	CPC1188	GU214424	Crous et al., 2009d
	CBS120253	GU214689	Crous et al., 2009d
<i>Ramularia acroptiti</i>	CBS120253	GU214689	Crous et al., 2009d
<i>Pseudocercospora schizolobii</i>	CBS124990	GQ852646	Crous et al., 2009b
	X300	GU214474	Crous et al., 2009d
<i>P. fijiensis</i>	X300	GU214474	Crous et al., 2009d
<i>P. ocimicola</i>	CPC10283	GU214678	Crous et al., 2009d
<i>Penidiela columbiana</i>	CBS28680	EU019274	Crous et al., 2007a
<i>Dothidea insculpta</i>	CBS18958	DQ247802	Schoch et al., 2006
<i>D. sambuci</i>	CBS19858	AY930109	Shoemaker & Hambleton, 2005

4. Crescimento micelial e esporulação em diferentes meios de cultura

O crescimento micelial de cinco isolados (PM01, PM02, PM06, PM08 e PM10) foi avaliado em diferentes meios de cultura. Testaram-se os meios V8 ágar [100 mL/L de V8 (Campbell Soup Company) e 20 g/L de ágar], V8 CaCO₃ (100 mL/L de V8, 2 g/L de CaCO₃ e 20 g/L de ágar), MEA (20 g/L de extrato de malte e 20 g/L de ágar), BDA [39 g/L de batata dextrose ágar (Acumedia®)], BCA (extrato de 20 g/L de batata, extrato de 20 g/l de cenoura e 20 g/L de ágar), MIC (10 g/L de farinha de soja, 10 g/L de dextrose e 10 g/L de ágar), CLA (20 g/L de ágar – adição de 4 fragmentos de folhas de cravo por placa), MEG (macerado de 200 g/L de folhas de *E. globulus* e 20 g/L de ágar), FEG (filtrado de 200 g/L de folhas de *E. globulus* e 20 g/L de ágar), ACA (1000 mL de água de coco (Ducoco) e 20 g de ágar), CVA (200 mL de caldo de vegetais, 20 g/L de ágar e 100 mL de água destilada), (Pereira et al., 2003) e AVSA (20 g/L de aveia, 15 g/L de sacarose e 20 g/L de ágar). Realizaram-se dois ensaios, o primeiro com os isolados PM01, PM02 e PM06 e o segundo com os isolados PM06, PM08 e PM10 (Tabela 2). Discos de cultivo de 5 mm (primeiro ensaio) ou 3 mm (segundo ensaio) de diâmetro foram retirados das bordas de

colônias crescidas em meio BDA por 40 dias a 20 °C e fotoperíodo de 12 h e transferidos para placas de Petri (6 mm), contendo 5 mL dos respectivos meios de cultura. As placas foram mantidas a 20 °C no escuro em delineamento inteiramente casualizado no esquema fatorial (meio x isolado) com cinco repetições de cada meio de cultura-isolado testado. A cada sete dias avaliou-se o diâmetro da colônia. Aos 14 dias de incubação, as culturas foram submetidas à luz negra contínua a fim de estimular a esporulação. A cada sete dias, avaliou-se a presença de esporulação das colônias sob microscópio estereoscópico.

Os dados de diâmetro em função do tempo foram utilizados para calcular a área abaixo da curva de crescimento micelial (AACCM) empregando-se a fórmula: $AACCM = \sum [(Y_{i+1} + Y_i) / 2] [X_{i+1} - X_i]$ onde,

Y_i = média do crescimento micelial (por unidade de tempo) na i - ésima observação;

X_i = tempo em (dias) na i - ésima observação e,

n = número total de observações

Realizou-se a análise de variância e compararam-se as médias dos tratamentos pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$), utilizando-se o software SAS (SAS/STAT. 1989).

RESULTADOS

1. Isolamento e obtenção das culturas monoascospóricas

Foram obtidos 19 isolados monoascospóricos, sendo onze provenientes de amostras de Santa Catarina e oito do Rio Grande do Sul (Tabela 3).

Tabela 3 – Espécies de *Mycosphaerella* e *Teratosphaeria* encontrados associados à MLD no Brasil

Isolado	PCR MN ¹⁾	PCR MN1 ²⁾	Identificação ³⁾	Clone	Estado de coleta ⁴⁾
PM01	-	-	<i>M. scytalidii</i>	Anselmo Rama	SC
PM02	-	-	<i>T. ohnowa</i>	Anselmo Rama	SC
PM03	-	-	<i>T. pseudaficana</i>	Anselmo Rama	SC
PM04	-	-	<i>T. ohnowa</i>	Batman	SC
PM05	-	-	<i>M. lateralis</i>	Batman	SC
PM06	-	-	<i>T. flexuosa</i>	Batman	SC
PM07	-	-	<i>T. ohnowa</i>	Batman	SC
PM08	+	+	<i>T. nubilosa</i>	Batman	SC
PM09	+	+	<i>T. nubilosa</i>	Semente	RS
PM10	+	+	<i>T. nubilosa</i>	Semente	RS
PM11	+	+	<i>T. nubilosa</i>	Semente	RS
PM12	+	+	<i>T. nubilosa</i>	Semente	RS
PM13	+	+	<i>T. nubilosa</i>	Semente	RS
PM14	+	+	<i>T. nubilosa</i>	Semente	RS
PM15	-	-	<i>T. ohnowa</i>	Rivera	SC
PM16	-	-	<i>T. pseudaficana</i>	Anselmo Rama	SC
PM17	-	-	<i>T. perpendicularis</i>	Rivera	SC
PM18	+	+	<i>T. nubilosa</i>	Semente	RS
PM19	+	+	<i>T. nubilosa</i>	Semente	RS

¹⁾ PCR espécie-específica para *T. nubilosa* utilizando os primers NMF e NMR (Geetha et al., 2004)

²⁾ PCR espécie-específica para *T. nubilosa* utilizando os primers NM1F e NM1R (Maxwell et al., 2005)

³⁾ Com base na análise filogenética da região ITS1-gene 5.8s-ITS2

⁴⁾ Estado de SC = Santa Catarina e RS = Rio Grande do Sul (Brasil)

2. Caracterização das lesões

As amostras de folhas apresentaram lesões de tamanhos variáveis (1 x 2 a 7 x 8 mm no clone Anselmo Rama; 0,5 x 0,5 a 8 x 9 mm no clone Batman; 1 x 1 a 7 x 10 mm no clone Rivera; 2 x 2 a 7 x 9 mm no material da Aracruz), de coloração predominantemente palha, com presença de pseudotécios nas superfícies adaxial e abaxial das folhas, bordas irregulares ou não (Figura 1). Cortes histológicos revelaram a presença de pseudotécios, contendo ascas bitunicadas com oito ascósporos uniseptados, característica das famílias *Mycosphaerellaceae* e *Teratosphaeriaceae*.

