

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

Desenvolvimento e validação de marcadores microssatélites para *Calonectria pteridis* e espécies associadas à mancha-de-calonectria no Sul do Brasil

Renata Sena Cardoso
Doctor Scientiae

VIÇOSA - MINAS GERAIS
2026

RENATA SENA CARDOSO

Desenvolvimento e validação de marcadores microssatélites para *Calonectria pteridis* e espécies associadas à mancha-de-calonectria no Sul do Brasil

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

Orientador: Rafael Ferreira Alfenas

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2026**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

C268d
2026

Cardoso, Renata Sena, 1992-

Desenvolvimento e validação de marcadores microsatélites para *Calonectria pteridis* e espécies associadas à mancha-de-calonectria no Sul do Brasil / Renata Sena Cardoso. – Viçosa, MG, 2026.

1 tese eletrônica (102 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Rafael Ferreira Alfenas.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Fitopatologia, 2026.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2026.447>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Fungos fitopatogênicos. 2. *Calonectria* - Genética. 3. Eucalipto - Doenças e pragas - Etiologia. 4. Marcadores genéticos. I. Alfenas, Rafael Ferreira, 1983-. II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Fitopatologia. Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia. III. Título.

CDD 22. ed. 632.4677

RENATA SENA CARDOSO

Desenvolvimento e validação de marcadores microssatélites para *Calonectria pteridis* e espécies associadas à mancha-de-calonectria no Sul do Brasil

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

APROVADA: 27 de abril de 2026.

Assentimento:

Renata Sena Cardoso
Autora

Rafael Ferreira Alfenas
Orientador

Essa tese foi assinada digitalmente pela autora em 25/08/2026 às 18:59:57 e pelo orientador em 03/09/2026 às 10:09:27. As assinaturas têm validade legal, conforme o disposto na Medida Provisória 2.200-2/2001 e na Resolução nº 37/2012 do CONARQ. Para conferir a autenticidade, acesse <https://siadoc.ufv.br/validar-documento>. No campo 'Código de registro', informe o código **WET8.MSN7.LFSM** e clique no botão 'Validar documento'.

A Deus e à Nossa Senhora de Nazaré.
Aos meus pais, Rosa e Luiz Alberto.
À minha irmã, Brena, e à minha afilhada, Daniela.

AGRADECIMENTOS

A Deus e à Nossa Senhora de Nazaré, pela vida, pela intercessão constante e pela força para superar os desafios desta caminhada.

Aos meus pais, Rosa do Carmo Cantão Cardoso e Luiz Alberto Sena Cardoso, pelo amor, apoio incondicional e pelos sacrifícios em prol da minha educação. Este título também é de vocês.

À minha irmã, Brenna Sena Cardoso, e à minha afilhada, Daniela Sena Pinheiro, pela parceria e por serem fonte de alegria.

Ao meu orientador, Rafael Ferreira Alfenas, pela orientação segura, pela confiança depositada e por compartilhar conhecimentos fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Professor Acelino Couto Alfenas e a todos os integrantes do Laboratório de Patologia Florestal (PATOMOL/UFV). Meu sincero agradecimento a todos que fazem parte desta equipe — técnicos, pós-graduandos e estudantes de iniciação científica. Tive a imensa sorte de conviver com pessoas maravilhosas; agradeço a ajuda mútua nas rotinas de pesquisa e por tornarem o dia a dia no laboratório muito mais leve e produtivo ao longo desses anos. À Marcia Queiroz, pela contribuição inicial e solicitude no início deste projeto.

Ao companheiro, amigo e confidente, Lucas Abreu, por estar ao meu lado em cada etapa, desde as revisões dos textos até as caronas tarde da noite em dias de experimento. Sua presença tornou esta jornada possível e muito mais feliz.

À Professora Eveline Caixeta e à equipe do Laboratório do Biocafé (Embrapa Café/UFV), pela acolhida e apoio nas análises.

Aos meus amigos de Viçosa, em especial Jessiane e Jose Neto, por tornarem essa caminhada mais leve e por fazerem da cidade um verdadeiro lar.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV) e ao Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, pela oportunidade de formação.

Este trabalho foi realizado com o apoio das seguintes agências de pesquisa brasileiras: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

“Eu sei que não ando só, pois Maria caminha comigo.”

RESUMO

CARDOSO, Renata Sena, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, abril de 2026.
Desenvolvimento e validação de marcadores microssatélites para *Calonectria pteridis* e espécies associadas à mancha-de-calonectria no Sul do Brasil.
Orientador: Rafael Ferreira Alfenas.

A mancha-de-calonectria constitui uma das principais doenças foliares do eucalipto no Brasil, causando desfolha severa, redução do crescimento e, conseqüentemente, redução da produtividade de madeira. A etiologia dessa doença é complexa, envolvendo múltiplas espécies do gênero *Calonectria*, cuja elevada similaridade morfológica e diversidade taxonômica dificultam a identificação precisa dos agentes etiológicos e a compreensão de sua dinâmica epidemiológica. Embora *Calonectria pteridis* seja amplamente reconhecida como o principal agente causal da doença em regiões tropicais e equatoriais do Brasil, pouco se conhece sobre estrutura genética populacional, variabilidade intraespecífica e dinâmica evolutiva associada aos isolados pertencentes ao complexo *Calonectria pteridis*. Adicionalmente, evidências recentes indicam que a etiologia da mancha-de-calonectria em regiões subtropicais do Sul do Brasil difere substancialmente daquela observada em áreas de clima mais quente, com predomínio de espécies pertencentes ao complexo *Calonectria candelabrum*. Nesse contexto, esta tese teve como objetivo ampliar o conhecimento sobre a diversidade e estrutura genética populacional de *Calonectria* e sobre as espécies associadas à mancha-de-calonectria em eucalipto no Brasil, integrando ferramentas de genética populacional e filogenia. No primeiro capítulo, foram desenvolvidos e validados marcadores microssatélites (SSR) genômicos e gênicos para isolados pertencentes ao complexo *Calonectria pteridis*, posteriormente aplicados à investigação da diversidade genética e da estrutura populacional em diferentes regiões produtoras de eucalipto no Brasil. Os resultados revelaram diversidade genética moderada, estruturação populacional significativa entre regiões geográficas e evidências de predominância de reprodução clonal, além de elevada transferibilidade dos marcadores para espécies filogeneticamente relacionadas. No segundo capítulo, análises filogenéticas multilocus permitiram identificar as espécies associadas à mancha-de-calonectria em plantios de eucalipto localizados no Sul do Brasil, demonstrando a predominância de espécies pertencentes ao complexo *Calonectria candelabrum*, além da identificação de linhagens filogeneticamente distintas potencialmente não descritas. Em conjunto, os resultados ampliam o entendimento da diversidade de *Calonectria* e das espécies associadas à mancha-de-calonectria no Brasil,

subsidiando o refinamento taxonômico, o manejo da doença e o melhoramento do eucalipto para resistência.

Palavras-chave: marcadores moleculares; filogenia; estudo etiológico; clima; *Cylindrocladium*

ABSTRACT

CARDOSO, Renata Sena, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, April, 2026.
Development and Validation of Microsatellite Markers for *Calonectria pteridis* and Species Associated with Calonectria Leaf Blight in Southern Brazil.
Adviser: Rafael Ferreira Alfenas.

Calonectria leaf blight is one of the most important foliar diseases of eucalyptus in Brazil, causing severe defoliation, reduced tree growth, and, consequently, reduced wood productivity. The etiology of this disease is complex, involving multiple species of the genus *Calonectria*, whose high morphological similarity and taxonomic diversity hinder the accurate identification of the causal agents and the understanding of their epidemiological dynamics. Although *Calonectria pteridis* is widely recognized as the primary causal agent of the disease in tropical and equatorial regions of Brazil, little is known about the population genetic structure, intraspecific variability, and evolutionary dynamics associated with isolates belonging to the *Calonectria pteridis* species complex. Additionally, recent evidence indicates that the etiology of Calonectria leaf blight in subtropical regions of southern Brazil differs substantially from that observed in warmer regions, with a predominance of species belonging to the *Calonectria candelabrum* species complex. In this context, this thesis aimed to expand the current knowledge of the diversity and population genetic structure of *Calonectria*, as well as the species associated with Calonectria leaf blight in eucalyptus in Brazil, integrating population genetics and phylogenetic approaches. In the first chapter, genomic and genic simple sequence repeat (SSR) markers were developed and validated for isolates belonging to the *Calonectria pteridis* species complex and subsequently applied to investigate the genetic diversity and population structure of isolates from different eucalyptus-producing regions in Brazil. The results revealed moderate genetic diversity, significant population structuring among geographic regions, evidence of predominant clonal reproduction, and high transferability of the markers to phylogenetically related species. In the second chapter, multilocus phylogenetic analyses enabled the identification of the species associated with Calonectria leaf blight in eucalyptus plantations located in southern Brazil, demonstrating the predominance of species belonging to the *Calonectria candelabrum* species complex, as well as the identification of phylogenetically distinct lineages that are potentially undescribed. Collectively, these findings expand the current understanding of *Calonectria* diversity and the species associated with Calonectria leaf blight in Brazil, providing support for taxonomic refinement, disease

management, and eucalyptus breeding for disease resistance.

Keywords: molecular markers; phylogeny; climate; *Cylindrocladium*

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	12
REFERÊNCIAS	15
CAPÍTULO 1.....	17
Desenvolvimento, caracterização e validação de marcadores microsatélites genômicos e gênicos para <i>Calonectria pteridis</i>.....	17
RESUMO	17
1. INTRODUÇÃO.....	20
2. MATERIAL E MÉTODOS	24
2.1 Obtenção e caracterização dos isolados	24
2.2 Origem do genoma e mineração de SSRs	25
2.3 Identificação de SSRs gênicos candidatos	26
2.4 Seleção dos marcadores SSR	26
2.5 Desenho dos primers e validação <i>in silico</i>	27
2.6 Condições de cultivo e extração de DNA	28
2.7 Amplificação por PCR e otimização das condições de anelamento	29
2.8 Validação preliminar por eletroforese em gel de poliacrilamida	29
2.9 Genotipagem por eletroforese capilar e determinação de alelos	30
2.10 Análises de diversidade genética e genotípica no complexo <i>C. pteridis</i>	31
2.11 Estrutura genética e rede de genótipos multilocus	32
2.12 Comparação entre marcadores SSR gênicos e genômicos e sua relação com a agressividade	33
2.13 Avaliação da transferibilidade entre complexos de espécies	34
3. RESULTADOS	35
3.1 Mineração e caracterização de microsatélites (SSRs)	35
3.2 Validação e polimorfismo dos marcadores SSR	40
3.3 Diversidade genética e diversidade genotípica	40
3.4 Estrutura genética e Rede de genótipos multilocus	42

3.5 Comparação entre marcadores SSR gênicos e genômicos e sua relação com a agressividade	46
3.6 Transferibilidade dos marcadores SSR entre complexos de espécies	50
4. DISCUSSÃO.....	53
CONCLUSÕES.....	58
REFERÊNCIAS	59
APÊNDICES	65
CAPÍTULO 2.....	71
Espécies associadas à mancha-de-calonectria em plantios de <i>E. dunnii</i> e <i>E. benthamii</i> no Sul do Brasil	71
RESUMO	71
1. INTRODUÇÃO.....	75
2. MATERIAL E MÉTODOS	77
2.1 Coletas de amostras, isolamento e obtenção de culturas monospóricas.....	77
2.2 Extração do DNA, PCR e sequenciamento	78
2.3 Análises filogenéticas multigênicas	80
3. RESULTADOS	82
3.1 Isolamento e caracterização preliminar dos isolados	82
3.2 Análises filogenéticas multilocus	86
3.3 Análises filogenéticas por locus	88
3.4 Análise filogenética comparativa com isolados de <i>Calonectria</i> descritos por Miranda <i>et al.</i> (2021) no Sul do Brasil	89
4. DISCUSSÃO.....	92
REFERÊNCIAS	95
APÊNDICES	99

INTRODUÇÃO GERAL

A eucaliptocultura representa um dos setores de maior relevância econômica em escala global, destacando-se pela elevada produtividade, ampla adaptabilidade a diferentes condições edafoclimáticas e múltiplas aplicações industriais da madeira. No Brasil, os plantios comerciais de espécies e híbridos de *Eucalyptus* ocupam milhões de hectares e sustentam importantes cadeias produtivas, incluindo os setores de celulose e papel, biomassa energética, carvão vegetal, madeira serrada e painéis reconstituídos (Ibá, 2025). A expressiva importância econômica da cultura posiciona o país entre os principais produtores florestais do mundo e reforça a necessidade de adoção de estratégias que assegurem a sanidade e a sustentabilidade dos plantios florestais (Alfenas et al., 2009).

Entretanto, a intensificação dos sistemas de produção e a expansão do cultivo de eucalipto para novas regiões têm favorecido a ocorrência e o estabelecimento de diversos problemas fitossanitários, dentre os quais se destacam as doenças foliares causadas por fungos fitopatogênicos (Schultz, 2011; Schultz et al., 2015). Essas enfermidades podem comprometer significativamente o crescimento inicial das plantas, reduzir a área fotossintética, elevar os custos de produção e, em casos severos, inviabilizar viveiros e plantios comerciais (Alfenas et al., 2009; Soares et al., 2017).

Entre as principais doenças foliares associadas à cultura do eucalipto, destaca-se a mancha-de-calonectria, amplamente distribuída em regiões produtoras e reconhecida por causar severos danos em viveiros e plantios (Schultz et al., 2015; Soares et al., 2017). A doença caracteriza-se pela formação de manchas foliares seguidas de desfolha intensa e redução do vigor vegetativo das plantas, podendo comprometer significativamente a produtividade florestal quando não manejada adequadamente (Alfenas et al., 2009). Em situações de alta severidade, os prejuízos podem alcançar reduções de até 45% no incremento volumétrico médio anual das florestas (Alfenas et al., 2013). O desenvolvimento da doença é favorecido por condições de elevada umidade relativa, molhamento foliar prolongado e temperaturas elevadas, fatores frequentemente observados em importantes regiões produtoras de eucalipto no Brasil (Graça et al., 2009; Wu & Chen, 2021).

A mancha-de-calonectria é causada por espécies do gênero *Calonectria*, um grupo de fungos fitopatogênicos de ampla distribuição geográfica e reconhecida importância econômica para culturas agrícolas e florestais (Crous, 2002; Li *et al.*, 2022). O gênero apresenta elevada diversidade taxonômica e inclui numerosas espécies morfológicamente semelhantes, frequentemente organizadas em complexos de espécies, o que dificulta a identificação precisa baseada exclusivamente em caracteres fenotípicos (Liu *et al.*, 2020; Banerjee *et al.*, 2025). Essa elevada complexidade taxonômica consolidou a filogenia molecular como ferramenta indispensável para a correta delimitação de espécies dentro do gênero.

No Brasil, estudos prévios demonstraram que a etiologia da mancha-de-calonectria em regiões de clima quente e úmido encontra-se relativamente bem estabelecida, sendo isolados previamente identificados como *C. pteridis* frequentemente associados à doença em plantios comerciais de eucalipto (Alfenas *et al.*, 2015; Freitas *et al.*, 2019). Apesar dos avanços obtidos na caracterização etiológica do patossistema nessas regiões, o conhecimento acerca da variabilidade genética e da estrutura populacional de populações pertencentes ao complexo *C. pteridis* ainda permanece limitado. A compreensão desses aspectos é essencial para elucidar padrões de dispersão, fluxo gênico, modo reprodutivo e potencial adaptativo do patógeno, fornecendo subsídios importantes para programas de manejo integrado da doença e melhoramento genético visando à resistência (Freitas *et al.*, 2019).

Para investigações dessa natureza, marcadores microssatélites (*Simple Sequence Repeats* – SSR) destacam-se como ferramentas moleculares de alta resolução amplamente empregadas em estudos de genética populacional de fungos fitopatogênicos (Weising *et al.*, 1995; Agarwal *et al.*, 2008; Vieira *et al.*, 2016). Esses marcadores consistem em regiões genômicas compostas por repetições curtas de padrões de nucleotídeos em série (tandem), altamente polimórficas, codominantes e amplamente distribuídas ao longo do genoma, características que lhes conferem elevado poder discriminatório para análises intraespecíficas (Agarwal *et al.*, 2008; Vieira *et al.*, 2016). Em fungos fitopatogênicos, os SSRs têm sido amplamente utilizados para inferir diversidade genética, estrutura populacional, fluxo gênico, padrões reprodutivos e processos microevolutivos (Leblanc *et al.*, 2019). Dessa forma, a aplicação desses

marcadores em populações de isolados pertencentes ao complexo *C. pteridis* representa uma abordagem promissora para aprofundar o entendimento sobre a diversidade genética, a estrutura populacional e os processos evolutivos associados ao complexo de espécies em regiões onde sua ocorrência já está consolidada.

Em contraste com o cenário etiológico da mancha-de-calonectria nas regiões central e norte do país, ocorrências recentes de surtos da doença observados em regiões de clima mais ameno nos estados do Sul do Brasil têm revelado um cenário distinto daquele previamente descrito para áreas tropicais e subtropicais quentes (Soares *et al.*, 2017; Miranda *et al.*, 2021). Nessas condições de ambiente, a mancha-de-calonectria tem sido preliminarmente associada a espécies do complexo *C. candelabrum*. A ocorrência de espécies pertencentes a esse complexo leva à hipótese de que a composição de espécies associadas à mancha-de-calonectria em regiões de clima mais frio possa diferir substancialmente daquela observada em áreas de clima quente, onde se concentra a maior área plantada com eucalipto no Brasil.

Dessa forma, o avanço no entendimento da mancha-de-calonectria em eucalipto no Brasil demanda abordagens complementares capazes de investigar tanto a variabilidade intraespecífica de patógenos já estabelecidos em importantes regiões produtoras quanto a correta delimitação taxonômica de espécies emergentes associadas a novos ambientes. Assim, esta tese foi desenvolvida com o objetivo de ampliar o conhecimento sobre a diversidade, a estrutura genética populacional e as espécies de *Calonectria* associadas à mancha-de-calonectria em eucalipto no Brasil, integrando ferramentas de genética populacional e sistemática molecular para compreender diferentes níveis de diversidade biológica dentro desse patossistema. Para atingir esse objetivo, a tese foi estruturada em dois capítulos. O primeiro capítulo aborda o desenvolvimento, caracterização e aplicação de marcadores microssatélites gênicos e genômicos para a investigação da diversidade genética e da estrutura genética de isolados pertencentes ao complexo *Calonectria pteridis*, frequentemente associado à mancha-de-calonectria em regiões tropicais e equatoriais do Brasil. Essa abordagem permitiu aprofundar o entendimento sobre a variabilidade genética intraespecífica, os padrões de estrutura populacional e os potenciais processos evolutivos que moldam populações desse importante fitopatógeno.

O segundo capítulo contempla a análise filogenética molecular multilocus visando à identificação de isolados pertencentes ao complexo *Calonectria candelabrum* associados à mancha-de-calonectria em plantios de eucalipto localizados no Sul do Brasil. Este capítulo teve como objetivo identificar as espécies associadas à mancha-de-calonectria em um novo cenário epidemiológico, caracterizado por condições climáticas contrastantes em relação às áreas tradicionalmente afetadas, além de contribuir para o refinamento taxonômico deste complexo de espécies.

REFERÊNCIAS

AGARWAL, M.; SHRIVASTAVA, N.; PAHLADEVI, R. Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 27, p. 617–631, 2008.

ALFENAS, A. C. *et al.* **Clonagem e doenças do eucalipto**. 2. ed. Viçosa: Editora UFV, 2009.

ALFENAS, R. F. *et al.* Diversity and potential impact of *Calonectria* species in *Eucalyptus* plantations in Brazil. **Studies in Mycology**, v. 80, p. 89–130, 2015.

ALFENAS, R. F. *et al.* Mass spore production and inoculation of *Calonectria pteridis* on *Eucalyptus* spp. under different environmental conditions. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 38, n. 5, p. 406–413, 2013.

BANERJEE, S. *et al.* Morphological and multilocus phylogenetic evidence confirms *Calonectria pseudoreteauidii* as the causal agent of leaf spot and blight on *Manilkara hexandra* in India. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 140, art. 102877, 2025.

CROUS, P. W. **Taxonomy and pathology of *Cylindrocladium* (*Calonectria*) and allied genera**. St. Paul: APS Press, 2002.

FREITAS, R. G. *et al.* Genetic diversity and aggressiveness of *Calonectria pteridis* associated with eucalyptus leaf blight. **Plant Pathology**, Oxford, v. 68, p. 147–157, 2019.

GRAÇA, R. N. *et al.* Factors influencing infection of eucalypts by *Cylindrocladium pteridis*. **Plant Pathology**, v. 58, n. 5, p. 971–981, 2009.

IBÁ – INDÚSTRIA BRASILEIRA DE ÁRVORES. *Relatório anual 2025*. 2025. Disponível em: <https://iba.org/wp-content/uploads/2025/10/relatorioAnual2025.pdf>. Acesso em: 15 mar. 2026.

LEBLANC, N. *et al.* Limited genetic diversity across pathogen populations responsible for the global emergence of boxwood blight identified using SSRs. **Plant Pathology**, Oxford, v. 68, n. 5, p. 861–868, 2019.

LI, J. *et al.* *Calonectria* in the age of genes and genomes: towards understanding an important but relatively unknown group of pathogens. **Molecular Plant Pathology**, v. 23, p. 1060–1072, 2022.

LIU, Q. L. *et al.* Reconsideration of species boundaries and proposed DNA barcodes for *Calonectria*. **Studies in Mycology**, v. 97, art. 100106, 2020.

LOMBARD, L. *et al.* Species concepts in *Calonectria* (*Cylindrocladium*). **Studies in Mycology**, v. 66, p. 15–30, 2010.

MIRANDA, I. D. S. *et al.* Occurrence of *Calonectria* leaf blight in *Eucalyptus benthamii* progenies and potential for disease resistance. **Tropical Plant Pathology**, v. 46, p. 254–264, 2021.

SCHULTZ, B. *et al.* Impact of *Cylindrocladium candelabrum* leaf spot in young plantations of *Eucalyptus benthamii* in Rio Negrinho, Santa Catarina State. **Ciência Florestal**, v. 25, n. 2, p. 307–316, 2015.

SCHULTZ, B. **Mancha foliar em *Eucalyptus benthamii* no Sul do Brasil**. 2011. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

SOARES, I. D. *et al.* **Fungos associados à mancha foliar em *Eucalyptus benthamii* Maiden et Cambage na região Sul do Brasil**. Colombo: Embrapa Florestas, 2017.

VIEIRA, M. L. C. *et al.* Microsatellite markers: what they mean and why they are so useful. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 39, n. 3, p. 312–328, 2016.

WEISING, K. *et al.* **DNA fingerprinting in plants and fungi**. Boca Raton: CRC Press, 1995.

WU, W. X.; CHEN, S. F. Species diversity, mating strategy and pathogenicity of *Calonectria* species from diseased leaves and soils in the *Eucalyptus* plantation in Southern China. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 1, art. 73, 2021.

CAPÍTULO 1

Desenvolvimento, caracterização e validação de marcadores microssatélites genômicos e gênicos para *Calonectria pteridis*

RESUMO

A mancha-de-calonectria figura entre as principais doenças foliares do eucalipto no Brasil, sendo espécies pertencentes ao complexo *Calonectria pteridis* amplamente reconhecidas como importantes agentes etiológicos em regiões tropicais e equatoriais do país. Apesar de sua relevância fitossanitária, o conhecimento acerca da diversidade genética e da estrutura populacional desse complexo de espécies ainda é limitado, sobretudo em razão da escassez de marcadores moleculares codominantes e altamente informativos específicos. Este estudo teve como objetivos desenvolver e validar marcadores microssatélites (SSR) genômicos e gênicos para isolados pertencentes ao complexo *Calonectria pteridis*, bem como usá-los na investigação da diversidade genética, da estrutura populacional e de possíveis associações entre variabilidade genética e agressividade dos isolados. Adicionalmente, avaliou-se a transferibilidade interespecífica dos marcadores para espécies filogeneticamente relacionadas de *Calonectria*. Foram identificados 4.660 loci SSR no genoma de *C. pteridis*. Após mineração *in silico*, desenho de primers e validação experimental, 13 marcadores polimórficos foram selecionados e utilizados na genotipagem de 94 isolados pertencentes ao complexo *C. pteridis*, provenientes de diferentes regiões eucaliptocultoras no Brasil. Foram identificados 36 genótipos multilocus, indicando diversidade genética moderada ($H_{exp} = 0,34$), com maior riqueza genotípica na população do Pará. O desequilíbrio de ligação significativo ($rD = 0,125$; $p < 0,001$) sugere predominância de reprodução clonal, possivelmente associada à estruturação populacional. Observou-se diferenciação genética significativa entre populações ($\Phi_{ST} = 0,366$; $p = 0,001$), com 36,62% da variação atribuída às diferenças entre estados. A ampla distribuição de genótipos indica persistência e expansão clonal. Não houve associação consistente entre perfis genéticos e agressividade. Os marcadores apresentaram alta transferibilidade para espécies dos complexos *C. candelabrum* e *C. cylindrospora*. Em conjunto, os resultados fornecem ferramentas robustas para estudos populacionais e ampliam o entendimento da dinâmica evolutiva e epidemiológica do patógeno.

Palavras-chave: SSR; Diversidade genética; Eucalipto; Marcadores moleculares; Transferibilidade.

CHAPTER I

Development, characterization, and validation of genomic and genic microsatellite markers for *Calonectria pteridis*

ABSTRACT

Calonectria leaf blight is among the most important foliar diseases of eucalyptus in Brazil, and species belonging to the *Calonectria pteridis* species complex are widely recognized as important etiological agents in tropical and equatorial regions of the country. Despite its phytosanitary relevance, knowledge regarding the genetic diversity and population structure of this species remains limited, mainly due to the scarcity of codominant and highly informative molecular markers specific to the pathogen. This study aimed to develop and validate genomic and genic microsatellite (SSR) markers for isolates belonging to the *Calonectria pteridis* species complex and to apply them to investigate genetic diversity, population structure, and possible associations between genetic variability and isolate aggressiveness. Additionally, the interspecific transferability of the markers was evaluated for phylogenetically related *Calonectria* species. A total of 4,660 SSR loci were identified in the genome of *C. pteridis*. Following *in silico* mining, primer design, and experimental validation, 13 polymorphic markers were selected and used to genotype 94 isolates belonging to the *C. pteridis* species complex collected from different eucalyptus-growing regions in Brazil. Thirty-six multilocus genotypes were identified, indicating moderate genetic diversity ($H_{exp} = 0.34$), with the highest genotypic richness observed in the Pará population. Significant linkage disequilibrium ($r_D = 0.125$; $p < 0.001$) suggested a predominance of clonal reproduction, possibly associated with population structuring. Significant genetic differentiation was observed among populations ($\Phi_{ST} = 0.366$; $p = 0.001$), with 36.62% of the variation attributed to differences among states. The broad distribution of genotypes indicates persistence and clonal expansion. No consistent association was observed between genetic profiles and aggressiveness. The markers showed high transferability to species belonging to the *C. candelabrum* and *C. cylindrospora* species complexes. Overall, the results provide robust tools for population studies and expand the understanding of the evolutionary and epidemiological dynamics of the pathogen.

Keywords: SSR; genetic diversity; eucalyptus; molecular markers; transferability.

1. INTRODUÇÃO

A eucaliptocultura ocupa posição estratégica no setor florestal brasileiro, sustentando cadeias produtivas de elevada relevância econômica, industrial e ambiental (Ibá, 2025). A competitividade desse setor está condicionada não apenas aos avanços no melhoramento genético e ao aprimoramento das práticas silviculturais, como também à manutenção da sanidade dos plantios ao longo dos ciclos produtivos (Alfenas *et al.*, 2009). Nesse contexto, as doenças de origem biótica assumem papel central, na medida em que podem comprometer a produtividade das plantações e impactar negativamente o retorno econômico dos sistemas de produção.

Dentre as principais doenças de origem biótica, destaca-se a mancha-de-calonectria, uma enfermidade de ampla distribuição geográfica e importância global, com registros de epidemias em diferentes países, associadas à redução significativa no crescimento das plantas (Rodas *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2011; Pham *et al.*, 2019). Em condições de campo, o patógeno infecta preferencialmente folhas mais velhas, situadas na porção basal da copa. Os sintomas iniciais caracterizam-se pela formação de pequenas lesões foliares, de formato arredondado a alongado, com coloração cinza-clara, frequentemente circundadas por halo arroxeadado a avermelhado e, por vezes, acompanhadas pela produção de conídios branco-brilhantes na superfície abaxial do limbo foliar (Alfenas *et al.*, 2009). À medida que a doença progride, essas lesões tendem a coalescer, podendo ocupar extensas áreas do limbo foliar, induzir a desfolha precoce e reduzir o incremento volumétrico médio anual em até 45% (Alfenas *et al.*, 2013). Em viveiros, o patógeno pode ocasionar manchas foliares necróticas expansivas, lesões em caules, podridão de estacas e tombamento de mudas, resultando em perdas expressivas na produção (Alfenas *et al.*, 2009).

