

RODRIGO GALVÃO DE FREITAS

**DIVERSIDADE GENÉTICA E AGRESSIVIDADE DE ISOLADOS DE
Calonectria pteridis NO BRASIL**

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

VIÇOSA

MINAS GERAIS – BRASIL

2016

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

T

F866d
2016 Freitas, Rodrigo Galvão de, 1989-
Diversidade genética e agressividade de isolados de
Calonectria pteridis no Brasil / Rodrigo Galvão de Freitas. –
Viçosa, MG, 2016.
vii, 31f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Acelino Couto Alfenas.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. *Calonectria pteridis*. 2. Eucalipto - Doenças e pragas -
Brasil. 3. Variabilidade (Genética). 4. . I. Universidade Federal
de Viçosa. Departamento de Fitopatologia. Programa de
Pós-graduação em Fitopatologia. II. Título.

CDD 22 ed. 632.4

RODRIGO GALVÃO DE FREITAS

**DIVERSIDADE GENÉTICA E AGRESSIVIDADE DE ISOLADOS DE
Calonectria pteridis NO BRASIL**

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

APROVADA: 27 de julho de 2016

Lúcio Mauro da Silva Guimarães
(Coorientador)

Rafael Ferreira Alfenas

Gleiber Quintão Furtado

Acelino Couto Alfenas
(Orientador)

Aos meus pais, Rui e Maria Luisa.
Aos meus irmãos, Janaína e Ricardo.
Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por iluminar e guiar o meu caminho, permitindo a conclusão dessa etapa de minha vida.

Aos meus pais, Rui e Maria Luisa, por todo amor, dedicação e incentivo.

Aos meus irmãos, Janaína e Ricardo, pela amizade e companheirismo.

Aos meus familiares, pelo carinho, apoio e torcida.

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

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Professor Acelino Couto Alfenas por tantas oportunidades e ensinamentos oferecidos desde o início da minha graduação.

Ao Dr. Lúcio M. S. Guimarães por toda ajuda e apoio, fundamentais na realização deste trabalho.

Ao Professor Rafael Alfenas, pelas sugestões e pelo acompanhamento do trabalho.

À Clonar Resistência a Doenças Florestais por todo zelo e cuidado na produção das mudas. Em especial ao Eduardo, por toda sua ajuda e dedicação.

Aos funcionários do Viveiro de Café da UFV, em especial ao Sr. Mário pelo apoio durante a fase de inoculação e avaliação das mudas.

Aos colegas e funcionários do Laboratório de Patologia Florestal pela amizade e companheirismo. Em especial agradeço à Mara, Paulo e Víctor pela ajuda nas avaliações e ao Leonardo, Denise e Danielle pela ajuda nas análises moleculares.

Aos amigos do curso de mestrado pela união, apoio e por tornarem mais fáceis os momentos de maior dificuldade.

Aos grandes amigos que a vida e a UFV me proporcionaram, por todas as risadas, descontração, conselhos, ajudas e carinho em qualquer situação. Em especial à Fabiana, Mariana, Breno e Diego, que além da amizade, me deram muita segurança, força e determinação sempre que precisei.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, o meu muito obrigado.

BIOGRAFIA

RODRIGO GALVÃO DE FREITAS, filho de Rui de Paula Freitas e Maria Luisa Galvão Freitas, nasceu em 29 de dezembro de 1989, em Viçosa, Minas Gerais.

Em 2007, concluiu o Ensino Médio no Colégio Equipe, em Viçosa.

Em 2008, iniciou o curso de Engenharia Florestal, na Universidade Federal de Viçosa, sendo o mesmo concluído em março de 2014.

No período de agosto de 2008 a março de 2013 foi bolsista de Iniciação Científica no Laboratório de Patologia Florestal do DFP/Bioagro, e entre setembro de 2013 a março de 2014 foi bolsista de Iniciação Científica da Clonar Resistência a Doenças Florestais, ambos sob a orientação do Prof. Acelino Couto Alfenas.

Foi bolsista do programa Ciências Sem Fronteiras no período de março a setembro de 2013, realizando um estágio no Departamento de Fitopatologia da Iowa State University em Ames, Iowa, EUA, sob orientação do Prof. Thomas C. Harrington.

Em agosto de 2014, iniciou o curso de mestrado em Fitopatologia sob orientação do Professor Acelino Couto Alfenas no Laboratório de Patologia Florestal/Bioagro do Departamento de Fitopatologia da UFV.

SUMÁRIO

RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
1. INTRODUÇÃO	1
2. MATERIAL E MÉTODOS	3
2.1 Coleção de isolados	3
2.2 Extração e quantificação de DNA	3
2.3 Marcadores ISSR	4
2.4 Análise dos dados	5
2.5 Agressividade dos isolados	7
3. RESULTADOS	9
3.1 Marcadores ISSR	9
3.2 Análise dos dados	12
3.3 Agressividade dos isolados	15
4. DISCUSSÃO	23
5. CONCLUSÕES GERAIS	26
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27

RESUMO

FREITAS, Rodrigo Galvão de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2016. **Diversidade genética e agressividade de isolados de *Calonectria pteridis* no Brasil.** Orientador: Acelino Couto Alfenas. Coorientador: Lúcio Mauro da Silva Guimarães.

A mancha-de-pteridis, causada por *Calonectria pteridis*, é, atualmente, uma das principais doenças foliares em plantações de eucalipto no Brasil. Em regiões de clima quente e úmido, a doença pode ser um fator limitante para o plantio de genótipos suscetíveis. O método mais eficaz de controle da doença no campo é o plantio de material resistente, o que requer o conhecimento da variabilidade genética e fisiológica na população do patógeno para a seleção de plantas. Neste trabalho avaliaram-se a diversidade genética e a agressividade de *C. pteridis* obtidos de vários clones de eucalipto em diferentes regiões do Brasil. Estudaram-se 90 isolados provenientes principalmente dos estados do Pará e Maranhão. Para o estudo da diversidade genética, dentre os 16 *primers* ISSR testados, empregaram-se cinco que foram polimórficos e reprodutíveis. Análises de diversidade genética permitiram identificar 33 genótipos entre os 90 isolados estudados, porém geneticamente próximos, indicando uma baixa diversidade entre eles. Para o estudo da agressividade inocularam-se em dois clones híbridos de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*, sob condições controladas, 16 isolados selecionados com base na origem geográfica e na diversidade genética. A avaliação da severidade foi feita através do percentual de desfolha e por atribuição de notas de acordo com uma escala diagramática, sendo analisada a correlação entre elas. Não houve correlação entre a variabilidade genética e fisiológica, pois os indivíduos diferiram em agressividade. Houve uma alta correlação entre as duas formas de avaliação para apenas um dos clones utilizados. Os isolados GFP004, LPF059 e LPF294 foram os mais agressivos e devem ser empregados nas inoculações para selecionar plantas resistentes à mancha-de-pteridis.

ABSTRACT

FREITAS, Rodrigo Galvão de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2016.
Genetic diversity and aggressiveness of *Calonectria pteridis* isolates in Brazil.
Adviser: Acelino Couto Alfenas. Co-adviser: Lúcio Mauro da Silva Guimarães.

Calonectria leaf blight caused by *Calonectria pteridis*, is, currently, one of the major foliar diseases of eucalyptus plantations in Brazil. In humid and warm regions, it may be a limiting factor for growing susceptible genotypes. The most effective method of disease control in the field is by planting resistant plant material, which requires knowledge of the genetic and physiological variability in the pathogen population for screening for plants. In this work we evaluated the genetic diversity and the aggressiveness of *C. pteridis* obtained by several eucalyptus clones in different regions of Brazil. We studied 90 isolates collected mainly from the states of Pará and Maranhão. To study the genetic diversity, among 16 ISSR primers tested, five who were polymorphic and reproducible were used. Genetic diversity analysis have identified 33 genotypes among the 90 isolates studied, but genetically related, indicating a low diversity among them. To study the aggressiveness, we inoculated into two hybrid clones of *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*, under controlled conditions, 16 isolates selected based on the geographic origin and genetic diversity. The severity assessment was performed using the percentage of defoliation and attribution of notes through a diagrammatic scale, and subsequently analyzed the correlation between them. There was no correlation between the genetic and physiological variability, because individuals differ in aggressiveness. There was a high correlation between the two forms of evaluation to only one of the clones used. The GFP004, LPF059 and LPF294 isolates were the most aggressive and should be used in inoculations to select plants resistant to *Calonectria* leaf blight.

1. INTRODUÇÃO

Até na década de 1970, a eucaliptocultura no Brasil era concentrada principalmente nos estados de São Paulo e Minas Gerais e apresentava incremento médio anual (IMA) de cerca de $25 \text{ m}^3 \cdot \text{ha}^{-1} \cdot \text{ano}^{-1}$ (Alfenas et al., 2009). Nas últimas décadas a crescente demanda por produtos madeireiros, combinado com a conscientização sobre a preservação das florestas nativas, tem-se expandido mundialmente as plantações de eucalipto. Paralelamente à expansão das áreas plantadas houve um aumento da produtividade, propiciado em parte pelo emprego de mudas clonais, que originam plantios homogêneos e de alta produtividade (Mora e Garcia, 2000). Somente no Brasil existe cerca de 5,56 milhões de hectares plantados, o que corresponde a 71,9% da área de plantios florestais no país, com uma produtividade média de aproximadamente $39 \text{ m}^3 \cdot \text{ha}^{-1} \cdot \text{ano}^{-1}$ (Ibá, 2015).

Por outro lado, a expansão da eucaliptocultura para regiões mais quentes e úmidas, associada ao uso de poucos materiais genéticos sem o prévio conhecimento da resistência a doenças ou da adaptabilidade desses materiais aos novos ambientes, têm tornado as plantações cada vez mais vulneráveis à incidência de doenças e pragas (Alfenas et al., 2011). Dentre as doenças que incidem na cultura, destaca-se a mancha-de-pteridis, causada por *Calonectria pteridis* Crous, MJ Wingf. e Alfenas (= *Cylindrocladium pteridis*).

C. pteridis é um fungo pertencente ao filo Ascomycota, sendo a fase assexuada mais comumente encontrada na natureza como agente causal de várias doenças, caracterizada por apresentar conídios cilíndricos a levemente curvados, com as extremidades arredondadas possuindo predominantemente um septo (Crous, 2002). Além disso, outra característica marcante da espécie é a presença de uma vesícula clavada a estreitamente elipsoidal, com o diâmetro variando de 4 a $5 \mu\text{m}$ (Crous, 2002).