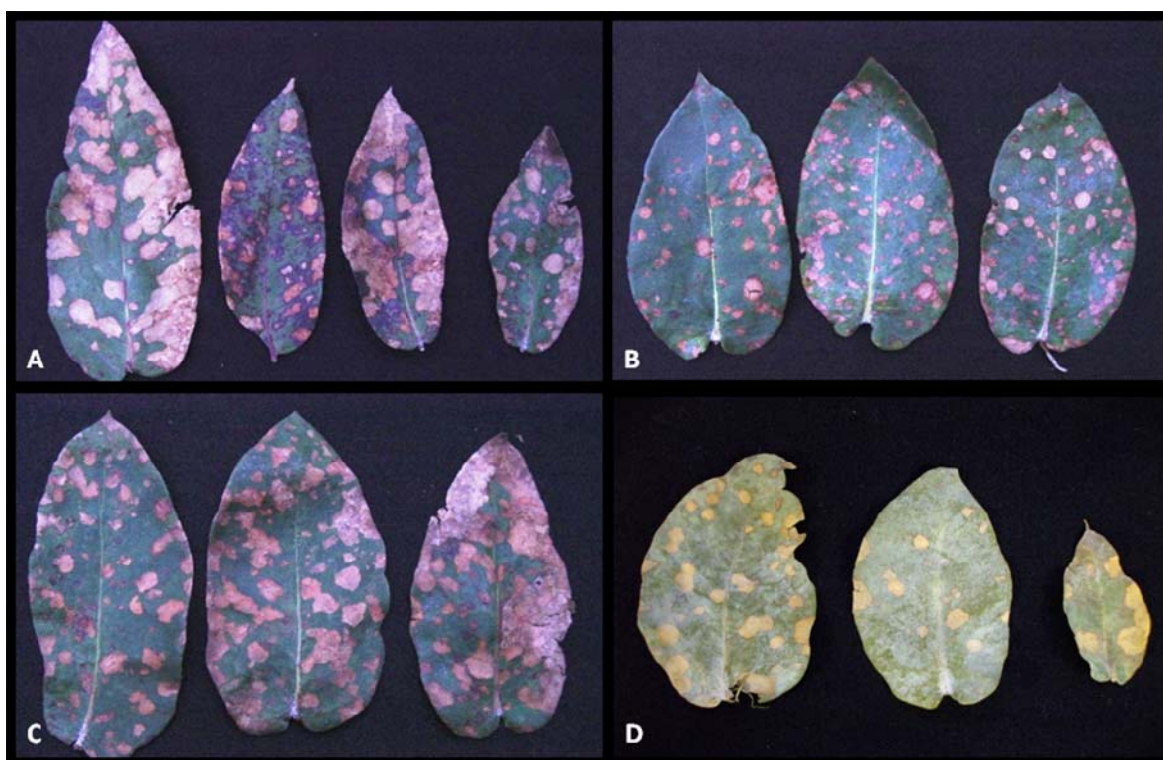


Figura 1 – Lesões foliares causadas por *Mycosphaerella* sp e *Teratosphaeria* sp. **A)** Clone Anselmo Rama; **B)** Clone Batman; **C)** Clone Rivera; **D)** Material Aracruz.

3. Padrão de germinação dos ascósporos

Os padrões de germinação dos ascósporos observados (Figura 2) foram o C, D, F, G, I, K e L (Figura 3) para *T. nubilosa*, *T. parkii*, *T. africana*, *T. juvenis*, *M. lateralis*, *T. flexuosa* e *T. suttoniae*.

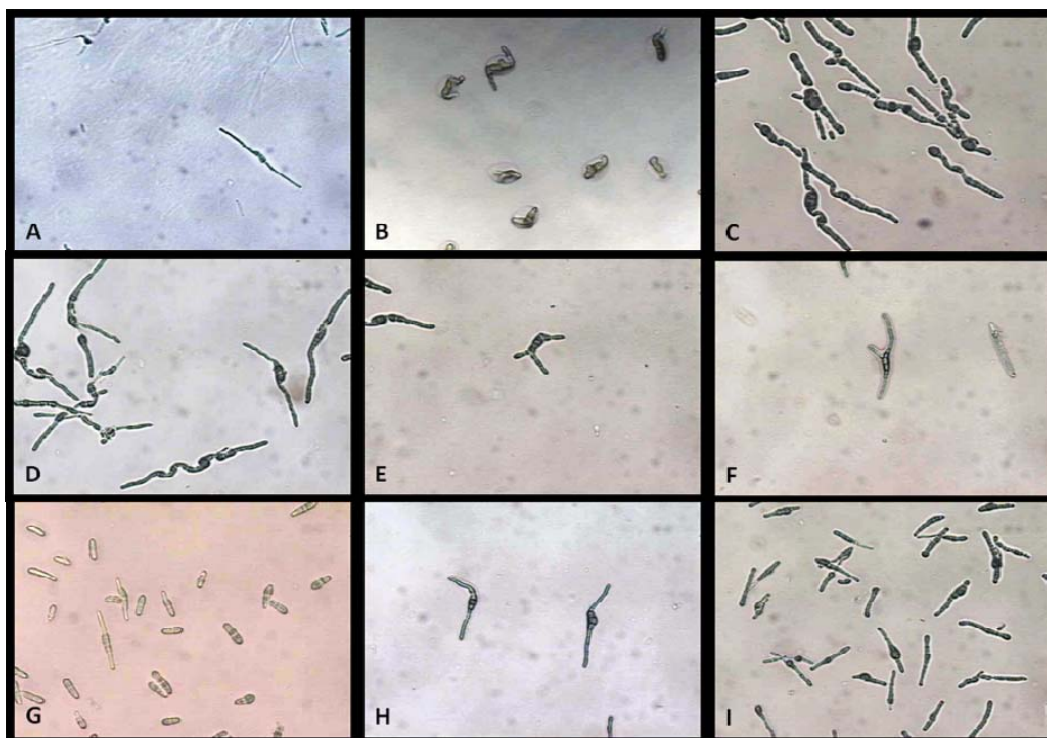


Figura 2 – Padrões de germinação dos ascósporos ejetados. **A, G, H e I** - padrão F, típico de *Mycosphaerella juvenis*. **B** – padrão L, típico de *Mycosphaerella suttoniae*. **C** – padrão G, típico de *Mycosphaerella africana* e padrão K, típico de *Mycosphaerella flexuosa*. **D** – padrão F e padrão K. **E** – padrão D, típico de *Mycosphaerella parkii*. **F** – padrão I, típico de *Mycosphaerella lateralis*.