A etiologia da mancha-de-calonectria em eucalipto é complexa, uma vez que diferentes espécies do fungo podem estar associadas à doença. No Brasil, observa-se elevada diversidade do gênero *Calonectria*, com táxons distribuídos em distintos complexos de espécies, incluindo *Calonectria pteridis*, *Calonectria brassicae*, *Calonectria candelabrum*, *Calonectria cylindrospora* e *Calonectria naviculata*. Esse cenário evidencia a ampla representatividade desses clados em diferentes regiões geográficas do país (Alfenas *et al.*, 2015; Bose *et al.*, 2023; Sánchez-González *et al.*, 2022). Essa complexidade tem sido ampliada pelos

avanços em estudos taxonômicos e filogenéticos, os quais têm resultado em importantes revisões nomenclaturais e na delimitação de múltiplas espécies de relevância fitopatológica no gênero (Lombard *et al.*, 2010; Lombard *et al.*, 2015; Alfenas *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2020). Assim, compreender a diversidade de *Calonectria* torna-se fundamental não apenas para a diagnose precisa da doença, mas também para a interpretação de sua epidemiologia, distribuição geográfica e risco fitossanitário.

Entretanto, *Calonectria pteridis* Crous, M.J. Wingf. & Alfenas tem sido a espécie mais frequentemente associada a epidemias em plantios de eucalipto em regiões mais quentes e úmidas do Brasil (Alfenas *et al.*, 2015; Freitas *et al.*, 2019). O primeiro relato de *C. pteridis* em eucalipto no Brasil ocorreu na década de 1990, causando mancha foliar e desfolha em *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden, no sudeste da Bahia. Desde então, a mancha-de-calonectria tem sido reportada nos estados do Pará, Maranhão e Bahia (Alfenas *et al.*, 2015), bem como, mais recentemente, em Mato Grosso do Sul e Alagoas, onde tem ocasionado epidemias severas em plantios de eucalipto. A doença já foi registrada na maioria das espécies de eucalipto cultivadas no Brasil, incluindo *Eucalyptus camaldulensis*, *Eucalyptus cloeziana*, *Eucalyptus grandis*, *Eucalyptus saligna*, *Eucalyptus tereticornis*, *Eucalyptus urophylla* e o híbrido *Eucalyptus grandis* × *Eucalyptus urophylla* (Alfenas *et al.*, 2009).

O uso de genótipos resistentes constitui, atualmente, a estratégia mais eficiente e economicamente viável para o manejo da mancha-de-calonectria em eucalipto. Entretanto, a durabilidade da resistência genética está diretamente relacionada à compreensão da variabilidade genética e da estrutura populacional do patógeno, uma vez que populações geneticamente diversas podem apresentar maior capacidade adaptativa e potencial de superação da resistência do hospedeiro (Alfenas *et al.*, 2009; Fonseca *et al.*, 2010). Nessa perspectiva, estudos voltados à caracterização da diversidade de isolados pertencentes ao complexo *C. pteridis* são fundamentais para subsidiar programas de melhoramento genético, especialmente na seleção de clones resistentes.

Nesse contexto, marcadores moleculares têm sido amplamente empregados na investigação da diversidade genética de espécies de *Calonectria*. Entre as principais técnicas utilizadas, destacam-se ISSR (Freitas *et al.*, 2019), RFLP-PCR (Gehesquière *et al.*, 2016), RAPD-PCR (Mohanty *et al.*, 2012) e SSR

(Leblanc *et al.*, 2019). Estudos prévios baseados em marcadores ISSR indicaram baixa diversidade genética em isolados pertencentes ao complexo *C. pteridis* provenientes da região Norte do Brasil, sugerindo possível ocorrência de fluxo gênico entre populações geograficamente distintas (Freitas *et al.*, 2019). Contudo, marcadores dominantes, como os ISSR, apresentam limitações na detecção da variabilidade genética, sobretudo em função do menor conteúdo informativo por loco, o que resulta em redução do poder discriminatório quando comparados a marcadores codominantes (Faleiro, 2011).

Entre os diferentes tipos de marcadores moleculares disponíveis, os microsatélites, ou SSR (*Simple Sequence Repeats*), destacam-se por apresentarem natureza codominante, elevado nível de polimorfismo, alta reprodutibilidade e ampla distribuição ao longo do genoma de organismos eucariotos (Weising *et al.*, 1995; Agarwal *et al.*, 2008). Esses marcadores consistem em curtas sequências repetitivas de DNA, geralmente compostas por unidades de um a seis nucleotídeos (Ferreira; Grattapaglia, 1998), e podem ser classificados em perfeitos, imperfeitos, interrompidos e compostos, de acordo com a organização do motivo repetitivo (Santana *et al.*, 2011). A elevada variabilidade dos *loci* SSR está associada, principalmente, a alterações no número de repetições em tandem, decorrentes do mecanismo de deslizamento da DNA polimerase (*slippage*) durante a replicação do DNA. Em razão da maior frequência desse mecanismo em comparação às mutações pontuais, os *loci* microsatélites apresentam elevado grau de variabilidade. Consequentemente, ensaios baseados em SSRs permitem a detecção de polimorfismos de comprimento entre indivíduos, os quais são identificados por meio da amplificação, via PCR, de regiões específicas utilizando *primers* flangeadores (Agarwal *et al.*, 2008).

Além do elevado conteúdo informativo, os marcadores microsatélites podem apresentar amplificação cruzada entre espécies filogeneticamente relacionadas, em decorrência da conservação das regiões flangeadoras, o que possibilita sua aplicação em diferentes táxons sem a necessidade de desenvolvimento de novos marcadores específicos. Entretanto, a eficiência dessa amplificação cruzada tende a diminuir à medida que aumenta a distância evolutiva entre as espécies (Barbará *et al.*, 2007).

Tradicionalmente, o desenvolvimento de marcadores SSR baseava-se na construção de bibliotecas genômicas ou bibliotecas enriquecidas para sequências

repetitivas, o que tornava o processo laborioso e oneroso (Ferreira; Grattapaglia, 1998; Ritschel *et al.*, 2004). Entretanto, os avanços nas tecnologias de sequenciamento de nova geração (NGS) e o desenvolvimento de ferramentas bioinformáticas têm viabilizado a identificação *in silico* de microssatélites diretamente a partir de genomas sequenciados (Vleeshouwers *et al.*, 2011).

A aplicação de marcadores microssatélites em *Calonectria* tem avançado gradualmente nas últimas décadas. Os primeiros estudos identificaram e caracterizaram *loci* SSR em *Calonectria ilicicola* (= *C. parasiticum*) e *Calonectria pauciramosa* (= *C. pauciramosum*) (Wright *et al.*, 2006; 2007). Posteriormente, esses marcadores foram empregados em estudos populacionais, como demonstrado por Wright *et al.* (2010), que utilizaram SSRs para investigar a estrutura populacional de *C. ilicicola*, agente causal da podridão em amendoim nos Estados Unidos. Mais recentemente, com os avanços no sequenciamento de nova geração e na mineração *in silico*, os SSRs passaram a ser desenvolvidos e aplicados em estudos populacionais de diferentes espécies do gênero, como *Calonectria pseudonaviculata* (Leblanc *et al.*, 2019; Castroagudín *et al.*, 2020), *Calonectria pauciramosa* (Li *et al.*, 2021), *Calonectria pseudoreteauidii* (Wu *et al.*, 2023; Li *et al.*, 2025) e *Calonectria reteaudii* (Pham *et al.*, 2025), evidenciando a utilidade dessa abordagem em estudos populacionais de fungos fitopatogênicos.

Apesar desses avanços, os estudos populacionais disponíveis para isolados pertencentes ao complexo *Calonectria pteridis*, de grande relevância para a eucaliptocultura brasileira, ainda se baseiam predominantemente em marcadores ISSR (Freitas *et al.*, 2019). Nesse contexto, evidencia-se a necessidade de desenvolvimento de um conjunto de marcadores SSR codominantes, reprodutíveis e de alta resolução, capazes de ampliar a compreensão da diversidade genética e da estrutura populacional desse patógeno.

Com esse propósito, o presente estudo teve como objetivo desenvolver e validar marcadores microssatélites (SSR) de alta resolução aplicáveis a isolados pertencentes ao complexo *Calonectria pteridis*. Adicionalmente, buscou-se investigar a estrutura populacional do patógeno, explorar a relação entre variabilidade genética e agressividade, bem como avaliar a transferibilidade desses marcadores para *Calonectria candelabrum* e *Calonectria cylindrospora*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção e caracterização dos isolados

Foram analisados 113 isolados de *Calonectria* spp., provenientes de plantios comerciais e viveiros de *Eucalyptus* spp., coletados entre os anos de 2011 e 2025 em polos produtores das regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste do Brasil. A amostragem foi delineada de modo a contemplar a diversidade geográfica do patógeno, abrangendo isolados pertencentes ao complexo *Calonectria pteridis* (n=94), bem como aos complexos *Calonectria candelabrum* (n=16) e *Calonectria cylindrospora* (n=3).

Para a validação dos marcadores SSR, foram selecionados oito isolados representativos pertencentes ao complexo *C. pteridis*, conforme descrito por Freitas *et al.* (2019), de forma a contemplar diferentes classes de agressividade, origens geográficas e grupos genéticos previamente estabelecidos com base em marcadores ISSR.

Para as análises populacionais, foram considerados todos os 94 isolados de *C. pteridis*, enquanto os isolados dos complexos *C. candelabrum* e *C. cylindrospora* foram incluídos com o objetivo de avaliar a transferibilidade interespecífica dos marcadores SSR desenvolvidos. A distribuição espacial dos isolados por unidade federativa, assim como a representação das áreas amostradas, está detalhada na Figura 1.

Os isolados integram a Coleção do Laboratório de Patologia Florestal (LPF) da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Minas Gerais, Brasil, e foram preservados conforme os protocolos laboratoriais. A lista completa dos isolados e seus respectivos perfis genotípicos está apresentada no Apêndice 1.

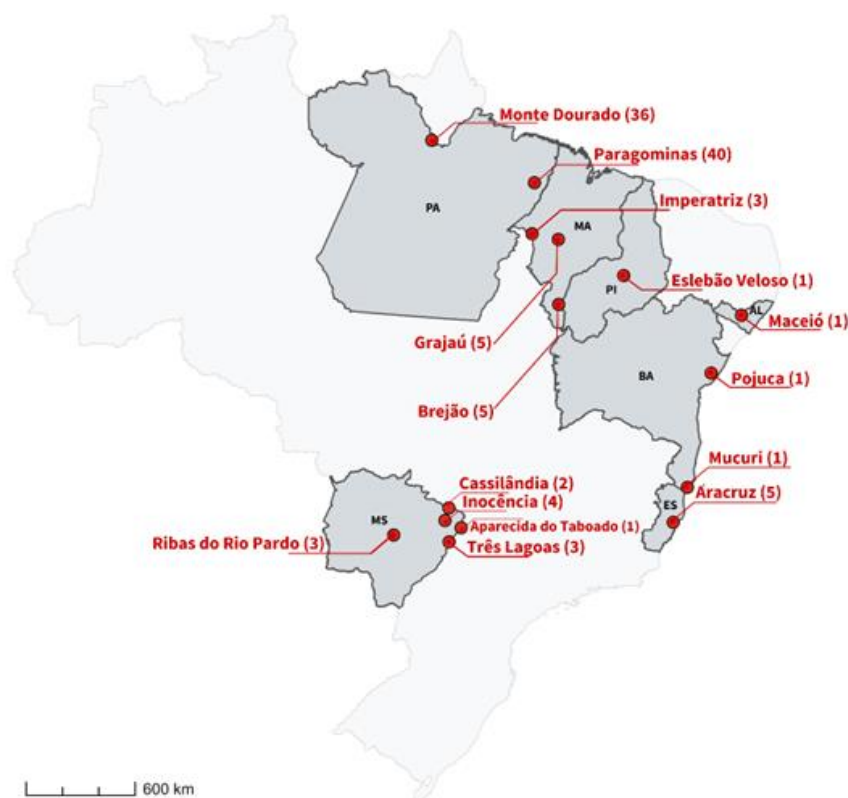


Figura 1 – Distribuição geográfica dos isolados pertencentes aos complexos *Calonectria pteridis*, *Calonectria candelabrum* e *Calonectria cylindrospora* nos estados brasileiros amostrados.

2.2 Origem do genoma e mineração de SSRs

O genoma de referência utilizado neste estudo corresponde ao isolado *C. pteridis* LPF059, previamente sequenciado na plataforma Illumina NovaSeq 6000 e montado como um genoma rascunho de 58,37 Mb, distribuídos em 1.167 scaffolds (GenBank: JAKZGU000000000; Queiroz *et al.*, 2022). Essa sequência genômica serviu de base para a identificação de regiões contendo microssatélites (SSRs).

A detecção dos *loci* SSR foi realizada utilizando a ferramenta MISA (MicroSATellite identification tool) (Thiel *et al.*, 2003; Beier *et al.*, 2017), configurada para identificar motivos repetitivos de dinucleotídeos a hexanucleotídeos, considerando-se um mínimo de cinco unidades repetidas para todas as classes de motivos. Os arquivos de saída gerados pelo MISA foram utilizados para determinar o número total de *loci* SSR identificados, a frequência dos diferentes tipos de motivos e sua distribuição ao longo do genoma.

2.3 Identificação de SSRs gênicos candidatos

O proteoma predito do isolado *C. pteridis* LPF059 foi analisado com o objetivo de identificar proteínas potencialmente associadas ao metabolismo de carboidratos e à patogenicidade. A identificação de enzimas ativas em carboidratos (CAZymes) foi realizada utilizando o servidor dbCAN2 (<https://bcb.unl.edu/dbCAN2>) (Zhang *et al.*, 2018).

A predição de proteínas secretadas foi conduzida por meio da identificação de peptídeos sinal utilizando o *software* SignalP v4.1, adotando-se um valor de corte de 0,45 (Petersen *et al.*, 2011). A localização subcelular das proteínas foi posteriormente avaliada com o programa TargetP v2.0 (Emanuelsson *et al.*, 2000), enquanto a presença de domínios transmembrana foi investigada utilizando o *software* TMHMM v2.0 (Krogh *et al.*, 2001).

Foram consideradas como proteínas secretadas putativas aquelas que apresentaram peptídeo sinal, ausência de domínios transmembrana e ausência de predição de localização em organelas intracelulares. Proteínas potencialmente associadas à patogenicidade foram identificadas por meio de buscas de similaridade contra os bancos de dados PHI-base v4.12 (Urban *et al.*, 2017) e DFVF (Lu *et al.*, 2012), utilizando o algoritmo BLASTp v2.9.0, adotando-se um valor de corte de $E = 1 \times 10^{-10}$.

As sequências gênicas que receberam ao menos uma das anotações funcionais de interesse (Cazymes, secretoma, PHI-base ou DFVF) foram posteriormente examinadas quanto à presença de microssatélites, os quais foram considerados 256 candidatos a marcadores SSR gênicos.

2.4 Seleção dos marcadores SSR

A seleção dos marcadores SSR foi realizada utilizando duas abordagens complementares. A primeira consistiu na identificação de microssatélites localizados em regiões gênicas potencialmente associadas à patogenicidade. Para isso, do conjunto de candidatos a marcadores SSR gênicos, foram considerados aqueles localizados em genes anotados como pertencentes ao secretoma ou como enzimas ativas em carboidratos (CAZymes), os quais foram integralmente mantidos, independentemente de métricas de similaridade. As anotações de secretoma foram baseadas na predição de peptídeo sinal, ausência de domínios transmembrana e ausência de predição de localização em organelas

intracelulares, enquanto as anotações de CAZymes foram definidas pela identificação de domínios catalíticos conservados.

Já os SSRs anotados com base em similaridade contra os bancos PHI-base e/ou DFVF foram submetidos a um critério de identidade mínima, sendo excluídos aqueles cuja única anotação funcional apresentasse identidade inferior a 30% na busca de similaridade. Genes com dupla anotação (PHI-base e DFVF) foram mantidos quando ao menos uma das fontes atendessem ao limiar estabelecido, com prevalência da anotação proveniente do PHI-base. Ao final dessa etapa, permaneceram 155 loci candidatos associados a genes de interesse.

Na segunda abordagem, para compor um painel de marcadores neutros, foram selecionados SSRs distribuídos ao longo do genoma de referência. Para essa finalidade, foram priorizados loci contendo motivos repetitivos com comprimento mínimo de 24 pb (≥ 12 unidades para dinucleotídeos, ≥ 10 para trinucleotídeos, ≥ 6 para tetranucleotídeos e ≥ 5 para penta- e hexanucleotídeos), bem como sua distribuição em diferentes scaffolds, visando garantir cobertura ampla e homogênea do genoma. Os loci selecionados foram posteriormente curados quanto à sua localização genômica, evitando-se a inclusão de SSRs em regiões codificadoras. Ao final dessa etapa, foram selecionados 50 loci SSR para compor o painel de marcadores neutros.

Ao todo, os 205 loci SSR obtidos pelas duas estratégias foram posteriormente utilizados para o desenho de primers e submetidos à validação *in silico* por meio de e-PCR.

2.5 Desenho dos primers e validação *in silico*

Os pares de *primers* para a amplificação dos loci SSR selecionados foram desenhados utilizando um *script* em Perl baseado no *software* Primer3 (Untergasser *et al.*, 2012). Foram adotados os seguintes critérios de desenho: comprimento dos *primers* entre 18 e 24 pb, tamanho esperado dos *amplicons* entre 100 e 450 pb, temperatura de *anelamento* entre 57 e 60 °C, diferença máxima de T_m de 5 °C entre os *primers* de cada par e conteúdo de GC entre 40 e 60%, com valor ótimo de 50%.

A especificidade dos *primers* foi avaliada por meio de PCR *in silico* (e-PCR) contra o genoma de referência (Rotmistrovsky *et al.*, 2004), permitindo até três mismatches e três gaps. Essa análise foi conduzida com o objetivo de identificar

possíveis amplificações inespecíficas e verificar a ocorrência de amplificação em múltiplas regiões do genoma.

Os arquivos de saída gerados pela e-PCR foram utilizados para determinar o tamanho previsto dos amplicons, a posição dos *loci* nos *scaffolds* e a identificação de marcadores de *locus* único ou multilocus. Marcadores que apresentaram evidências de amplificação multilocus foram descartados, sendo mantidos apenas marcadores com padrão de amplificação específico e de *locus* único. Adicionalmente, visando selecionar os candidatos mais robustos para estudos de correlação com a agressividade, foram mantidos os marcadores localizados em genes com anotação de virulência de alta confiança (identidade $\geq$ 40% contra os bancos PHI-base e/ou DFVF). Marcadores com anotações exclusivas de secretoma ou de enzimas ativas em carboidratos (CAZymes) que não possuíam evidência adicional de virulência foram preteridos nesta etapa.

Os pares de primers selecionados nesta etapa foram inicialmente sintetizados sem marcação com fluoróforos, para triagem inicial e validação por eletroforese em gel de poliacrilamida.

2.6 Condições de cultivo e extração de DNA

Culturas monospóricas dos isolados dos complexos *C. pteridis*, *C. candelabrum* e *C. cylindrospora* utilizadas neste estudo foram recuperadas do armazenamento em óleo mineral ou solução salina e transferidas para meio batata-dextrose-água (BDA), sendo incubadas por 4 a 10 dias.

Posteriormente, o micélio foi cultivado em 100 mL de caldo de extrato de malte, a 25 °C, sob agitação constante de 180 rpm, por 48 h. A biomassa fúngica foi então filtrada em peneira de 200 μ m, lavada com água destilada autoclavada e seca em papel estéril.

O micélio obtido foi transferido para tubos de microcentrífuga de 2 mL e submetido ao congelamento em nitrogênio líquido até completa solidificação. Em seguida, o material foi macerado até a obtenção de pó fino utilizando o equipamento TissueLyser III (Qiagen, Hilden, Alemanha), operando por 2 min a 20 Hz. O DNA genômico foi extraído com base no protocolo de Specht et al. (1982), com adaptações para as condições deste estudo, incluindo lise celular com SDS e purificação por extração com fenol: clorofórmio.

A integridade do DNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose a 1%, enquanto a concentração foi determinada utilizando espectrofotômetro

NanoDrop 2000c (Thermo Scientific). As amostras foram posteriormente diluídas para uma concentração de trabalho de $10 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ para utilização nas reações de PCR.

2.7 Amplificação por PCR e otimização das condições de anelamento

A triagem inicial dos *primers* SSR foi realizada utilizando o isolado de referência LPF059. As reações de amplificação foram conduzidas por meio de um protocolo de PCR do tipo *touchdown* com o objetivo de avaliar a especificidade da amplificação antes das etapas de validação. O programa consistiu em uma desnaturação inicial a 96°C por 2 min, seguida por 5 ciclos com redução progressiva da temperatura de anelamento de 66°C a 61°C (-1°C por ciclo). Em cada ciclo, a reação foi submetida à desnaturação a 96°C por 30 s, anelamento por 30 s e extensão a 72°C por 30 s. Em seguida, foram realizados 30 ciclos adicionais sob as mesmas condições, exceto pela temperatura de anelamento, fixada em 60°C , com extensão final a 72°C por 20 min.

Com base nos resultados dessa triagem, os *primers* foram submetidos a uma etapa de otimização fina, na qual diferentes temperaturas de anelamento próximas ao T_m predito foram testadas, visando reduzir amplificações inespecíficas e maximizar a intensidade dos amplicons. A temperatura de 56°C foi selecionada por proporcionar maior especificidade e consistência dos perfis de amplificação, sendo adotada nas análises subsequentes.

As reações de PCR foram realizadas em volume final de $15 \mu\text{L}$, contendo $1,5 \mu\text{L}$ de cada *primer* ($10 \mu\text{M}$), $7,5 \mu\text{L}$ de GoTaq Colorless Master Mix (Promega), $2 \mu\text{L}$ de DNA genômico ($10 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$) e $2,5 \mu\text{L}$ de água Milli-Q estéril. O ciclo térmico final consistiu em desnaturação inicial a 96°C por 5 min, seguida de 35 ciclos a 96°C por 30 s, anelamento a 56°C por 30 s e extensão a 72°C por 1 min, com extensão final a 72°C por 20 min.

Os produtos amplificados foram visualizados em gel de agarose a 2,0%, com o objetivo de confirmar a especificidade e a integridade dos *amplicons* obtidos.

2.8 Validação preliminar por eletroforese em gel de poliacrilamida

Para a validação preliminar dos marcadores SSR, os primers que não apresentaram amplificação na etapa anterior foram descartados. Os primers restantes foram avaliados utilizando oito isolados representativos pertencentes ao complexo *C. pteridis* (LPF201, LPF294, LPF315, LPF338, LPF344, LPF436,

LPF457 e LPF2315), previamente selecionados conforme descrito anteriormente, com o objetivo de verificar a consistência e a especificidade da amplificação.

Os produtos de PCR foram diluídos em água Milli-Q estéril até o volume final de 25 µL, misturados com 6 µL de tampão de formamida e desnaturados a 95 °C por 5 min. Os *amplicons* foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante e posteriormente visualizados por coloração com nitrato de prata. Um marcador de peso molecular de 100 pb foi utilizado para estimar o tamanho dos amplicons.

Foram selecionados para as etapas subsequentes apenas os marcadores que apresentaram bandas únicas, bem definidas e reproduzíveis, indicativas de amplificação de um único *locus*. Adicionalmente, foram priorizados os marcadores que apresentaram padrão polimórfico entre os isolados avaliados.

Ao final do processo de triagem e validação preliminar, foram selecionados 20 pares de *primers* que atenderam aos critérios estabelecidos. Dentre estes, 11 correspondem a marcadores localizados em regiões gênicas e 9 em regiões genômicas não codificadoras.

2.9 Genotipagem por eletroforese capilar e determinação de alelos

Os *primers* selecionados foram sintetizados com marcação fluorescente na extremidade 5' do *primer* forward, utilizando os fluoróforos 6-FAM, VIC e NED, compatíveis com detecção no sequenciador automático ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). O padrão interno de tamanho GeneScan LIZ 600 foi utilizado para a estimativa dos *amplicons*.

Marcadores compatíveis quanto à coloração, ao tamanho esperado dos amplicons e ao padrão de amplificação foram combinados em reações *multiplex*, conforme apresentado na Tabela 1. Os *loci* que apresentaram instabilidade de amplificação ou sobreposição de picos em reações *multiplex* foram analisados em reações individuais (*singleplex*).

Tabela 1 – Organização dos marcadores SSR em reações *multiplex* e *singleplex* utilizadas na genotipagem de três complexos de *Calonectria*.

<i>Multiplex</i>	<i>Locí</i> SSR	Fluoróforo	Tamanho esperado (pb)
Mix 1	CP_SSR2	VIC	344
Mix 1	CP_SSR97	6-FAM	193
Mix 1	CP_SSR59	6-FAM	581
Mix 2	CP_SSR1	6-FAM	201
Mix 2	CP_SSR42	6-FAM	305

Mix 2	CP_SSR72	VIC	362
Mix 3	CP_SSR20	6-FAM	328
Mix 3	CP_SSR29	NED	379
Mix 3	CP_SSR64	6-FAM	430
Mix 4	CP_SSR145	6-FAM	205
Mix 4	CP_SSR127	6-FAM	439
Mix 4	CP_SSR66	VIC	334
Mix 4	CP_SSR112	6-FAM	383
Mix 6	CP_SSR140	VIC	384
Mix 6	CP_SSR68	6-FAM	387
Mix 6	CP_SSR133	NED	386
—	CP_SSR125	VIC	407
—	CP_SSR131	6-FAM	310
—	CP_SSR141	NED	378
—	CP_SSR132	VIC	343

Para a genotipagem, 2 µL do produto de PCR foram misturados a 8 µL de formamida Hi-Di contendo o padrão interno LIZ 600. As amostras foram desnaturadas a 95 °C por 5 min e imediatamente resfriadas em gelo, sendo posteriormente submetidas à eletroforese capilar utilizando polímero POP-7 no sequenciador ABI 3500.

A determinação dos alelos foi realizada no *software* GeneMapper v5.0 (Applied Biosystems). Foram considerados válidos apenas os marcadores que apresentaram picos únicos, reprodutíveis e com boa intensidade de sinal e baixo nível de artefatos de amplificação (*stutter*).

A suficiência do conjunto de marcadores microsatélites utilizados para discriminar os genótipos multilocus (MLG) foi avaliada por meio de curvas de acumulação de MLG. Essa análise foi realizada por reamostragem aleatória dos *loci* SSR utilizando a função *genotype_curve* do pacote *poppr* no ambiente R (Kamvar *et al.*, 2014). A curva de acumulação foi utilizada para verificar se o número de *loci* polimórficos selecionados era suficiente para capturar a diversidade genotípica presente no conjunto de isolados analisados.

2.10 Análises de diversidade genética e genotípica no complexo *C. pteridis*

As análises de diversidade genética e genotípica foram conduzidas utilizando os genótipos multilocus obtidos a partir dos marcadores microsatélites (SSR) para os isolados (n= 94) pertencentes ao complexo *C. pteridis*.

Os genótipos obtidos no *software* GeneMapper v5.0 (Applied Biosystems) foram organizados em uma matriz multilocus com base no tamanho dos amplicons. Cada genótipo multilocus corresponde ao perfil alélico de um isolado, definido pelos tamanhos dos *amplicons* observados em todos os *loci* SSR analisados. *Loci* monomórficos ou que apresentaram padrões inconsistentes de amplificação foram excluídos das análises subsequentes.

As análises foram conduzidas no ambiente R (R core team, 2024), utilizando principalmente os pacotes adegenet (Jombart, 2008) e poppr (Kamvar *et al.*, 2014).

A diversidade genética foi estimada a partir da construção de um objeto do tipo *genind* (pacote adegenet), a partir do qual foram calculadas as frequências alélicas e a diversidade genética esperada de Nei (H_{exp}).

A diversidade genotípica foi avaliada por meio da identificação de genótipos multilocus (MLGs) e da estimativa de diferentes índices de diversidade, incluindo o índice de Shannon–Wiener (H'), o índice de Stoddart e Taylor (G), o índice de diversidade de Simpson (λ) e o índice de equitabilidade ($E5$), utilizando funções implementadas no pacote poppr. Para permitir a comparação da riqueza genotípica entre populações com diferentes tamanhos amostrais, foi estimado o número esperado de genótipos multilocus (eMLG) por meio de rarefação.

A ocorrência de reprodução clonal foi avaliada utilizando o índice de associação multilocus padronizado (rD), cuja significância foi testada por meio de 999 permutações aleatórias.

2.11 Estrutura genética e rede de genótipos multilocus

Para as análises de estrutura genética, os isolados foram agrupados em populações de acordo com o estado de origem. Embora as amostras tenham sido coletadas em diferentes municípios, algumas localidades apresentaram número reduzido de isolados, o que inviabilizou sua inclusão nas análises populacionais. Dessa forma, foram consideradas apenas as populações provenientes dos estados do Maranhão (MA), Mato Grosso do Sul (MS) e Pará (PA), que apresentaram número amostral suficiente para as análises.