A mancha-de-pteridis é caracterizada por apresentar lesões foliares pequenas, circulares ou alongadas de coloração cinza-claro, que ao progredirem, coalescem e tornam-se marrom-claras, podendo atingir a área completa do limbo foliar e conseqüentemente induzir à desfolha prematura (Ferreira et al., 1995). As lesões foliares e a desfolha reduzem a área fotossintética das plantas, o que resulta provavelmente em diminuição do incremento volumétrico, além de permitir a entrada de luz no sub-bosque e favorecer conseqüentemente o crescimento de plantas e os resultantes efeitos negativos da mato-competição (Alfenas et al., 2009).

O patógeno foi descrito pela primeira vez como agente causal da mancha marrom em *Polystichum adiantiformis* (G. Forst.) J. Sm. (samambaia “chapéu de couro”) na Flórida em 1926 (Wolf, 1926). No Brasil, o primeiro relato de *C. pteridis* em eucalipto data de 1990, no sudeste da Bahia, onde causou severa desfolha em plantações de *Eucalyptus grandis* Hill ex. Maiden (Ferreira et al., 1995). Além de *C. pteridis*, outras espécies do gênero *Calonectria* foram descritas associadas à mancha-de-Calonectria no Brasil. Entretanto, *C. pteridis* tem sido a espécie mais comumente encontrada em plantações comerciais (Alfenas et al., 2015).

Para o controle químico da doença já existe um fungicida registrado, o Comet, pertencente ao grupo químico das estrubilurinas (Agrofit, 2016). Entretanto, devido às extensas áreas empregadas em plantios de eucalipto e pelo fato dela incidir a partir de seis meses de idade (Alfenas et al., 2009), quando a planta já está com a parte aérea bem desenvolvida, o gasto com o produto pode ser financeiramente inviável. Logo, o método mais eficiente e econômico de controle da doença no campo consiste no plantio de genótipos resistentes (Fonseca et al., 2010). Porém, para isso é necessário determinar a variabilidade genética e fisiológica nas populações do patógeno (Mc Donald & Linde, 2002; Bruton, 1998) para embasar a seleção de genótipos resistentes.

Dentre as técnicas utilizadas para avaliar a estrutura genética de fungos destacam-se os marcadores moleculares (Chen et al., 2002; Lu et al. 2004; Meng e Chen, 2001). O marcador *Inter-Simple-Sequence-Repeat* (ISSR), que consistem na amplificação das sequências de DNA entre duas regiões microssatélites adjacentes e inversamente orientadas através de um único primer (Zietkiewicz et al., 1994; Godwin et al., 1997), destaca-se por ser altamente polimórfico em relação a outros marcadores moleculares (Wolfe e Liston, 1998; Zhou et al., 2001). Além disso, é um método rápido, barato e não necessita de informação das sequências sobre o genoma em estudo.

Neste trabalho determinaram-se a diversidade genética e a agressividade de isolados de *C. pteridis* por meio de marcadores ISSR e inoculações sob condições controladas, analisando se houve correlação entre variabilidade genética e fisiológica.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Coleção de isolados

Estudaram-se 90 isolados de *C. pteridis* (Tabela 1) previamente identificados com base em análises filogenéticas (Alfenas et al., 2015).

Tabela 1. Isolados de *Calonectria pteridis* pertencentes à coleção do Laboratório de Patologia Florestal/Bioagro/UFV utilizados neste trabalho.

Número de Isolados	Estado	Região	Folha/Solo
50	Pará	Monte Dourado	Folha
7	Pará	Monte Dourado	Solo
1	Distrito Federal	Brasília	Folha
26	Maranhão	Imperatriz	Folha
1	Maranhão	Urbano Santos	Solo
2	Piauí	Teresina	Folha
3	Mato Grosso	Primavera do Leste	Folha

2.2 Extração e quantificação de DNA

O DNA fúngico foi extraído utilizando o kit Wizard Genomic DNA Purification Kit® (Promega, Madison, Estados Unidos), a partir de culturas cultivadas em meio BDA (Batata-dextrose-ágar) incubadas a 25 °C por 20 dias. Após incubação, o micélio foi transferido para tubos de microcentrífuga (2,0 mL) e a estes foram adicionados 600 µL da “Nuclei Lysis Solution”. As amostras foram maceradas a 30Hz por 2 min com o auxílio de um macerador TissueLyser II (Quiagen®, Hilden, Alemanha) e a seguir, incubadas a -20 °C por 5 min. Após incubação, adicionaram-se às amostras 400 µL de “Precipitation Protein Solution” e elas foram homogeneizadas no mesmo macerador por 1 min a 30 Hz, seguindo por centrifugação a 13200 rpm/10 min. Em seguida transferiram-se 400 µL da fase aquosa (sobrenadante) para um novo tubo de 1,5 mL contendo 500 µL de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1), seguida de homogeneização em TissueLyser por 2 min a 4 Hz e centrifugação a 13200 rpm/10 min. Transferiu-se a fase aquosa para um novo tubo de 1,5 mL contendo 600 µL de isopropanol gelado, cuja amostra foi homogeneizada invertendo-se, cuidadosamente, os tubos algumas vezes e em seguida eles foram mantidos a -20°C por 2 h. A seguir, as amostras foram centrifugadas a 13200 rpm por 10 min e o sobrenadante foi descartado. Ao *pellet*, adicionaram-se 600 µL de etanol (70%) gelado, e a seguir as

amostras foram homogeneizadas em TissueLyser por 2 min a 4 Hz, seguido de centrifugação por 3 min a 13200 rpm. Essa etapa foi realizada por duas vezes e subsequentemente os *pellets* de DNA formados foram secos em estufa a 37°C por 20 min. Após a secagem, o *pellet* de DNA foi ressuspensão em 50 µL de “DNA rehydration” e 2 µL de Rnase e mantidos em banho maria a 37 °C por 12 h, seguido de armazenamento a -20°C. Posteriormente, o DNA foi quantificado em espectrofotômetro NanoDrop 2000c (Thermo Scientific®, Wilmington, Estados Unidos) e a concentração ajustada para 20 ng µL⁻¹.

2.3 Marcadores ISSR

Para a seleção dos marcadores ISSR a serem utilizados no estudo da diversidade genética foram testados 16 *primers* (Tabela 2). A reação de PCR foi conduzida em um volume total de 20 µL, contendo 2 µL do *primer* (2µM), 10,0 µL da solução GoTaq® Green Master Mix (constituída de 2X Green GoTaq® Reaction Buffer, 400 µM dNTP e 3mM MgCl₂) (Promega), 2 µL de DNA, 0,3 µL de MgCl₂ (25mM) e o volume final completado com água ultra-pura. O programa utilizado foi composto por uma desnaturação inicial de 94 °C por 3 min, 40 ciclos de 92 °C por 1 min, a temperatura de anelamento correspondente de cada *primer* por 1 min e 72 °C por 2 min e uma extensão final de 72 °C por 7 min, em termociclador Veriti 96® (Applied Biosystems, Carlsbad, Estados Unidos). As reações de PCR-ISSR foram realizadas duas vezes para confirmação das ampliações e tamanho dos fragmentos. Os produtos da PCR foram separados em gel de agarose a 2%, a 80V por 120 min em tampão TBE 1X (Tris-Borato EDTA). Decorrido o tempo de corrida da eletroforese, o gel foi retirado da cuba, corado com brometo de etídeo (0,003% v/v a 5ng/mL) por 15 min e fotodocumentado (Loccus Biotecnologia, Cotia, Brasil) sob fonte de luz ultravioleta.

Tabela 2. Relação de *primers* ISSR utilizados para o estudo de diversidade genética com suas respectivas sequências de nucleotídeos e temperaturas de anelamento.

<i>Primer</i>	Sequência (5'-3')	Ta (°C)	Citação
P1	(AG) ₈	43,4	
P2	(AC) ₈	47,4	
P3	(CAG) ₅	47,4	
P5	(GTG) ₅	47,4	
P6	(CAC) ₅	47,4	Rampersad, 2013
P10	(AAG) ₆	41,2	
P12	(GACA) ₄	43,4	
P15	(AG) ₈ TG	47,4	
P20	CT(GA) ₈	47,4	
Manny	(CAC) ₄ RC	45,0	
John	(AG) ₇ YC	45,0	Chiron et al., 2009
Omar	(GAG) ₄ RC	45,0	
UBC 807	(AG) ₈ T	50,0	
UBC 841	(GA) ₈ YC	50,0	Li e Dong, 2009
UBC 835	(AG) ₈ YC	49,0	Kapital et al., 2015
SSR7	GC(AC) ₅	38,0	Dhoro, 2010
R-purina (A ou G)			
Y-pirimidina (T ou C)			

2.4 Análise dos dados

A partir dos fragmentos amplificados, construiu-se uma matriz binária com a presença (1) ou ausência (0) dos fragmentos. Fragmentos inconsistentes ou fracos foram excluídos das análises.

O número mínimo de fragmentos amplificados necessários para os estudos de diversidade genética foi obtido a partir das estimativas de correlação (*r*) de valores da matriz de similaridade e o valor de estresse (*E*), que indica o ajuste entre a matriz original e a matriz simulada. Esse número foi calculado por meio do software GENES (Cruz, 2013) e considerado satisfatório para as análises quando o valor do estresse foi inferior a 0,05 (Kruskal, 1964) e a correlação mais próxima de 1.

A diversidade genética foi calculada por meio do programa PopGene, versão 1.32 (Yeh et al., 1997), onde foram obtidos o percentual de polimorfismo e a diversidade genética de Nei. Esse valor de diversidade também foi calculado considerando apenas os genótipos diferentes, ou seja, cada genótipo foi contado apenas uma vez. Para a análise da similaridade genética entre os isolados foi construído um dendrograma utilizando o programa NTSYS, versão 2.21 Rohlf (2009), pelo método hierárquico aglomerativo da média aritmética entre pares não ponderados (UPGMA).

As análises acima foram realizadas considerando todos os 90 isolados, já as próximas análises foram realizadas considerando apenas as populações do Pará e Maranhão, que contém um número maior de indivíduos, já que os isolados dos outros estados não formam uma população. A diversidade genotípica foi calculada através do índice de Stoddart & Taylor (G) (Stoddart e Taylor, 1988) com rarefação, ou seja, igualou-se o tamanho de cada população para que se possa compará-las. Para isso foi utilizado o pacote poppr (Kamvar et al., 2014) do software R v3.2.4 (Development Core Team, Vienna). O valor de Θ (Weir e Cockerham's, 1984), que é comparável com Wright's F_{ST} , foi calculado através do programa Multilocus (Mac version 1.21), e revela se há diferenciação entre as populações, variando de 0 (não há diferenciação) a 1 (populações completamente diferentes). O fluxo gênico (Nm) entre as populações do Pará e Maranhão foi estimado pelo programa Pop Gen versão 1.32 (Yeh et al., 1997), sendo $Nm < 1$ um indicativo de baixo fluxo gênico; $Nm = 1$ as populações não divergem e nem convergem, ou seja, os efeitos da deriva são contrabalanceados com os efeitos do fluxo gênico; e $Nm > 1$ sugere um alto nível de fluxo gênico (McDermott e McDonald, 1993). A AMOVA (Análise da variância molecular) foi realizada pelo programa ARLEQUIN 2.0 (Excoffier et al., 2005) para determinar se a variabilidade genética é maior entre ou dentro das populações. Por fim, o desequilíbrio de ligação, que analisa se está ocorrendo acasalamento ao acaso nas populações, foi calculado através do Índice de associação (I_A) no programa Multilocus (Mac version 1.21) com 1000 permutações. A hipótese nula para esse teste é que há associação aleatória entre alelos em diferentes loci, sendo $(I_A) = 0$, estatisticamente. Essa hipótese é rejeitada quando o valor do I_A é estatisticamente maior que zero, ou seja, um indicativo de que a população está se reproduzindo assexuadamente.