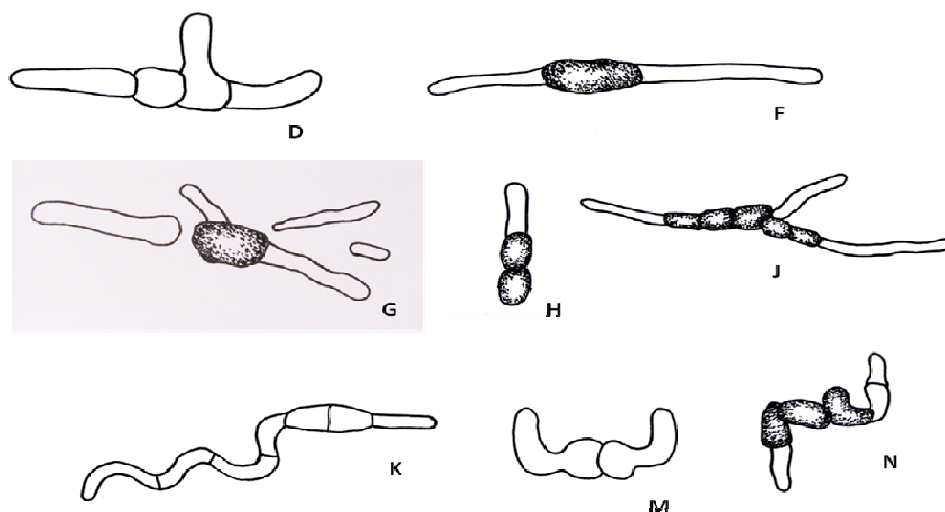


Figura 3: Padrões de germinação observados nas culturas identificadas. Padrão **D**, típico de *Mycosphaerella parkii*, padrão **F**, típico de *Mycosphaerella juvenis*, padrão **G**, típico de *Mycosphaerella africana* padrão **H**, típico de *Mycosphaerella mexicana*, padrão **J**, típico de *Mycosphaerella colombiensis*, padrão **K**, típico de *Mycosphaerella flexuosa*, padrão **M**, típico de *Mycosphaerella suttoniae* e padrão **N**, típico de *Mycosphaerella parva*.

4. Análises filogenéticas

Aproximadamente 1700 bases, abrangendo as regiões ITS e LSU, foram obtidas das amostras sequenciadas. A região ITS foi utilizada nas análises filogenéticas para um posicionamento em nível de gênero (Figura 4) e a região LSU para determinar as relações em nível de espécies (Figura 5) das amostras estudadas. Dentre o alinhamento ITS que continha 64 taxons incluindo as duas sequências *outgroup*, 511 caracteres foram usados nas análises filogenéticas, destes, 262 foram de parcimônia-informativa, 27 foram variáveis e parcimônia-não informativa e 222 foram constantes. As 22 árvores igualmente mais parcimoniosas foram retidas a partir de busca heurística e a primeira delas está demonstrada na figura 4 (TL = 1035, CI = 0.531, RI = 0.861, RC = 0.458). O alinhamento LSU continha 54 taxons com 754 caracteres utilizados nas análises filogenéticas. Destes 172 foram de parcimônia-informativa, 50 foram variáveis e parcimônia-não informativa e 532 foram constantes. Somente dezesseis árvores igualmente mais parcimoniosas foram retidas pela busca heurística e a primeira delas é mostrada na figura 5 (TL = 549, CI = 0.563, RI = 0.845, RC = 0.476).

Os *primers* específicos para *T. nubilosa* amplificaram fragmentos de aproximadamente 200pb (MNF-MNR) e 400pb (MN1F-MN1R) apenas para os isolados PM08, PM09, PM10, PM11, PM12, PM13, PM14, PM18 e PM19 o que reforça os resultados obtidos nas análises filogenéticas para esta espécie.

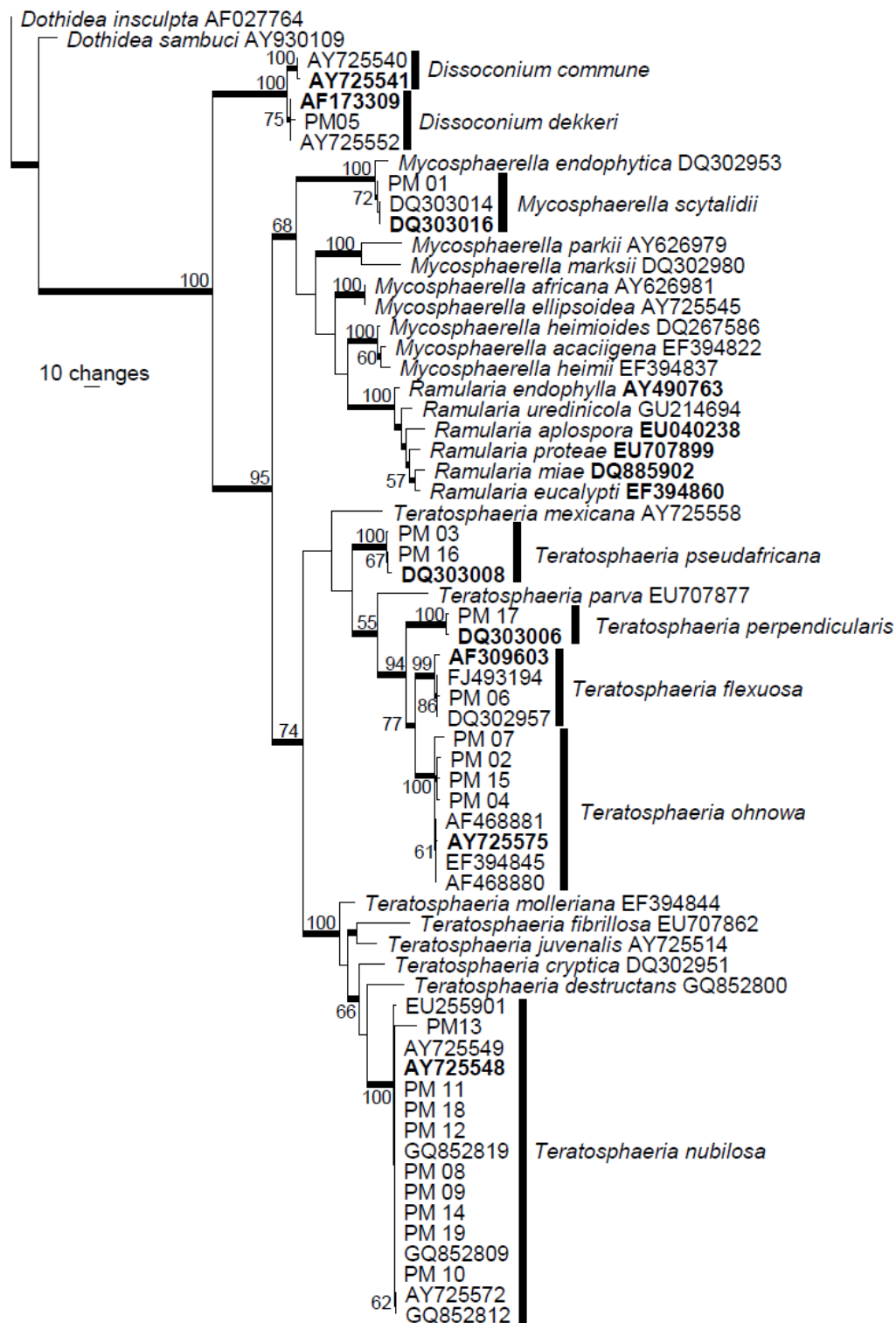


Figura 4: A primeira das 22 árvores igualmente mais parcimoniosas obtidas a partir da busca heurística com taxa de adição 50 aleatorizações para o alinhamento de sequências ITS. A barra de escala mostra 10 alterações e os valores de suporte *bootstrap* (1000 replicações) estão mostrados nos nós. As sequências das espécies tipo estão destacadas em negrito e ramos presentes na árvore consenso estão espessados. A árvore foi enraizada com sequências de duas espécies de *Dothidea*.