As distâncias genéticas entre os isolados foram estimadas utilizando a distância de Bruvo (Bruvo *et al.*, 2004). A matriz de distâncias resultante foi utilizada para realizar uma Análise de Coordenadas Principais (PCoA), com o objetivo de visualizar os padrões de similaridade genética entre os isolados.

Inicialmente, os genótipos multilocus (MLG) foram identificados com base nos perfis alélicos obtidos a partir dos *loci* SSR. Para evitar a super-representação de clones nas análises de ordenação, os genótipos duplicados foram removidos, mantendo-se apenas genótipos multilocus únicos. A PCoA foi conduzida utilizando esse conjunto de genótipos únicos, sendo mantido um isolado representativo para cada MLG.

As relações genéticas entre os isolados também foram exploradas por meio da construção de uma árvore de mínima expansão (Minimum Spanning Tree – MST), baseada nos perfis multilocus obtidos com os marcadores SSR. Diferentemente da análise de ordenação, para a construção da MST foram considerados todos os isolados analisados, incluindo genótipos multilocus repetidos, de modo a representar as relações genéticas completas entre os indivíduos amostrados. A rede foi construída utilizando o *software* BioNumerics versão 6.2 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Bélgica).

A diferenciação genética associada à origem geográfica foi avaliada por meio de uma Análise de Variância Molecular (AMOVA), considerando o estado como unidade populacional. Adicionalmente, foi realizada uma análise de variância multivariada permutacional (PERMANOVA), utilizando 999 permutações no pacote *vegan* do ambiente R, para testar a significância da diferenciação genética entre os estados.

2.12 Comparação entre marcadores SSR gênicos e genômicos e sua relação com a agressividade

Para investigar possíveis diferenças no nível de variabilidade genética detectado por diferentes tipos de marcadores, as análises de diversidade foram conduzidas separadamente para os SSR localizados em regiões gênicas, potencialmente associados a genes envolvidos na patogenicidade, e para aqueles distribuídos em regiões genômicas aleatórias.

Os mesmos parâmetros de diversidade genética descritos anteriormente foram estimados de forma independente para cada conjunto de marcadores, permitindo comparar o nível de variabilidade detectado por SSR gênicos e genômicos.

Considerando que parte dos marcadores SSR utilizados está localizada em regiões gênicas associadas a genes potencialmente envolvidos em processos de patogenicidade, como enzimas da classe CAZymes, foi investigado se a variação

genética detectada por esses marcadores poderia estar relacionada aos níveis de agressividade dos isolados.

As informações referentes à agressividade dos isolados foram obtidas a partir de dados previamente publicados (Freitas *et al.*, 2019). Os isolados com classificação disponível foram categorizados de acordo com os grupos de agressividade descritos naquele estudo.

A relação entre a variação genética e os níveis de agressividade foi investigada utilizando uma matriz de distâncias genéticas estimada a partir dos marcadores SSR, calculada com base na distância de Bruvo (Bruvo *et al.*, 2004). A distribuição dos isolados em relação às classes de agressividade foi visualizada por meio de uma Análise de Coordenadas Principais (PCoA).

Adicionalmente, os perfis alélicos dos isolados, considerando os SSR localizados em regiões gênicas, foram visualizados por meio de um *heatmap*, construído a partir de uma matriz de dados convertida para valores numéricos e padronizada por marcador (escala por coluna). O agrupamento dos isolados foi realizado com base em distância euclidiana e método de ligação completa (*complete linkage*), permitindo avaliar padrões de similaridade genética entre os indivíduos e sua possível associação com as classes de agressividade.

Por fim, a diferenciação genética entre as classes de agressividade foi testada por meio de uma análise de variância multivariada permutacional (PERMANOVA), utilizando 999 permutações no pacote *vegan* do ambiente R.

2.13 Avaliação da transferibilidade entre complexos de espécies

A transferibilidade dos marcadores SSR desenvolvidos para o complexo *C. pteridis* foi avaliada por meio da amplificação em isolados pertencentes aos complexos *C. candelabrum* e *C. cylindrospora*. As relações genéticas entre os complexos foram investigadas por meio de análise de coordenadas principais (PCoA) baseada na distância de Bruvo e por análise de variância multivariada permutacional (PERMANOVA), utilizando 999 permutações no pacote *vegan*. A homogeneidade das dispersões multivariadas entre os grupos foi avaliada por meio de análise de dispersão multivariada permutacional (PERMDISP).

3. RESULTADOS

3.1 Mineração e caracterização de microssatélites (SSRs)

A análise do genoma montado do isolado *C. pteridis* LPF059 resultou na identificação de 4.660 *loci* de microssatélites (SSRs) com motivos perfeitos distribuídos ao longo do genoma.

A distribuição das classes de repetição revelou claro predomínio de SSR dinucleotídicos, que representaram 66,03% do total, seguidos pelos trinucleotídicos (27,98%). As demais classes ocorreram em baixas frequências, com SSR tetranucleotídicos correspondendo a 3,02%, pentanucleotídicos a 1,78% e hexanucleotídicos a 1,18%. De modo geral, observa-se uma redução progressiva na frequência dos SSR à medida que aumenta o tamanho da unidade repetitiva.

A análise da frequência do número de repetições revelou predominância de *loci* contendo baixo número de unidades repetidas, com redução progressiva da frequência à medida que o número de repetições aumentou. Esse padrão foi observado em todas as classes de motivos analisadas, embora com variações na amplitude das repetições entre os diferentes tipos de SSR (Figura 2).

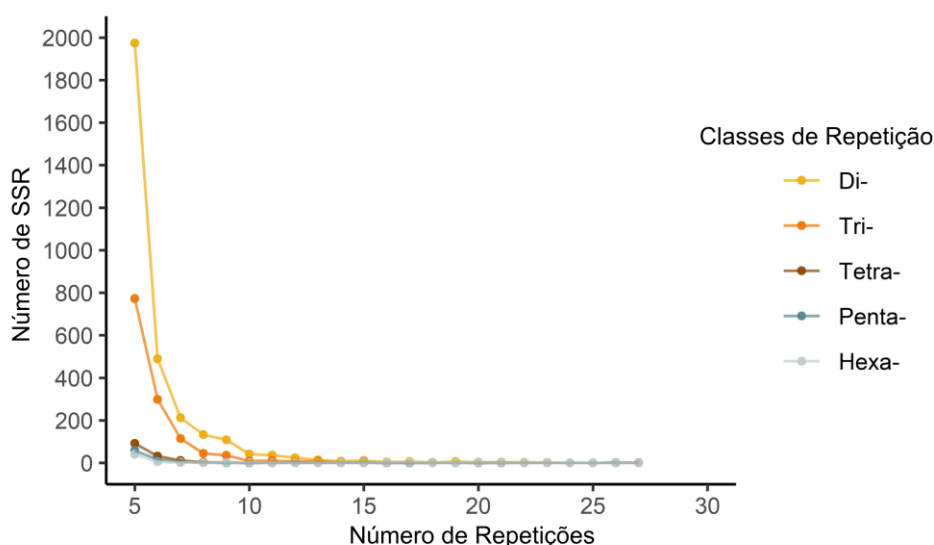


Figura 2 – Distribuição do número de repetições dos microssatélites identificados no genoma do isolado LPF059 pertencente ao complexo *Calonectria pteridis*.

Quando os SSR foram classificados de acordo com sua localização no genoma, observou-se predominância em regiões não codificantes (SSR genômicos), enquanto uma menor proporção foi identificada em regiões gênicas (Figura 3A). Nos SSRs genômicos, os dinucleotídeos constituíram a classe mais

abundante, seguidos pelos trinucleotídeos. Já nos SSRs gênicos, os trinucleotídeos representaram a classe mais numerosa, padrão frequentemente associado à manutenção do quadro de leitura em regiões codificadoras e atribuído a restrições seletivas contra mutações do tipo frameshift.

Considerando especificamente os SSRs gênicos, verificou-se variação na distribuição das classes de repetição entre regiões exônicas e intrônicas (Figura 3B). Os motivos trinucleotídicos e hexanucleotídicos foram majoritariamente encontrados nos éxons, enquanto as classes tetranucleotídicas e pentanucleotídicas foram exclusivas em regiões intrônicas.

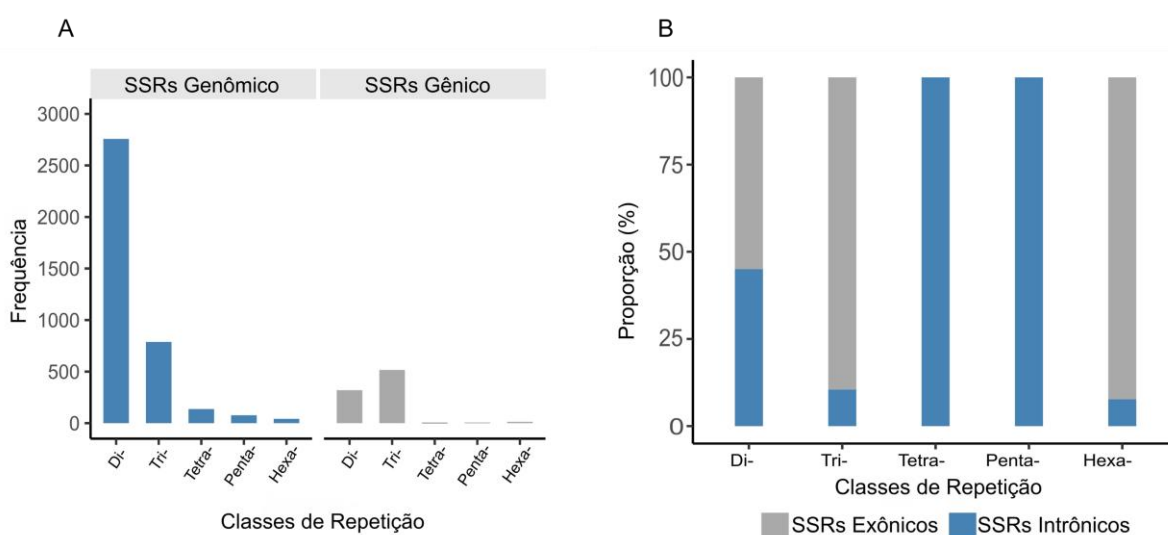


Figura 3 – Distribuição dos microssatélites (SSR) em função da localização no genoma e das classes de repetição: (A) Frequência absoluta e (B) Proporção em regiões exônicas e intrônicas.

Dos 256 *loci* SSR identificados em regiões codificadoras e inicialmente selecionados com base na anotação funcional, 155 atenderam aos critérios estabelecidos para o desenho de *primers*. O processo de seleção e refinamento dos marcadores está resumido na Figura 4. Ao final das etapas de validação *in silico* e priorização funcional, foram selecionados 104 SSRs gênicos, sendo 100 localizados em éxons e quatro em íntrons, além de 46 SSRs intergênicos

distribuídos ao longo do genoma, totalizando 150 *loci* para as etapas subsequentes de validação.

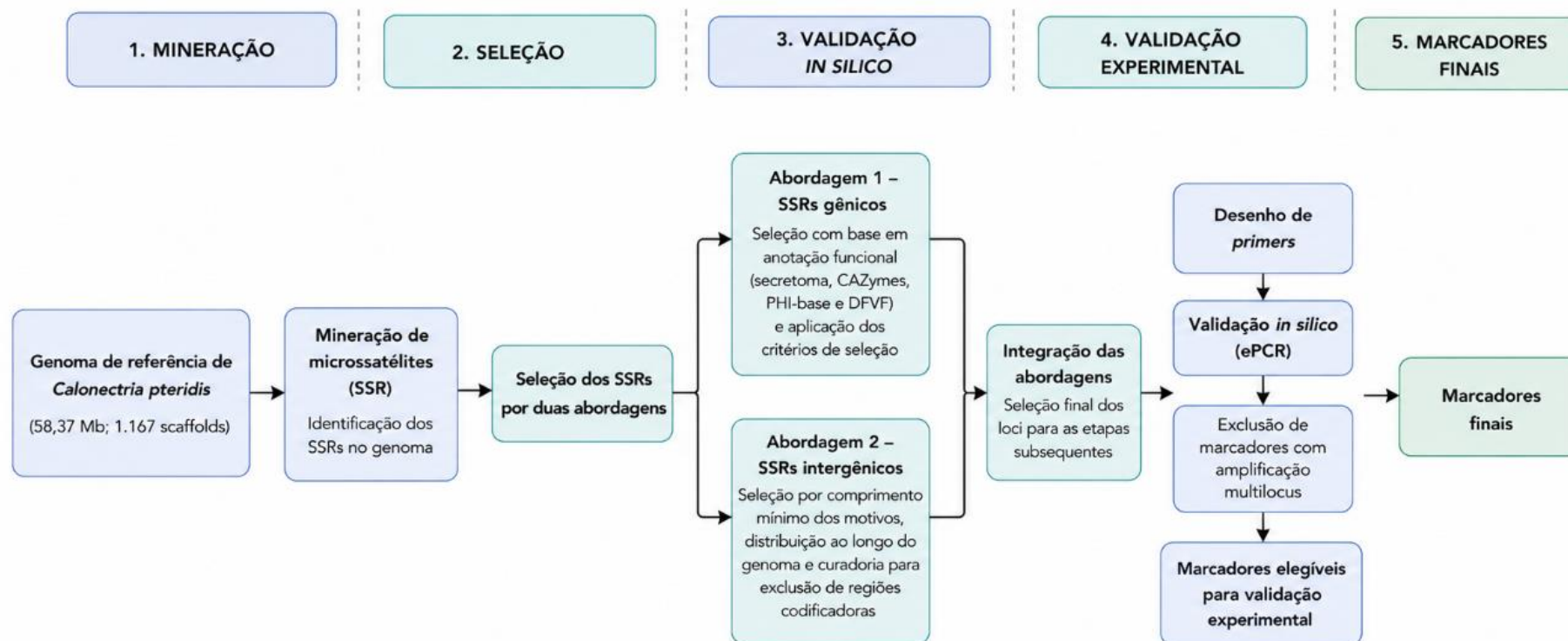


Figura 4 – Fluxograma da identificação, seleção e validação *in silico* de marcadores microsatélites (SSR) em *Calonectria pteridis*.

Para a validação experimental em gel de poliacrilamida, foi selecionado um subconjunto de 82 pares de *primers*. Os ensaios revelaram variações na eficiência de amplificação, incluindo ausência de amplificação e formação de bandas inespecíficas em alguns

isolados. Ainda assim, foi possível identificar 20 marcadores altamente polimórficos, reprodutíveis e com elevada capacidade de discriminação, os quais foram utilizados nas análises subsequentes (Tabela 2).

Tabela 2 – Características dos *loci* microssatélites (SSR) selecionados e dos respectivos pares de primers desenvolvidos para o complexo *Calonectria pteridis*.

<i>Locus</i>	Sequência dos <i>primers</i>	<i>T_m</i>	<i>Scaffold</i>	Região Repetitiva Amplificada	Número de Cópias
Cp_SSR1	F:CGGGAGTGGTGCAAGTACAT R:AGCATGCCACGTCTCTTCAT	60.04 59.75	13	AGC	7
Cp_SSR2	F:TGTCACCTGCCTGCGATTCAT R: TGATCCAGTTCTTGCAGCGT	60.04 59.96	175	TC	5
Cp_SSR20	F:GGAGCCATACATCCGCAGTC R:GAGGCTCTGGTGTGATGCT	60.60 60.04	49	CAGCAC	5
Cp_SSR29	F:ACATTGAGGACTCTGCCAGC R:CGCTCATCCTCGTCCATCTC	60.04 60.04	64	CAG	13
Cp_SSR42	F:TGTCCTACTATCCCGGCCAA R:GTAATTCGAGGGAGGAGGCC	60.03 59.61	18	CGG	5
Cp_SSR59	F:TGGTAATATGCGCCGAGGAC R:CCTCGCACTTCTCGCAAATG	59.97 59.90	123	GGC	6
Cp_SSR64	F:CCGATACCAGACGTACGACTC R:GCTGAAGTAGTGCTCGCTCA	59.74 60.11	56	CCG	6
Cp_SSR66	F:CGTGAAGAGGGAGGAATCCG R:TGGAGTCATCATGGCAACCC	59.90 60.03	5	GAG	5
Cp_SSR68	F:CCTGACATCGAAGCGGCTAT R:GTTGTGTGCGAGGAAGTCGA	59.97 59.69	5	CAG	7
Cp_SSR72	F: GATTACGAATGGCCCAACGC R: GTCAACCCAGCCTTCTCCTC F: TGCTCATTGTGACTTCCGCT	59.97 60.04 59.96	26	CA	5

Cp_SSR97	R: CCCTGCCGGAGTACATGTTT	60.04	115	CAC	5
Cp_SSR112	F: CCGCTTCCACATACGAACGA	60.46	127	ACGA	6
	R: GCCAGAACCAGTCATCGTCA	60.04			
Cp_SSR125	F: CGTCCTTGATCTGCGATGGA	59.90	87	CACAG	7
	R: GACTCCACACTGCGCTATGT	60.11			
Cp_SSR127	F: CACTTTGGGTAGACGCTGGT	59.97	37	CAT	11
	R: CGCACAATGAAGCCGATGAG	59.97			
Cp_SSR131	F: TCCTCTTCCTGCCACTACCA	59.88	18	CCCAGA	5
	R: ACGAGGGATGATGGATGGGA	60.10			
Cp_SSR132	F: GATCTTGGGACTGTTGGCGA	60.04	13	TGGCAC	6
	R: AAGGGAAGACAGTAACGGCG	60.04			
Cp_SSR133	F: ATCCCGTTACTGTGCTCTGC	60.11	728	GCTCTG	7
	R: CGGGAAGGGTATGTGCAAGA	59.75			
Cp_SSR140	F: CAAGACGGTTGCCAAGTGTG	59.97	15	CCCACG	5
	R: AAGTGTGGGTCTTGGACGG	60.18			
Cp_SSR141	F: ATGTAAGCTTGCGAGGAGGG	59.82	19	AGCAGA	5
	R: GCTTCGCATCCATCGTCAAC	59.97			
Cp_SSR145	F: CGCTATCTTGACAAACCGCC	59.63	8	CACG	7
	R: TGACACCGGCTGACATGAAA	59.89			

3.2 Validação e polimorfismo dos marcadores SSR

Dos 20 *loci* SSR selecionados para validação experimental, 13 apresentaram amplificação consistente e perfis polimórficos quando avaliados em isolados do complexo *C. pteridis*. Esses marcadores foram utilizados nas análises intraespecíficas, correspondendo aos *loci* CP_SSR20, CP_SSR29, CP_SSR59, CP_SSR64, CP_SSR68, CP_SSR125, CP_SSR127, CP_SSR131, CP_SSR132, CP_SSR133, CP_SSR140, CP_SSR141 e CP_SSR145.

Os sete marcadores restantes (CP_SSR1, CP_SSR2, CP_SSR42, CP_SSR66, CP_SSR72, CP_SSR97 e CP_SSR112), embora tenham apresentado amplificação robusta, foram monomórficos para os isolados pertencentes ao complexo *C. pteridis*. Dentre esses, CP_SSR2, CP_SSR72 e CP_SSR97 foram excluídos ainda na etapa inicial de validação, enquanto os quatro *loci* remanescentes (CP_SSR1, CP_SSR42, CP_SSR66 e CP_SSR112) foram considerados informativos para análises de transferibilidade e diferenciação interespecífica.

Os perfis de amplificação representativos, evidenciando *loci* polimórficos e monomórficos, estão apresentados no Apêndice 2.

3.3 Diversidade genética e diversidade genotípica

A genotipagem de 94 isolados pertencentes ao complexo *Calonectria pteridis*, com base em 13 *loci* microssatélites polimórficos, permitiu identificar 36 genótipos multilocus (MLGs) distintos. A suficiência do conjunto de marcadores para discriminar a diversidade genotípica presente no material amostrado foi avaliada por meio da curva de acumulação de MLGs, cuja tendência à estabilização indicou que o número de *loci* empregados foi suficiente para captar a maior parte da variação genotípica presente no conjunto analisado (Figura 5).

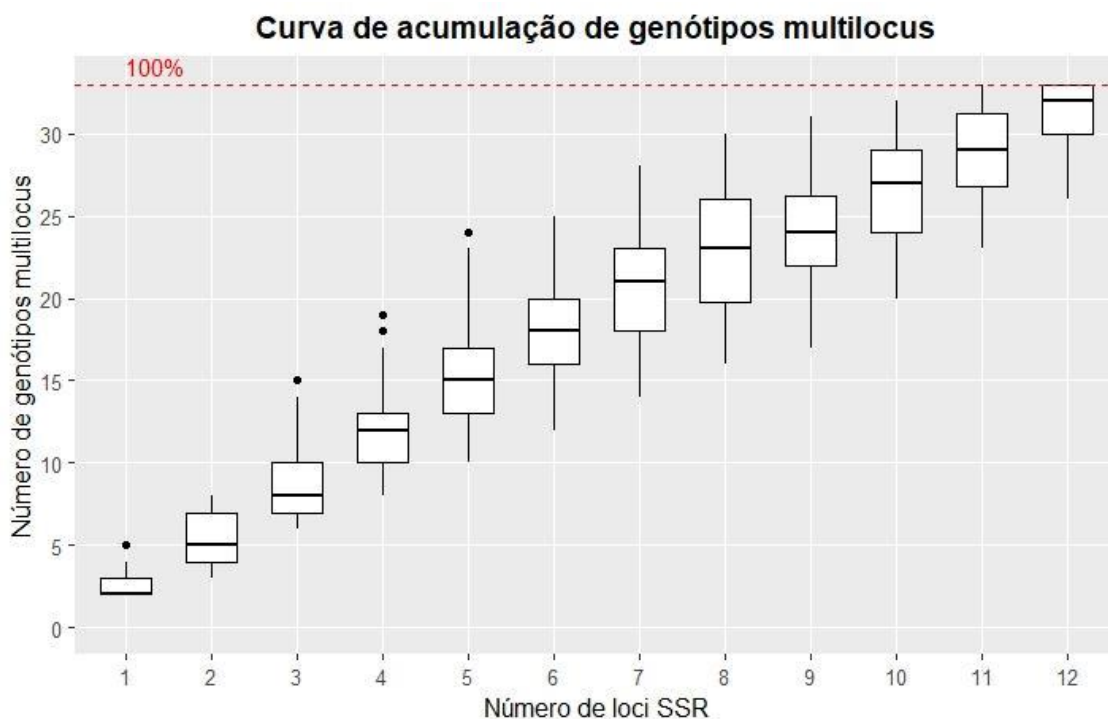


Figura 5 – Curva de acumulação de genótipos multilocus (MLGs) baseada na reamostragem aleatória dos *loci* SSR.

A diversidade genética esperada para o conjunto total de isolados foi moderada ($H_{exp} = 0,34$) (Tabela 3). Entre as populações avaliadas, o estado do Pará apresentou a maior riqueza genotípica, com 32 MLGs entre 75 isolados, além de menor dominância relativa de genótipos e valor intermediário de equitabilidade ($E5 = 0,54$). Mesmo após a padronização do tamanho amostral por rarefação, essa população manteve a maior diversidade genotípica esperada ($eMLG = 7,39$), enquanto Maranhão e Mato Grosso do Sul apresentaram valores inferiores e idênticos ($eMLG = 3,00$).

As populações do Maranhão e do Mato Grosso do Sul apresentaram menor número de MLGs, com três genótipos multilocus em cada estado. Esse padrão é compatível com menor diversidade genotípica e maior contribuição de genótipos repetidos nessas populações, embora essa interpretação deva ser considerada com cautela, em razão do menor tamanho amostral em comparação com o Pará.

A análise de associação multilocus, realizada considerando o conjunto total de isolados, revelou desequilíbrio de ligação significativo entre os *loci* analisados ($rD = 0,125$; $p < 0,001$), uma vez que o tamanho amostral reduzido em algumas populações inviabilizou estimativas robustas por grupo. Esse resultado indica que a composição genética da população é compatível com contribuição de

reprodução clonal e/ou estruturação populacional. Em conjunto, esses resultados apontam para variabilidade genética moderada entre isolados pertencentes ao complexo *C. pteridis*, com distribuição heterogênea da diversidade entre as populações avaliadas.

Tabela 3 – Índices de diversidade genética e genotípica estimados para populações geográficas do complexo *Calonectria pteridis*, com base em 13 *loci* SSR.

População	N	MLG	eMLG ¹	H	Lambda ²	E.5 ³	Hexp ⁴	rD	p-valor
Maranhão (MA)	6	3	3,00	0,87	0,50	0,72	0,30	-	-
Pará (PA)	75	32	7,39	2,88	0,90	0,54	0,31	-	-
Mato Grosso do Sul (MS)	9	3	3,00	0,85	0,49	0,73	0,05	-	-
Alagoas (AL)	1	1	1,00	0,00	0,00	-	-	-	-
Piauí (PI)	1	1	1,00	0,00	0,00	-	-	-	-
Bahia (BA)	2	1	1,00	0,00	0,00	-	0,00	-	-
Total	94	36	7,46	2,96	0,91	0,56	0,34	0,125	<0,001

Nota: N: número de isolados; MLG: número de genótipos multilocus; ¹eMLG: número esperado de genótipos multilocus obtido por rarefação (n = 6); H: índice de diversidade de Shannon–Wiener; ²Lambda: índice de diversidade de Simpson; ³E.5: índice de equitabilidade (evenness); ⁴Hexp: diversidade genética esperada de Nei.

3.4 Estrutura genética e Rede de genótipos multilocus

As relações genéticas entre os isolados pertencentes ao complexo *C. pteridis* foram investigadas por meio de uma Árvore de Mínima Expansão (MST), construída a partir de genótipos multilocus obtidos com base em 13 *loci* SSR (Figura 6).

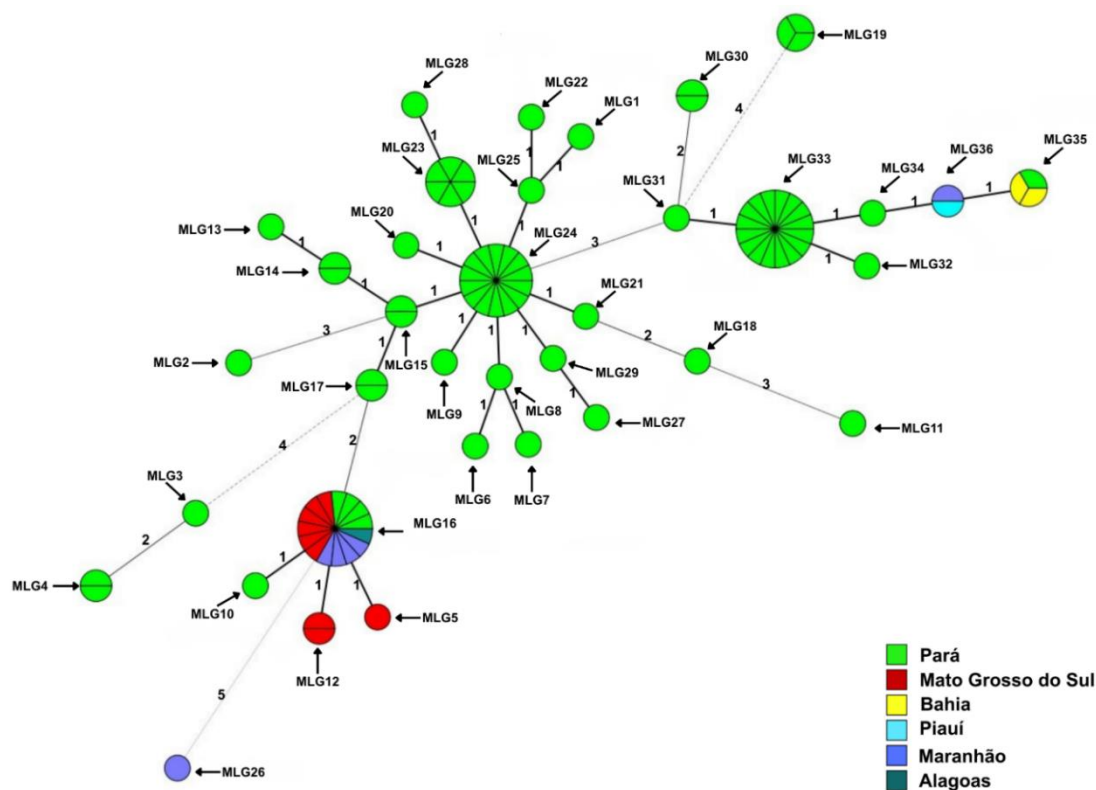


Figura 6 – Árvore de Mínima Expansão (Minimum Spanning Tree – MST) dos genótipos multilocus (MLGs) de isolados pertencentes ao complexo *Calonectria pteridis*, construída com base em 13 loci microssatélites (SSR). O tamanho dos nós é proporcional ao número de isolados por MLG, as cores representam a origem geográfica e os números nas conexões indicam o número de diferenças alélicas entre os genótipos.