2.5 Agressividade dos isolados

Para o estudo da agressividade dos isolados de *C. pteridis* empregaram-se mudas dos clones CLR222 e CLR221, híbridos de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*, empregados no Laboratório de Patologia Florestal/Bioagro/UFV em estudos deste patossistema. Mudanças com 90 dias de idade foram transplantadas para sacos plásticos de 6 L contendo substrato Carolina II (Carolina Soil do Brasil, Santa Cruz do Sul, Brasil), enriquecido com superfosfato simples ($6,0 \text{ kg.m}^{-3}$) e Basacote® (19:06:10 a $1,5 \text{ kg.m}^{-3}$) (Compo Expert, Florianópolis, Brasil). As plantas foram mantidas em casa de vegetação e adubadas quinzenalmente com 100 mL de uma solução de NPK (05:10:30 em 6 gL^{-1}) até alcançar a fase adequada para a inoculação (Graça et al., 2009), aos 60 dias após o transplante.

Dos 90 isolados, 16 foram selecionados com base na origem geográfica e nos resultados das análises moleculares. Os isolados utilizados foram semeados em placas de Petri contendo meio GAA (Glicose-Asparagina-Ágar) e cultivados a $25 \text{ }^\circ\text{C}$, com fotoperíodo de 12 h, por 20 dias.

Após esse período, visando estimular a produção de conídios (Alfenas et al., 2013), as culturas fúngicas foram submetidas a estresse físico por meio da deposição de 20 mL de água destilada e posterior raspagem da superfície da colônia, de modo a remover todo o micélio aéreo presente. A seguir, foram depositados 10 mL de água destilada estéril em cada placa. A cultura permaneceu submersa por dois dias, quando se descartou a água e o excesso de umidade foi removido com auxílio de papel toalha. Em seguida, a cultura foi mantida em condição ambiente ($\pm 25^\circ\text{C}$) por dois dias, quando ocorre a esporulação do patógeno na superfície do meio de cultura.

A suspensão de inóculo foi preparada com adição de 20 mL de água destilada + Tween 20 a 0,05% e posterior remoção dos conídios mediante raspagem com um pincel autoclavado (Alfenas et al., 2013). Após filtrar a suspensão em camada dupla de gaze a concentração de inóculo foi ajustada para 1×10^4 conídios.mL⁻¹ e posteriormente atomizada homoganeamente nas superfícies abaxial e adaxial das folhas das plantas. Para isso, foi utilizado um pulverizador costal modelo FT-16S (Yamaha, Diadema, Brasil) com capacidade de 16 L com bico leque nº 1001 e diâmetro de gotas de 158 μm acoplado a uma válvula de pressão constante de 2 kgf.cm^{-2} na barra de pulverização. Cada isolado foi inoculado separadamente em cinco réplicas clonais de cada um dos clones CLR222 e CLR221. Após a inoculação, as plantas foram mantidas em câmara de nevoeiro por 48 h, com nebulização intermitente a cada 30

min durante 10 seg, a $28^{\circ}\text{C} \pm 2$, sendo posteriormente mantidas em casa de vegetação, em delineamento inteiramente casualizado, onde receberam pulverização intermitente de água a cada 1 h por 2 min. Como testemunha, cinco réplicas de cada clone foram atomizadas com água e mantidas nas mesmas condições.

Previamente à inoculação, contaram-se o número de folhas de quatro ramos marcados no terço basal de cada planta. A avaliação da severidade da doença foi aferida de duas formas: através de uma escala de notas (Damasceno et al., 2014) e pela porcentagem de desfolha.

As notas foram atribuídas para as cinco folhas consideradas mais severamente lesionadas de cada planta e seus valores variaram de 1 a 8 (Figura 1), sendo a nota 1 correspondente à porcentagem de área lesionada em até cerca de 1,84% e a nota 8 em cerca de 83,75%. Dois avaliadores atribuíram as notas separadamente para uma melhor validação dos resultados.

Já o percentual de desfolha foi calculado por meio da contagem do número de folhas remanescentes em relação ao total nos 4 ramos marcados de cada planta, como previamente determinado (Graça et al., 2009).

A atribuição das notas e a avaliação da desfolha foram feitas em intervalos de 7 dias até 35 dias após a inoculação. Os dados de desfolha aos 35 dias após a inoculação foram submetidos à análise de variância e as médias agrupadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Já a comparação entre as notas dos isolados foi realizada aos sete dias da inoculação utilizando-se o teste de Kruskal-Wallis e o teste t para distribuições não paramétricas ao mesmo nível de significância. As análises dos dados foram realizadas pelo software R.

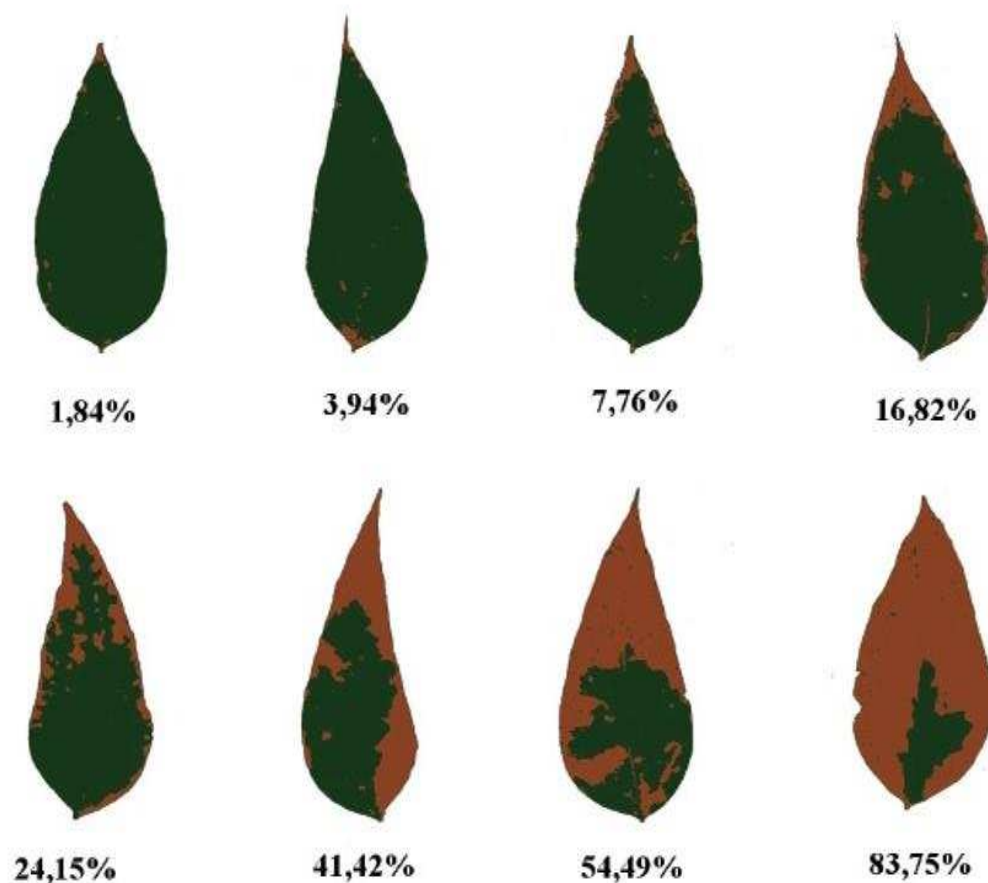


Figura 1. Escala diagramática utilizada para a avaliação da severidade de *Calonectria pteridis* (Damasceno et al., 2014).

3. RESULTADOS

3.1 Marcadores ISSR

Dos 16 *primers* testados, cinco que apresentaram uma boa reprodutibilidade e polimorfismo (Tabela 3) foram selecionados para a caracterização da diversidade genética de *C. pteridis*. Apesar de ter apresentado boa repetibilidade, os resultados do *primer* Omar foram descartados por serem monomórficos (Figura 2).

Tabela 3. *Primers* ISSR selecionados para caracterização da diversidade genética de *Calonectria pteridis*.

<i>Primer</i>	Número de locos obtidos	Número de locos polimórficos	Polimorfismo (%)
Manny	12	05	41,7
UBC807	23	18	78,3
UBC841	08	04	50,0
SSR7	10	06	60,0
UBC835	07	03	42,9
Total	60	36	60,0

O número ótimo para se obter a precisão desejada nas análises de diversidade genética com a espécie em estudo foi a partir de 32 fragmentos, quando o estresse assumiu valor de 0,0431 e a correlação (r) de 0,897 (Figura 3). A partir de 32 fragmentos, a correlação aproximou-se do valor máximo (1,0), o que comprova que o número de fragmentos utilizados neste trabalho foi suficiente para as análises.