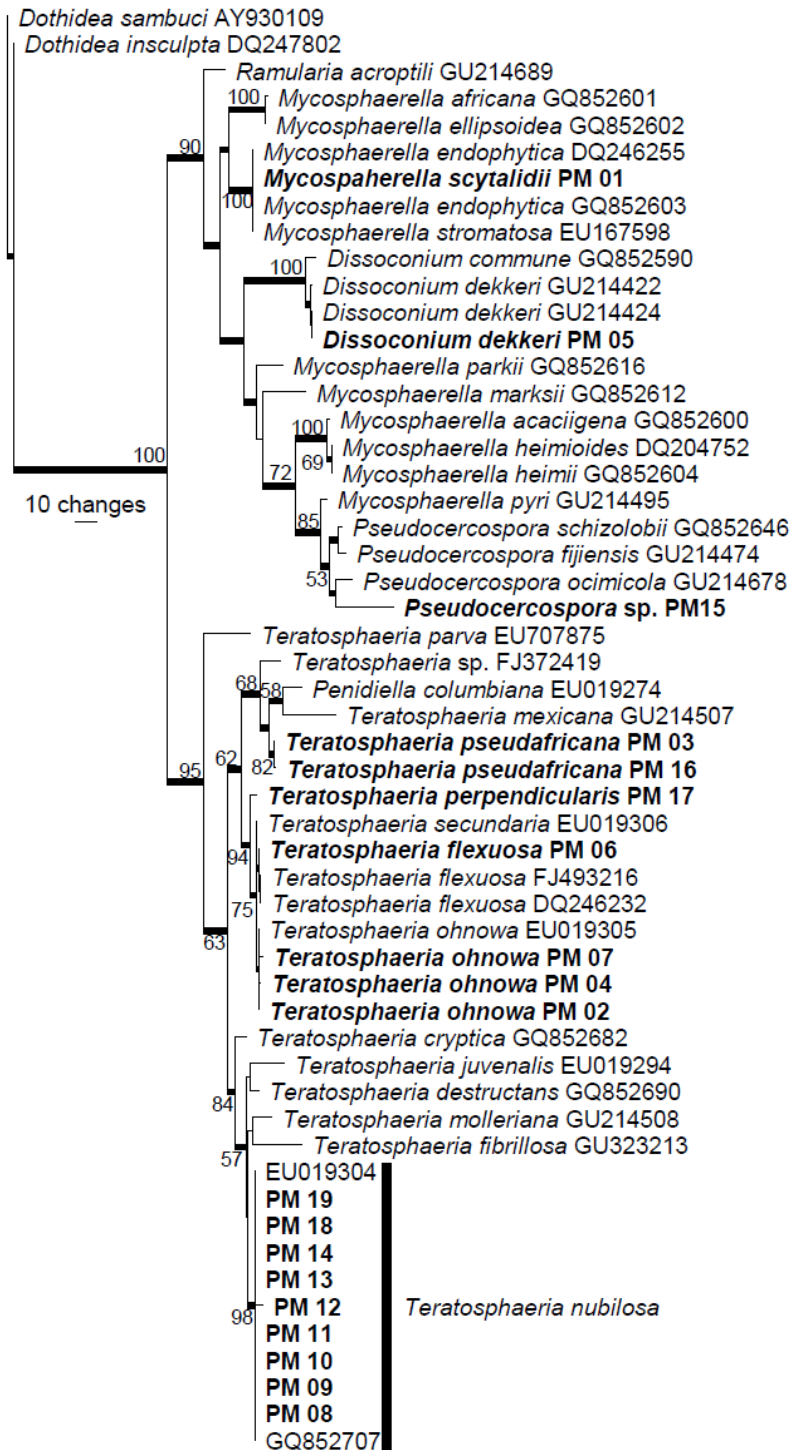


Figura 5: A primeira das dezesseis árvores igualmente mais parcimoniosas obtidas a partir da busca heurística com taxa de adição 100 aleatorizações para o alinhamento de sequências LSU. A barra de escala mostra 10 alterações e os valores de suporte *bootstrap* (1000 replicações) estão mostrados nos nós. As novas sequências geradas neste estudo aparecem em negrito e ramos presentes na árvore consenso estão espessados. A árvore foi enraizada com sequências de duas espécies de *Dothidea*.

5. Crescimento micelial e esporulação em diferentes meios de cultura

Houve interação significativa entre isolados e meios de cultura ($P < 0,0001$), ou seja, o crescimento micelial dos isolados variou de acordo com o meio de cultura (Tabela 4).

Tabela 4 – Área abaixo da curva do crescimento micelial (AACCM) de isolados de *M. scytilidii*, *T. ohnowa*, *T. flexuosa*, *T. nubilosa*¹ e *T. nubilosa*²

	Ensaio I			Ensaio II		
	<i>M. scytilidii</i>	<i>T. ohnowa</i>	<i>T. flexuosa</i>	<i>T. nubilosa</i> ¹	<i>T. nubilosa</i> ²	<i>T. flexuosa</i>
94,4 A**b*	102,31 Ab	114,52 Aa	55.16 Ab	56.84 Ab	123.76 Aa	
ACA	ACA	ACA	BDA	BDA	ACA	
84,67 ABb	84,07 Bb	98,28 Ba	54,25 Ab	51.59 Ab	101.92 ABa	
MEA	MEA	MEA	AVSA	AVSA	V8	
78,26 BCb	83,72 Bb	94,99 BCa	47.04 Ab	50.61 ABb	101.43 ABa	
BDA	AVSA	AVSA	MEA	MEA	AVSA	
77,53 BCb	79,56 Bb	94,50 BCa	46.69 ABb	47.74 Bb	100.06 ABa	
AVSA	MIC	V8	MIC	MIC	MEA	
70,53 CDb	75,78 BCb	91,42 BCa	41.09 Bb	45.43 BCb	98.7 ABa	
CLA	BDA	MIC	CVA	BCA	MIC	
70,21 CDb	69,61 CDb	87,99 DEa	37.66 BCb	45.15 BCb	93.87 Ba	
CVA	V8	BDA	V8CaCO3	CVA	BDA	
69,37 CDb	65,84 DEb	84,35 Ea	37.03 BCb	42.35 BCb	89.81 Ba	
MIC	CVA	V8CaCO3	V8	CLA	FEG	
68,50 CDb	65,73 DEa	83,16 EFa	36.61 EFb	39.62 Cb	88.34 BCa	
V8CaCO3	FEG	CVA	BCA	ACA	CVA	
64,51 DEab	64,30 DEab	83,16 EFa	35.42 BCb	39.41 Cb	87.78 BCa	
BCA	CLA	BDA	ACA	V8CaCO3	V8CaCO3	
59,92 EDb	58,98 EFb	77,98 Fa	32.83 Cb	38.92 Cb	86.17 BCa	
V8	V8CaCO3	CLA	MEG	V8	BCA	
52,85 EFb	54,47 Fb	62,09 Gab	31.71 Bb	32.90 Db	83.89 BCa	
FEG	BCA	FEG	CLA	FEG	CLA	
42,14 Fb	53,34 Fa	47,04 Hab	30.73 Cb	31.99 Db	51.73 Da	
MEG	MEG	MEG	FEG	MEG	MEG	

**Médias seguidas por letras maiúsculas equivalem a comparações na vertical e * médias seguidas por letras minúsculas equivalem a comparações na horizontal. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. CV (%): 5,62 para ensaio I e 6,06 para ensaio II.