A rede revelou a presença de um genótipo multilocus central (MLG24), representado por um nó de maior tamanho e compartilhado por diversos isolados, predominantemente oriundos do estado do Pará. Esse genótipo ocupa posição estratégica na rede, apresentando elevada conectividade com múltiplos genótipos adjacentes. A partir desse núcleo, observa-se a formação de genótipos intimamente relacionados, conectados por poucas diferenças alélicas, caracterizando um padrão compatível com expansão clonal. Adicionalmente, esse genótipo está associado a coletas mais recentes (2021) e ocorre em diferentes áreas dentro do estado do Pará, sugerindo ampla distribuição espacial e possível capacidade de dispersão e estabelecimento em múltiplos ambientes.

Em contraste, a presença de genótipos mais distantes, ligados por maior número de diferenças alélicas, indica a ocorrência de variabilidade genética dentro da população. A identificação dos genótipos multilocus (MLGs), bem como a distribuição dos isolados e o intervalo de anos de coleta, estão apresentados na Tabela 4. Observa-se que o MLG33 está associado às amostras mais antigas (2008–2011), o que pode indicar sua presença inicial na população amostrada; no

entanto, sua posição periférica na rede sugere que esse genótipo não desempenha papel central na estrutura genética atual. Destaca-se ainda o MLG16, que apresenta ampla distribuição temporal (2011–2025), sugerindo persistência ao longo do tempo.

Tabela 4 – Genótipos multilocus (MLGs) de isolados pertencentes ao complexo *Calonectria pteridis*, respectivos isolados (LPF), número de amostras (n) e intervalo de anos de coleta, com base em 13 *loci* SSR.

Genótipos multilocus (MLGs)	Isolados (LPF)	número de amostras (n)	Ano de coleta
MLG1	LPF315	1	2021
MLG2	LPF346	1	2021
MLG3	LPF340	1	2021
MLG4	LPF17, LPF4	2	2008
MLG5	LPF2307	1	2019
MLG6	LPF2561	1	2021
MLG7	LPF2562	1	2021
MLG8	LPF2559	1	2021
MLG9	LPF2512	1	2021
MLG10	LPF2509	1	2021
MLG11	LPF341	1	2011
MLG12	LPF3195, LPF3197	2	2025
MLG13	LPF2506	1	2021
MLG14	LPF2500, LPF2525	2	2021
MLG15	LPF2526, LPF2530	2	2021
MLG16	LPF168, LPF2315, LPF2505, LPF2511, LPF2566, LPF2801, LPF2804, LPF2927, LPF2928, LPF294, LPF409, LPF2925, LPF3194, LPF3196, LPF3198	15	2011–2025
MLG17	LPF2527, LPF2533	2	2021
MLG18	LPF436	1	2011
MLG19	LPF314, LPF349, LPF56	3	2008–2011
MLG20	LPF2532	1	2021
MLG21	LPF2	1	2008
MLG22	LPF457	1	2011
MLG23	LPF2499, LPF2552, LPF2554, LPF2555, LPF2563, LPF2564	6	2021
MLG24	LPF2498, LPF2502, LPF2508, LPF2513, LPF2515, LPF2516, LPF2517, LPF2518, LPF2520, LPF2522, LPF2523, LPF2531, LPF2560, LPF2569	14	2021
MLG25	LPF344	1	2011
MLG26	LPF201	1	2021
MLG27	LPF2507	1	2021
MLG28	LPF2538	1	2021
MLG29	LPF2504	1	2021
MLG30	LPF20, LPF335	2	2009–2011
MLG31	LPF59	1	2008
MLG32	LPF342	1	2011
MLG33	LPF19, LPF297, LPF323, LPF324, LPF326, LPF328, LPF329, LPF330, LPF334, LPF338, LPF348, LPF352, LPF357, LPF361, LPF52, LPF64	16	2008–2011
MLG34	LPF54	1	2008
MLG35	LPF2556, LPF2815, LPF2962	3	2021–2024
MLG36	LPF163, LPF416	2	2011

A Análise de Coordenadas Principais (PCoA), realizada com base na distância genética de Bruvo, considerando as populações com tamanho amostral suficiente, mostrou que os dois primeiros eixos explicaram 80,0% da variação genética total, sendo 49,7% correspondentes ao primeiro eixo (PCoA1) e 30,3% ao segundo (PCoA2) (Figura 7).

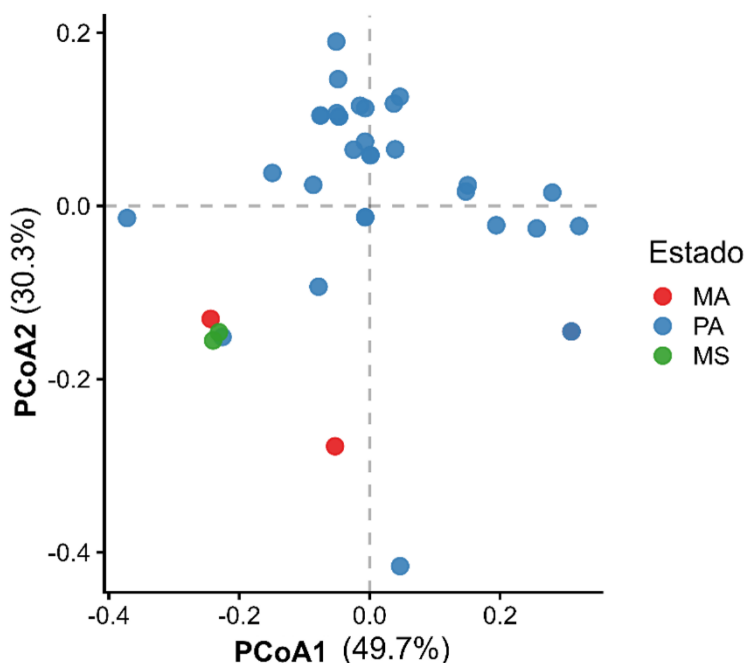


Figura 7 – Análise de Coordenadas Principais (PCoA) baseada na distância de Bruvo para genótipos multilocus únicos de isolados pertencentes ao complexo *Calonectria pteridis*. As cores representam o estado de origem dos isolados.

A ordenação dos genótipos revelou um agrupamento principal composto predominantemente por isolados provenientes do estado do Pará, indicando elevada similaridade genética entre esses indivíduos. Isolados do Mato Grosso do Sul apresentaram distribuição mais restrita, refletindo menor diversidade genética nessa população. Em contraste, os isolados provenientes do Maranhão ocuparam posições mais periféricas em relação ao agrupamento principal, sugerindo maior diferenciação genética em relação à maioria dos genótipos avaliados.

A estrutura genética das populações de isolados pertencentes ao complexo *C. pteridis* foi avaliada por meio de análise de variância molecular (AMOVA), considerando o estado de origem como unidade populacional.

Os resultados corroboram o padrão observado na análise de coordenadas principais (PCoA), indicando que 63,38% da variação genética ocorreu dentro das populações, enquanto 36,62% foi atribuída às diferenças entre estados (Tabela 5).

A diferenciação genética entre as populações foi significativa ($p = 0,001$), com valor de $\Phi_{ST} = 0,366$, evidenciando estruturação genética moderada a alta entre os estados.

Tabela 5 – Análise de variância molecular (AMOVA) para populações de isolados pertencentes ao complexo *Calonectria pteridis*, agrupadas por estado de origem.

Fonte de Variação	df ¹	Soma de Quadrados	Componentes de Variância	Variância Total (%)	P-valor ²
Entre Estados	2	63,91	2,15	36,62%	0,001
Dentro dos Estados	87	324,38	3,73	63,38%	-
Total	89	388,29	5,88	100,00%	-

Nota: ¹df: graus de liberdade; ²P-valor baseado em 999 permutações (teste de Monte Carlo); $\Phi_{ST} = 0,366$.

3.5 Comparação entre marcadores SSR gênicos e genômicos e sua relação com a agressividade

Com o objetivo de comparar o desempenho de marcadores SSR gênicos e genômicos na discriminação genética de isolados pertencentes ao complexo *C. pteridis* e investigar sua relação com os níveis de agressividade, foram analisados isolados previamente caracterizados quanto à desfolha, conforme descrito por Freitas *et al.* (2019). Os isolados foram classificados em diferentes classes de agressividade, variando de baixa a alta, conforme apresentado na Tabela 6.

Tabela 6 – Isolados pertencentes ao complexo *C. pteridis* utilizados na análise de agressividade, com informações de origem, porcentagem de desfolha, classe de agressividade e respectivos genótipos multilocus (MLGs) determinados com base em marcadores SSR.

Isolado	Local de coleta	Estado	Desfolha (%) ¹	Classe de agressividade ¹	Genótipo (MLG) ²
LPF201	Imperatriz	MA	30,64	C (Média-baixa)	MLG26
LPF294	Monte Dourado	PA	65,59	A (Alta)	MLG16
LPF315	Monte Dourado	PA	42,62	B (Média-Alta)	MLG1
LPF323	Monte Dourado	PA	45,80	B (Média-Alta)	MLG33
LPF338	Monte Dourado	PA	20,37	D (Baixa)	MLG33
LPF344	Monte Dourado	PA	39,64	B (Média-Alta)	MLG25
LPF416	Elesbão Veloso	PI	23,49	D (Baixa)	MLG36
LPF436	Monte Dourado	PA	13,86	D (Baixa)	MLG18
LPF457	Monte Dourado	PA	16,67	D (Baixa)	MLG22
LPF59	Monte Dourado	PA	55,44	A (Alta)	MLG31

Notas: ¹ Dados de desfolha e classificação de agressividade obtidos de Freitas *et al.*, 2019.

² Genótipos multilocus determinados com base em marcadores SSR no presente estudo.

A Análise de Coordenadas Principais (PCoA), baseada na distância de Bruvo, evidenciou diferenças na distribuição dos isolados no espaço multivariado em função do conjunto de marcadores utilizado. Considerando todos os marcadores SSR, os dois primeiros eixos explicaram 96,0% da variação total (PCoA1 = 68,9%; PCoA2 = 27,1%), com maior dispersão dos isolados ao longo dos eixos principais (Figura 8A). Por outro lado, a análise baseada apenas em marcadores localizados em regiões gênicas apresentou menor proporção de variação explicada (PCoA1 = 53,52%; PCoA2 = 45,88%) e distribuição mais concentrada dos isolados no espaço multivariado (Figura 8B). Independentemente do conjunto de marcadores considerado, não foi observado agrupamento dos isolados em função dos níveis de agressividade. Isolados pertencentes a diferentes grupos fenotípicos apresentaram distribuição sobreposta ao longo dos eixos principais, enquanto isolados de uma mesma classe foram distribuídos em diferentes regiões do gráfico, sem a formação de agrupamentos consistentes (Figura 8A–B).

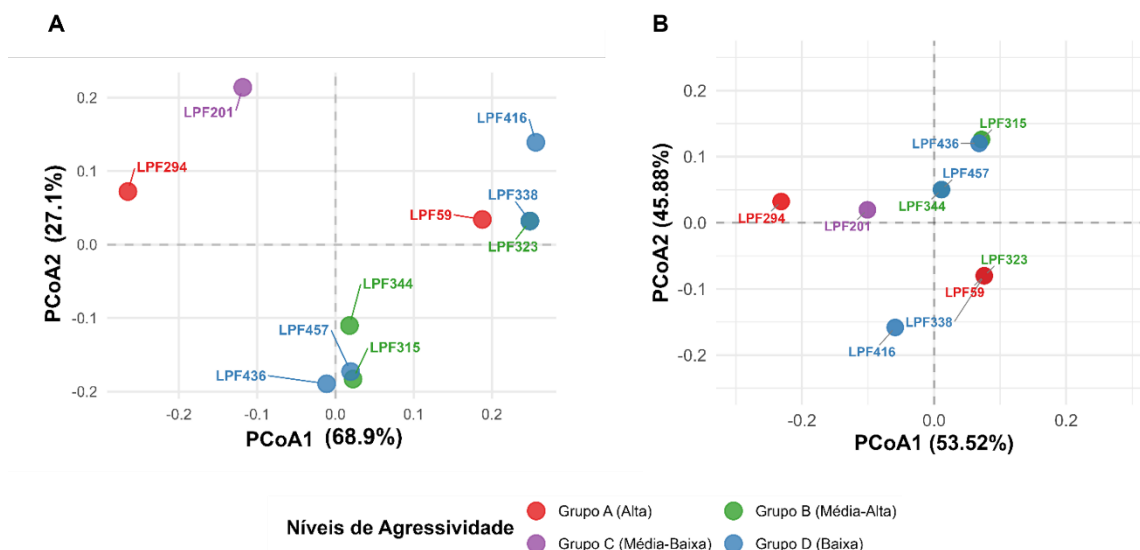


Figura 8 – Análise de Coordenadas Principais (Principal Coordinates Analysis – PCoA) baseada na distância de Bruvo para genótipos de isolados pertencentes ao complexo *Calonectria pteridis*, classificados em diferentes níveis de agressividade. (A) Análise utilizando todos os marcadores microsatélites (SSR); (B) análise utilizando apenas marcadores SSR localizados em regiões gênicas. As cores indicam as classes de agressividade (A = alta, B = média-alta, C = média-baixa e D = baixa).

A diversidade genética variou entre os *loci* SSR avaliados, com valores de diversidade genética esperada (Hexp) variando de 0,50 a 0,83 (Figura 9). O *locus* CP_SSR131 destacou-se por apresentar o maior valor de diversidade genética, enquanto os demais *loci* apresentaram valores intermediários ou mais baixos.

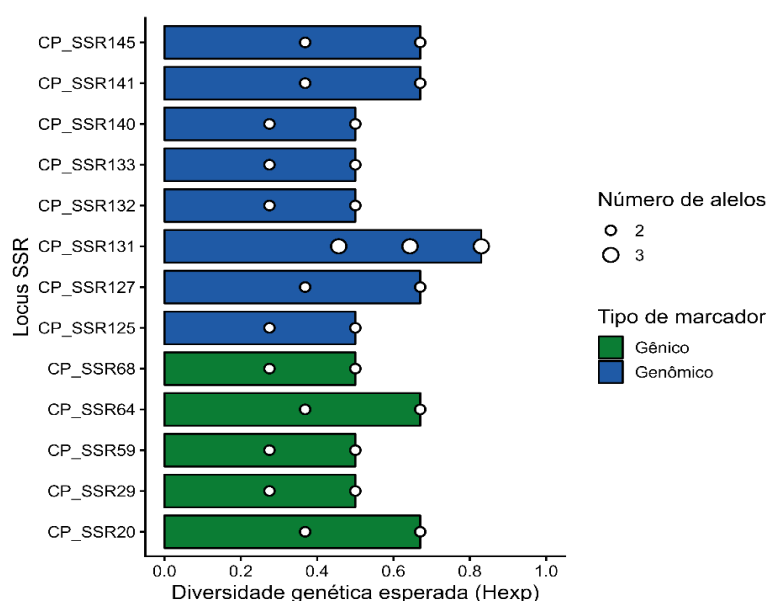


Figura 9 - Diversidade genética esperada (Hexp) estimada para cada marcador SSR utilizado nas análises populacionais.

De modo geral, os marcadores SSR genômicos apresentaram valores de diversidade genética ligeiramente superiores aos observados para os marcadores SSR gênicos, bem como maior número de alelos por *locus* (Tabela 7).

Tabela 7 - Diversidade genética média estimada para marcadores SSR gênicos e genômicos em isolados de *Calonectria pteridis*

Tipo de marcador	Número de <i>loci</i>	Na médio	Hexp médio
Gênico	5	2,00	0,600
Genômico	8	2,13	0,634

O padrão de ausência de estruturação em função dos níveis de agressividade também foi observado na análise dos perfis alélicos. A visualização por meio do *heatmap* não evidenciou agrupamentos consistentes entre isolados pertencentes às diferentes classes de agressividade (Figura 10). Os agrupamentos formados incluíram isolados de diferentes classes fenotípicas, enquanto isolados de uma mesma classe foram distribuídos em diferentes ramos do dendrograma.

O gradiente de cores representa a variação relativa dos valores alélicos dos *loci* SSR após padronização, evidenciando diferenças na composição genética entre os isolados, porém sem associação consistente com os níveis de agressividade.

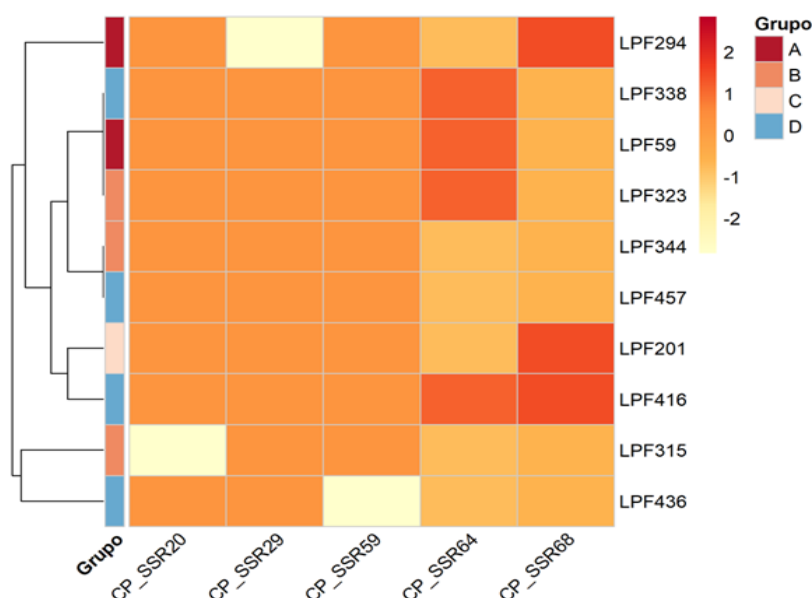


Figura 10 - Heatmap da variação alélica de marcadores microssatélites (SSR) localizados em regiões gênicas de isolados pertencentes ao complexo *Calonectria pteridis*. As linhas correspondem aos isolados e as colunas aos *loci* avaliados. O gradiente de cores representa os valores alélicos padronizados, e o dendrograma ilustra o agrupamento hierárquico dos isolados com base na similaridade de seus perfis alélicos.

3.6 Transferibilidade dos marcadores SSR entre complexos de espécies

A maioria dos marcadores SSR desenvolvidos para isolados pertencentes ao complexo *Calonectria pteridis* apresentou amplificação bem-sucedida em isolados pertencentes aos complexos *Calonectria candelabrum* e *Calonectria cylindrospora*. A identificação dos isolados foi baseada em diferentes abordagens: parte dos isolados foi previamente caracterizada por Alfenas *et al.* (2015), enquanto os demais foram avaliados com base em sequências do gene do fator de alongação da tradução 1-alfa (*tef1*). Contudo, a delimitação taxonômica em nível de espécie foi limitada, não permitindo a discriminação inequívoca entre espécies. Ainda assim, os isolados foram agrupados em nível de complexo de espécies.

No complexo *C. candelabrum*, os *loci* CP_SSR140, CP_SSR141 e CP_SSR133 não apresentaram amplificação consistente em todos os isolados avaliados. De forma semelhante, o *locus* CP_SSR141 não foi amplificado nos isolados do complexo *C. cylindrospora*.

Apesar dessas limitações pontuais, 17 dos 20 marcadores SSR foram transferíveis entre os complexos avaliados, evidenciando elevada transferibilidade interespecífica. Entre esses *loci*, CP_SSR66 apresentou amplificação exclusiva

no complexo *C. candelabrum*, não sendo detectado em *C. cylindrospora*. Adicionalmente, quatro *loci* (CP_SSR1, CP_SSR42, CP_SSR66 e CP_SSR112), embora monomórficos em *C. pteridis*, apresentaram variação alélica entre os complexos, indicando potencial para diferenciação genética entre grupos.

A Análise de Coordenadas Principais (PCoA), baseada na distância de Bruvo, evidenciou estruturação genética entre os complexos de espécies. As análises conduzidas com diferentes conjuntos de marcadores revelaram agrupamentos distintos correspondentes a cada complexo, com separação clara entre *C. pteridis*, *C. candelabrum* e *C. cylindrospora* (Figura 10 A–C). Em conjunto, esses resultados evidenciam diferenciação genética entre os complexos analisados.

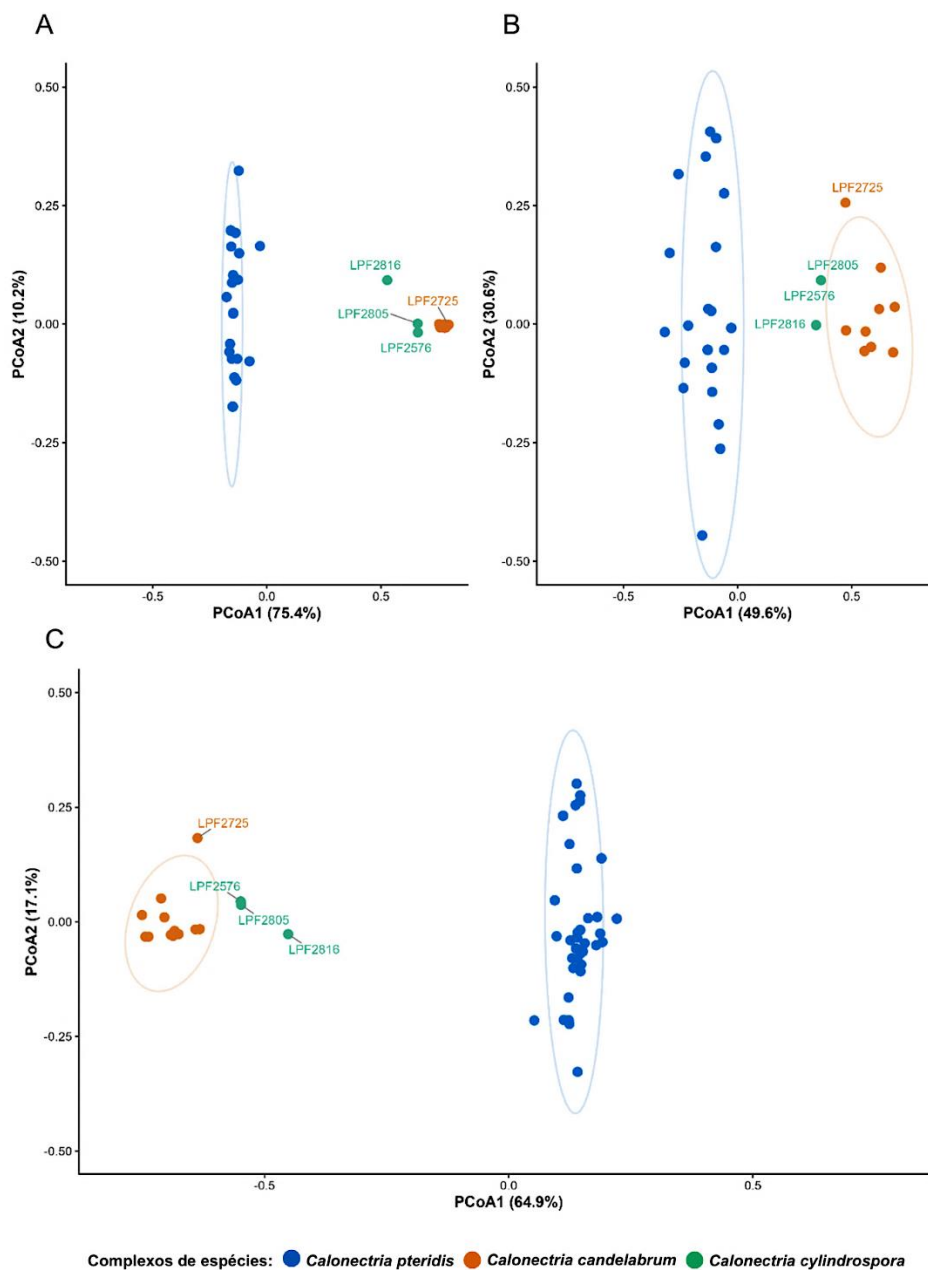


Figura 11 - Análise de Coordenadas Principais (PCoA) baseada na distância genética de Bruvo para isolados pertencentes aos complexos de espécies de *Calonectria*. Os pontos representam os isolados e as elipses a dispersão dos agrupamentos genéticos. As análises foram realizadas utilizando (A) marcadores SSR gênicos, (B) marcadores SSR genômicos e (C) o conjunto completo de marcadores. Os valores entre parênteses nos eixos correspondem à porcentagem da variância explicada por cada coordenada principal.

A análise de variância multivariada permutacional (PERMANOVA) indicou diferenciação genética significativa entre as espécies avaliadas ($p < 0,001$). A proporção da variação explicada pela identidade específica foi maior para os SSRs gênicos ($R^2 = 0,787$), seguida pelos SSRs genômicos ($R^2 = 0,555$), enquanto a análise combinada explicou 70,0% da variação total ($R^2 = 0,700$) (Tabela 8). Para os SSRs gênicos, contudo, essa interpretação deve ser realizada

com cautela, uma vez que foi detectada diferença significativa na dispersão entre os grupos (PERMDISP, $p = 0,049$). Para os SSRs genômicos e para o conjunto total de marcadores, os valores de PERMDISP não indicaram diferenças significativas na dispersão entre os grupos.

Tabela 8 - Resultados da PERMANOVA baseada na distância de Bruvo para isolados pertencentes aos complexos de *Calonectria*.

Conjunto de marcadores	F (PERMANOVA)	R ²	p-valor	p-valor PERMDISP
SSR gênicos	203.41	0.787	0.001	0.049
SSR genômicos	68.66	0.555	0.001	0.120
Todos os SSR	128.37	0.700	0.001	0.191

4. DISCUSSÃO

A identificação de 4.660 *loci* de microssatélites (SSRs) perfeitos no isolado LPF059 de *Calonectria pteridis* resultou em uma densidade aproximada de 79,8 SSRs/Mb. Esse valor está dentro da faixa reportada para o reino Fungi (63 a 377 SSRs/Mb) e é consistente com o observado em outros ascomicetos, como *Aspergillus nidulans* e *Fusarium graminearum* (Karaoglu *et al.*, 2005), indicando que a abundância de SSRs segue padrões genômicos previamente descritos para fungos. A menor densidade relativa desses elementos, em comparação a eucariotos mais complexos, pode estar associada à elevada densidade gênica e à reduzida proporção de DNA não codificador característica dos genomas fúngicos. Esses fatores sugerem que a ocorrência de microssatélites nesses organismos é influenciada por características taxonômicas e evolutivas, e não apenas pelo tamanho do genoma (Karaoglu *et al.*, 2005).

A composição dos SSRs revelou predominância de motivos dinucleotídicos (66,03%), seguidos por trinucleotídicos (27,98%), padrão amplamente descrito na literatura e que reflete a relação inversa entre a frequência dos SSRs e o tamanho da unidade de repetição (Temnykh *et al.*, 2001; Grover *et al.*, 2007; Karaoglu *et al.*, 2005). Esse comportamento está associado ao mecanismo de deslizamento da DNA polimerase, o qual apresenta maior propensão a erros em motivos curtos, favorecendo sua expansão (Zalapa *et al.*, 2012; Kelkar *et al.*, 2008; Schlötterer, 2000). Por outro lado, a menor frequência de repetições mais longas reflete o equilíbrio entre eventos de expansão e a interrupção desses arranjos por mutações pontuais (Schlötterer, 2000; Ellegren, 2004).

A distribuição dos SSRs evidenciou predominância em regiões não codificantes, em detrimento das regiões gênicas, padrão consistente com a atuação de seleção purificadora sobre sequências codificadoras em eucariotos (Hancock, 1995). Em regiões exônicas, variações em SSRs que não correspondem a múltiplos de três nucleotídeos podem resultar em mutações do tipo *frameshift*, frequentemente deletérias (Metzgar & Wills, 2000; Ellegren, 2004; Zhang *et al.*, 2004; Xu *et al.*, 2013; Vieira *et al.*, 2016). Esse padrão explica a maior prevalência de motivos tri- e hexanucleotídicos em éxons do isolado LPF059, uma vez que alterações nessas repetições tendem a modificar aminoácidos sem comprometer a matriz de leitura (Zhang *et al.*, 2004; Xu *et al.*, 2013). Estruturalmente, essas repetições podem originar regiões de baixa complexidade, como cadeias de aminoácidos repetidos, que atuam como elementos flexíveis entre domínios proteicos, sendo comuns em fatores de transcrição fúngicos (Katti *et al.*, 2000).

Em contraste, a maior frequência de motivos tetra- e pentanucleotídicos em íntrons sugere maior tolerância dessas repetições em regiões nas quais a instabilidade não afeta diretamente a estrutura proteica, embora possam influenciar processos regulatórios, como o *splicing* alternativo e o transporte de mRNA (Temnykh *et al.*, 2001; Vieira *et al.*, 2016; Schlötterer, 2000).

Com base nesse panorama estrutural, a estratégia de desenvolvimento de marcadores priorizou SSRs localizados em regiões codificadoras (CDS), associados a genes funcionalmente anotados por meio das bases PHI-base e DFVF (Metzgar & Wills, 2000; Albà; Guigó, 2004; Ellegren, 2004; Queiroz, 2022). Essa abordagem possibilitou a identificação de *loci* relacionados a funções potencialmente envolvidas na patogenicidade, incluindo biossíntese de metabólitos secundários, transportadores e enzimas, como quitina sintase (Queiroz, 2022).