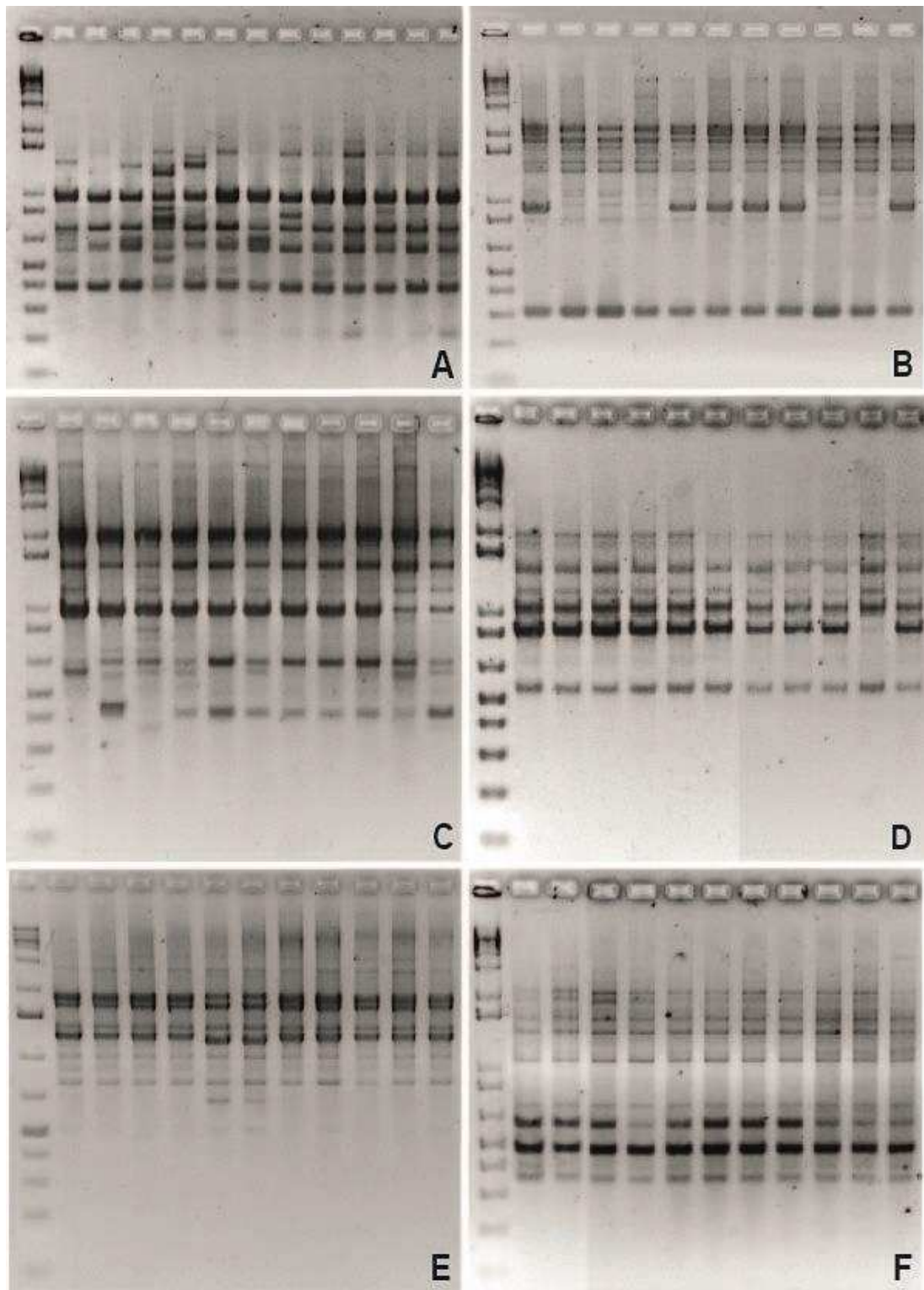


Figura 2. Perfis da amplificação dos marcadores ISSR em géis de agarose de diferentes isolados de *Calonectria pteridis* para os *primers* UBC 807 (A), Manny (B), UBC841 (C), UBC835 (D), SSR7 (E) e Omar (F).

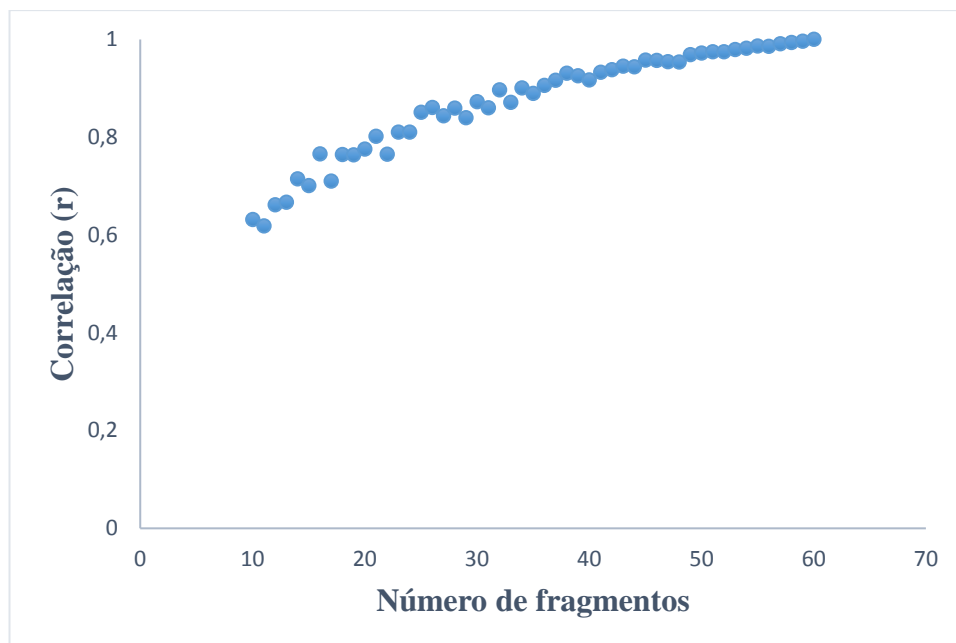


Figura 3. Coeficiente de correlação e número ótimo de fragmentos para estudos de diversidade entre isolados de *Calonectria pteridis* obtidos por marcadores ISSR.

3.2 Análise dos dados

A diversidade gênica de Nei (H) considerando todos os isolados como uma população, foi de apenas 0,048 contando todos os genótipos, e de 0,085 contando somente os genótipos diferentes (Tabela 4). Essa baixa diversidade também foi encontrada para as populações do Pará e Maranhão em conjunto e separadas.

Tabela 4. Estimativas da diversidade genética e número de genótipos encontrados para os isolados de *Calonectria pteridis*.

População	Nº de isolados	Nº de locos	P (%)	H	H ₁	Nº de genótipos	G
Total	90	60	60,00	0,048	0,085	33	
PA	57	55	40,00	0,040	0,081	22	12,42
MA	27	55	30,91	0,055	0,073	12	12
PA + MA	84	55	49,09	0,050	0,080	31	

*P: porcentagem de polimorfismo; H: diversidade gênica de Nei; H₁: diversidade gênica de Nei considerando apenas genótipos diferentes.

Considerando-se os isolados estudados de todos os estados coletados, foram encontrados 33 genótipos diferentes (Tabela 4). Ao se considerar os estados PA + MA foram encontrados 31, pois há genótipos em comum. Como as populações desses estados possuem número de isolados diferentes, a diversidade genotípica foi calculada com rarefação, onde seu valor máximo (quando todos os isolados possuem genótipos diferentes) é igual ao número de isolados da menor população, nesse caso, 27. A diversidade genotípica dos isolados do fungo no Pará e Maranhão foi 12,42 e 12, respectivamente.

Apesar do número relativamente alto de genótipos encontrados, os isolados possuem alta similaridade entre eles, o que explica a baixa diversidade gênica (Figura 4). Os genótipos mais divergentes (G30, G31 e G33) apresentaram acima de 81% de similaridade com os outros isolados, e os demais apresentaram acima de 90% de similaridade. De acordo com essa análise, não houve uma separação geográfica entre os isolados. Alguns genótipos prevaleceram em algumas regiões, como o genótipo 6 no estado do Pará, representado por 29 indivíduos, e também presente no Maranhão (dois isolados) e no Mato Grosso (dois isolados). No Maranhão prevaleceu o genótipo 20 (11 isolados), estando também presente no Pará (dois isolados). Apenas um genótipo (G2) foi comum no Pará, Maranhão e Piauí.

Estes resultados indicam uma migração de genes entre as populações, sendo comprovada pelo valor calculado do fluxo gênico (Nm) entre as populações do Pará e Maranhão, que foi de 3,80. Valores de fluxo gênico quando maiores que 1, indicam um alto nível de fluxo gênico. Além disso, o valor de Theta (Θ) (Weir & Cockerham's, 1984) igual a 0,19, indica uma baixa diferenciação entre as duas populações e os resultados da AMOVA (Tabela 5), indicam que cerca de 80% da variabilidade observada entre os isolados de *C. pteridis* está dentro das populações.

O índice de associação (I_A) mostra que os isolados estão reproduzindo assexuadamente, pois os valores analisando as populações do Pará e Maranhão em conjunto e separadamente foram estatisticamente diferentes de zero, o que explica a baixa variabilidade genética (Tabela 6).

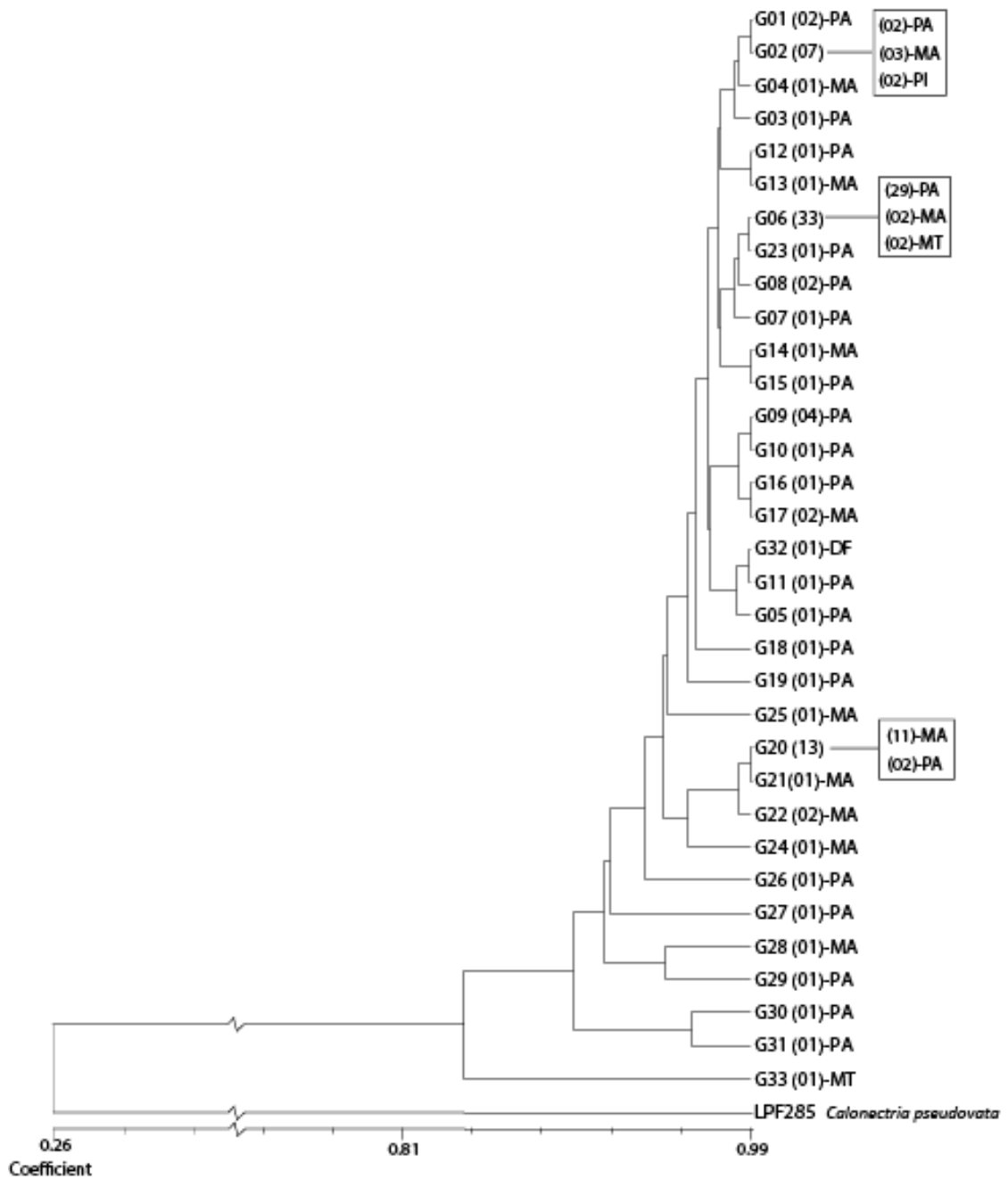


Figura 4. Dendrograma UPGMA representando o coeficiente de similaridade genética entre os 33 genótipos de *Calonectria pteridis* encontrados para os 90 isolados estudados. Os valores entre parêntesis representam o número de isolados com o mesmo genótipo, seguido do estado onde foi encontrado. G: Genótipo; PA: Pará; MA: Maranhão; PI: Piauí; MT: Mato Grosso; e DF: Distrito Federal. O isolado LPF285 de *Calonectria pseudovata* foi utilizado como *outgroup*.