¹ – isolado PM10

² – isolado PM08

No primeiro ensaio, o meio que proporcionou maior crescimento micelial foi o ACA para os isolados PM01, PM02 e PM06, seguido por MEA para os isolados de PM01, PM02 e PM06 e BDA foi o terceiro melhor meio para o isolado PM01, MIC para o isolado PM02 e AVSA para o isolado PM06. No meio MEG o crescimento foi inferior aos demais para os isolados avaliados. Já no segundo ensaio, os melhores meios para os isolados PM10 e PM08 foram BDA, seguido de AVSA e MEA e para o isolado PM06 foram ACA, V8 e AVSA. O meio FEG foi o menos eficiente para o crescimento do isolado PM10 e o meio MEG para os isolados PM08 e PM06 (Figuras 6 e 7).

Nenhum dos meios testados induziu a esporulação, sob as condições de incubação testadas.

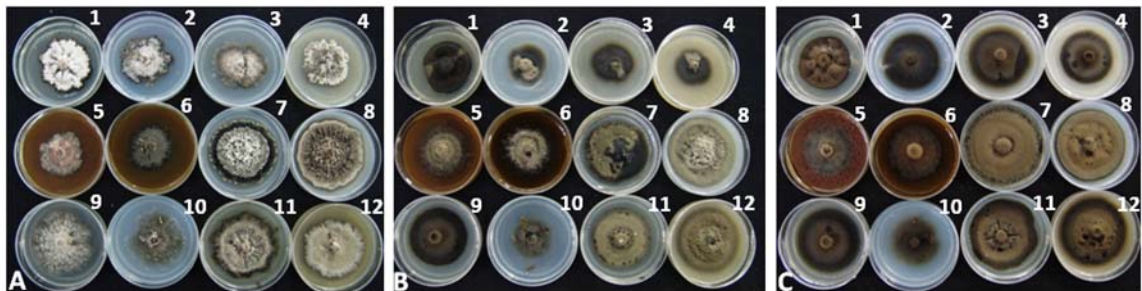


Figura 6 – Ensaio de crescimento micelial em diferente meios de cultura. 1 – BDA; 2 – BCA; 3 – V8; 4 – V8CaCO₃; 5 – MEG; 6 – FEG; 7 – ACA; 8 – AVSA; 9 – CVA; 10 – CLA; 11 – MEA e 12 – MIC. **A** – *Mycosphaerella scytalidii* (PM01). **B** – *Teratosphaeria ohnowa* (PM02). **C** – *Teratosphaeria flexuosa* (PM06).

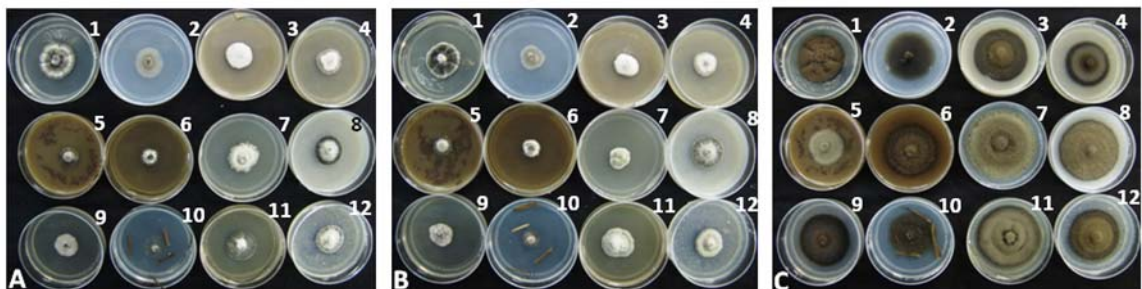


Figura 7 – Ensaio de crescimento micelial em diferente meios de cultura. 1 – BDA; 2 – BCA; 3 – V8; 4 – V8CaCO₃; 5 – MEG; 6 – FEG; 7 – ACA; 8 – AVSA; 9 – CVA; 10 – CLA; 11 – MEA e 12 – MIC. **A** – *Teratosphaeria nubilosa* (PM10). **B** – *Teratosphaeria nubilosa* (PM08). **C** – *Teratosphaeria flexuosa* (PM06).

DISCUSSÃO

As lesões em *E. globulus* incitadas por *Mycosphaerella* e *Teratosphaeria* podem variar de acordo com a espécie do patógeno e hospedeiro (Hunter et al., 2004). Neste trabalho, observaram-se diferenças na forma, na coloração, no tamanho, na quantidade e na distribuição de pseudotécios nas lesões que podem estar relacionadas à espécie do fungo presente. Não raro, patógenos secundários e oportunistas colonizam tecidos necróticos resultantes de infecção de patógenos primários, injúrias por insetos ou senescência natural das folhas (Crous et al., 2006). Acredita-se que *M. marksii*, *M. parkii*, *T. nubilosa*, *T. suberosa* e *T. suttonii* sejam as espécies mais comuns no Brasil (Alfenas et al., 2009), associadas à *Eucalyptus* spp. Patógenos primários como *T. nubilosa* e *T. cryptica* colonizam o tecido foliar vivo e adquirem nutrientes de forma hemibiotrófica (Hunter et al., 2009).

A identificação de espécies de *Mycosphaerella* e *Teratosphaeria* baseada em características morfológicas é complexa. Em geral é baseada em pequenas diferenças nas dimensões, na forma, no padrão de germinação dos ascósporos e na associação com a espécie hospedeira (Crous, 1998). Os padrões de germinação dos ascósporos observados, neste estudo, foram C, D, F, G, I, K e L típicos respectivamente de *T. nubilosa*, *T. parkii*, *T. africana*, *T. juvenis*, *M. lateralis*, *T. flexuosa* e *T. suttoniae*. Contudo, somente foram isoladas as espécies *T. nubilosa*, *T. lateralis* e *T. flexuosa*. O padrão de germinação parece não ser um bom critério para diferenciação de espécies, uma vez que pode variar dependendo do meio de germinação (água ou meio de cultura) (Crous, 1998), e com o estágio fenológico da folha. Perez et al. (2009a) ao examinarem o padrão de germinação de ascósporos de *T. nubilosa* ejetados de lesões de *E. globulus* verificaram padrão de germinação F a partir de folhas juvenis e intermediárias, diferentemente do observado em ascósporos ejetados de lesões de folhas adultas. Analogamente Carnegie (2007), ao estudar *T. nubilosa* observou ascósporos germinados com múltiplos tubos germinativos.