Em contraste com abordagens baseadas em marcadores neutros, como os ISSRs utilizados por Freitas *et al.* (2019), que não evidenciaram associação com a agressividade, a seleção direcionada de SSRs gênicos incorpora um componente funcional à análise da variabilidade genética.

Embora o uso de SSRs como marcadores moleculares seja amplamente consolidado em fungos, incluindo espécies como *Fusarium graminearum* e *Neurospora crassa* (Karaoglu *et al.*, 2005), a priorização de *loci* inseridos em

genes potencialmente associados à virulência representa uma abordagem mais direcionada. Nesse contexto, essa estratégia amplia a interpretação dos dados para além das análises populacionais clássicas, ao considerar a possível relação entre o polimorfismo genético e o fenótipo de infecção em *C. pteridis*. No entanto, a ausência de associação observada no presente estudo indica que essa relação não foi evidenciada com os marcadores avaliados, devendo ser investigada por meio de abordagens funcionais complementares.

A validação de 13 *loci* SSR polimórficos permitiu uma análise robusta da biologia populacional de *C. pteridis* no Brasil. A estabilização da curva de acumulação de genótipos multilocus (MLGs), evidenciada pela formação de um platô, indica que o número de *loci* empregado foi suficiente para capturar a diversidade genotípica da população (Li *et al.*, 2021; Wu *et al.*, 2023; Li *et al.*, 2025), reduzindo o risco de subestimação (Castroagudín *et al.*, 2020).

A identificação de 36 MLGs em 94 isolados evidencia maior poder de resolução em comparação a estudos baseados em marcadores ISSR, os quais identificaram 33 genótipos em 90 isolados (Freitas *et al.*, 2019). Esse resultado reflete um aumento expressivo na diversidade genética estimada para a população de *C. pteridis* ($H_{exp} = 0,05$ para $H_{exp} = 0,34$).

Estudos baseados em microsatélites (SSRs) têm evidenciado a presença de “diversidade oculta” em populações de *Calonectria*. Em *C. pseudoreteauidii*, por exemplo, foram identificados 90 genótipos multilocus (MLGs) entre 311 isolados, refletindo elevada variabilidade genética (Li *et al.*, 2025). Esse elevado poder de resolução está associado à alta taxa de mutação dos SSRs em comparação a marcadores filogenéticos ou dominantes, como ISSR, permitindo a detecção de polimorfismos decorrentes de eventos evolutivos recentes.

De forma consistente, os resultados obtidos no presente estudo evidenciam maior capacidade discriminatória dos SSRs, refletida no aumento do número de genótipos identificados e na estimativa mais elevada de diversidade genética em *C. pteridis*.

A relação genética entre isolados provenientes de solo e de folhas segue um padrão consistente no gênero *Calonectria*. Os resultados obtidos neste estudo corroboram achados para *C. pseudoreteauidii* na China (Wu *et al.*, 2023) e *C. reteaudii* na Malásia (Pham *et al.*, 2025), nos quais os isolados de solo representam um subconjunto da diversidade genética observada na população

foliar. Esse padrão sugere que a população presente no solo pode derivar da população aérea, possivelmente em decorrência da deposição de estruturas propagativas oriundas de tecidos infectados.

Outras espécies do gênero apresentam padrões distintos, incluindo elevados níveis de clonalidade em escala global. *Calonectria pauciramosa*, por exemplo, apresenta um genótipo dominante (MLG20) distribuído em sete países e cinco continentes, indicando ampla disseminação associada ao trânsito de germoplasma infectado (Li *et al.*, 2021). De forma semelhante, *C. pseudonaviculata*, no Irã, apresenta baixa variabilidade genética, possivelmente resultante da introdução recente de um único genótipo (Khazaeli *et al.*, 2018).

Em contraste, os resultados obtidos para *C. pteridis* indicam um padrão intermediário, caracterizado pela presença de múltiplos genótipos multilocus e diversidade genética moderada, sugerindo a atuação combinada de processos de clonagem e geração de variabilidade.

De acordo com McDonald & Linde (2002), populações com elevada variação genética, como as observadas para *C. pseudoreteaudii* e, em menor grau, para *C. pteridis*, apresentam maior potencial evolutivo. Esse cenário pode representar um risco ampliado para o hospedeiro, uma vez que tais populações tendem a apresentar maior capacidade adaptativa, incluindo a superação de mecanismos de resistência em plantas de eucalipto.

Adicionalmente, a coexistência dos dois tipos de acasalamento (MAT1-1 e MAT1-2) em campo, mesmo sob predominância do ciclo assexuado, sugere potencial para ocorrência de recombinação sexual e geração de novos genótipos, contribuindo para a variabilidade genética observada (Li *et al.*, 2022).

A heterogeneidade na riqueza genotípica entre as regiões sugere dinâmicas populacionais distintas. A elevada diversidade observada no Pará (32 MLGs; eMLG = 7,39) indica maior variabilidade genética nessa região, podendo refletir condições favoráveis à manutenção e geração de diversidade. Por outro lado, a baixa diversidade no Maranhão e no Mato Grosso do Sul (3 MLGs cada) indica a predominância de linhagens clonais, padrão recorrente no gênero *Calonectria* (Crous, 2002; Burgess & Wingfield, 2017).

Essa dominância genotípica pode estar associada à dispersão de material infectado, como observado em epidemias de *C. pseudonaviculata* (Roy, 2016; Santini *et al.*, 2018; Leblanc *et al.*, 2019; Castroagudín *et al.*, 2020), embora essa

interpretação deva ser considerada com cautela, em razão do menor tamanho amostral nessas populações.

Entretanto, não se pode descartar que parte dessa variação na riqueza genotípica esteja associada a diferenças no esforço amostral entre as regiões, o que pode levar à subestimação da diversidade em populações menos representadas.

O desequilíbrio de ligação significativo ($rD = 0,125$; $p < 0,001$) indica que, apesar do potencial para reprodução sexuada (heterotalismo), a reprodução assexuada, via conídios, predomina nas populações de *Calonectria* analisadas (Wu *et al.*, 2023; Queiroz *et al.*, 2022; Pham *et al.*, 2025). A Análise de Coordenadas Principais (PCoA) e a Árvore de Mínima Expansão (MST) corroboram esse padrão, evidenciando a presença de genótipos centrais e linhagens intimamente relacionadas, compatíveis com expansão clonal.

A diferenciação genética entre os estados ($\Phi ST = 0,366$; $p = 0,001$) indica estruturação genética de moderada a alta, sugerindo limitações ao fluxo gênico ou possíveis eventos de colonização independentes (Freitas *et al.*, 2019). A maior proporção de variação intra-populacional (63,38%) em relação à inter-populacional segue um padrão frequentemente observado no gênero *Calonectria* (Wu *et al.*, 2023; Pham *et al.*, 2025).

Um dos principais achados deste estudo foi a ausência de correlação entre os agrupamentos genotípicos obtidos com os marcadores SSR e a agressividade previamente avaliada em alguns isolados. A sobreposição fenotípica observada nos agrupamentos da PCoA, bem como a dispersão de isolados altamente agressivos (LPF059 e LPF294) na rede molecular, indicam ausência de associação entre os marcadores avaliados e os níveis de agressividade (Freitas *et al.*, 2019).

Essa dissociação pode ser explicada pelas diferentes pressões seletivas que atuam sobre os microssatélites e sobre regiões genômicas associadas à patogenicidade. Enquanto os SSRs são, em sua maioria, marcadores neutros, refletindo processos como mutação e deriva genética, genes relacionados à patogenicidade, como efetores e enzimas da classe CAZymes, estão frequentemente sob seleção natural, respondendo diretamente às pressões impostas pelo hospedeiro e pelo ambiente (Queiroz *et al.*, 2022; Freitas *et al.*, 2019).

Adicionalmente, deve-se considerar que a fenotipagem da agressividade foi conduzida sob condições experimentais controladas, utilizando clones híbridos de *Eucalyptus grandis* (CLR221) × *E. urophylla* (CLR222) (Freitas *et al.*, 2019). O uso de uma base genética restrita do hospedeiro pode limitar a detecção de variações fenotípicas mais amplas.

Uma avaliação mais abrangente da agressividade requer ensaios sob diferentes condições ambientais e em múltiplos genótipos de hospedeiro, uma vez que esse caráter possui base genética complexa e natureza quantitativa, sendo fortemente influenciado pela interação genótipo × ambiente (McDonald & Linde, 2002).

Por fim, a elevada transferibilidade (85%) dos *loci* para as espécies *C. candelabrum* e *C. cylindrospora* evidencia a conservação das regiões flangeadoras entre espécies pertencentes ao Grupo Prolate (Clado 1). Esse grupo compreende os complexos *Calonectria brassicae*, *C. candelabrum*, *C. colhounii*, *C. cylindrospora*, *C. gracilipes*, *C. mexicana*, *C. pteridis*, *C. reteaudii* e *C. spathiphylli* (Barbará *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2020). A taxa de amplificação observada foi superior à reportada em estudos prévios com fungos filamentosos (Wright *et al.*, 2006).

Além disso, observou-se que marcadores monomórficos em *C. pteridis* (como o *locus* CP_SSR66) podem ser informativos para a diferenciação entre complexos de espécies relacionadas. Esse padrão ocorre quando o *locus* apresenta variação interespecífica, apesar de permanecer conservado dentro de uma espécie específica, conforme descrito por Leblanc *et al.* (2019).

Adicionalmente, os SSRs gênicos apresentaram maior capacidade de discriminação entre espécies ($R^2 = 0,79$), indicando que regiões codificadoras podem preservar sinais mais estáveis de identidade taxonômica, enquanto SSRs genômicos tendem a ser mais informativos para discriminação em nível intraespecífico.

CONCLUSÕES

Este estudo estabeleceu uma estratégia *in silico* eficiente para o desenvolvimento de marcadores microssatélites (SSR) polimórficos a partir de dados genômicos do complexo *Calonectria pteridis*. O conjunto de 13 *loci* polimórficos permitiu a discriminação de 36 perfis multilocus (MLGs) entre os 94 isolados analisados, evidenciando variabilidade genética de moderada a elevada,

especialmente nas populações do Pará, além da identificação de genótipos exclusivos em áreas com menor amostragem.

Adicionalmente, os marcadores demonstraram elevada transferibilidade interespecífica, reforçando seu potencial de aplicação em estudos genético-populacionais em outros complexos de espécies do gênero. Embora não tenha sido observada correlação entre genótipos e níveis de agressividade, os resultados obtidos fornecem subsídios relevantes para o monitoramento da diversidade do patógeno em escala regional, contribuindo para estratégias de manejo e programas de melhoramento genético.

REFERÊNCIAS

- ALBÀ, M. M.; GUIGÓ, R. Comparative analysis of amino acid repeats in rodents and humans. **Genome Research**, v. 14, p. 549–554, 2004.
- ALFENAS, A. C. *et al.* **Clonagem e doenças do eucalipto**. 2. ed. Viçosa: Editora UFV, 2009.
- AGARWAL, M. *et al.* Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 27, p. 617–631, 2008.
- ALFENAS, R. F. *et al.* Diversity and potential impact of *Calonectria* species in *Eucalyptus* plantations in Brazil. **Studies in Mycology**, v. 80, p. 89–130, 2015.
- ALFENAS, R. F. *et al.* Mass spore production and inoculation of *Calonectria pteridis* on *Eucalyptus* spp. under different environmental conditions. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 38, n. 5, p. 406–413, 2013.
- BARBARÁ, T. *et al.* Cross-species transfer of nuclear microsatellite markers: potential and limitations. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 16, p. 3759–3767, 2007.
- BEIER, S. *et al.* MISA-web: a web server for microsatellite prediction. **Bioinformatics**, v. 33, n. 16, p. 2583–2585, 2017.
- BOSE, R.; BANERJEE, S.; PANDEY, A.; BHANDARI, M. S.; BARTHWAL, S.; PANDEY, S. *Calonectria* leaf blight of *Eucalyptus*: a global review. **Annals of Applied Biology**, v. 182, n. 1, p. 6–28, 2023.
- BRUVO, R. *et al.* A simple method for the calculation of microsatellite genotype distances irrespective of ploidy level. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 13, n. 7, p. 2101–2106, 2004.
- BURGESS, T. I.; WINGFIELD, M. J. Pathogens on the move: a 100-year global experiment with planted eucalypts. **BioScience**, Oxford, v. 67, n. 1, p. 14–25, 2017.
- CASTROAGUDÍN, V. L. *et al.* One clonal lineage of *Calonectria pseudonaviculata* is primarily responsible for the boxwood blight epidemic in the United States. **Phytopathology**, St. Paul, v. 110, n. 11, p. 1845–1853, 2020.

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.; KANG, J. C. Re-evaluation of *Cylindrocladium* species with 1-septate conidia. **Mycologia**, New York, v. 93, p. 127–140, 2001.

CROUS, P. W. *Taxonomy and pathology of Cylindrocladium (Calonectria) and allied genera*. St. Paul, MN: **American Phytopathological Society (APS Press)**, 2002.

CROUS, P. W.; WINGFIELD, M. J. A re-evaluation of *Cylindrocladium* based on morphology and DNA sequence data. **Mycological Research**, Cambridge, v. 97, p. 433–448, 1993.

CROUS, P. W.; WINGFIELD, M. J. Species of *Cylindrocladium* and allied genera associated with disease of plants. **Mycological Research**, Cambridge, v. 98, p. 689–703, 1994.

ELLEGREN, H. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. **Nature Reviews Genetics**, London, v. 5, n. 6, p. 435–445, 2004.

EMANUELSSON, O. *et al.* Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 300, n. 4, p. 1005–1016, 2000.

FALEIRO, F. G. **Marcadores genético-moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2011.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: Embrapa-Cenargen, 1998.

FONSECA, S. M. *et al.* Resistência genética de espécies de *Eucalyptus* à mancha de *Calonectria*. **Forest Pathology**, Oxford, v. 40, p. 123–134, 2010.

FREITAS, R. G. *et al.* Genetic diversity and aggressiveness of *Calonectria pteridis* associated with eucalyptus leaf blight. **Plant Pathology**, Oxford, v. 68, p. 147–157, 2019.

GEHESQUIÈRE, B. *et al.* Development of PCR–RFLP markers for the detection of *Calonectria* species. **Plant Disease**, St. Paul, v. 100, p. 1230–1236, 2016.

GROVER, A. *et al.* Searching microsatellites in DNA sequences: approaches used and tools developed. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, New Delhi, v. 13, n. 1, p. 1–11, 2007.

HANCOCK, J. M. The contribution of slippage-like processes to genome evolution. **Journal of Molecular Evolution**, New York, v. 41, n. 6, p. 1038–1047, 1995.

INDÚSTRIA BRASILEIRA DE ÁRVORES (IBÁ). **Relatório anual 2025**. Brasília, DF: IBÁ, 2025.

JOMBART, T. adegenet: a R package for the multivariate analysis of genetic markers. **Bioinformatics**, Oxford, v. 24, n. 11, p. 1403–1405, 2008.

KAMVAR, Z. N. *et al.* poppr: an R package for genetic analysis of populations with clonal, partially clonal, and/or sexual reproduction. **PeerJ**, San Diego, v. 2, e281, 2014.

KARAOGLU, H. *et al.* Survey of simple sequence repeats in completed fungal genomes. **Fungal Genetics and Biology**, San Diego, v. 42, n. 12, p. 1025–1036, 2005.

KHAZAELI, P.; REZAEI, S.; MIRABOLFATHY, M.; ZAMANIZADEH, H.; KIADALIRI, H. Genetic and phenotypic variation of *Calonectria pseudonaviculata* isolates causing boxwood blight disease in the Hyrcanian forest of Iran. *Agricultural Research & Technology: Open Access Journal*, v. 19, n. 1, p. 556081, 2018.

KATTI, M. V. *et al.* Amino acid repeat patterns in protein sequences: their diversity and structural-functional implications. **Protein Science**, Cambridge, v. 9, n. 6, p. 1203–1209, 2000.

KELKAR, Y. D. *et al.* What is a microsatellite: a computational and experimental definition based upon repeat mutational behavior. **Genome Biology and Evolution**, Oxford, v. 1, p. 100–111, 2008.

KROGH, A. *et al.* Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 305, n. 3, p. 567–580, 2001.

LEBLANC, N. *et al.* Limited genetic diversity across pathogen populations responsible for the global emergence of boxwood blight identified using SSRs. **Plant Pathology**, Oxford, v. 68, n. 5, p. 861–868, 2019.

LI, J. *et al.* Global genetic diversity and mating type distribution of *Calonectria pauciramosa*: an important wide-host-range plant pathogen. **Plant Disease**, St. Paul, v. 105, n. 6, p. 1648–1656, 2021.

LI, J. *et al.* *Calonectria* in the age of genes and genomes: towards understanding an important but relatively unknown group of pathogens. **Molecular Plant Pathology**, v. 23, p. 1060–1072, 2022.

LI, W. *et al.* High genetic diversity and limited regional population differentiation in populations of *Calonectria pseudoreteauidii* from *Eucalyptus* plantations. **Phytopathology**, St. Paul, v. 115, n. 1, p. 97–105, 2025.

LIU, Q. L. *et al.* Reconsideration of species boundaries and proposed DNA barcodes for *Calonectria*. **Studies in Mycology**, Utrecht, v. 97, p. 100106, 2020.

LOMBARD, L.; CHEN, S. F.; MOU, X.; ZHOU, X. D.; CROUS, P. W.; WINGFIELD, M. J. New species, hyper-diversity and potential importance of *Calonectria* spp. from *Eucalyptus* in South China. *Studies in Mycology*, v. 80, p. 151–188, 2015.

LOMBARD, L. *et al.* The forgotten *Calonectria* collection: pouring old wine into new bags. **Studies in Mycology**, Utrecht, v. 85, p. 159–198, 2016.

LU, S. *et al.* DFVF: database of fungal virulence factors. **Database**, Oxford, v. 2012, p. bas032, 2012.

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

METZGAR, D. *et al.* Selection against frameshift mutations limits microsatellite expansion in coding DNA. **Genome Research**, v. 10, n. 1, p. 72–80, 2000.

MOHANTY, S. *et al.* Genetic diversity of fungal pathogens using RAPD markers. **Indian Journal of Microbiology**, New Delhi, v. 52, p. 543–549, 2012.

PHAM, N. Q. *et al.* Evidence of high genetic diversity in populations of *Calonectria pseudoreteauidii*. **Plant Disease**, St. Paul, v. 103, p. 1–10, 2019.

PHAM, N. Q. *et al.* Genetic diversity of *Calonectria reteaudii* isolates from infected *Eucalyptus* leaves and associated soils indicates a phyllosphere origin of the pathogen. **Forest Pathology**, v. 55, e70037, 2025.

PETERSEN, T. N.; BRUNAK, S.; VON HEIJNE, G.; NIELSEN, H. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. **Nature Methods**, v. 8, p. 785–786, 2011.

QUEIROZ, M. F. *et al.* Draft genome sequence of *Calonectria pteridis*, the causal agent of *Calonectria* leaf blight on *Eucalyptus*. **Microbiology Resource Announcements**, Washington, v. 11, n. 5, e00284-22, 2022.

QUEIROZ, Marcia Ferreira. **Genomic analyses of *Calonectria pteridis* and standard area diagram sets for severity assessment of calonectria leaf blight**. 2022. 85 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2022.

RITSCHER, P. S. *et al.* Development of microsatellite markers: methodologies and applications. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 27, p. 1–8, 2004.

RODAS, C. A. *et al.* *Cylindrocladium* blight of *Eucalyptus grandis* in Colombia. **Australasian Plant Pathology**, v. 34, p. 143–149, 2005.

ROSSMAN, A. Y. A revision of the genus *Calonectria*. **Mycologia**, New York, v. 71, p. 660–676, 1979.

ROSSMAN, A. Y. *et al.* One fungus = one name: changes in fungal nomenclature. **IMA Fungus**, v. 4, p. 41–51, 2013.

ROTMISTROVSKY, K. *et al.* A web server for performing electronic PCR. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 32, p. W108–W112, 2004.

ROY, H. E. Control wildlife pathogens too. **Nature**, London, v. 530, n. 7591, p. 281, 2016.

R CORE TEAM. **R: a language and environment for statistical computing**. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing, 2024. Disponível em: <www.R-project.org>.

SÁNCHEZ-GONZÁLEZ, E. I. *et al.* Two new species of *Calonectria* (Hypocreales, Nectriaceae) causing *Eucalyptus* leaf blight in Brazil. **MycoKeys**, v. 91, p. 169–197, 2022.

SANTANA, I. B. B.; OLIVEIRA, E. J.; SOARES FILHO, W. dos S.; *et al.* Variabilidade genética entre acessos de umbu-cajazeira mediante análise de marcadores ISSR. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. 3, p. 868–876, 2011.

SANTINI, A. *et al.* Tracing the role of human civilization in the globalization of plant pathogens. **The ISME Journal**, London, v. 12, n. 3, p. 647–652, 2018.

SCHLÖTTERER, C. Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. **Chromosoma**, Berlin, v. 109, n. 6, p. 365–371, 2000.

SPECHT, C. A. *et al.* A method for extracting high-molecular-weight deoxyribonucleic acid from fungi. **Fungal Genetics Reports**, Manhattan, v. 29, p. 24, 1982.

TEMNYKH, S. *et al.* Computational and experimental analysis of microsatellites in rice (*Oryza sativa* L.). **Genome Research**, v. 11, p. 1441–1452, 2001.

THIEL, T. *et al.* Exploiting EST databases for the development and characterization of gene-derived SSR markers in barley (*Hordeum vulgare* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 106, n. 3, p. 411–422, 2003.

UNTERGASSER, A. *et al.* Primer3—new capabilities and interfaces. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 40, n. 15, p. e115, 2012.

URBAN, M. *et al.* PHI-base: the pathogen–host interactions database. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 45, n. D1, p. D604–D610, 2017.

VIEIRA, M. L. C. *et al.* Microsatellite markers: what they mean and why they are so useful. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 39, n. 3, p. 312–328, 2016.

VLEESHOUWERS, V. G. A. A. *et al.* Understanding and exploiting late blight resistance in the age of effectors. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 49, p. 507–531, 2011.

WEISING, K. *et al.* **DNA fingerprinting in plants and fungi**. Boca Raton: CRC Press, 1995.

WRIGHT, L. P. *et al.* Isolation and characterization of microsatellite loci in *Cylindrocladium parasiticum*. **Molecular Ecology Notes**, Oxford, v. 6, p. 1092–1094, 2006.

WRIGHT, L. P.; WINGFIELD, B. D.; CROUS, P. W.; WINGFIELD, M. J. Isolation and characterization of microsatellite loci in *Cylindrocladium pauciramosum*. **Molecular Ecology Notes**, v. 7, p. 343–345, 2007.

WRIGHT, L. P.; DAVIS, A. J.; WINGFIELD, B. D.; *et al.* Population structure of *Cylindrocladium parasiticum* infecting peanuts (*Arachis hypogaea*) in Georgia, USA. **European Journal of Plant Pathology**, v. 127, p. 199–206, 2010.

WU, Y. *et al.* Evidence of high genetic diversity and differences in the population diversity of the eucalyptus leaf blight pathogen *Calonectria pseudoreteaudii* from diseased leaves and soil. **Microorganisms**, Basel, v. 11, n. 11, p. 2785, 2023.

XU, J. *et al.* Development and characterization of simple sequence repeat markers providing genome-wide coverage and high resolution in maize. **DNA Research**, Oxford, v. 20, n. 5, p. 497–509, 2013.

ZALAPA, J. E. *et al.* Using next-generation sequencing approaches to isolate simple sequence repeat (SSR) loci in the plant sciences. **Applications in Plant Sciences**, St. Louis, v. 1, n. 12, 2012.

ZHANG, H. *et al.* dbCAN2: a meta server for automated carbohydrate-active enzyme annotation. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 46, n. W1, p. W95–W101, 2018.

ZHANG, L. *et al.* Preference of simple sequence repeats in coding and non-coding regions of *Arabidopsis thaliana*. **Bioinformatics**, Oxford, v. 20, n. 7, p. 1081–1086, 2004.

APÊNDICES

Apêndice 1 - Informações dos isolados de *Calonectria* spp., incluindo origem geográfica, ano de coleta e perfis alélicos dos *loci* SSR utilizados na análise populacional.

ID	Local	Estado	Ano	CP SSR1	CP SSR20	CP SSR42	CP SSR29	CP SSR59	CP SSR64	CP SSR145	CP SSR125	CP SSR140	CP SSR127	CP SSR132	CP SSR68	CP SSR66	CP SSR141	CP SSR133	CP SSR112	CP SSR131
LPF163	Imperatriz	MA	2011	195	319	300	368	574	418	203	402	380	435	339	386	328	370	383	378	304
LPF168	Imperatriz	MA	2011	195	319	300	351	574	407	199	410	380	430	339	386	328	352	365	378	299
LPF17	Monte Dourado	PA	2008	195	313	300	368	574	407	203	402	380	435	334	386	328	352	383	378	304
LPF19	Monte Dourado	PA	2009	195	319	300	368	574	418	199	402	380	435	339	380	328	370	383	378	304
LPF2	Monte Dourado	PA	2008	195	319	300	368	574	407	199	402	380	430	334	380	328	352	383	378	299
LPF20	Monte Dourado	PA	2009	195	319	300	368	574	418	199	402	375	430	339	380	328	370	383	378	299
LPF201	Imperatriz	MA	2011	195	319	300	368	574	407	203	410	375	439	339	386	328	352	365	378	304
LPF2315	Maceió	AL	2019	195	319	300	351	574	407	199	410	380	430	339	386	328	352	365	378	299
LPF2498	Paragominas	PA	2021	195	319	300	368	574	407	199	402	380	430	339	380	328	352	383	378	299
LPF2502	Paragominas	PA	2021	195	319	300	368	574	407	199	402	380	430	339	380	328	352	383	378	299
LPF2504	Paragominas	PA	2021	195	319	300	368	574	407	199	402	380	430	339	386	328	352	383	378	299
LPF2505	Paragominas	PA	2021	195	319	300	351	574	407	199	410	380	430	339	386	328	352	365	378	299
LPF2508	Paragominas	PA	2021	195	319	300	368	574	407	199	402	380	430	339	380	328	352	383	378	299
LPF2509	Paragominas	PA	2021	195	319	300	301	574	407	199	410	380	430	339	386	328	352	365	378	299
LPF2511	Paragominas	PA	2021	195	319	300	351	574	407	199	410	380	430	339	386	328	352	365	378	299
LPF2512	Paragominas	PA	2021	195	319	300	329	574	407	199	402	380	430	339	380	328	352	383	378	299
LPF2513	Paragominas	PA	2021	195	319	300	368	574	407	199	402	380	430	339	380	328	352	383	378	299
LPF2515	Paragominas	PA	2021	195	319	300	368	574	407	199	402	380	430	339	380	328	352	383	378	299
LPF2516	Paragominas	PA	2021	195	319	300	368	574	407	199	402	380	430	339	380	328	352	383	378	299
LPF2517	Paragominas	PA	2021	195	319	300	368	574	407	199	402	380	430	339	380	328	352	383	378	299
LPF2518	Paragominas	PA	2021	195	319	300	368	574	407	199	402	380	430	339	380	328	352	383	378	299
LPF2520	Paragominas	PA	2021	195	319	300	368	574	407	199	402	380	430	339	380	328	352	383	378	299
LPF2522	Paragominas	PA	2021	195	319	300	368	574	407	199	402	380	430	339	380	328	352	383	378	299
LPF2523	Paragominas	PA	2021	195	319	300	368	574	407	199	402	380	430	339	380	328	352	383	378	299