Tabela 5. Análise da variância molecular (AMOVA) das populações de *Calonectria pteridis* em eucalipto nos estados do Pará e Maranhão.

Fonte de variação	G.L	Soma de Quadrados	Componentes da variância	Percentual de variação	p*
Entre populações	1	12,63	0,31015	19,69	<0,001
Dentro de populações	82	103,704	1,26468	80,31	<0,001
Total	83	116,333	1,57483		

* O valor de p é referente a hipótese nula de que não há variação significativa a aquele determinado nível, baseado em 1023 permutações.

Tabela 6. Índice de associação (I_A) das populações de *Calonectria pteridis* em eucalipto nos estados do Pará e Maranhão.

População	N ^a	I_A	Probabilidade ^b
Pará	57	2,27	<0,001
Maranhão	27	1,66	<0,001
Pará e Maranhão	84	1,58	<0,001

^a N: Número de isolados

^b Probabilidade de o índice de associação não diferir de uma população com acasalamento ao acaso.

3.3 Agressividade dos isolados

Observou-se variabilidade em agressividade entre os isolados testados. Não houve interação entre isolados e clones, além de não ter ocorrido diferenças significativas entre as médias de desfolha dos clones (Tabela 7). Isso indica que os dois clones apresentaram o mesmo grau de resistência ou suscetibilidade para os isolados quanto à porcentagem de desfolha, sendo possível comparar, portanto, apenas os isolados (Tabela 8), onde o valor de p foi significativo.

Tabela 7. Análise de variância da desfolha causada por isolados de *Calonectria pteridis* em dois clones de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*.

FV	GL	SQ	QM	Valor F	p
Isolado	16	34.970,445	2.185,653	17,663	<0.001*
Clone	1	360,594	360,594	2,914	0.0903
Isolado:Clone	16	3.385,432	211,590	1,710	0.0528
Resíduo	125	15.467,720	123,742		

* significativo a 5% de probabilidade pelo teste F

Tabela 8. Porcentagem média de desfolha causada por isolados de *Calonectria pteridis* nos clones de eucalipto CLR221 e CLR222 aos 35 dias após a inoculação. Diferenças estatísticas entre as médias de desfolha são representadas pelo teste de Scott-Knott.

Isolado	Estado	Genótipo	Desfolha (%) ^a	Scott-Knott (5%) ^b
LPF294	Pará	G20	65,59	A
GFP004	Mato Grosso	G06	59,12	A
LPF059	Pará	G09	55,44	A
LPF323	Pará	G06	45,80	B
LPF315	Pará	G06	42,62	B
GFP002	Mato Grosso	G33	42,54	B
LPF344	Pará	G06	39,64	B
LPF444	Maranhão	G06	39,64	B
LPF008	Pará	G06	31,45	C
LPF201	Maranhão	G22	30,64	C
LPF183	Maranhão	G02	25,16	D
LPF416	Piauí	G02	23,49	D
LPF173	Maranhão	G20	23,34	D
Testemunha	-	-	23,07	D
LPF338	Pará	G06	20,37	D
LPF457	Pará	G01	16,67	D
LPF436	Pará	G02	13,86	D

^a Média de 10 plantas por isolado (5 de cada clone). Desfolha (%) = relação entre o número de folhas antes e o número de depois da inoculação, em quatro ramos basais da planta.

^b Teste Scott & Knott ($p \leq 0,05$). Médias seguidas pela mesma letra não diferiram estatisticamente entre si.

Os isolados mais agressivos para a desfolha foram LPF294, GFP004 e LPF059. Seis isolados que não diferiram da testemunha, foram considerados não agressivos. A desfolha observada nessas plantas pode ser atribuída principalmente à senescência natural comumente observada em eucalipto (Figura 5). Os demais isolados que induziram de 30,64 – 45,80% de desfolha foram considerados medianamente agressivos.



Figura 5. Intensidade de desfolha causada por diferentes isolados de *Calonectria pteridis* em um clone híbrido de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*. A: LPF294; B: GFP002; C: LPF436; D: Testemunha

Já para a análise da agressividade utilizando-se a escala de notas os dados não seguiram as pressuposições da análise de variância, sendo realizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, separadamente para cada clone, para determinar as diferenças entre os isolados (Tabela 9).

Assim como na desfolha, houve diferença na agressividade dos isolados através da análise pela escala de notas para os avaliadores 1 (Tabela 10) e 2 (Tabela 11).

Tabela 09. Teste de Kruskal-Wallis para as notas atribuídas pelos avaliadores aos sete dias após inoculação para avaliar a severidade da mancha-de-*Calonectria* de diferentes isolados em dois clones de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*.

	Clone	QM	p
Avaliador 1	CLR221	60,6240	0,0000*
	CLR222	79,0006	0,0000*
Avaliador 2	CLR221	59,9118	0,0000*
	CLR222	77,8976	0,0000*

* significativo a 5% de probabilidade

Tabela 10. Mediana das notas atribuídas pelo avaliador 1 para a severidade da área foliar lesionada por diferentes isolados de *Calonectria pteridis* em dois clones de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*. G: Genótipo

Avaliador 1									
Clone CLR222					Clone CLR221				
Isolado	Estado	G	Nota ^a	t ^b	Isolado	Estado	G	Nota ^a	t ^b
GFP004	Mato Grosso	G06	7,4	a	LPF059	Pará	G09	5	a
LPF059	Pará	G09	7	a	GFP004	Mato Grosso	G06	4,4	ab
LPF294	Pará	G20	5,8	a	LPF315	Pará	G06	3,7	ac
LPF315	Pará	G06	5,4	b	LPF294	Pará	G20	3,6	acd
GFP002	Mato Grosso	G33	4,8	b	LPF201	Maranhão	G22	3,5	acd
LPF173	Maranhão	G20	4,4	bc	LPF173	Maranhão	G20	3,4	acd
LPF444	Maranhão	G06	4,2	cd	LPF338	Pará	G06	3,2	bcd
LPF201	Maranhão	G22	4	d	GFP002	Mato Grosso	G33	3,1	ce
LPF323	Pará	G06	4	d	LPF323	Pará	G06	2,8	ce
LPF008	Pará	G06	3,6	de	LPF008	Pará	G06	2,6	de
LPF338	Pará	G06	3,6	ef	LPF457	Pará	G01	1,4	ef
LPF344	Pará	G06	3	fg	LPF344	Pará	G06	1,4	ef
LPF457	Pará	G01	2,4	gh	LPF444	Maranhão	G06	1,3	fg
LPF436	Pará	G02	1,6	hi	LPF436	Pará	G02	1,2	fg
LPF183	Maranhão	G02	1,2	ij	Testesmunha	-	-	1	g
Testemunha	-	-	1	j	LPF416	Piauí	G02	1	g
LPF416	Piauí	G02	1	j	LPF183	Maranhão	G02	1	g

^a Mediana das notas de 5 plantas

^b Teste t ($p \leq 0,05$). Medianas seguidas pela mesma letra não diferiram estatisticamente entre si.

Tabela 11. Mediana das notas atribuídas pelo avaliador 2 para a severidade da área foliar lesionada por diferentes isolados de *Calonectria pteridis* em dois clones de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*. G: Genótipo

Avaliador 2									
Clone CLR222					Clone CLR221				
Isolado	Estado	G	Nota ^a	t ^b	Isolado	Estado	G	Nota ^a	t ^b
GFP004	Mato Grosso	G06	6,6	a	LPF059	Pará	G09	4,4	a
LPF059	Pará	G09	6,2	a	LPF294	Pará	G20	4	ab
LPF294	Pará	G20	6,2	ab	LPF201	Maranhão	G22	3,8	ab
LPF315	Pará	G06	5,4	bc	GFP004	Mato Grosso	G06	3,6	ab
GFP002	Mato Grosso	G33	4,6	cd	LPF315	Pará	G06	3,4	ab
LPF173	Maranhão	G20	4,2	d	LPF173	Maranhão	G20	3,2	ab
LPF444	Maranhão	G06	3,4	e	GFP002	Mato Grosso	G33	2,4	bc
LPF201	Maranhão	G22	3,4	e	LPF323	Pará	G06	2,2	bc
LPF323	Pará	G06	3,2	e	LPF338	Pará	G06	2,1	bcd
LPF008	Pará	G06	3,2	e	LPF008	Pará	G06	2	ce
LPF338	Pará	G06	2,6	f	LPF444	Maranhão	G06	1,1	ce
LPF457	Pará	G01	2	f	LPF457	Pará	G01	1	def
LPF344	Pará	G06	2	fg	LPF344	Pará	G06	1	ef
LPF436	Pará	G02	1,6	gh	Testemunha	-	-	1	f
LPF183	Maranhão	G02	1,2	hi	LPF416	Piauí	G02	1	f
Testemunha	-	-	1	i	LPF183	Maranhão	G02	1	f
LPF416	Piauí	G02	1	i	LPF436	Pará	G02	1	f

^a Mediana das notas de 5 plantas

^b Teste t ($p \leq 0,05$). Medianas seguidas pela mesma letra não diferiram estatisticamente entre si.

Para o clone CLR222, os isolados GFP004, LPF059 e LPF 294 foram os mais agressivos pelas duas avaliações, coincidindo com a análise da desfolha. Já para o clone CLR221, os mais agressivos foram LPF059, GFP004, LPF315, LPF294, LPF201 e LPF173 (Figura 6).