Neste trabalho, não foi realizado um monitoramento entre a lesão e a espécie de *Mycosphaerella* e *Teratosphaeria* isolada, porém observou-se a

presença de diferentes padrões de germinação de ascósporos advindos de uma mesma lesão. Diferentes espécies de *Mycosphaerella* e *Teratosphaeria* podem ser encontradas em uma única folha e até mesmo em uma mesma lesão (Crous & Wingfield, 1996). *Mycosphaerella lateralis*, *M. grandis* e *M. parva* tem sido frequentemente associadas secundariamente a lesões causadas por outras espécies de *Mycosphaerella* e *Teratosphaeria* (Milgate et al., 2001; Crous et al., 2006)

A co-ocorrência de mais de uma espécie em uma mesma lesão, a necessidade de empregar culturas monoascospóricas, o lento crescimento micelial e a ausência de esporulação do fungo em cultura dificultam sua identificação (Crous et al., 2004). Crous et al. (2006) concluíram ser impossível identificar espécies de *Mycosphaerella* e *Teratosphaeria* de *Eucalyptus* sem a utilização de análises de seqüências de DNA.

A utilização de técnicas moleculares tem contribuído para o aumento do número de espécies descritas nos últimos anos (Silva et al., 2009). Seqüências de nucleotídeos de DNA podem diferir entre espécies de *Mycosphaerella* e *Teratosphaeria* e por isso tem sido amplamente utilizadas em estudos de taxonomia e filogenia destes gêneros (White et al., 1990; Crous et al., 2001). Crous et al. (2006) e Hunter et al. (2006a), ao empregarem várias seqüências de DNA de *Mycosphaerella* spp., verificaram que a região ITS oferece resolução suficiente para distinguir espécies. No presente estudo, foram empregadas seqüências de DNA das regiões ITS e LSU para as comparações filogenéticas e conseqüentemente identificação dos isolados obtidos. Foram identificadas duas espécies de *Mycosphaerella* e cinco de *Teratosphaeria*. Os isolados de *Mycosphaerella* foram identificados como *M. scytalidii* e *M. lateralis* e quando comparadas com outras seqüências, foram agrupadas em diferentes clados, conforme foi encontrado por Crous et al. (2006). Existem três relatos de *M. scytalidii*, sendo o primeiro na Colômbia e o segundo no Brasil em *E. globulus* (Crous et al., 2006) e recentemente no Uruguai em *E. grandis*, *E. dunni* e *E. globulus* (Pérez et al., 2009). *M. lateralis* primeiramente descrito como hiperparasita de *T. nubilosa* e *T. cryptica* (Hoog et al., 1991; Jackson et al., 2005) teve sua patogenicidade confirmada por Jackson et al. (2005). *M. lateralis* já foi relatada na Austrália, África do Sul, Zâmbia, Bolívia, Espanha, Portugal e no Uruguai em *E. grandis*, *E. globulus*, *E. saligna*, *E. nitens*, *E.*

maidenii e híbridos de *E. grandis* x *E. saligna* (Crous, 1998; Maxwell, 2000; Crous et al., 2006; Perez et al., 2009).

Das cinco espécies identificadas como *Teratosphaeria*, somente *T. nubilosa* foi relatada no Brasil (Perez et al., 2009b). *Teratosphaeria ohnowa* foi relatada na África do Sul e Austrália em *E. grandis* e no Uruguai em *E. viminalis* (Crous et al., 2004; Crous et al., 2007b; Perez et al., 2009), *T. pseudaficana* foi relatada em Zâmbia em *E. globulus* (Crous et al., 2006), *T. perpendicularis* foi relatada na Colômbia em híbridos de *E. urophylla* x *E. urograndis* (Crous et al., 2006) e *T. flexuosa* na Colômbia em *E. globulus* (Crous, 1998). Porém a patogenicidade de *T. pseudaficana* e *T. flexuosa* ainda não foi comprovada.

Dentre as espécies identificadas neste estudo, *T. nubilosa* é a mais importante por incitar intensa desfolha em *Eucalyptus globulus* em vários países. Recentemente foi identificada em plantios de *E. globulus* e *E. dunnii* no Uruguai e *E. globulus* no Brasil (Perez et al., 2009b). Neste estudo, *T. nubilosa* foi constatada no Rio Grande do Sul e em Santa Catarina, onde tem causado intensa desfolha em *E. globulus*.

Em um estudo de genética de população no Uruguai, Perez et al. (2009a) encontraram um único haplótipo do patógeno idêntico ao haplótipo encontrado na Espanha e em Portugal, onde a população de *T. nubilosa* é também monoclonal (Hunter et al., 2008). Os autores sugeriram que o patógeno foi introduzido no Uruguai a partir material vegetativo desses países. É possível que este patógeno tenha sido introduzido no Brasil a partir do Uruguai em virtude da proximidade das áreas de plantio e intercâmbio de material genético entre os dois países.

O plantio de materiais resistentes é a única estratégia de controle da doença (Alfenas et al., 2009). Recentes estudos têm mostrado a existência de variabilidade genética para resistência à mancha foliar e desfolha em *E. globulus*, causadas por *Mycosphaerella* spp. e *Teratosphaeria* spp., tornando a resistência genética um método factível no controle da doença (Freeman, 2008).

Para a seleção de materiais resistentes a partir de inoculação sob condições controladas é fundamental desenvolver métodos de produção massal e esporulação do patógeno em cultura bem como estabelecer protocolos de inoculação e quantificação da doença. Neste estudo,

compararam-se meios de cultura para o crescimento e esporulação do fungo, uma vez que a composição do meio determina a quantidade e qualidade do crescimento micelial e esporulação (Dhingra & Sinclair, 1995). Espécies de *Mycosphaerella* e *Teratosphaeria* apresentam crescimento lento e geralmente não esporulam em meios de cultura (Crous, 1998). Neste estudo nenhum dos meios testados proporcionou esporulação dos fungos testados, entretanto os meios ACA e MEA proporcionaram melhores taxas de crescimento para *T. nubilosa*, *T. flexuosa*, *T. pseudaficana* e *M. scytalidii*, enquanto V8-ágar foi eficiente apenas para *T. flexuosa*. Os meios MEA, BDA e AVSA são comumente utilizados em estudos com espécies de *Mycosphaerella* e *Teratosphaeria* (Crous et al. 2009a). Neste estudo esses meios estão entre os melhores para crescimento micelial, porém não induziram esporulação das espécies testadas. Estes resultados dão suporte a estudos futuros para a produção massal de inóculo.

Neste trabalho foram encontradas seis espécies de *Mycosphaerella* e *Teratosphaeria* em apenas quatro materiais de *E. globulus*, o que sugere que podem existir muitas outras espécies associadas a *Eucalyptus* no Brasil. Comparação de seqüências de DNA baseada em múltiplos genes deve ser realizada para o levantamento das espécies que ocorrem no Brasil. Além disso, são necessários estudos sobre a patogenicidade dessas espécies em *Eucalyptus*, visto que muitos autores focam apenas na identificação e descrição de novas espécies.