LPF2526	Paragominas	PA	2021	195	319	300	351	574	407	199	402	380	430	339	380	328	352	383	378	299
LPF2527	Paragominas	PA	2021	195	319	300	351	574	407	199	402	380	430	339	386	328	352	383	378	299
LPF2530	Paragominas	PA	2021	195	319	300	351	574	407	199	402	380	430	339	380	328	352	383	378	299
LPF2531	Paragominas	PA	2021	195	319	300	368	574	407	199	402	380	430	339	380	328	352	383	378	299
LPF2532	Paragominas	PA	2021	195	319	300	368	575	407	199	402	380	430	339	380	328	352	383	378	299
LPF2533	Paragominas	PA	2021	195	319	300	351	574	407	199	402	380	430	339	386	328	352	383	378	299
LPF2559	Paragominas	PA	2021	195	319	300	360	574	407	199	402	380	430	339	380	328	352	383	378	299
LPF2560	Paragominas	PA	2021	195	319	300	368	574	407	199	402	380	430	339	380	328	352	383	378	299
LPF2561	Paragominas	PA	2021	195	319	300	360	574	360	199	402	380	430	339	380	328	352	383	378	299
LPF2566	Paragominas	PA	2021	195	319	300	351	574	407	199	410	380	430	339	386	328	352	365	378	299
LPF2569	Paragominas	PA	2021	195	319	300	368	574	407	199	402	380	430	339	380	328	352	383	378	299
LPF2801	Grajaú	MA	2023	195	319	300	351	574	407	199	410	380	430	339	386	328	352	365	378	299
LPF2804	Grajaú	MA	2023	195	319	300	351	574	407	199	410	380	430	339	386	328	352	365	378	299
LPF2927	Ribas do Rio Pardo	MS	2024	195	319	300	351	574	407	199	410	380	430	339	386	328	352	365	378	299
LPF2928	Ribas do Rio Pardo	MS	2024	195	319	300	351	574	407	199	410	380	430	339	386	328	352	365	378	299
LPF294	Monte Dourado	PA	2011	195	319	300	351	574	407	199	410	380	430	339	386	328	352	365	378	299
LPF297	Monte Dourado	PA	2011	195	319	300	368	574	418	199	402	380	435	339	380	328	370	383	378	304
LPF314	Monte Dourado	PA	2011	195	319	300	368	560	418	199	410	380	430	339	386	328	370	365	378	304
LPF315	Monte Dourado	PA	2011	195	302	300	368	574	407	203	402	380	430	339	380	328	352	383	378	299
LPF323	Monte Dourado	PA	2011	195	319	300	368	574	418	199	402	380	435	339	380	328	370	383	378	304
LPF324	Monte Dourado	PA	2011	195	319	300	368	574	418	199	402	380	435	339	380	328	370	383	378	304
LPF326	Monte Dourado	PA	2011	195	319	300	368	574	418	199	402	380	435	339	380	328	370	383	378	304
LPF328	Monte Dourado	PA	2011	195	319	300	368	574	418	199	402	380	435	339	380	328	370	383	378	304
LPF329	Monte Dourado	PA	2011	195	319	300	368	574	418	199	402	380	435	339	380	328	370	383	378	304
LPF330	Monte Dourado	PA	2011	195	319	300	368	574	418	199	402	380	435	339	380	328	370	383	378	304
LPF334	Monte Dourado	PA	2011	195	319	300	368	574	418	199	402	380	435	339	380	328	370	383	378	304

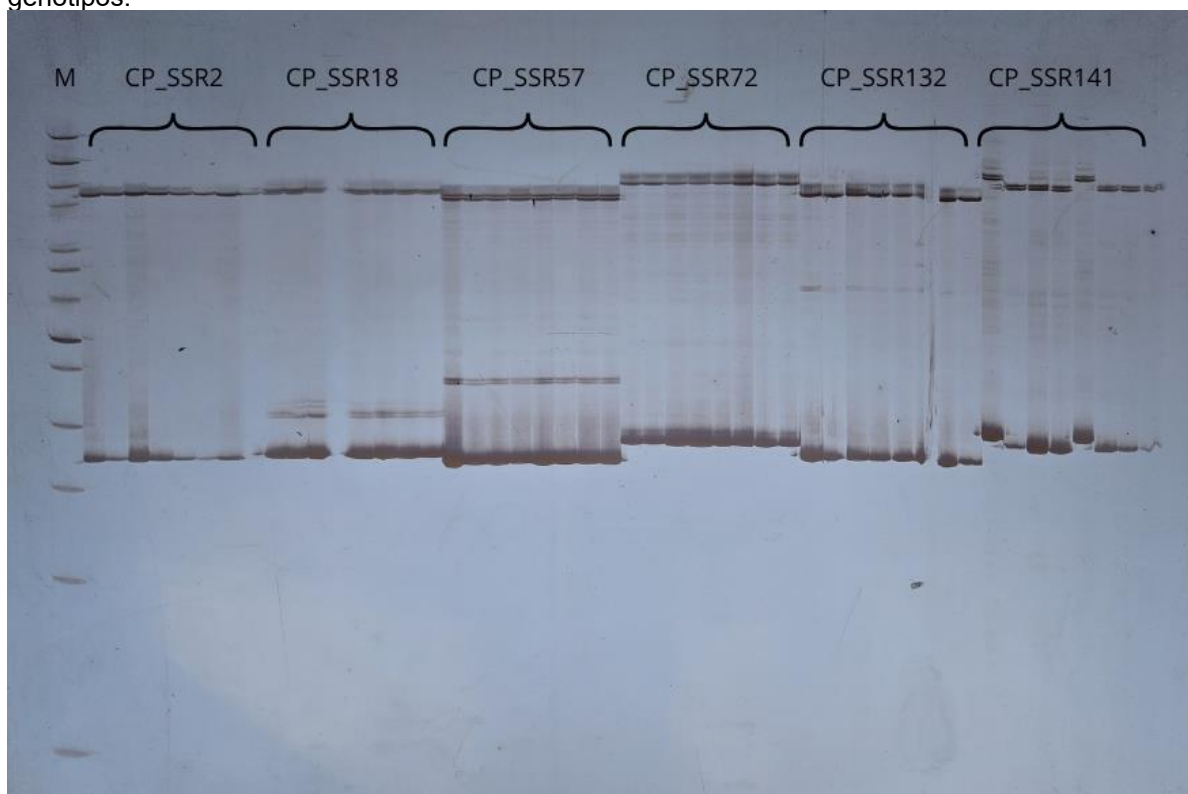
LPF335	Monte Dourado	PA	2011	195	319	300	368	574	418	199	402	375	430	339	380	328	370	383	378	299
LPF338	Monte Dourado	PA	2011	195	319	300	368	574	418	199	402	380	435	339	380	328	370	383	378	304
LPF340	Monte Dourado	PA	2011	195	313	300	351	574	407	203	402	380	430	334	386	328	352	383	378	304
LPF341	Monte Dourado	PA	2011	195	319	300	351	560	407	199	410	375	430	334	380	328	352	365	378	299
LPF342	Monte Dourado	PA	2011	195	319	300	368	574	418	199	402	380	435	334	380	328	370	383	378	304
LPF344	Monte Dourado	PA	2011	195	319	300	368	574	407	203	402	380	430	339	380	328	352	383	378	299
LPF346	Monte Dourado	PA	2011	195	313	300	351	574	407	199	402	375	435	339	380	328	352	383	378	299
LPF348	Monte Dourado	PA	2011	195	319	300	368	574	418	199	402	380	435	339	380	328	370	383	378	304
LPF349	Monte Dourado	PA	2011	195	319	300	368	560	418	199	410	380	430	339	386	328	370	365	378	304
LPF352	Monte Dourado	PA	2011	195	319	300	368	574	418	199	402	380	435	339	380	328	370	383	378	304
LPF357	Monte Dourado	PA	2011	195	319	300	368	574	418	199	402	380	435	339	380	328	370	383	378	304
LPF361	Monte Dourado	PA	2011	195	319	300	368	574	418	199	402	380	435	339	380	328	370	383	378	304
LPF4	Monte Dourado	PA	2008	195	313	300	368	574	407	203	402	380	435	334	386	328	352	383	378	304
LPF409	Grajaú	MA	2011	195	319	300	351	574	407	199	410	380	430	339	386	328	352	365	378	299
LPF416	Elesbão Veloso	PI	2011	195	319	300	368	574	418	203	402	380	435	339	386	328	370	383	378	304
LPF436	Monte Dourado	PA	2011	195	319	300	368	560	407	199	402	375	430	334	380	328	352	383	378	299
LPF457	Monte Dourado	PA	2011	195	319	300	368	574	407	203	402	380	430	334	380	328	352	383	378	299
LPF52	Monte Dourado	PA	2008	195	319	300	368	574	418	199	402	380	435	339	380	328	370	383	378	304
LPF54	Monte Dourado	PA	2008	195	319	300	368	574	418	203	402	380	435	339	380	328	370	383	378	304
LPF56	Monte Dourado	PA	2008	195	319	300	368	560	418	199	410	380	430	339	386	328	370	365	378	304
LPF59	Monte Dourado	PA	2008	195	319	300	368	574	418	199	402	380	430	339	380	328	370	383	378	304
LPF64	Monte Dourado	PA	2011	195	319	300	368	574	418	199	402	380	435	339	380	328	370	383	378	304
LPF2499	Paragominas	PA	2021	195	319	300	368	574	407	199	402	380	430	339	380	328	352	385	378	299
LPF2500	Paragominas	PA	2021	195	319	300	351	574	407	199	402	380	430	339	380	328	352	385	378	299

LPF2506	Paragominas	PA	2021	195	319	300	351	574	407	199	410	380	430	339	380	328	352	385	378	299
LPF2507	Paragominas	PA	2021	195	319	300	368	574	407	199	402	380	430	339	386	328	352	366	378	299
LPF2525	Paragominas	PA	2021	195	319	300	351	574	407	199	402	380	430	339	380	328	352	385	378	299
LPF2538	Paragominas	PA	2021	195	319	300	368	574	407	199	402	380	430	339	386	328	352	385	378	299
LPF2552	Paragominas	PA	2021	195	319	300	368	574	407	199	402	380	430	339	380	328	352	385	378	299
LPF2554	Paragominas	PA	2021	195	319	300	368	574	407	199	402	380	430	339	380	328	352	385	378	299
LPF2555	Paragominas	PA	2021	195	319	300	368	574	407	199	402	380	430	339	380	328	352	385	378	299
LPF2556	Paragominas	PA	2021	195	319	300	368	574	418	203	402	380	435	339	386	328	370	385	378	304
LPF2562	Paragominas	PA	2021	195	319	300	360	574	407	199	402	380	430	339	380	328	352	385	378	299
LPF2563	Paragominas	PA	2021	195	319	300	368	574	407	199	402	380	430	339	380	328	352	385	378	299
LPF2564	Paragominas	PA	2021	195	319	300	368	574	407	199	402	380	430	339	380	328	352	385	378	299
LPF2307	Três Lagoas	MS	2019	195	319	300	345	574	407	199	410	380	430	339	386	328	352	365	378	299
LPF2571	Brejão	BA	2023	189	365	250	345	585	365	187	373	NA	414	339	377	324	NA	NA	324	280
LPF2572	Brejão	MS	2023	192	365	250	345	585	365	199	373	NA	414	339	377	324	NA	NA	324	280
LPF2573	Brejão	BA	2024	189	365	250	345	585	365	199	373	NA	414	339	377	324	NA	NA	324	280
LPF2574	Brejão	MS	2025	192	365	250	345	585	365	199	373	330	414	339	377	324	NA	NA	324	280
LPF2575	Brejão	MS	2025	189	365	250	345	585	365	199	373	380	414	339	377	324	NA	NA	324	280
LPF2576	Brejão	MS	2025	181	301	357	345	607	422	187	382	380	407	301	377	324	NA	378	324	271
LPF2725	Aracruz	ES	2025	189	365	250	345	585	365	203	360	380	414	339	377	324	370	385	324	280
LPF2733	Aracruz	ES	2025	192	360	247	345	585	360	203	373	NA	414	339	377	324	NA	NA	324	280
LPF2734	Aracruz	ES	2022	189	365	247	345	585	365	199	373	NA	414	339	377	324	NA	NA	324	280
LPF2735	Aracruz	ES	2022	192	365	250	345	582	365	199	373	412	414	339	377	324	NA	NA	324	280
LPF2736	Aracruz	ES	2022	189	360	247	345	585	360	199	373	NA	414	339	377	324	NA	NA	324	280
LPF2792	Três Lagoas	MS	2023	186	360	250	345	585	360	199	373	380	414	330	377	324	NA	NA	324	280
LPF2802	Grajau	MA	2023	189	360	250	345	582	360	199	373	NA	414	330	377	324	NA	NA	324	280
LPF2803	Grajau	MA	2023	192	365	250	345	585	365	199	373	380	414	339	377	324	NA	NA	324	280
LPF2805	Grajau	MA	2023	181	301	305	345	607	425	187	382	380	407	301	377	324	NA	378	324	271
LPF2815	Pocajúba	BA	2023	195	319	300	368	574	418	203	402	380	435	339	386	328	370	385	378	304
LPF2816	Camaçari	BA	2023	181	278	309	345	574	404	199	390	380	407	325	377	324	NA	355	324	271
LPF2817	Três Lagoas	MS	2023	186	360	250	345	585	360	199	373	NA	414	330	377	324	NA	NA	324	280

LPF2925	Ribas do Rio Pardo	MS	2023	195	319	300	351	574	407	199	410	380	430	339	386	328	352	365	378	299
LPF2962	Mucuri	BA	2024	195	319	300	368	574	418	203	402	380	435	339	386	328	370	385	378	304
LPF3163	Cassilândia	MS	2025	189	360	247	345	585	360	199	373	NA	414	339	377	324	NA	NA	324	280
LPF3179	Cassilândia	MS	2025	192	360	247	345	585	360	223	373	NA	414	339	377	324	NA	NA	324	208
LPF3194	Aparecida do Taboado	MS	2025	195	319	300	351	574	407	199	410	380	430	339	386	328	352	365	378	299
LPF3195	Inocência	MS	2025	195	319	300	351	574	404	199	410	380	430	339	386	328	352	365	378	299
LPF3196	Inocência	MS	2025	195	319	300	351	574	407	199	410	380	430	339	386	328	352	365	378	299
LPF3197	Inocência	MS	2025	195	319	300	351	574	404	199	410	380	430	339	386	328	352	365	378	299
LPF3198	Inocência	MS	2025	195	319	300	351	574	407	199	410	380	430	339	386	328	352	365	378	299

Nota: Os valores correspondem ao tamanho dos amplicons (pb). NA = ausência de amplificação ou dado não disponível.

Apêndice 2 - Ensaios preliminares de perfis de amplificação de *loci* SSR em oito isolados pertencentes ao complexo *Calonectria pteridis*, evidenciando monomorfismo e polimorfismo entre os genótipos.



Nota: Os produtos de PCR foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida e visualizados após coloração. M = marcador de peso molecular; os demais códigos correspondem aos isolados analisados. Estão apresentados os *loci* representativos Cp_SSR2, Cp_SSR18, Cp_SSR57, Cp_SSR72, Cp_SSR132 e Cp_SSR141.

CAPÍTULO 2

Espécies associadas à mancha-de-calonectria em plantios de *E. dunnii* e *E. benthamii* no Sul do Brasil

RESUMO

A mancha-de-calonectria destaca-se entre as principais doenças foliares do eucalipto no Brasil, causando desfolha intensa e comprometendo a produção de mudas em viveiros e o crescimento de plantas no campo. Embora espécies do complexo *Calonectria pteridis* sejam amplamente reconhecidas como os principais agentes etiológicos da doença em regiões tropicais brasileiras, as espécies associadas à mancha-de-calonectria em plantios estabelecidos no Sul do país ainda permanecem insuficientemente conhecidas. Nesse contexto, este estudo teve como objetivo identificar as espécies associadas à mancha-de-calonectria em plantios de eucalipto localizados no Sul do Brasil, por meio de análises filogenéticas multilocus direcionadas à caracterização de isolados pertencentes ao complexo *Calonectria candelabrum*, contribuindo simultaneamente para o refinamento taxonômico desse grupo em um cenário epidemiológico distinto, caracterizado por condições climáticas contrastantes em relação às regiões tradicionalmente afetadas pela doença. Foram obtidos 31 isolados a partir de folhas, ramos, mudas, solo e substrato coletados nos estados de Santa Catarina, Paraná e Rio Grande do Sul. A caracterização molecular foi conduzida com base no sequenciamento parcial dos loci *tef1*, *tub2*, *cmdA* e *his3*, seguido de análises filogenéticas por Máxima Verossimilhança e Inferência Bayesiana. As análises evidenciaram a predominância de espécies pertencentes ao complexo *C. candelabrum*, com destaque para *Calonectria spathulata*, que representou 14 dos 31 isolados avaliados. Adicionalmente, nove isolados formaram um clado filogeneticamente distinto e bem suportado, tratado provisoriamente como *Calonectria* sp. 1, sugerindo a ocorrência de uma linhagem potencialmente não descrita dentro do complexo. Outras espécies identificadas incluíram *C. brasiliiana*, *C. exiguispora*, *C. imperata* e *C. putriramosa*. As análises baseadas em loci individuais apresentaram baixa capacidade de resolução interespecífica dentro do complexo *C. candelabrum*, reforçando a necessidade do emprego de abordagens multilocus para delimitação taxonômica robusta nesse grupo. Em conjunto, os resultados demonstram que as espécies associadas à mancha-de-calonectria no Sul do Brasil diferem substancialmente daquelas observadas em regiões tropicais do

país, evidenciando a predominância de espécies do complexo *C. candelabrum* em condições subtropicais e ampliando o entendimento sobre a distribuição, diversidade e importância epidemiológica dessas espécies em sistemas florestais de clima temperado-subtropical.

Palavras-chave: *Calonectria candelabrum*; Multilocus; Clima subtropical; Manchas foliares; Sequenciamento.

CHAPTER II

Etiology of *Calonectria* leaf blight in *E. dunnii* and *E. benthamii* in southern Brazil

ABSTRACT

Calonectria leaf blight is one of the most important foliar diseases of eucalyptus in Brazil, causing severe defoliation and compromising seedling production in nurseries as well as tree growth under field conditions. Although species within the *Calonectria pteridis* species complex are widely recognized as the primary causal agents of the disease in tropical regions of Brazil, the species associated with *Calonectria* leaf blight in eucalyptus plantations established in southern Brazil remain poorly understood. In this context, the present study aimed to identify the species associated with *Calonectria* leaf blight in eucalyptus plantations in southern Brazil through multilocus phylogenetic analyses designed to characterize isolates belonging to the **Calonectria candelabrum** species complex, while simultaneously contributing to the taxonomic refinement of this group in a distinct epidemiological setting characterized by climatic conditions that contrast with those of regions traditionally affected by the disease. A total of 31 isolates were obtained from leaves, branches, seedlings, soil, and substrate collected in the states of Santa Catarina, Paraná, and Rio Grande do Sul. Molecular characterization was based on partial sequencing of the *tef1*, *tub2*, *cmdA* and *his3* loci, followed by phylogenetic analyses using Maximum Likelihood and Bayesian Inference. The analyses revealed the predominance of species belonging to the *C. candelabrum* species complex, particularly *Calonectria spathulata*, which accounted for 14 of the 31 isolates examined. Additionally, nine isolates formed a well-supported and phylogenetically distinct clade, provisionally designated *Calonectria* sp. 1, suggesting the occurrence of a potentially undescribed lineage within the complex. Other identified species included *C. brasiliiana*, *C. exiguispora*, *C. imperata*, and *C. putriramosa*. Analyses based on individual loci showed limited interspecific resolution within the *C. candelabrum* species complex, highlighting the need for multilocus approaches to achieve robust species delimitation within this group. Overall, the results demonstrate that the species associated with *Calonectria* leaf blight in southern Brazil differ substantially from those reported in tropical regions of the country, revealing the predominance of species within the *C. candelabrum* species complex under subtropical conditions and expanding our

understanding of the distribution, diversity, and epidemiological importance of these species in temperate–subtropical forest ecosystems.

Keywords: *Calonectria candelabrum*; multilocus phylogeny; subtropical climate; leaf blight; DNA sequencing.

1. INTRODUÇÃO

Na região Sul do Brasil, as temperaturas são, em geral, mais baixas que nas demais regiões do país, e a ocorrência de geadas constitui uma importante restrição climática ao cultivo da maioria das espécies de *Eucalyptus* (Schultz, 2011; Schultz *et al.*, 2015; Soares *et al.*, 2017). Essas condições são menos favoráveis para espécies amplamente cultivadas no Brasil, como *Eucalyptus grandis*, *E. urophylla* e híbridos *E. grandis* × *E. urophylla*, sobretudo em áreas sujeitas a geadas mais severas. Como consequência, torna-se necessário o plantio de espécies mais adaptadas ao frio, em substituição aos clones tropicais amplamente utilizados no Brasil (Paludzyszyn Filho *et al.*, 2006; Auer & Santos, 2011; Schultz *et al.*, 2015). Nesse contexto, *Eucalyptus dunnii* e *Eucalyptus benthamii* têm sido amplamente empregados devido à sua maior tolerância a baixas temperaturas e ao bom desempenho silvicultural apresentado em condições subtropicais (Rocha, 2000; Rocha & Tomaselli, 2002; Müller, 2013; Cunha *et al.*, 2015). *Eucalyptus dunnii* apresenta adaptação a regiões sujeitas a geadas, enquanto *E. benthamii* se destaca pela tolerância a invernos rigorosos, sendo amplamente utilizada em áreas de maior altitude no Sul do Brasil (Paludzyszyn Filho *et al.*, 2006; Higa; Pereira, 2003).

Apesar da adaptação dessas espécies às condições edafoclimáticas da região, a eucaliptocultura no Sul do Brasil ainda enfrenta limitações importantes relacionadas às doenças e à propagação clonal, especialmente pela recalcitrância ao enraizamento adventício observada em muitos genótipos de *E. benthamii* e *E. dunnii* (Alfenas *et al.*, 2009; Auer & Santos, 2011). Dentre as doenças associadas a essas espécies, o cancro causado por *Botryosphaeria dothidea*, a mancha-de-kirramyces causada por *Teratosphaeria epicoccoides* (= *Kirramyces epicoccoides*) e a mancha-de-apoharknessia causada por *Apharknessia eucalyptorum*, são frequentemente relatadas na cultura (Auer & Santos, 2009b, 2011; De Almeida Garrett *et al.*, 2018, 2024), mas são considerados de importância secundária, por estarem associados a plantas fisiologicamente debilitadas (Alfenas *et al.*, 2009). Em contraste, a ferrugem causada por *Austropuccinia psidii*, a seca de ponteiros causada por *Erwinia psidii* e a mancha-de-calonectria causada por *Calonectria* spp., já foram relatadas causando perdas significativas de produtividade em povoamentos florestais no Sul do Brasil.

Entretanto, a mancha-de-calonectria tem se destacado como o principal desafio fitossanitário para as espécies de *E. dunnii* e *E. benthamii*, uma vez que

surtos epidêmicos têm sido registrados desde 2011, tanto em mudas no viveiro quanto em plantas no campo (Schultz, 2011; Schultz *et al.*, 2015; Soares *et al.*, 2017). A doença é caracterizada por lesões foliares de coloração palha a marrom-claro, frequentemente delimitadas por halo clorótico, evoluindo para intensa desfolha e consequente redução da área fotossintética (Schultz *et al.*, 2015; Soares *et al.*, 2017). Em viveiros, o patógeno pode infectar folhas basais e a região do colo, causando necrose e tombamento de mudas (Schultz, 2011). Diferentes espécies do gênero *Calonectria* estão associadas a epidemias tanto em viveiros quanto em plantios comerciais (Soares *et al.*, 2017; Miranda *et al.*, 2021).

No Brasil, *Calonectria pteridis* é reconhecida como o principal agente etiológico da mancha-de-calonectria em plantios de eucalipto nas regiões Centro-Oeste, Sudeste e Norte do Brasil (Alfenas *et al.*, 2015). No entanto, sua ocorrência na região Sul ainda não está claramente estabelecida, o que gera incertezas quanto à etiologia da doença e limita o desenvolvimento de estratégias de manejo e seleção de genótipos resistentes. Além disso, evidências recentes indicam a presença de espécies pertencentes a outros complexos, como o complexo *Calonectria candelabrum*, tradicionalmente associadas a doenças em viveiros (Miranda *et al.*, 2021).

Essa incerteza etiológica está diretamente relacionada à complexidade taxonômica de *Calonectria*, um gênero que se encontra em constante revisão, o que torna a identificação precisa dos agentes etiológicos um desafio. Embora alguns caracteres morfológicos auxiliem na distinção entre complexos de espécies do gênero, a delimitação de espécies baseia-se principalmente em análises filogenéticas multilocus. Nas análises filogenéticas multilocus, as regiões gênicas mais utilizadas são fator de alongação 1- α (*tef1*), β -tubulina (*tub2*), calmodulina (*cmdA*), histona H3 (*his3*), subunidade 2 da RNA polimerase II (*rpb2*) e actina (*act*) (Liu *et al.*, 2020). Com essa abordagem, mais de 130 espécies já foram descritas, sendo organizadas em complexos de espécies que agrupam táxons filogeneticamente relacionados e morfológicamente semelhantes (Crous *et al.*, 2018, 2019, 2021a, 2021b; Wang *et al.*, 2019; Liu *et al.*, 2020; Mohali & Stewart, 2021; Pham *et al.*, 2022).

Em 2024, epidemias severas de mancha-de-calonectria foram registradas em testes de progênies e plantios comerciais de *Eucalyptus dunnii* e *Eucalyptus benthamii* nos estados do Paraná e Santa Catarina. Análises morfológicas

preliminares dos agentes causais indicaram que estes não pertencem ao complexo *C. pteridis*, principal espécie associada à doença no campo. Diante da importância da correta identificação etiológica para o desenvolvimento de estratégias de manejo e seleção de clones resistentes, adaptados às condições climáticas do Sul do Brasil, este estudo teve como objetivo caracterizar, por meio de análises filogenéticas multilocus, a diversidade de *Calonectria* spp. associadas a *E. dunnii* e *E. benthamii*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Coletas de amostras, isolamento e obtenção de culturas monospóricas

A amostragem foi realizada em plantios comerciais de eucalipto localizados nos estados de Santa Catarina e Paraná, Brasil. Foram coletadas folhas e ramos com sintomas característicos da mancha-de-calonectria em áreas de plantio contendo diferentes clones e progênies. Adicionalmente, foram amostradas mudas sintomáticas em viveiros florestais.

As amostras vegetais foram acondicionadas em sacos de papel e posteriormente encaminhadas ao Laboratório de Patologia Florestal da Universidade Federal de Viçosa (UFV), localizado em Viçosa, Minas Gerais.

Isolados adicionais de amostras de solo e substrato foram obtidos a partir de culturas previamente isoladas e devidamente preservadas na coleção do mesmo laboratório.

O isolamento de *Calonectria* spp. foi realizado por métodos direto e indireto em meio Batata Dextrose Ágar (BDA), utilizando-se amostras de folhas e ramos sintomáticos. Para as amostras de solo e substrato provenientes da coleção, adotou-se o método de isca com ramos de eucalipto, conforme descrito por Alfenas *et al.* (2015).

Para a obtenção de culturas monospóricas, colônias puras de cada isolado foram submetidas a estresse mecânico por meio da remoção total do micélio com auxílio de pincel esterilizado, visando induzir a esporulação. Em seguida, foram adicionados 2 mL de água destilada estéril às placas, que foram mantidas em caixas do tipo gerbox sem tampa por 48 h, favorecendo a formação de estruturas conidiogênicas. Após esse período, a água foi removida e as placas foram completamente secas.

Após 24 h, sob microscópio estereoscópico, estruturas conidiogênicas contendo conidióforos e massas de conídios foram visualizadas na superfície da colônia. Uma dessas estruturas foi transferida para placa de Petri contendo BDA com

pequena quantidade de água destilada estéril e dispersa suavemente. Em seguida, conídios individualizados foram visualizados, sendo um único conídio selecionado com auxílio de agulha de dissecação estéril e transferido para nova placa contendo BDA. As placas foram incubadas a 25 °C até o estabelecimento de colônias monospóricas, sendo os isolados posteriormente armazenados em óleo mineral à temperatura ambiente.

2.2 Extração do DNA, PCR e sequenciamento

A extração de DNA genômico foi realizada a partir de culturas monospóricas cultivadas em meio líquido de extrato de malte 2%, mantidas sob agitação (180 rpm) a 25 °C por 48 h. O micélio foi coletado por filtração, lavado com água destilada estéril, seco em papel filtro e submetido à extração utilizando o kit Wizard® Genomic DNA Purification (Promega, Madison, WI, USA), conforme as instruções do fabricante.

Sequências parciais dos genes codificadores do fator de alongação 1- α (*tef1*), β -tubulina (*tub2*), calmodulina (*cmdA*) e histona H3 (*his3*) foram amplificadas por PCR utilizando os respectivos pares de primers descritos na Tabela 1, comumente empregados em estudos filogenéticos de *Calonectria*.

Tabela 1 - *Primers* selecionados para a amplificação parcial de genes usados na identificação filogenética das espécies.

Locus	Primer	Sequência 5'-3'	Referência
Fator de alongação 1- α (<i>tef1</i>)	EF1-728F	CATCGAGAAGTTCGAGAA	Carbone e Kohn 1999
	EF-2	GGAAGTACCAGTGATCATGTT	O'Donnell <i>et al.</i> 1998
β -tubulina (<i>tub2</i>)	T1	AACATGCGTGAGATTGTAAGT	O'Donnell e Cigelnik, 1997
	CYLTUB1R	AGTTGTCGGGACGGAAGAG	Crous <i>et al.</i> 2004
Calmodulina (<i>cmdA</i>)	CAL-228F	GAGTTCAAGGAGGCCTTCTCCC	Carbone e Kohn 1999
	CAL-2Rd	TGRTCNGCCTCDCGGATCATCTC	Quaedvlieg <i>et al.</i> 2011
Histona 3 (<i>his3</i>)	CYLH3F	AGGTCCACTGGTGGCAAG	Crous <i>et al.</i> 2004
	CYLH3R	AGCTGGATGTCCTTGGACTG	

Cada reação de PCR foi preparada em um volume final de 15 μL , contendo 7,5 μL de GoTaq® G2 Colorless Master Mix (Promega), 1,5 μL de cada primer forward e reverse (10 μM) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 2 μL de DNA genômico (15 ng μL^{-1}) e água livre de nucleases para completar o volume final.