Diferentemente da desfolha, onde o isolado LPF173 foi pouco agressivo e se agrupou com a testemunha, na análise pela escala de notas para o clone CLR221, esse isolado está entre os agressivos (Figura 6). Além disso, esse clone se mostrou mais resistente que o clone CLR222 para a mancha foliar, enquanto para a desfolha obtiveram o mesmo grau de doença.

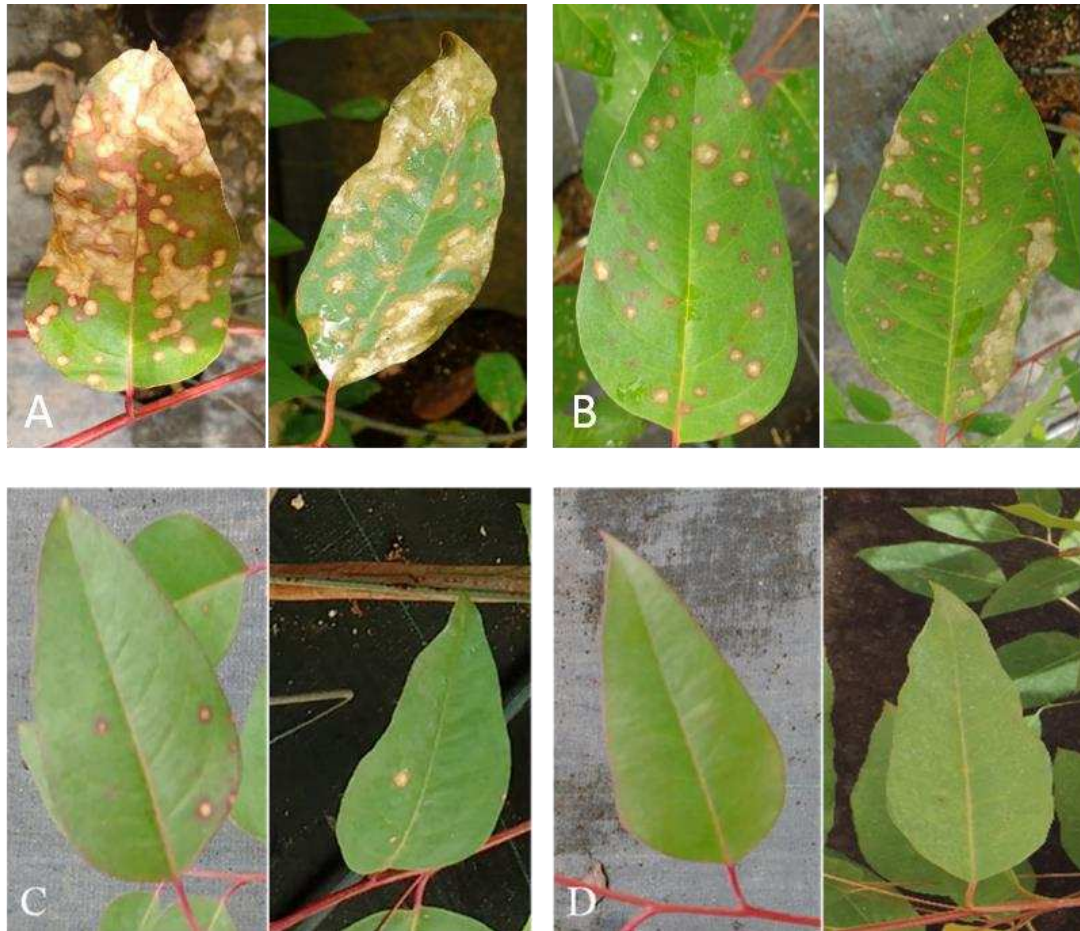


Figura 6. Área foliar lesionada indicando diferentes níveis de agressividade para isolados de *Calonectria pteridis* em dois clones híbridos de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*. A: LPF059; B: LPF173; C: LPF457; D: Testemunha. Folha à direita: CLR221 e folha à esquerda: CLR222.

Houve uma alta correlação (R) entre as notas atribuídas pelos avaliadores 1 e 2 para os dois clones (Figura 7), indicando que a escala utilizada foi apropriada.

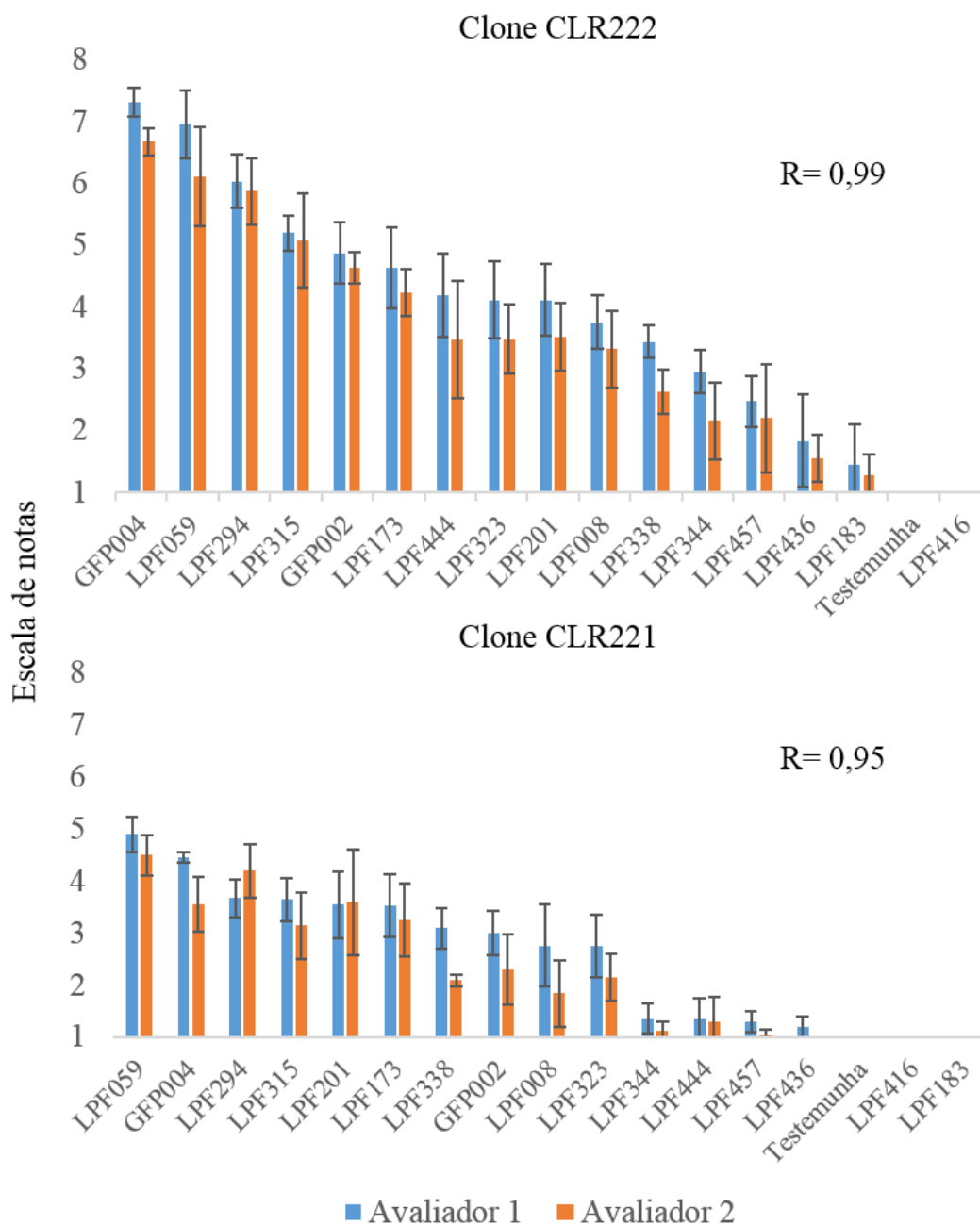


Figura 7. Correlação entre as médias das notas de severidade para cada isolado de *Calonectria pteridis* atribuídas pelos avaliadores 1 e 2 para os clones CLR221 e CLR222.

Para o clone CLR222 houve uma boa correlação (R) entre a avaliação pela escala de notas aos 7 dias pelos dois avaliadores e a avaliação pela desfolha aos 35 dias (Figura 8). Porém o mesmo não ocorreu para o clone CLR221, onde a correlação foi de apenas 0,6 para o avaliador 1 e 0,67 para o avaliador 2.

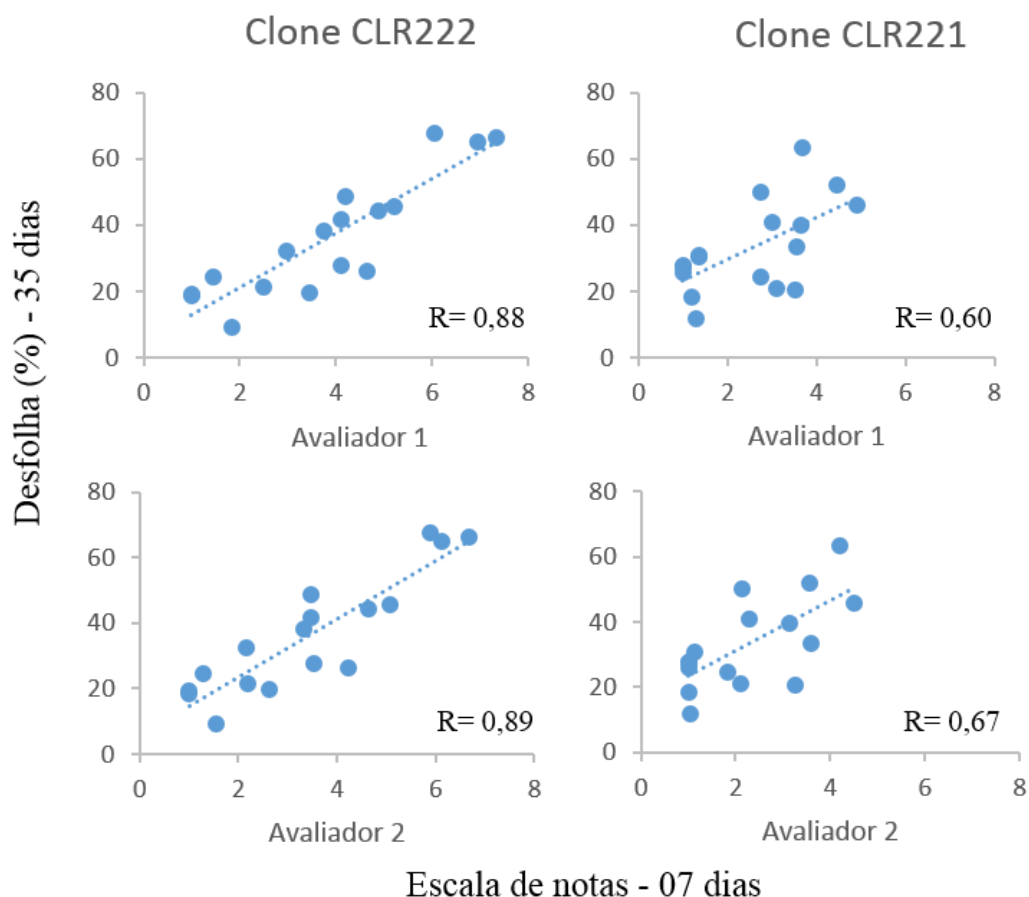


Figura 8. Correlação entre as médias das notas de severidade atribuídas pelos avaliadores 1 e 2 aos 7 dias após a inoculação com *Calonectria pteridis* e a desfolha aos 35 dias após a inoculação para os dois clones avaliados.