CONCLUSÕES

Os resultados do presente estudo permitiram concluir que:

- Mais de uma espécie de *Mycosphaerella* e/ou *Teratosphaeria* está associada à mancha foliar e desfolha de *E. globulus* no Brasil.
- Diferentes espécies podem co-ocorrer em uma mesma folha ou lesão.
- As espécies *T. pseudaficana*, *T. perpendicularis*, *T. flexuosa*, *T. ohnowa* e *M. lateralis* foram identificadas pela primeira vez no Brasil.
- Os meios ACA, MEA, BDA, MIC e AVSA foram os mais favoráveis para o crescimento micelial de *M. scytalidii*, *T. ohnowa* e *T. flexuosa*.
- *Teratosphaeria nubilosa* apresentou melhor crescimento nos meios BDA, seguido de AVSA e MEA.
- Nenhum dos meios de cultura testados propiciou a esporulação das espécies testadas.

REFERÊNCIAS

- Alfenas AC, Zauza EAV, Mafia RG, Assis, TF. 2009. Clonagem e doenças do eucalipto. 2ª edição. Viçosa, MG, Brasil: Editora UFV, 500p.
- Carnegie AJ, Burgess T, Beilharz V, Wingfield MJ. 2007. New species of *Mycosphaerella* from Myrtaceae in plantations and native forests in eastern Australia. *Mycologia* 99: 461-74.
- Carnegie, AJ. 2007. Forest health in New South Wales, Australia, 1996–2005. II. Fungal damage recorded in eucalypt plantations during forest health surveys and their management. *Australasian Plant Pathology* 36: 225-239.
- Cheewangkoon R, Crous PW, Hyde KD, Groenewald JZ, To-anan C. 2008. Species of *Mycosphaerella* and related anamorphs on *Eucalyptus* leaves from Thailand. *Persoonia* 21: 77-91.
- Crous PW. 1998. *Mycosphaerella* spp. and their anamorphs associated with leaf spot diseases of *Eucalyptus*. *Mycologia Memoir* 21: 1-170.
- Crous PW, Braun U, Groenewald JZ. 2007a. *Mycosphaerella* is polyphyletic. *Studies in Mycology* 58: 1-32.
- Crous PW, Braun U, Schubert K, Groenewald JZ. 2007b. Delimiting *Cladosporium* from morphologically similar genera. *Studies in Mycology* 58:33-56
- Crous PW, Groenewald JZ. 2006. *Fungal Planet* no. 3
- Crous PW, Groenewald JZ, Mansilla JP, Hunter GC, Wingfield MJ. 2004. Phylogenetic reassessment of *Mycosphaerella* spp. and their anamorphs occurring on *Eucalyptus*. *Studies in Mycology* 50: 195-214.
- Crous PW, Groenewald JZ, Summerell BA, Wingfield BD, Wingfield MJ. 2009a. Co-occurring species of *Teratosphaeria* on *Eucalyptus*. *Persoonia* 22: 38-48.

- Crous PW, Hong L, Wingfield MJ, Wingfield BD, Kang J. 1999. *Uwebraunia* and *Dissoconium*, two morphologically similar anamorph genera with distinct teleomorph affinity. *Sydowia*, 52, 155-166.
- Crous PW, Hong L, Wingfield BD, Wingfield MJ. 2001. ITS rDNA phylogeny of selected *Mycosphaerella* species and their anamorphs occurring on Myrtaceae. *Mycological Research* 105: 425-431.
- Crous PW, Summerell BA, Carnegie AJ, Mohammed C, Himaman W, Groenewald JZ. 2007c. Follicolous *Mycosphaerella* spp. and their anamorphs on *Corymbia* and *Eucalyptus*. *Fungal Diversity* 26: 143-185.
- Crous PW, Schoch CL, Hyde KD, Wood AR, Gueidan C, de Hoog GS, Groenewald JZ. 2009d. Phylogenetic lineages in the Capnodiales. *Studies in Mycology* 64: 17-47S7.
- Crous PW, Summerell BA, Carnegie AJ, Wingfield MJ, Hunter GC, Burgess TI, Andjic V, Barber PA, Groenewald JZ. 2009b. Unravelling *Mycosphaerella*: do you believe in genera? *Persoonia* 23: 99-118.
- Crous PW, Summerell BA, Carnegie AJ, Wingfield MJ, Groenewald JZ. 2009c. Novel species of Mycosphaerellaceae and Teratosphaeriaceae. *Persoonia* 23: 119-146.
- Crous PW, Summerell BA, Mostert L, Groenewald JZ. 2008a. Host specificity and speciation of *Mycosphaerella* and *Teratosphaeria* species associated with leaf spots of Proteaceae. *Persoonia* 20: 59-86.
- Crous PW, Wingfield, MJ. 1996. Species of *Mycosphaerella* and their anamorphs associated with leaf blotch disease of *Eucalyptus* in South Africa. *Mycologia* 88: 441-458. 1996.
- Crous PW, Wingfield MJ, Mansilha JP, Alfenas AC, Groenewald JZ. 2006. Phylogenetic reassessment of *Mycosphaerella* spp. and their anamorphs occurring on *Eucalyptus*. II. *Studies in Mycology* 55: 99-131.
- Crous PW, Wood AR, Okada G, Groenewald JZ. 2008b. Follicolous microfungi occurring on Encephalartos. *Persoonia* 21: 135-146.

- Dhingra OD, Sinclair JB. 1995. Basic Plant Pathology Methods. Florida: CRC Press. 91-97.
- Eldridge KG, Davidson J, Harwood CE, van Wyk, G. 1993. Eucalypt domestication and breeding. Clarendon Press; Oxford University Press, Oxford : New York ; Melbourne.
- Fonsceca SM, Resende MDV, Alfenas AC, Guimarães LMS, Assis TF, Grattapaglia D. 2010. Manual prático de melhoramento genético do eucalipto. Viçosa, MG, Brasil: Editora UFV, 200p.
- Freeman JS, Potts BM, Vaillancourt RE. 2008. Few Mendelian genes underlie the quantitative response of a forest tree, *Eucalyptus globulus*, to a natural fungal epidemic. *Genetics* 178: 563-571.
- Geetha HA, Kularatne C, Lawrie AC, Barber PA, Keane P. 2004. A specific primer PCR and RFLP assay for the rapid detection and differentiation *in planta* of some *Mycosphaerella* species associated with foliar diseases of *Eucalyptus globulus*. *Mycological Research* 108: 1476-1493.
- Gezahgne A, Roux J, Hunter GC. 2006. *Mycosphaerella* species associated with leaf disease of *Eucalyptus globulus* in Ethiopia. *Forest Pathology* 36: 253-263.
- Glen M, Smith AH, Langrell SRH, Mohammed CL. 2007. Development of Nested Polymerase Chain Reaction Detection of *Mycosphaerella* spp. and Its Application to the Study of Leaf Disease in *Eucalyptus* Plantations. *Phytopathology* 97: 132-144.
- Hillis DM, Bull JJ. 1993. An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. *Systematic Biology* 42: 182-192.
- Hoog GS de, Hijwegen T, Batenburg-van der Vegte WH. 1991. A new species of *Dissoconium*. *Mycological Research* 95: 679-682.