As amplificações das regiões *tef1*, *cmdA* e *his3* foram realizadas em termociclador Veriti™ Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 96 °C por 5 min, seguida de 35 ciclos de amplificação (96 °C por 30 s; anelamento a 55 °C (*cmdA* e *his3*) e 52 °C (*tef1*) por 30 s; extensão a 72 °C por 1 min), e extensão final a 72 °C por 20 min, conforme descrito por Liu *et al.* (2020), com adaptações.

Para a região gênica *tub2*, foi utilizado um protocolo de PCR do tipo touchdown, consistindo em desnaturação inicial a 96 °C por 5 min, seguida de 8 ciclos de 96 °C por 30 s; 62 °C por 30 s, com decréscimo de 1 °C por ciclo; 72 °C por 1 min, seguidos de 27 ciclos de 96 °C por 30 s; 55 °C por 30 s; 72 °C por 1 min, e uma etapa final de extensão a 72 °C por 10 min.

A confirmação dos amplicons foi feita por eletroforese em gel de agarose a 2,0%, utilizando tampão Tris–borato–EDTA (TBE 1X). Após a corrida eletroforética, os géis foram corados com GelRed (Biotium) e visualizados em sistema de documentação de géis L-PIX (Loccus Biotechnology). O tamanho dos *amplicons* foi estimado por comparação com marcador de peso molecular 1 Kb Plus (Invitrogen, CA, USA).

Os produtos de PCR foram purificados utilizando o kit ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup Reagent (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), conforme as recomendações do fabricante, para remoção de primers e dNTPs residuais.

As reações de sequenciamento foram realizadas pelo método de Sanger utilizando o kit BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems). Cada reação foi preparada em volume final de 10 μL , contendo 1 μL de BigDye Terminator Ready Reaction Mix, primer específico (forward ou reverse) na concentração de 1 μM , produto de PCR purificado e água ultrapura para completar o volume final.

Após a reação de sequenciamento, os produtos foram purificados por precipitação com EDTA 125 mM, visando à remoção de terminadores fluorescentes não incorporados. As amostras purificadas foram submetidas à eletroforese capilar

em sequenciador automático ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems), sendo as leituras obtidas em ambas as direções.

2.3 Análises filogenéticas multigênicas

As sequências de nucleotídeos obtidas foram inspecionadas manualmente, e eventuais posições ambíguas foram resolvidas por meio da comparação entre as leituras senso e antissenso utilizando o *software* SeqAssem (Hepperle, 2004). As sequências consenso resultantes foram posteriormente editadas no *software* MEGA versão 12 (Kumar *et al.*, 2024).

Após a obtenção dos conjuntos de sequências dos isolados investigados, sequências parciais dos genes *tef1*, *cmdA*, *his3* e *tub2* de isolados representativos de espécies válidas pertencentes ao complexo *Calonectria candelabrum* (Liu *et al.*, 2020) foram recuperadas do GenBank, visando à construção dos alinhamentos.

Os alinhamentos múltiplos das sequências foram compostos utilizando o algoritmo MUSCLE (Edgar, 2004), implementado no *software* MEGA versão 12. Após o alinhamento individual de cada região gênica (*tef1*, *tub2*, *cmdA* e *his3*), os alinhamentos foram concatenados utilizando o *software* SequenceMatrix (Vaidya *et al.*, 2011), gerando uma matriz multilocus combinada utilizada nas análises filogenéticas.

As análises filogenéticas dos alinhamentos dos loci individuais e da matriz concatenada foram conduzidas por meio dos métodos de Máxima Verossimilhança (ML) e Inferência Bayesiana (IB).

As análises de Máxima Verossimilhança foram realizadas no programa do IQ-TREE (Nguyen *et al.*, 2015), com suporte dos ramos estimado por meio de 1.000 repetições de bootstrap não paramétrico (BS). Os modelos de substituição nucleotídica foram selecionados separadamente para cada região gênica no próprio IQ-TREE, com base no Critério de Informação de Akaike (AIC), sendo selecionados os seguintes modelos: TVMe+I+G4 para *cmdA*, TN+F+I+G4 para *his3*, TIM2e+I+G4 para *tef1* e K2P+I para *tub2*.

As análises de Inferência Bayesiana foram conduzidas no *software* MrBayes v.3.2.6 (Ronquist *et al.*, 2012), utilizando o algoritmo de Cadeias de Markov via Monte Carlo (MCMC), sob parâmetros padrão do *software*. Duas corridas independentes foram realizadas, cada uma com quatro cadeias simultâneas, por até 10.000.000 de gerações, com amostragem a cada 1.000 gerações e terminação automática das análises quando o desvio padrão da frequência de clados (*split frequencies*) entre as

cadeias frias das duas corridas independentes atingiu 0.01. As primeiras 25% das árvores foram descartadas como burn-in, e as probabilidades posteriores (PP) foram estimadas a partir da árvore consenso gerada com as árvores remanescentes. Os seguintes modelos evolutivos, adaptados dos resultados da análise no IQ-TREE, foram empregados nas análises: SYM+I+G para *cmdA*, HKY+I+G para *his3*, GTR+I+G4 para *tef1* e K2P+I para *tub2*.

Adicionalmente, foi realizada uma análise filogenética com sequências dos loci *cmdA* e *tub2*, incluindo sequências de isolados de *Calonectria* provenientes de plantios de *Eucalyptus benthamii* no estado de Santa Catarina, Sul do Brasil, previamente caracterizados por Miranda *et al.* (2021). As análises foram conduzidas conforme os procedimentos metodológicos previamente descritos, utilizando *Calonectria gracilipes* como grupo externo para o enraizamento das árvores.

As árvores filogenéticas foram visualizadas no *software* MEGA versão 12 (Kumar *et al.*, 2024) e posteriormente editadas no *software* Inkscape v.1.4.3 (Inkscape Project, 2023).

3. RESULTADOS

3.1 Isolamento e caracterização preliminar dos isolados

A sintomatologia observada em campo e as características morfológicas do patógeno estão apresentadas na Figura 1.

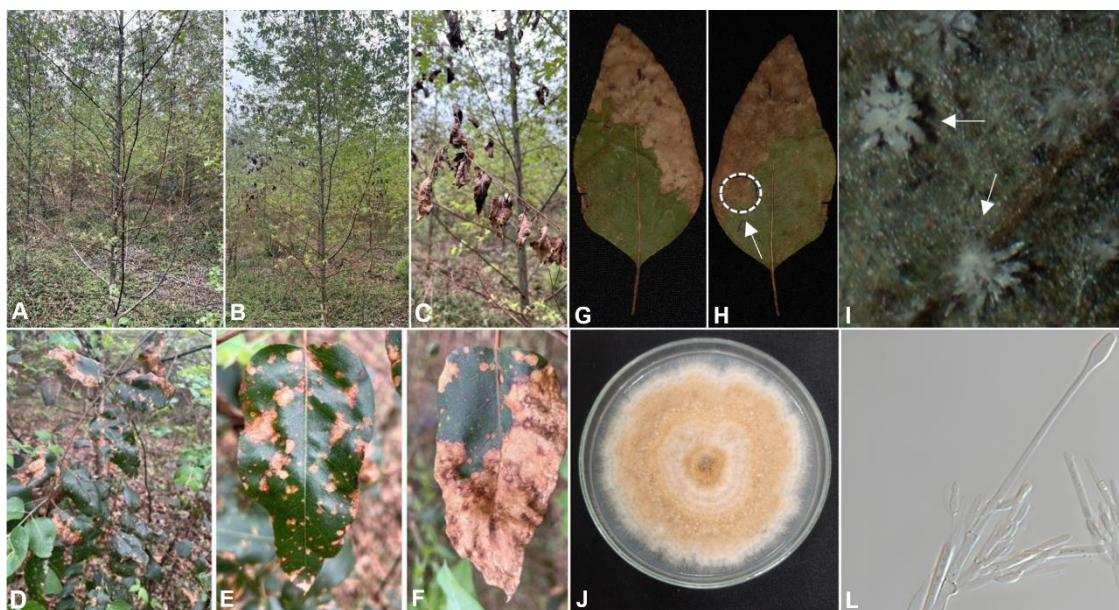


Figura 1 - Sintomas e características morfológicas de isolados de *Calonectria candelabrum* s.l. associados a *Eucalyptus dunni*. (A–B) Plantas com sintomas de mancha foliar; (C–F) detalhes de lesões necróticas em diferentes estágios de desenvolvimento observadas em campo; (G–H) folhas apresentando áreas necróticas; (I) estruturas reprodutivas (setas) associadas ao tecido foliar; (J) aspecto da colônia de *Calonectria* sp. em meio batata-dextrose-ágar (BDA); (L) estruturas conidiogênicas e conídios observados em microscópio óptico, sob aumento de 40×.

As plantas de eucalipto apresentaram sintomas típicos de mancha foliar, caracterizados por lesões de coloração cinza-clara a marrom-clara, com dimensões variáveis e formatos circulares, alongados ou irregulares. As lesões iniciais foram observadas como pequenas manchas puntiformes, que evoluíram para áreas necróticas extensas por coalescência, frequentemente iniciando a partir do ápice ou das margens foliares. Em condições de maior severidade, observou-se necrose generalizada das folhas e intensa desfolha.

Adicionalmente, foram observados sinais do patógeno nas lesões, caracterizados por esporulação branca brilhante na superfície foliar, indicativa da presença de estruturas conidiogênicas típicas do gênero *Calonectria*.

Em meio de cultura Batata Dextrose Ágar (BDA), os 31 isolados apresentaram colônias de crescimento rápido, com coloração variando de branca a bege ou marrom-clara, frequentemente com aspecto cotonoso. A caracterização morfológica foi realizada com base nos 26 isolados obtidos durante a amostragem. Os demais

isolados utilizados neste estudo pertenciam à coleção de culturas do Laboratório de Patologia Florestal (LPF) e, por já terem sido previamente caracterizados morfológicamente, não foram novamente avaliados. A observação microscópica revelou a presença de conidióforos hialinos, ramificados, contendo vesículas terminais características, além de conídios hialinos, cilíndricos a levemente alongados, produzidos em massas mucilaginosas. Essas características morfológicas são compatíveis com espécies pertencentes ao complexo *Calonectria candelabrum*.

Os isolados utilizados neste estudo, bem como suas informações de origem, hospedeiro e identificação, estão apresentados na Tabela 2.

No total, foram obtidos 31 isolados de *Calonectria*, distribuídos entre os estados de Santa Catarina, Paraná e Rio Grande do Sul, associados principalmente a *Eucalyptus dunnii* e *E. benthamii*.

Tabela 2 - Isolados de *Calonectria* utilizados nas análises filogenéticas multilocus, com informações de identificação taxonômica, hospedeiro e origem.

Espécie	ID	Hospedeiro	Tipo de Amostra	Local	Cidade	Estado
<i>Calonectria spathulata</i>	LPF2891	<i>Eucalyptus benthamii</i>	Folha de ramo	Fazenda São Miguel da Roseira	São Mateus do Sul	PR
<i>Calonectria</i> sp. 1	LPF2892	<i>Eucalyptus dunnii</i>	Folha de ramo	Fazenda Paredão	Três Barras	SC
<i>Calonectria</i> sp. 1	LPF2893	<i>Eucalyptus dunnii</i>	Folha de ramo	Fazenda Paredão	Três Barras	SC
<i>Calonectria spathulata</i>	LPF2894	<i>Eucalyptus dunnii</i>	Folha de ramo	Fazenda Paredão	Três Barras	SC
<i>Calonectria spathulata</i>	LPF2895	<i>Eucalyptus dunnii</i>	Folha de ramo	Fazenda Paredão	Três Barras	SC
<i>Calonectria</i> sp. 1	LPF2896	<i>Eucalyptus benthamii</i>	Folha de ramo	Fazenda Paredão	Três Barras	SC
<i>Calonectria spathulata</i>	LPF2897	<i>Eucalyptus dunnii</i>	Folha de ramo	Fazenda São Miguel da Roseira	São Mateus do Sul	PR
<i>Calonectria</i> sp. 1	LPF2898	<i>Eucalyptus dunnii</i>	Folha de ramo	Fazenda Paredão	Três Barras	SC
<i>Calonectria</i> sp. 1	LPF2899	<i>Eucalyptus dunnii</i>	Folha de ramo	Fazenda Paredão	Três Barras	SC
<i>Calonectria spathulata</i>	LPF2900	<i>Eucalyptus dunnii</i>	Folha de ramo	Fazenda São Miguel da Roseira	São Mateus do Sul	PR
<i>Calonectria spathulata</i>	LPF2901	<i>Eucalyptus dunnii</i>	Folha de ramo	Fazenda São Miguel da Roseira	São Mateus do Sul	PR
<i>Calonectria</i> sp. 1	LPF2902	<i>Eucalyptus benthamii</i>	Folha de ramo	Fazenda Paredão	Três Barras	SC
<i>Calonectria</i> sp. 1	LPF2903	<i>Eucalyptus dunnii</i>	Folha de ramo	Fazenda Paredão	Três Barras	SC
<i>Calonectria spathulata</i>	LPF2904	<i>Eucalyptus dunnii</i>	Folha de ramo	Fazenda Paredão	Três Barras	SC
<i>Calonectria</i> sp. 1	LPF2905	<i>Eucalyptus dunnii</i>	Folha de ramo	Fazenda Paredão	Três Barras	SC

<i>Calonectria spathulata</i>	LPF2906	<i>Eucalyptus dunnii</i>	Folha de ramo	Fazenda Paredão	Três Barras	SC
<i>Calonectria spathulata</i>	LPF2907	<i>Eucalyptus dunnii</i>	Folha de ramo	Fazenda São Miguel da Roseira	São Mateus do Sul	PR
<i>Calonectria spathulata</i>	LPF2908	<i>Eucalyptus benthamii</i>	Folha de ramo	Fazenda São Miguel da Roseira	São Mateus do Sul	PR
<i>Calonectria spathulata</i>	LPF2909	<i>Eucalyptus dunnii</i>	Folha de ramo	Viveiro de espera	Três Barras	SC
<i>Calonectria</i> sp. 1	LPF2910	<i>Eucalyptus dunnii</i>	Folha de ramo	Fazenda Paredão	Três Barras	SC
<i>Calonectria spathulata</i>	LPF2911	<i>Eucalyptus benthamii</i>	Folha de ramo	Viveiro de espera	Três Barras	SC
<i>Calonectria putriramosa</i>	LPF2912	<i>Eucalyptus benthamii</i>	Folha de ramo	Fazenda Paredão	Três Barras	SC
<i>Calonectria imperata</i>	LPF2913	<i>Eucalyptus dunnii</i>	Haste (muda)	Viveiro de espera	Três Barras	SC
<i>Calonectria brasiliiana</i>	LPF2967	<i>Eucalyptus benthamii</i>	Folha de ramo	Viveiro Viflona	Indaial	SC
<i>Calonectria putriramosa</i>	LPF2968	<i>Eucalyptus</i> sp.	Folha de ramo	Viveiro Viflona	Indaial	SC
<i>Calonectria</i> sp. 2	LPF2969	<i>Eucalyptus benthamii</i>	Folha de ramo	Viveiro Viflona	Indaial	SC
<i>Calonectria imperata</i>	LPF2231	<i>Eucalyptus</i> sp.	Substrato	Viveiro	Guaíba	RS
<i>Calonectria exiguispora</i>	LPF2475	<i>Eucalyptus</i> sp.	Solo	Campo	Campo Belo do Sul	SC
<i>Calonectria exiguispora</i>	LPF2480	<i>Eucalyptus</i> sp.	Solo	Campo	Campo Belo do Sul	SC
<i>Calonectria spathulata</i>	LPF2489	<i>Eucalyptus</i> sp.	Solo	Campo	Otacílio Costa	SC
<i>Calonectria spathulata</i>	LPF2491	<i>Eucalyptus</i> sp.	Solo	Campo	Otacílio Costa	SC

3.2 Análises filogenéticas multilocus

A análise filogenética, baseada na matriz concatenada dos loci *tef1*, *tub2*, *cmdA* e *his3*, permitiu inferir as relações evolutivas entre os isolados estudados e isolados representativos das espécies do complexo *Calonectria candelabrum*, (Figura 2).

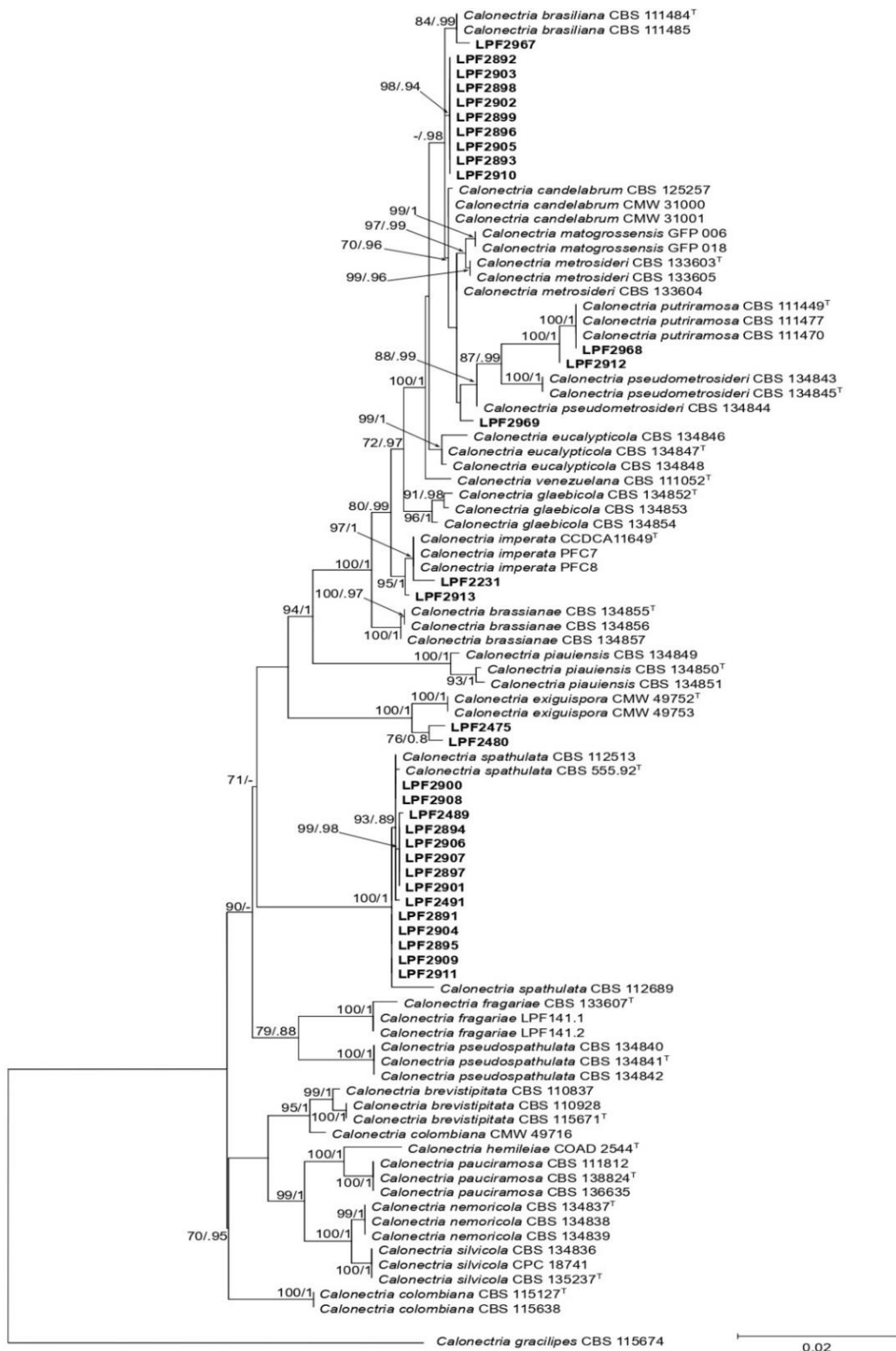


Figura 2 - Árvore filogenética baseada na análise concatenada dos *loci* *tef1*, *tub2*, *cmdA* e *his3* de isolados de *Calonectria candelabrum* s.l. Os valores de suporte (bootstrap/probabilidade posterior) estão indicados nos nós. Os isolados deste estudo estão destacados em negrito e identificados pelo prefixo LPF. A análise incluiu *Calonectria gracilipes* como grupo externo. T indica isolados ex-tipo.

A topologia obtida evidenciou a presença de múltiplos agrupamentos bem suportados, indicando elevada diversidade de espécies. A maioria dos

isolados (14) agrupou-se com sequências de referência de *Calonectria spathulata*, formando um clado com alto suporte estatístico (BS = 100; PP = 1,0), corroborando sua identificação taxonômica.

Um grupo composto por nove isolados (LPF2892, LPF2893, LPF2896, LPF2898, LPF2899, LPF2902, LPF2903, LPF2905 e LPF2910) formou um clado bem suportado (BS = 98; PP = 0,94), filogeneticamente próximo a *Calonectria brasiliiana* e a um clado contendo *C. candelabrum*, *C. matogrossensis*, *C. metrosideri*, *C. putriramosa* e *C. pseudometrosideri*. No entanto, esses isolados permaneceram distintos das sequências de referência dessas espécies, indicando tratar-se de uma linhagem filogeneticamente independente. Com base na congruência entre os loci analisados, esses isolados foram provisoriamente designados como *Calonectria* sp. 1.

De forma semelhante, o isolado LPF2969 apresentou posicionamento filogenético distinto dos demais, sendo tratado como *Calonectria* sp. 2, embora com suporte limitado para inferências taxonômicas mais conclusivas.

O isolado LPF2967 agrupou-se com sequências de referência de *Calonectria brasiliiana*, apresentando alto suporte na análise Bayesiana (PP = 0,99) e suporte moderado na análise de Máxima Verossimilhança (BS = 84). Outros isolados foram atribuídos às espécies *C. exiguispora* (LPF2475 e LPF2480), *C. imperata* (LPF2913 e LPF2231) e *C. putriramosa* (LPF2912 e LPF2968), todos com elevado suporte estatístico na análise dos dados concatenados.

3.3 Análises filogenéticas por locus

Em contraste com a clara resolução entre espécies filogenéticas obtida nas análises multilocus, as análises filogenéticas baseadas nos loci individuais evidenciaram variações na resolução dos agrupamentos (Apêndices 1–4).

Todas as quatro árvores individuais recuperaram *Calonectria spathulata* e *C. exiguispora* como grupos monofiléticos exclusivos, com alto suporte estatístico. No entanto, a delimitação entre espécies não foi satisfatória dentro do grande “Clado Candelabrum”, composto por isolados atribuídos às espécies *C. brasiliiana*, *C. brassianae*, *C. candelabrum*, *C.*

eucalypticola, *C. glaebicola*, *C. imperata*, *C. matogrossensis*, *C. metrosideri*, *C. pseudometrosideri*, *C. putriramosa*, *C. venezuelana*, *Calonectria* sp.1 e *Calonectria* sp.2. Os isolados dessas espécies agruparam-se, em geral, em grandes politomias, como observado na árvore de *his3*, ou em clados menores, sem suporte estatístico e contendo isolados de diferentes espécies, como nas árvores de *cmdA*, *tef1* e *tub2*.

Considerando os isolados avaliados, algumas espécies do Clado *Candelabrum* formaram agrupamentos monofiléticos exclusivos em análises específicas, como *C. imperata* e *C. putriramosa* na árvore de *cmdA*, sendo que esta última formou um clado mais distante das demais espécies, e *Calonectria* sp.1 na árvore de *tef1*.

Esses resultados evidenciam que a identificação precisa de espécies dentro do complexo *Calonectria candelabrum* depende da análise combinada de múltiplos loci, uma vez que nenhum dos marcadores avaliados apresentou, isoladamente, resolução suficiente para delimitar as espécies do complexo.

3.4 Análise filogenética comparativa com isolados de *Calonectria* descritos por Miranda *et al.* (2021) no Sul do Brasil

A análise filogenética baseada nos loci *cmdA* e *tub2*, incluindo sequências de referência provenientes de estudo prévio conduzido na região Sul do Brasil (Miranda *et al.*, 2021), foi congruente com os agrupamentos observados na análise multilocus principal (Figura 3).

Três isolados (CIS03, CIS09 e CIS35), provenientes de Miranda *et al.* (2021), agruparam-se no clado correspondente a *Calonectria spathulata*. Por outro lado, os isolados CIS24, CIS41, CIS49 e CIS30 (Miranda *et al.*, 2021), juntamente com os isolados de referência CTCME, CTCME2 e CTCAM, além do isolado LPF2969 e do isolado CBS 134844 (*C. pseudometrosideri*), formaram um agrupamento não suportado, posicionado de forma parafilética em relação a isolados de *C. metrosideri*, incluindo o isolado CIS21. Este, por sua vez, encontra-se em posição parafilética em relação aos isolados representativos de *C. matogrossensis*.

Os isolados LPF2892, LPF2893, LPF2896, LPF2898, LPF2899, LPF2902, LPF2903, LPF2905 e LPF2910 formaram um clado distinto e bem suportado (BS = 99; PP = 0,96). Esse grupo posicionou-se próximo a

Calonectria brasiliiana e *C. candelabrum*, porém separado das sequências de referência dessas espécies, bem como dos isolados provenientes do estudo comparativo (CIS e CTC). Esse padrão reforça a interpretação de que esses isolados representam uma linhagem independente dentro do complexo *Calonectria candelabrum*, sendo consistente com os resultados obtidos na análise multilocus baseada em quatro loci.

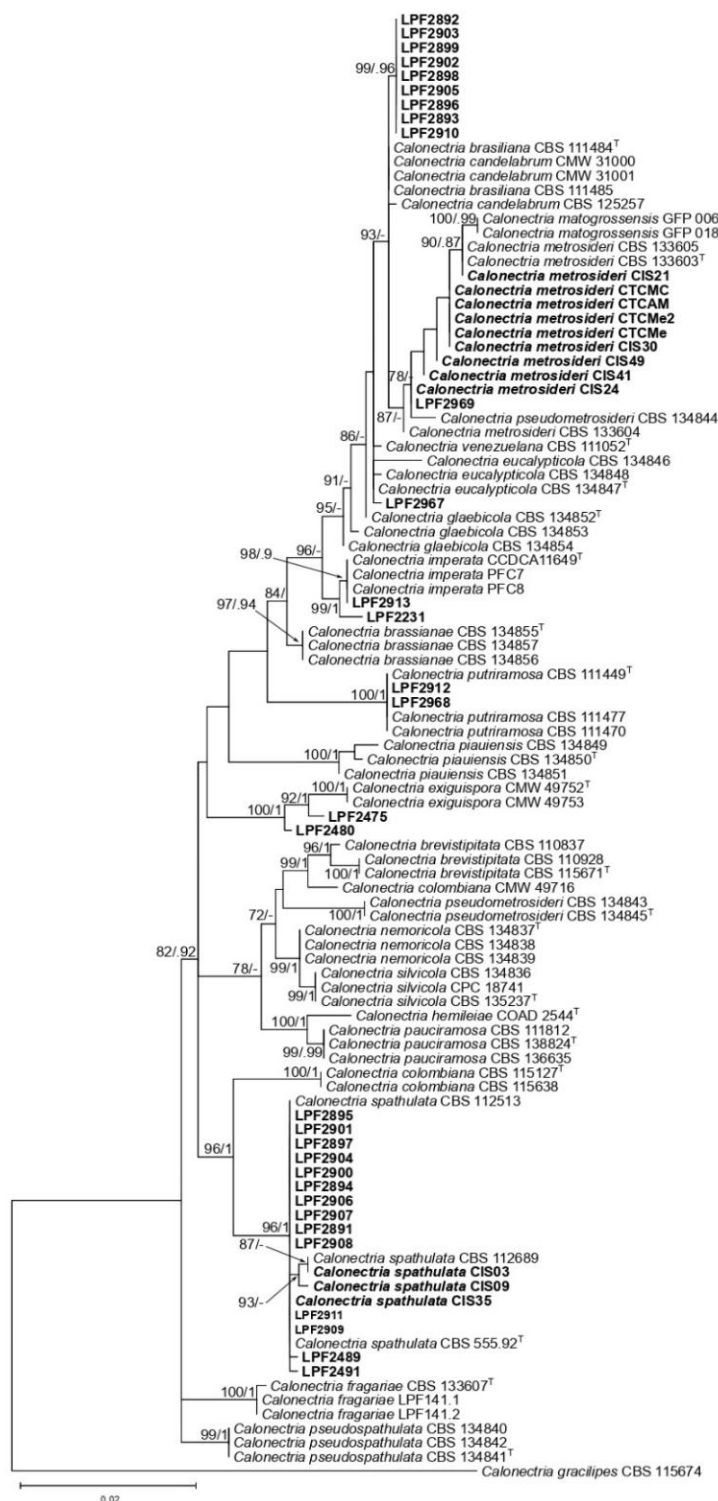


Figura 3 - Árvore filogenética inferida a partir da análise concatenada dos *loci* *cmdA* e *tub2*, incluindo isolados obtidos neste estudo e seqüências de referência de Miranda *et al.* (2021). Os isolados deste estudo estão identificados pelo prefixo LPF. Os valores de suporte nos nós correspondem ao bootstrap (BS) e às probabilidades posteriores (PP). Os códigos CIS e CTC referem-se aos isolados descritos por Miranda *et al.* (2021). *Calonectria gracilipes* foi utilizada como grupo externo. A letra T indica isolados ex-tipo.