Os gráficos de dispersão (Figura 9) mostram que para a avaliação da mancha-de-pteridis a partir da escala de notas o ideal é se fazer aos 7 dias, pois a partir daí, devido à desfolha, as notas tendem a diminuir. Já para a avaliação através da desfolha, percebe-se que ainda não houve uma estabilização desta aos 35 dias, porém a partir daí pode estar ocorrendo mais fortemente o efeito da senescência. A Figura 9 representa apenas o isolado LPF323 e as notas atribuídas pelo avaliador 1, mas todos os outros isolados inoculados e as notas atribuídas pelo avaliador 2 seguiram a mesma tendência.

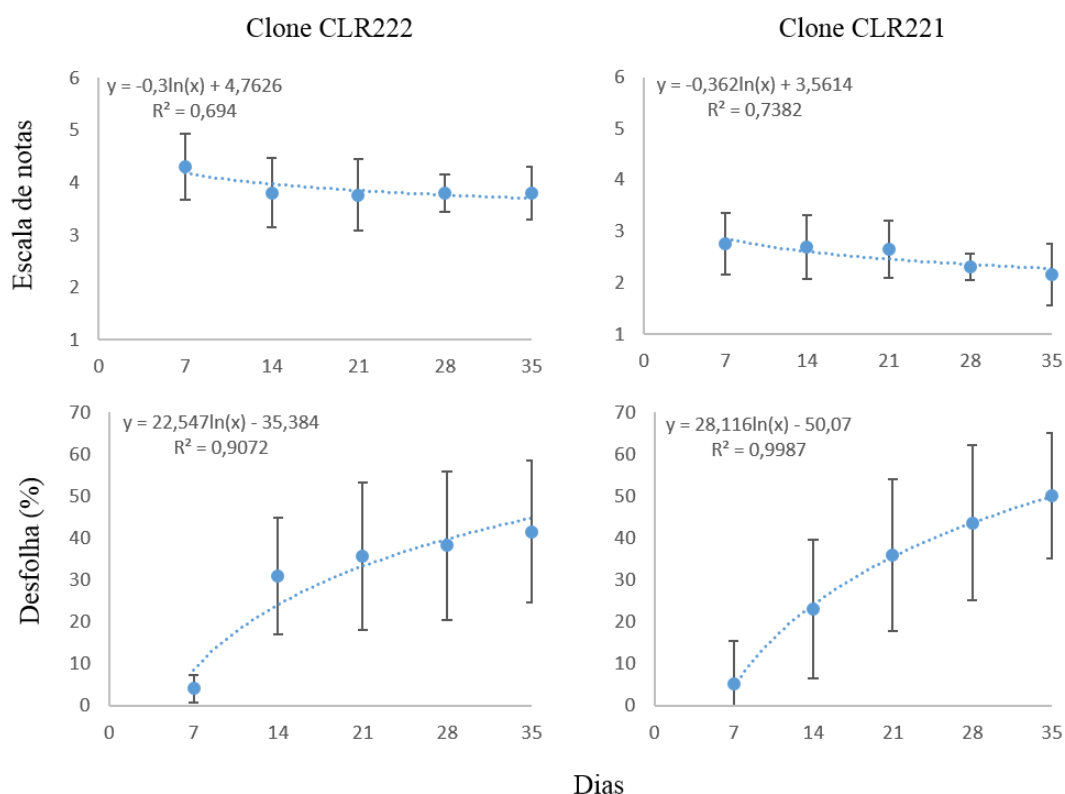


Figura 9. Gráficos de dispersão para o isolado de *Calonectria pteridis* LPF323 para a escala de notas atribuídas pelo avaliador 1 e desfolha, considerando os dois clones avaliados.

4. DISCUSSÃO

Os dados moleculares obtidos neste trabalho sugerem que os isolados de *C. pteridis* no Brasil formam uma população com baixa diversidade genética. Esses resultados podem ser explicados pelas evidências de que este fungo tem predominantemente reprodução assexuada, indicada pelo valor do índice de associação, que é a fase mais comumente encontrada na natureza para o gênero *Calonectria* (Crous, 2002). Wright et al. (2010) utilizando marcadores SSR, encontraram valores de diversidade genética semelhantes para populações de *Calonectria ilicicola* Boedijn e Reitsma (= *Cylindrocladium parasiticum*) causando doença em *Arachis hypogaea* L. nos Estados Unidos, variando de 0,054 a 0,094, considerando-as altamente clonais.

Os isolados não agruparam por região geográfica. Ainda assim, formaram-se dois grupos maiores, um com a maioria dos isolados do Pará (genótipo 6), e o outro

com a maioria do Maranhão (genótipo 20). Mohanty et al. (2012) apresentaram resultados semelhantes, onde foi utilizada a técnica de RAPD-PCR para identificar populações de *Calonectria quinqueseptata* Figueiredo e Namek (= *Cylindrocladium quinqueseptatum*) no norte da Índia. Neste trabalho, apesar de ter sido encontrada uma separação geográfica entre isolados um pouco mais evidente, ainda assim agruparam-se isolados de diferentes estados dentro de uma mesma população. Os autores sugeriram que isso pode ser devido à disseminação de esporos do fungo pelo vento ou por meio de material vegetativo infectado.

Assim como para os isolados de *C. quinqueseptata* no norte da Índia, o vento pode ter sido importante para o fluxo gênico de *C. pteridis* no Brasil. Além disso, as condições climáticas e a presença de hospedeiros suscetíveis em todo o território nacional podem ter favorecido a disseminação do fungo (Ferreira et al., 1995). *C. pteridis* é um patógeno de solo, sendo capaz de viver em condições saprofíticas (Crous, 2002), porém ainda é incerto se o patógeno é nativo ou se foi introduzido durante o estabelecimento das plantações de eucalipto no Brasil.

O valor de Theta ($\Theta = 0,19$) indicou que houve uma pequena diferença entre as populações do Pará e Maranhão, que podem estar em um início de processo de diferenciação, entretanto, devido à alta similaridade entre os indivíduos mesmo em estados diferentes e o fato da maior porcentagem da variabilidade estar dentro da população, acredita-se que os isolados de *C. pteridis* ainda constituem apenas uma única população. O ideal seria coletar mais isolados de outros estados e, assim, formar outras populações, para confirmar essa hipótese. Ferreira et al. (2010) utilizaram valores de Θ acima de 0,5 para considerar que duas populações de *Ceratocystis fimbriata* Ellis e Halsted eram significativamente diferentes, bem acima do valor encontrado neste estudo.

Este trabalho representa o primeiro estudo utilizando-se marcadores ISSR para *C. pteridis* em eucalipto no Brasil. Apesar de serem marcadores dominantes e oferecerem uma menor quantidade de informação, a análise da variabilidade genética é compensada por acessarem um grande número de locos do genoma (Nybom 2004; Cavers et al. 2005; Kremer et al. 2005). Além disso, esses marcadores genéticos são muito úteis em trabalhos iniciais, quando há carência de informações genéticas do patógeno (Ng & Tan, 2015). A eficiência dos marcadores ISSR utilizadas neste trabalho é confirmada pelo cálculo do número mínimo de fragmentos necessários, que foi menor que o número utilizado, e por ter diferenciado o isolado de *C. pseudovata*

R.F. Alfenas, L. Lombard, Crous e A.C. Alfenas, que é do mesmo complexo de espécies que *C. pteridis*.

Não houve, também, uma correlação entre diversidade genética e variabilidade fisiológica entre os isolados estudados. Mesmo isolados geneticamente similares diferiram em agressividade. Isso se deve ao fato de que os microssatélites devem ser mais abundantes em regiões não codificantes, sendo seletivamente neutros (Kojima et al., 1998). Mesmo dentro de uma linhagem clonal, diferentes patótipos podem surgir, pois a patogenicidade pode evoluir rapidamente e independentemente dos marcadores moleculares, logo, sem um teste de patogenicidade ou agressividade não é possível inferir sobre essas características fisiológicas (Goodwin et al., 1995). Estes autores encontraram diferenças na patogenicidade de *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary em batata e tomate em indivíduos como o mesmo genótipo, assim como foi encontrada diferenças na agressividade de isolados de *C. pteridis* em um mesmo genótipo neste estudo. Oliveira et al. (2016) também não encontraram relação entre agressividade e diversidade genética para isolados de *C. fimbriata* oriundos de mangueira utilizando marcadores microssatélites.

A agressividade dos isolados também não se correlacionou com a região geográfica. Indivíduos do Pará e Maranhão variaram entre os mais e menos agressivos, mesmo tendo sido coletados no mesmo plantio. Oliveira et al. (2015) também encontraram que dois isolados de *C. fimbriata* obtidos de um mesmo clone diferiram em agressividade e capacidade de infectar diferentes clones, sendo que um dos isolados infectou apenas o clone do qual foi coletado. Os autores sugeriram que a agressividade de *C. fimbriata* varia de acordo com o isolado, independentemente da região geográfica e do material genético de onde é obtido.

Os isolados de *C. pteridis* apresentaram alta variabilidade quanto à agressividade em dois clones de eucalipto testados. Assim como para *C. fimbriata* (Oliveira et al., 2015), essa informação é útil na seleção de plantas resistentes à mancha-de-pteridis, já que é recomendável o uso de isolados mais agressivos e que infectam um maior número possível de clones. Baseado em observações de campo, o clone CLR221, até então era considerado resistente à mancha-de-pteridis. No entanto, ele foi tão suscetível à desfolha quanto o clone CLR222 aos isolados mais agressivos encontrados neste estudo. Logo, o conhecimento da agressividade de isolados utilizados na avaliação de resistência à doença é fundamental para evitar a seleção de clones suscetíveis.