- Hunter GC, Crous PW, Carnegie AJ, Wingfield MJ. 2009. *Teratosphaeria nubilosa*, a serious leaf disease pathogen of *Eucalyptus* spp. in native and introduced areas. *Molecular Plant Pathology* 10: 1-14.
- Hunter GC, Crous PW, Wingfield BD, Pongpanich K, Wingfield MJ. 2006b. *Pseudocercospora flavomarginata* sp. nov. from *Eucalyptus* leaves in Thailand. *Fungal Diversity* 22: 71-90.
- Hunter GC, van der Merwe NA, Burgess TI, Carnegie AJ, Wingfield BD, Crous PW, Wingfield MJ. 2008. Global movement and population biology of *Mycosphaerella nubilosa* infecting leaves of cold-tolerant *Eucalyptus globulus* and *E. nitens*. *Plant Pathology* 57: 235-242.
- Hunter GC, Wingfield BD, Crous PW, Wingfield MJ. 2006a. A multi-gene phylogeny for species of *Mycosphaerella* occurring on *Eucalyptus* leaves. *Studies in Mycology* 55: 147-161.
- Hunter GC, Roux J, Wingfield MJ, Wingfield BD, Crous PW. 2004. *Mycosphaerella* species causing *Mycosphaerella* leaf disease (MLD) on eucalypts in South African *Eucalyptus* plantations. *Mycological Research* 108:672-681.
- Jacobs KA, Rehner SA. 1998. Comparison of cultural and morphological and ITS sequences in *Botryosphaeria* and related taxa. *Mycologia* 90: 601-610.
- Jackson SL, Maxwell A, Neumeister-Kemp HG, Dell B, Hardy GE St J. 2005. Infection, hyperparasitism and conidiogenesis of *Mycosphaerella lateralis* on *Eucalyptus* in Western Australia. *Australasian Plant Pathology* 33: 49-53.
- Maxwell A, Hardy GE St J, Wingfield MJ, Dell B. 2000. First record of *Mycosphaerella lateralis* on *Eucalyptus* in Australia. *Australasian Plant Pathology* 29: 279.
- Maxwell A, Jackson SL, Dell B, Hardy GE St J. 2005. PCR-identification of *Mycosphaerella* species associated with leaf diseases of *Eucalyptus*. *Mycological research* 109: 992-1004.

- Milgate AW, Yuan ZQ, Vaillancourt RE, Mohammed C. 2001. *Mycosphaerella* species occurring on *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus nitens* plantations of Tasmania, Australia. *Forest Pathology* 31: 53-63.
- NCBI – www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank
- Page RDM. 1996. TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences* 12: 357–358.
- Park RF, Keane PJ. 1984. Further *Mycosphaerella* species causing leaf diseases of *Eucalyptus*. *Transactions of the British Mycological Society* 83 93-105.
- Park RF, Keane PJ. 1987. Spore production by *Mycosphaerella* species causing leaf diseases of *Eucalyptus*. *Transactions of the British Mycological Society* 89 461-470.
- Park RF, Keane PJ. 1982. Three *Mycosphaerella* species from leaf disease of *Eucalyptus*. *Transactions of the British Mycological Society* 79: 95-100.
- Pereira JM, Barreto RW, Ellison CA, Maffia LA. 2003. *Corynespora cassiicola* f. sp. *lantanae*: a potential biocontrol agent from Brazil for *Lantana camara*. *Biological Control* 26: 21-31.
- Pérez CA, Wingfield MJ, Altier NA, Blachette RA. 2009. *Mycosphaerella* and *Teratosphaeria* associated with *Eucalyptus* leaf diseases and stem cankers in Uruguay. *Forest Pathology* 39: 349-360.
- Pérez G, Hunter GC, Slippers G, Pérez C, Wingfield BD, Wingfield MJ. 2009a. *Teratosphaeria* (*Mycosphaerella*) *nubilosa*, the causal agent of *Mycosphaerella* Leaf Disease (MLD), recently introduced into Uruguay. *European Journal of Plant Pathology* 125: 109-118.
- Pérez G, Slippers B, Wingfield BD, Finkenauer E, Wingfield MJ. 2009b. *Mycosphaerella* leaf disease (MLD) outbreak on *Eucalyptus globulus* in

- Brazil caused by *Teratosphaeria* (*Mycosphaerella*) *nubilosa*. *Phytopathology Mediterranea* 48: 302-306.
- Pinkard EA, Mohammed CL. 2006. Photosynthesis of *Eucalyptus globulus* with *Mycosphaerella* leaf disease. *New Phytologist* 170: 119-27.
- Rambaut A. 2002. Sequence Alignment Editor. Version 2.0. Department of Zoology, University of Oxford, Oxford.
- SAS Institute (Cary, USA). 1989. SAS/STAT User's guide, version 6. 4.ed., Cary v.1. 943p.
- Schoch CL, Crous PW, Groenewald JZ, Boehm EWA, Burgess TI, de Gruyter J, de Hoog GS, Dixon LJ, Grube M, Gueidan C, Harada Y, Hatakeyama S, Hirayama K, Hosoya T, Huhndorf SM, Hyde KD, Jones EBG, Kohlmeyer J, Kruys A, Li YM, Lucking R, Lumbsch HT, Marvanova L, Mbatchou JS, McVay AH, Miller AN, Mugambi GK, Muggia L, Nelsen MP, Nelson P, Owensby CA, Phillips AJL, Phongpaichit S, Pointing SB, Pujade-Renaud V, Raja HA, Plata ERivas, Robbertse B, Ruibal C, Sakayaroj J, Sano T, Selbmann L, Shearer CA, Shirouzu T, Slippers B, Suetrong S, Tanaka K, Volkmann-Kohlmeyer B, Wingfield MJ, Wood AR, Woudenberg JHC, Yonezawa H, Zhang Y, Spatafora JW. 2009. A class-wide phylogenetic assessment of Dothideomycetes. *Studies in Mycology* 64: 1-1510.
- Schoch CL, Kohlmeyer J, Volkmann-Kohlmeyer B, Tsui CK, Spatafora JW. 2006. The halotolerant fungus *Glomerobolus gelineus* is a member of the Ostropales. *Mycol Res* 110: 257–263.
- Shoemaker RA, Hambleton S. 2005. *Dothidea sambuci* and *Diaporthe spiculosa*. *Canadian Journal of Botany* 83: 484-490.
- Silva M, Machado H, Phillips AJL. 2009. *Mycosphaerella* species occurring on *Eucalyptus globulus* in Portugal. *European Journal Plant Pathology* 125: 425-433.
- Simon UK, Groenewald JZ, Crous PW. 2009. *Cymadothea trifolii*, an obligate biotrophic leaf parasite of trifolium, belongs to *Mycosphaerellaceae* as shown by nuclear ribosomal DNA analyses. *Persoonia* 22: 49-55.

- Swofford DL. 2003. PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Verkley GJM, Starink-Willemse M, van Iperen A, Abeln ECA. 2004. Phylogenetic analyses of *Septoria* species based on the ITS and LSU-D2 regions of nuclear ribosomal DNA Mycologia 96: 558-57.
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds), PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications: 315-322. Academic Press, San Diego, California, USA.