Os demais isolados apresentaram posicionamento filogenético congruente com a análise principal, agrupando-se com alto suporte às espécies *C. spathulata*, *C. putriramosa*, *C. imperata* e *C. exiguispora*, o que indica estabilidade dos agrupamentos entre diferentes combinações de marcadores moleculares.

4. DISCUSSÃO

A análise filogenética multilocus, baseada na concatenação dos loci *tef1*, *tub2*, *cmdA* e *his3*, permitiu a inferência robusta das relações evolutivas entre os isolados analisados, evidenciando a presença de múltiplos agrupamentos bem suportados no complexo de espécies *Calonectria candelabrum*. A formação de grupos monofiléticos com alto suporte, como observado para *Calonectria spathulata*, bem como a consistência na identificação dos isolados deste estudo em clados correspondentes às espécies *C. brasiliiana*, *C. exiguispora*, *C. imperata* e *C. putriramosa*, demonstram a eficiência da abordagem multilocus na delimitação taxonômica no gênero. Esse padrão reforça que a integração de marcadores filogenéticos complementares aumenta a estabilidade topológica e reduz ambiguidades na inferência evolutiva (Liu *et al.*, 2020).

Entre os resultados obtidos, destaca-se a formação de um clado distinto composto pelos isolados LPF2892, LPF2893, LPF2896, LPF2898, LPF2899, LPF2902, LPF2903, LPF2905 e LPF2910, filogeneticamente próximo a *Calonectria candelabrum* e outras espécies relacionadas. O alto suporte estatístico e a congruência entre os loci analisados sustentam a hipótese de que esses isolados representam uma linhagem independente, aqui tratada como *Calonectria* sp. 1. De forma semelhante, o isolado LPF2969 apresentou posicionamento filogenético distinto dos demais, sendo tratado como *Calonectria* sp. 2, ainda que com suporte limitado para inferências taxonômicas conclusivas, por se tratar de apenas um isolado. A presença de linhagens como *Calonectria* sp. 1 e sp. 2, associadas a *Eucalyptus dunnii* e *E. benthamii* no Sul do Brasil, sugere a existência de uma diversidade biológica e genética ainda não formalmente descrita, possivelmente relacionada a processos de divergência recente e adaptação a nichos específicos.

Em contraste, as análises baseadas em loci individuais evidenciaram limitações na resolução filogenética, principalmente na resolução das espécies dentro do “Clado Candelabrum”, composto por *C. candelabrum* e outras espécies muito próximas, geralmente não delimitadas como grupos monofiléticos nas árvores filogenéticas de genes individuais. Esse cenário demonstra as limitações das abordagens baseadas em morfologia e em marcadores genéticos únicos, utilizados isoladamente como ‘barcodes’ para identificações moleculares por meio de comparações com bancos de dados, como o GenBank, reforçando a necessidade de integração de múltiplas evidências para a delimitação de espécies (Lombard *et al.*, 2010, 2016; Banerjee *et al.*, 2025). Nesse contexto, os resultados obtidos indicam a tenuidade dos limites específicos no complexo *C. candelabrum*, bem como o desempenho inferior de determinados loci, especialmente *his3*, na resolução taxonômica (Liu *et al.*, 2020).

No presente estudo, *Calonectria spathulata* foi a espécie predominante, representada por 14 dos 31 isolados analisados. Isolados dessa espécie foram obtidos de plantas sintomáticas em São Mateus do Sul, PR (N = 6) e em Três Barras, SC (N = 6), além de amostras de solo provenientes de Otacílio Costa, SC (N = 2). *Calonectria* sp. 1 foi a segunda espécie mais frequente, com nove isolados obtidos exclusivamente de folhas de *Eucalyptus dunnii* e *E. benthamii* em Três Barras, SC. As demais espécies (*C. brasiliensis*, *C. exiguispora*, *C. imperata* e *C. putriramosa*) foram detectadas de forma esporádica, associadas a amostras de plantas, solo e substrato provenientes de viveiros e plantios localizados em Santa Catarina e Rio Grande do Sul.

Esses resultados são, em parte, congruentes com aqueles reportados por Miranda *et al.* (2021), que investigaram a etiologia da mancha de calonectria em plantios de *Eucalyptus benthamii* no Sul do Brasil. Nesse estudo, espécies pertencentes ao complexo *Calonectria candelabrum*, incluindo *C. spathulata* e *C. metrosideri*, foram associadas à doença em campo, apesar de esse complexo ser tradicionalmente relacionado a doenças em viveiros. A ocorrência de *C. spathulata* em ambos os estudos, bem como a detecção de espécies filogeneticamente próximas, reforça a

importância desse grupo de espécies associadas à mancha-de-calonectria em condições subtropicais.

Em uma perspectiva mais ampla, os resultados aqui obtidos contrastam com a maioria dos levantamentos conduzidos em outras regiões do Brasil, nos quais espécies do complexo *Calonectria pteridis* são frequentemente relatadas como os principais agentes etiológicos da mancha de calonectria em eucalipto (Alfenas *et al.*, 2015; Soares *et al.*, 2017). Nessas regiões, caracterizadas por clima tropical e equatorial, observa-se ampla distribuição dessas espécies, frequentemente associadas a epidemias em campo. Adicionalmente, estudos conduzidos em regiões mais quentes do Brasil também evidenciam elevada diversidade de espécies de *Calonectria* associadas ao eucalipto, incluindo representantes de diferentes complexos de espécies, como os complexos *Calonectria candelabrum* e *Calonectria pteridis*, como demonstrado por Sanchez-Gonzalez *et al.* (2022) no Nordeste do país. Esse cenário reforça a influência de fatores ambientais na distribuição e prevalência das espécies do gênero, como já sugerido em estudos sobre a ecologia de *Calonectria* em diferentes regiões climáticas.

Por outro lado, neste trabalho, assim como observado por Miranda *et al.* (2021), verificou-se a predominância de espécies pertencentes ao complexo *Calonectria candelabrum*. Esse padrão sugere que, em condições de clima mais ameno, como as observadas no Sul do Brasil, espécies desse complexo podem apresentar maior adaptação e estar mais frequentemente associadas à mancha-de-calonectria em campo, contrastando com o padrão observado em regiões tropicais.

Os resultados obtidos evidenciam um padrão distinto de distribuição de espécies de *Calonectria* associadas à mancha foliar em eucalipto no Sul do Brasil, com predominância de espécies do complexo *Calonectria candelabrum*, em contraste com o padrão observado em regiões tropicais do país, onde espécies do complexo *C. pteridis* são mais frequentes. Adicionalmente, a ocorrência de linhagens filogeneticamente distintas reforça a complexidade taxonômica desse grupo e sugere que a diversidade de espécies dentro do complexo *C. candelabrum* pode estar subestimada, destacando-se a necessidade de estudos adicionais para melhor delimitação taxonômica dessas linhagens. Esses resultados contribuem para o

entendimento da diversidade e distribuição de *Calonectria* em regiões subtropicais e fornecem subsídios para o manejo da doença na eucaliptocultura.

REFERÊNCIAS

ALFENAS, A. C. et al. **Clonagem e doenças do eucalipto**. 2. ed. Viçosa: Editora UFV, 2009.

ALFENAS, R. F. et al. Diversity and potential impact of *Calonectria* species in *Eucalyptus* plantations in Brazil. **Studies in Mycology**, v. 80, p. 89–130, 2015.

AUER, C. G.; SANTOS, Á. F. Doenças em eucaliptos destinados à produção de energia na região Sul do Brasil. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 31, p. 373, 2011.

AUER, C. G.; SANTOS, Á. F. Principais doenças em espécies de eucalipto utilizadas para a produção de energia na região Sul do Brasil. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, n. 60, p. 45–56, 2009.

AUER, C. G.; SANTOS, Á. F. dos. Associação de *Botryosphaeria dothidea* com a morte de árvores jovens de *Eucalyptus benthamii* no estado do Paraná. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 35, p. 84, 2009a.

AUER, C. G.; SANTOS, Á. F. dos. Ocorrência de mancha de *Kirramyces* em *Eucalyptus benthamii* na região Sul do Brasil. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 35, p. 85, 2009b.

BANERJEE, S. et al. Morphological and multilocus phylogenetic evidence confirms *Calonectria pseudoreteauidii* as the causal agent of leaf spot and blight on *Manilkara hexandra* in India. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 140, p. 102877, 2025.

CARBONE, I.; KOHN, L. M. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. **Mycologia**, v. 91, n. 3, p. 553–556, 1999.

CROUS, P. W. et al. Fungal Planet description sheets: 1182–1283. **Persoonia**, v. 46, p. 313–528, 2021a.

CROUS, P. W. et al. Fungal Planet description sheets: 1284–1382. **Persoonia**, v. 47, p. 178–374, 2021b.

CROUS, P. W. et al. Fungal Planet description sheets: 716–784. **Persoonia**, v. 40, p. 240–393, 2018.

CROUS, P. W. et al. Fungal Planet description sheets: 868–950. **Persoonia**, v. 42, p. 291–473, 2019.

CROUS, P. W. et al. *Calonectria* species and their *Cylindrocladium* anamorphs: species with sphaeropedunculate vesicles. **Studies in Mycology**, v. 50, p. 415–430, 2004.

CUNHA, A. B. da et al. Avaliação do rendimento em madeira serrada de *Eucalyptus benthamii* e de *Eucalyptus grandis* por meio do desdobro tangencial e radial. **Floresta**, Curitiba, v. 45, n. 2, p. 241–250, 2015.

DE ALMEIDA GARRETT, A. T. et al. First report of *Apharknessia eucalyptorum* on *Eucalyptus dunnii* in Brazil. **Forest Pathology**, 2018.

DE ALMEIDA GARRETT, A. T. et al. Pathogenicity and symptomatology of *Apharknessia eucalyptorum* on leaves and stems of *Eucalyptus* and *Corymbia*. **European Journal of Plant Pathology**, v. 168, p. 207–223, 2024.

EDGAR, R. C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic Acids Research**, v. 32, n. 5, p. 1792–1797, 2004.

FERREIRA, F. A. **Patologia florestal: principais doenças florestais no Brasil**. Viçosa: Sociedade de Investigações Florestais, 1989. 570 p.

HEPPERLE, D. **SeqAssem: a sequence analysis tool, contig assembler and trace data visualization tool**. 2004.

HIGA, R. C. V.; PEREIRA, J. C. D. **Usos potenciais do *Eucalyptus benthamii* Maiden et Cabbage**. Colombo: Embrapa Florestas, 2003.

INKSCAPE PROJECT. **Inkscape (version 1.4.3)** [software]. 2023. Disponível em:

KUMAR, S. et al. MEGA12: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 12 for adaptive and green computing. **Molecular Biology and Evolution**, v. 41, n. 1, 2024.

LIU, Q. L. et al. Reconsideration of species boundaries and proposed DNA barcodes for *Calonectria*. **Studies in Mycology**, v. 97, p. 100106, 2020.

LOMBARD, L. et al. Species concepts in *Calonectria* (*Cylindrocladium*). **Studies in Mycology**, v. 66, p. 15–30, 2010.

LOMBARD, L. et al. The forgotten *Calonectria* collection: pouring old wine into new bags. **Studies in Mycology**, v. 85, p. 159–198, 2016.

MIRANDA, I. D. S. et al. Occurrence of *Calonectria* leaf blight in *Eucalyptus benthamii* progenies and potential for disease resistance. **Tropical Plant Pathology**, v. 46, p. 254–264, 2021.

MOHALI, S. R.; STEWART, J. E. *Calonectria vigiensis* sp. nov. (Hypocreales, Nectriaceae) associated with dieback and sudden-death symptoms of *Theobroma cacao* from Mérida state, Venezuela. **Botany**, v. 99, n. 11, p. 683–693, 2021.

MULLER, B. V. **Efeito de sistemas de desdobro na qualidade e rendimento de madeira serrada de *Eucalyptus benthamii* Maiden et Cambage**. 2013. 120f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

NGUYEN, L.-T. et al. IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. **Molecular Biology and Evolution**, v. 32, n. 1, p. 268–274, 2015.

O'DONNELL, K. et al. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 5, p. 2044–2049, 1998.

O'DONNELL, K.; CIGELNIK, E. Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 7, n. 1, p. 103–116, 1997.

PALUDZYSZYN FILHO, E. et al. **Eucaliptos indicados para plantios no estado do Paraná**. Colombo: Embrapa Florestas, 2006.

PHAM, N. Q. et al. Soil-borne *Calonectria* associated with *Eucalyptus* plantations in Colombia. **MycoKeys**, v. 94, p. 17–35, 2022.

QUAEDVLIEG, W. et al. *Zymoseptoria* gen. nov.: a new genus to accommodate *Septoria*-like species occurring on graminicolous hosts. **Persoonia**, v. 26, p. 57–69, 2011.

ROCHA, M. P. da. ***Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden e *Eucalyptus dunnii* Maiden como fontes de matéria-prima para serrarias**. 2000. Tese (Doutorado em Ciências Florestais) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2000.

ROCHA, M. P.; TOMASELLI, I. Efeito do modelo de desdobro na qualidade da madeira serrada de *Eucalyptus dunnii*. **Cerne**, v. 8, n. 2, p. 70–83, 2002.

RONQUIST, F. et al. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. **Systematic Biology**, v. 61, n. 3, p. 539–542, 2012.

SANCHEZ-GONZALEZ, E. I. et al. Two new species of *Calonectria* (Hypocreales, Nectriaceae) causing *Eucalyptus* leaf blight in Brazil. **MycoKeys**, v. 91, p. 169–197, 2022.

SCHULTZ, B. et al. Impact of *Cylindrocladium candelabrum* leaf spot in young plantations of *Eucalyptus benthamii* in Rio Negrinho, Santa Catarina State. **Ciência Florestal**, v. 25, n. 2, p. 307–316, 2015.

SCHULTZ, B. **Mancha foliar em *Eucalyptus benthamii* no Sul do Brasil**. 2011. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

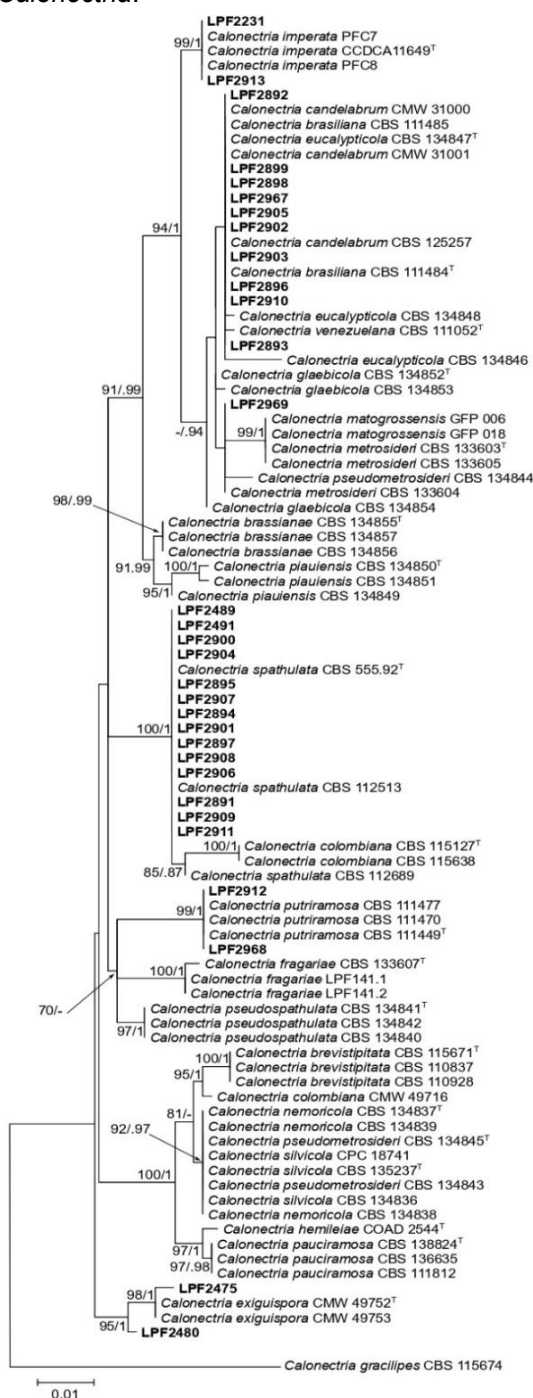
SOARES, I. D. et al. **Fungos associados à mancha foliar em *Eucalyptus benthamii* Maiden et Cabbage na região Sul do Brasil**. Colombo: Embrapa Florestas, 2017.

VAIDYA, G. et al. SequenceMatrix: concatenation software for the fast assembly of multi-gene datasets with character set and codon information. **Cladistics**, v. 27, n. 2, p. 171–180, 2011.

WANG, Q. et al. Novel species of *Calonectria* isolated from soil near *Eucalyptus* plantations in southern China. **Mycologia**, v. 111, n. 6, p. 1028–1040, 2019.

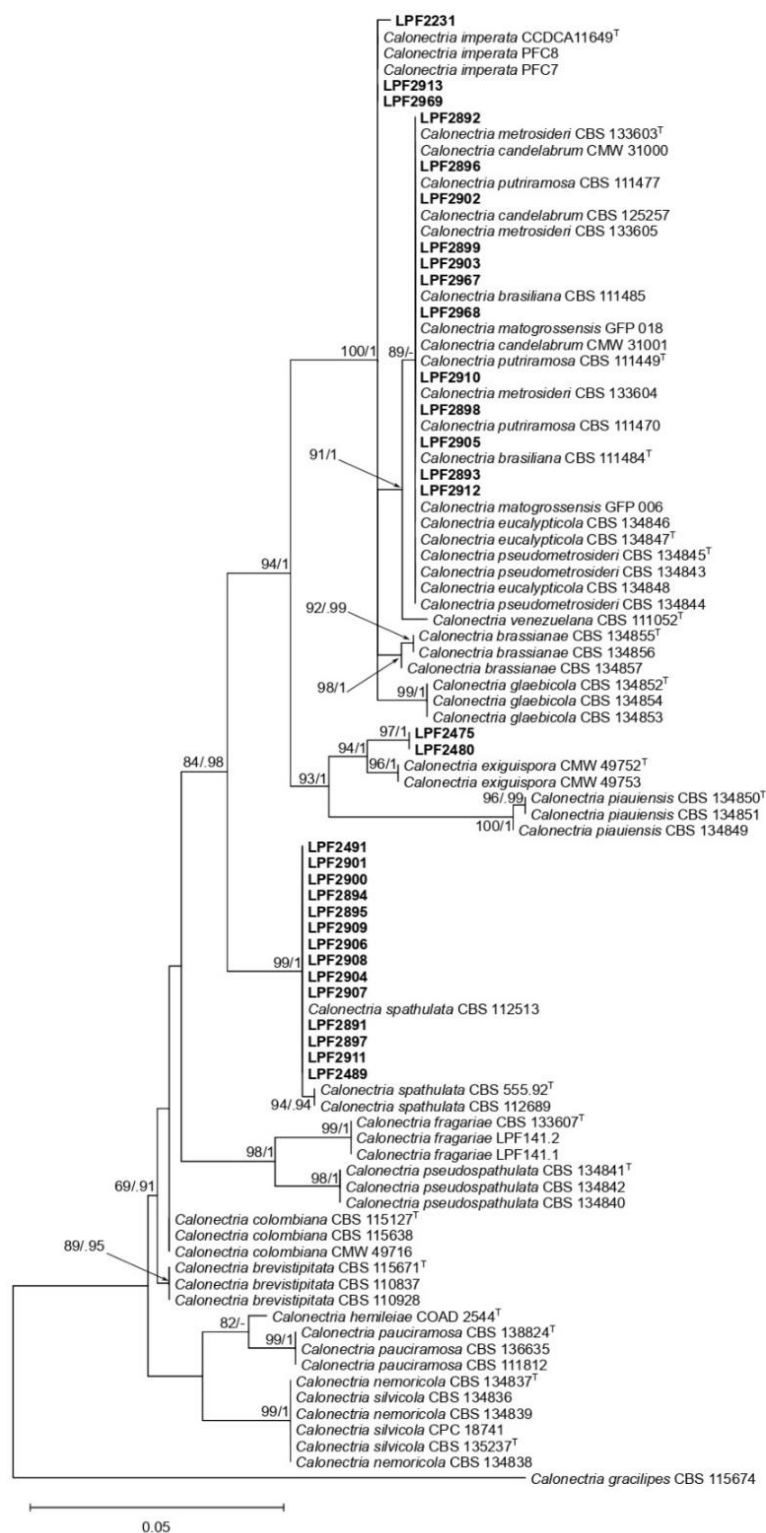
APÊNDICES

Apêndice 1 - Árvore filogenética baseada nas sequências do locus *cmdA* de isolados de *Calonectria*.



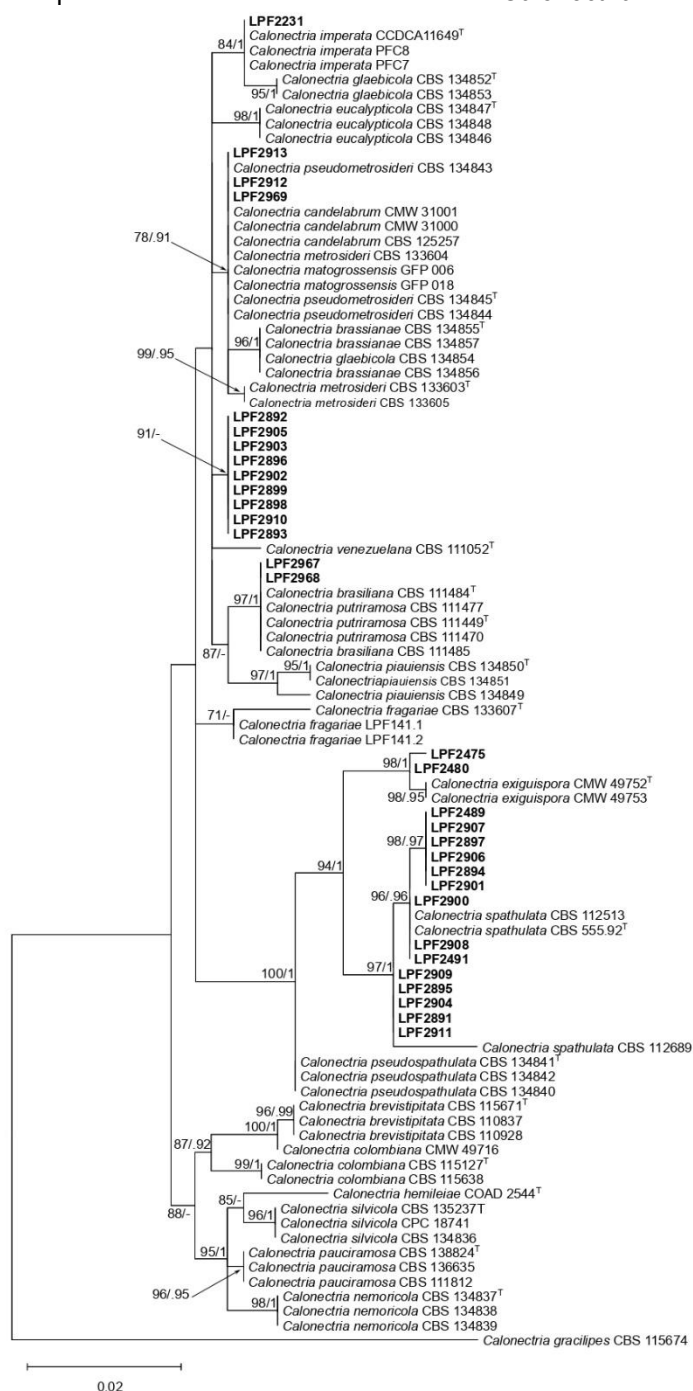
Nota: Os valores de suporte estão apresentados como bootstrap (BS) e probabilidades posteriores (PP) nos nós. Os isolados obtidos neste estudo estão identificados pelo prefixo LPF. A análise incluiu *Calonectria gracilipes* como grupo externo. T indica isolados ex-tipo.

Apêndice 2 - Árvore filogenética baseada nas sequências do locus *his3* de isolados de *Calonectria*.



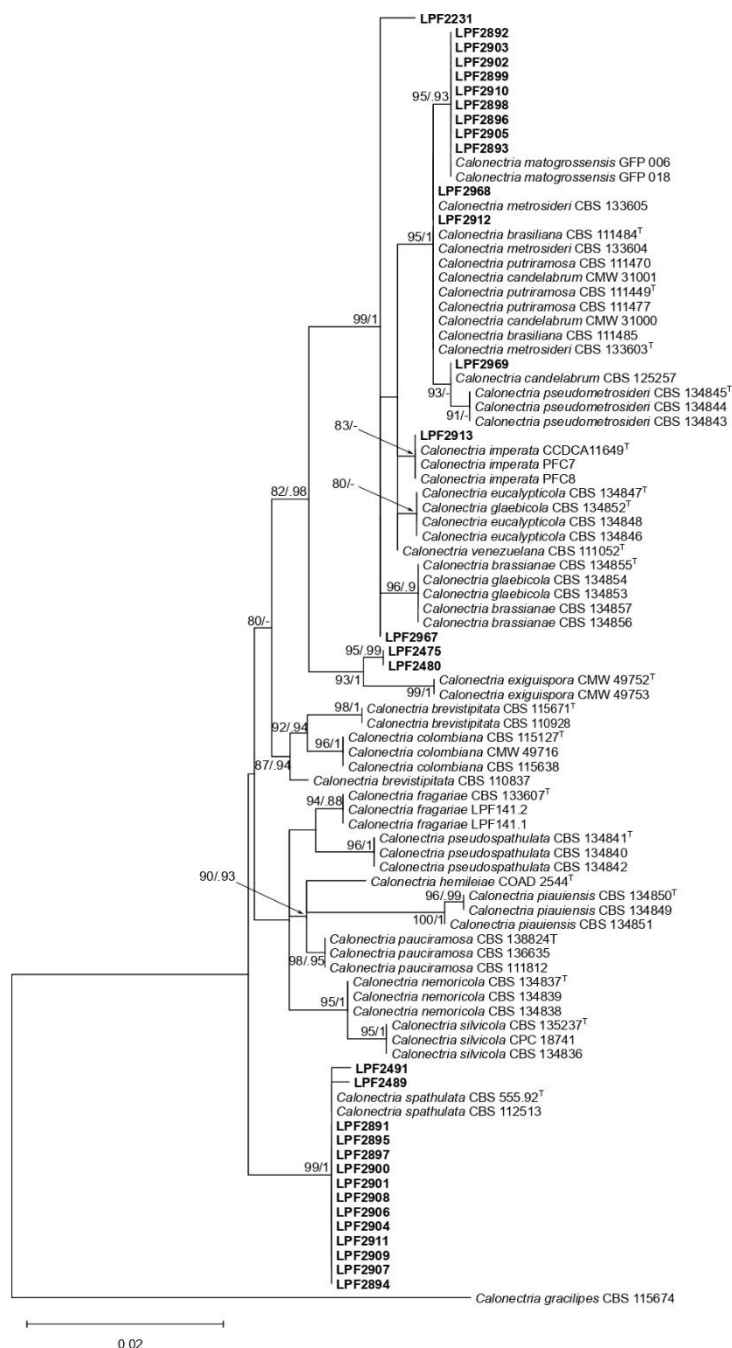
Nota: Os valores de suporte estão apresentados como bootstrap (BS) e probabilidades posteriores (PP) nos nós. Os isolados obtidos neste estudo estão identificados pelo prefixo LPF. A análise incluiu *Calonectria gracilipes* como grupo externo. T indica isolados ex-tipo.

Apêndice 3 - Árvore filogenética baseada nas sequências do locus *tef1* de isolados de *Calonectria*.



Nota: Os valores de suporte estão apresentados como bootstrap (BS) e probabilidades posteriores (PP) nos nós. Os isolados obtidos neste estudo estão identificados pelo prefixo LPF. A análise incluiu *Calonectria gracilipes* como grupo externo. T indica isolados ex-tipo.

Apêndice 4 - Árvore filogenética baseada nas sequências do locus *tub2* de isolados de *Calonectria*.



Nota: Os valores de suporte estão apresentados como bootstrap (BS) e probabilidades posteriores (PP) nos nós. Os isolados obtidos neste estudo estão identificados pelo prefixo LPF. A análise incluiu *Calonectria gracilipes* como grupo externo. T indica isolados ex-tipo.