Neste trabalho a agressividade foi avaliada por meio da desfolha aos 35 dias pelo método de Graça et al. (2009) e pela escala de notas desenvolvida por Damasceno et al. (2014) aos sete dias. A expectativa era de que se houvesse uma correlação entre os dois resultados, o uso da escala de notas seria uma alternativa mais prática e rápida de avaliação. Para o clone CLR222 essa correlação foi alta, porém, para o clone CLR221 a correlação foi baixa, pois, para alguns isolados o clone apresentou uma desfolha relativamente alta mesmo com uma nota mais baixa. A avaliação da doença por meio da escala de notas confirmou os resultados de campo quanto a resistência do clone CLR221 à mancha-de-pteridis, diferentemente da análise da desfolha. O efeito da senescência natural pode ter interferido no resultado do percentual de desfolha e ter sido a causa do clone CLR 221 não ter se diferenciado quanto a esse aspecto do clone suscetível CLR 222. Logo, a avaliação da área foliar lesionada através de uma escala de notas pode ser uma forma mais confiável e prática para avaliação da severidade da doença.

5. CONCLUSÕES GERAIS

Os resultados deste trabalho permitem concluir que:

- 1- Os marcadores ISSR são eficientes para caracterizar a diversidade genética das populações de *Calonectria pteridis*;
- 2- As análises moleculares indicam que os isolados de *C. pteridis* formam uma população clonal;
- 3- Não há uma relação entre variabilidade genética e fisiológica quanto à agressividade do fungo;
- 4- Há diferenças em agressividade entre isolados de *C. pteridis* quando inoculados em diferentes clones de eucalipto.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agrofit - Sistema de agrotóxicos fitossanitários. Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons.> Acesso em: 11 ago. 2016.

Alfenas AC, Zauza EA, Mafia RG, Assis TF (2009) Clonagem e doenças do eucalipto. 2ª Ed. Editora UFV. Viçosa, MG. 500p.

Alfenas AC, Ferreira MA, Alfenas RF (2011) Impacts of emerging diseases and their control in the cultivation of eucalyptus. In: II Brazilian Forestry. Campinas, SP. Proceedings of the II Brazilian Forestry. Piracicaba: PTSM / IPEF / ESALQ / FUPEF. 2: 115-127.

Alfenas RF, Pereira OL, Freitas RG, Freitas CS, Dita MA, Alfenas AC (2013) Mass spore production and inoculation of *Calonectria pteridis* on *Eucalyptus* spp. under different environmental conditions. *Tropical Plant Pathology*, 38(5): 406-413.

Alfenas RF, Lombard L, Pereira OL, Alfenas AC, Crous PW (2015) Diversity and potential impact of *Calonectria* species in *Eucalyptus* plantations in Brazil. *Studies in Mycology* 80: 89-130.

Bruton BD (1998) Soilborne diseases in cucurbitaceae: pathogen virulence and host resistance. *International Society of Horticultural Science*. 143-166.

Cavers S, Degen B, Caron H, Lemes MR, Margis R, Salgueiro F, Lowe AJ (2005) Optimal sampling strategy for estimation of spatial genetic structure in tree populations. *Heredity* 95: 281–289.

Chen F, Goodwin PH, Khan A, Hsiang T (2002) Population structure and mating-type genes of *Colletotrichum graminicola* from *Agrostis palustris*. *Can. J. Microbiol* 48: 427-436.

Chiron GR, Oliveira PR, Santos TM, Bellvert F, Bertrand C, Berg C. van den. (2009) Phylogeny and evolution of *Baptistonia* (Orchidaceae, Oncidiinae) based on molecular

analyses, morphology and floral oil evidences. *Plant Systematics and Evolution* 281(1): 35-49.

Cruz CD (2013) Genes - a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. *Acta Scientiarum*. 35: 271-276.

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

Damasceno VFF, Furtado EL, Ferreira Filho PJ (2014) Comparação de dois métodos de elaboração e validação de escala diagramática para a quantificação da severidade da mancha-de-*Cylindrocladium* em eucalipto. *Summa Phytopathologica* 40(3): 248-255.

Dhoro M (2010) Identification and differentiation of fusarium species using selected molecular methods. Zimbabwe, 2010. 101p. Dissertação (Mestrado em Filosofia) - University of Zimbabwe.

Excoffier L, Laval G, Schneider S (2005) Arlequin ver. 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1: 47-50.

Ferreira FA, Alfenas AC, Moreira AM, Demuner NL (1995) Mancha-de-pteridis: doença foliar de eucalipto em áreas tropicais brasileiras. *Fitopatologia brasileira* 20: 107-110.

Ferreira EM, Harrington TC, Thorpe DJ, Alfenas A C (2010) Genetic diversity and interfertility among highly differentiated populations of *Ceratocystis fimbriata* in Brazil. *Plant Pathology* 59:721-735.

Fonseca SM, Resende MDV, Alfenas AC, Guimarães LMS, Assis TF, Grattapaglia D (2010) Manual Prático de Melhoramento Genético do Eucalipto. Editora UFV. Viçosa, 200p.

Goodwin SB, Sujkowski LS, Fry WE (1995) Rapid evolution of pathogenicity within clonal lineages of the potato late blight disease fungus. *Phytopathology* 85: 669-676.

- Godwin ID, Aitken EAB, Smith LW (1997) Application of inter-simple sequence repeat (ISSR) markers to plant genetics. *Electrophoresis* 18: 1524-1528.
- Graça RN, Alfenas AC, Maffia LA, Titon M, Alfenas RF, Lau D, Rocabado JMA (2009) Factors influencing infection of eucalypts by *Cylindrocladium pteridis*. *Plant Pathology* 58 (5): 971-981.
- Ibá - Indústria Brasileira de Árvores. Anuário Estatístico da Indústria Brasileira de Árvores: ano base 2014. Brasília, DF: IBA, 2015. 80p. Disponível em: <http://iba.org/images/shared/iba_2015.pdf>. Acesso em: 10 jul. 2016.
- Kamvar ZN, Tabima JF, Grünwald NJ (2014) Poppr: an R package for genetic analysis of populations with clonal, partially clonal, and/or sexual reproduction. *PeerJ* e281.
- Kapital B, Feyissa T, Petros Y, Mohammed S (2015) Molecular diversity study of black cumin (*Nigella sativa* L.) from Ethiopia as revealed by inter simple sequence repeat (ISSR) markers. *African Journal of Biotchnology* 14(18): 1543-1551.
- Kojima T, Nagaoka T, Noda K, Ogihara Y (1998) Genetic linkage map of ISSR and RAPD markers in Einkorn wheat in relation to that of RFLP markers. *Theor Appl Genet* 96: 37–45.
- Kremer A, Caron H, Cavers S, Colpaert N, Gheysen G, Gribel R, Lemes M, Lowe AJ, Margis R, Navarro C, Salgueiro F (2005) Monitoring genetic diversity in tropical trees with multilocus dominant markers. *Heredity* 95: 274–280.
- Kruskal JB (1964) Multidimensional scaling by optimizing goodness of fit to a nonmetric hypothesis. *Psychometrika* 29(1): 1-27.
- Li J, Dong M (2009) Fine-scale clonal structure and diversity of invasive plant *Mikania micrantha* H.B.K. and its plant parasite *Cuscuta campestris* Yunker. *Biol Invasions* 11(3): 687–695.
- Lu G, Cannon PF, Reid A, Simmons CM (2004) Diversity and molecular relationships of endophytic *Colletotrichum* isolates from the Iwokrama Forest Reserve, Guyana. *Mycol. Res.* 108: 53-63.

- Mc Dermott JM, Mc Donald BA (1993) Gene flow in plant pathosystems. *Annu. Rev. Phytopathol* 31: 353-373.
- Mc Donald BA, Linde C (2002) Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. *Annual Review of Phytopathology* 40: 349-379.
- Meng X, Chen W (2001) Applications of AFLP and ISSR techniques in detecting genetic diversity in the soybean brown stem rot pathogen *Phialophora gregata*. *Mycol. Res.* 105: 936-940.
- Mora AL, Garcia CH (2000) A cultura do eucalipto no Brasil. São Paulo: SBS, 112p.
- Mohanty PS, Pandey A, Arya P, Harsh NSK (2012) Molecular variability in north Indian isolates of *Cylindrocladium quinquiseptatum* causing eucalyptus leaf and seedling blight. *Indian J. Microbiol* 52(2):131–136.
- Ng, WL, Tan SG (2015) Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) Markers: are we doing it right? *ASM Sci. J* 9(1): 30–39.
- Nybom H (2004) Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. *Molecular Ecology* 13(5): 1143–1155.
- Oliveira LSS, Guimarães LMS, Ferreira MA, Nunes AS, Pimenta LVA, Alfenas AC (2015). Aggressiveness, cultural characteristics and genetic variation of *Ceratocystis fimbriata* on *Eucalyptus* spp.. *Forest Pathology* 45(6): 505-514.
- Oliveira LSS, Damacena MB, Guimarães LMS, Siqueira DL, Alfenas AC (2016) *Ceratocystis fimbriata* isolates on *Mangifera indica* have different levels of aggressiveness. *Eur J Plant Pathol* 145(4): 847-856
- Rampersad SN (2013) Genetic structure of *Colletotrichum gloeosporioides* sensu lato isolates infecting papaya inferred by multilocus ISSR markers. *Phytopathology* 103: 182-189.
- Rohlf FJ (2009) NTSYSpc: Numeral taxonomy system. Ver. 2.21 Exeter Software Stauket, New York.

Stoddart JA, Taylor JF (1988) Genotypic diversity: Estimation and prediction in samples. *Genetics* 118: 705-711.

Weir BS, Cockerham CC (1984) Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38: 1358-70.

Wolf FA (1926) Brown leaf spot of leather leaf fern. *J. Elisha Mitchell Sci. Soc.* 42: 55-62.

Wolfe AD, Liston A (1998) Contributions of PCR-based methods to plant systematics and evolutionary biology 43-86 in: *Plant Molecular Systematics II*. D. E. Soltis, P. S. Soltis, and J. J. Doyle, eds. Kluwer Academic Press, Dordrecht, The Netherlands.

Wright, LP, Davis AJ, Wingfield BD, Crous PW, Brenneman T, Wingfield MJ (2010) Population structure of *Cylindrocladium parasiticum* infecting peanuts (*Arachis hypogaea*) in Georgia, USA. *Eur J Plant Pathol.* 127(2): 199-206.

Yeh FC, Yang RC, Boyle TBJ, Ye ZH, Mao JX (1997) POPGENE, the User-friendly Shareware for Population Genetic Analysis. *Molecular Biology and Biotechnology Centre*. University of Alberta, Edmonton, Alberta, Canada.

Zhou S, Smith DR, Stanosz GR (2001) Differentiation of Botryosphaeria species and related anamorphic fungi using inter simple or short sequence repeat (ISSR) fingerprinting. *Mycol. Res.* 105(8): 919-926.

Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D (1994) Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 20: 176-183.