



THAISSA DE PAULA FARIAS DOS SANTOS

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, FILOGENÉTICA E
PATOGENICA DE *Chrysoporthe* spp. ASSOCIADO AO CANCRO EM
Eucalyptus spp. E *Tibouchina* spp.**

LAVRAS – MG

2015

THAISSA DE PAULA FARIAS DOS SANTOS

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, FILOGENÉTICA E
PATOGENICA DE *Chrysosporthe* spp. ASSOCIADO AO CANCRO EM
Eucalyptus spp. E *Tibouchina* spp.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitopatologia, área de concentração em Fitopatologia, para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora

Dra. Maria Alves Ferreira

**LAVRAS - MG
2015**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Santos, Thaissa de Paula Farias dos.

Caracterização morfológica, filogenética e patogênica de *Chrysoporthe* spp. associado ao cancro em *Eucalyptus* spp. e *Tibouchina* spp. / Thaissa de Paula Farias dos Santos. – Lavras : UFLA, 2017.
59 p. : il.

Dissertação (mestrado acadêmico)–Universidade Federal de Lavras, 2015.

Orientador(a): Maria Alves Ferreira.

Bibliografia.

1. *Chrysoporthe cubensis*. 2. *Chrysoporthe doradensis*. 3. Clones de eucalipto. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

Aos meus pais, João e Sandra, e aos meus irmãos, Thiago e Thamiris,
pelo amor e apoio incondicional.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, a quem devo toda a minha gratidão e reverência por estar presente em cada início e fim dos meus planos;

À Universidade Federal de Lavras, em especial aos funcionários, professores e estudantes;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos;

À professora Maria Alves Ferreira, a quem devo minha admiração e respeito, pela orientação, colaboração, paciência, e principalmente pela amizade e dedicação empregadas durante todo o processo.

A todos os professores e técnicos da Universidade Federal de Lavras que contribuíram direta e indiretamente na realização desse projeto.

A toda minha família, em especial, meus pais e irmãos, pelo amor, apoio e motivação que me faz sentir capaz de tornar todos os meus sonhos em realidade.

Aos membros do laboratório de Nematologia e Patologia Florestal, em especial a Aline, Arinaldo, Eduardo, Ariana, Nathália, pela amizade, carinho, pelos sorrisos e momentos de descontração que me proporcionaram nestes dois anos.

Aos amigos e colegas de laboratório, Fernanda, Elaine, Luiz Henrique, Gizeli, Lívia, Renata, Luíza e Noemi, por todo apoio e ajuda, que perto ou distante, tornam meus dias mais alegres.

A todos, que de alguma maneira, tornaram possível a realização deste trabalho!

RESUMO

Espécies de *Chrysoporthe* sp. são conhecidas como patógeno do cancro em plantações comerciais de *Eucalyptus* spp. e outros hospedeiros da família Myrtaceae e Melastomataceae. Causam cancro em troncos de árvores, reduzindo seu crescimento, levando a ruptura das hastes, podendo provocar a morte da planta. Neste trabalho foi investigado se outras espécies ou linhagens filogenéticas ocorriam no Brasil, além de *C. cubensis*. Testes de patogenicidade e de inoculação cruzada foram conduzidos para avaliar a resistência de 10 clones de eucalipto ao patógeno sendo avaliado também a especificidade do fungo por hospedeiro. Vinte isolados foram submetidos a análises multilocus utilizando a região ITS e os genes da beta-tubulina e actina. A análise filogenética de Máxima Parcimônia e Inferência Bayesiana de sequências combinadas das três regiões estudadas agruparam os isolados avaliados em três grupos distintos. Isolados pertencentes ao grupo 1, coletados em São João Del Rei e Tiradentes, MG, formaram um clado distinto e não agruparam com qualquer espécie de *Chrysoporthe* relatadas na literatura. A caracterização morfológica destes isolados revelou se tratar de uma nova espécie que ocorre no Brasil, devido às diferenças no tamanho de conídios e conidióforos. Isolados pertencentes ao grupo 2 agruparam com *C. doradensis*, espécie cuja ocorrência no país ainda não havia sido relatada até o presente estudo. Este resultado foi concernente com os aqueles obtidos pela avaliação morfológica, uma vez que apresentaram dimensões dos caracteres morfológicos avaliados equivalentes àqueles descritos para *C. doradensis*. Isolados do grupo 3 agruparam com *C. cubensis* e sua classificação foi confirmada pela caracterização morfológica. Os testes de patogenicidade conduzidos em quaresmeira e eucalipto demonstraram que não há especificidade do patógeno ao hospedeiro. Os clones de eucalipto testados foram classificados em quatro grupos de resistência e observou-se que o isolado de *C. cubensis* foi mais agressivo que o isolado de *C. dorandensis* testado. Estes resultados contribuirão para o conhecimento das espécies de *Chrysoporthe* que ocorrem no Brasil e sua virulência aos hospedeiros presentes no país. Os programas de melhoramento que buscam a resistência de eucalipto ao patógeno poderão se beneficiar desse conhecimento sobre a verdadeira diversidade do patógeno no país.

Palavras-chave: *Chrysoporthe cubensis*. *Chrysoporthe doradensis*. Clones de eucalipto.

ABSTRACT

Chrysosporthe spp. are known as canker of the pathogen in commercial plantations of *Eucalyptus* spp. and other hosts of Myrtaceae and Melastomataceae family. Cause canker in tree trunks, reducing their growth, leading to rupture of rods and even death of the plant. This work investigated whether other species or phylogenetic lineages of *Chrysosporthe* occurred in Brazil, besides of *C. cubensis*. Pathogenicity tests and cross inoculation were conducted to evaluate the resistance of 10 *Eucalyptus* clones and whether a pathogen specificity for the fungus host. Twenty isolates were submitted to analysis of molecular phylogeny of three gene regions: ITS, beta-tubulin and actin. Phylogenetic analysis Maximum parsimony and Bayesian inference sequences combined the three regions studied grouped the tested isolates into three groups. Isolates belonging to group 1, collected in Sao Joao del Rei and Tiradentes, MG, formed a distinct clade and not grouped with any species of *Chrysosporthe* reported in the literature. The morphological characterization of these isolates revealed that it is a new species that occurs in Brazil, due to differences in spore size, conidiophores. Isolates belonging to group 2 grouped with *C. doradensis*, species occurring in the country had not been reported until this study. This result was concerned with those obtained by morphological evaluation, as presented dimensions of equivalents tested morphological characters to those described for *C. doradensis*. Group 3 isolates clustered with *C. cubensis* and their classification was confirmed by morphological characterization. Pathogenicity tests conducted in quaresmeira and eucalyptus have shown no specificity of the pathogen to the host. The eucalyptus clones tested were classified into 4 groups and resistance was observed that the isolate of *C. cubensis* was more virulent than the isolated *C. dorandensis* tested. These results contribute to the knowledge of species *Chrysosporthe* occurring in Brazil and its virulence to present hosts in the country. Breeding programs that seek after the pathogen eucalyptus resistance will benefit from this knowledge about the true diversity of the pathogen in the country.

Key words: *Chrysosporthe cubensis*. *Chrysosporthe doradensis*. *Eucalyptus clones*.

SUMÁRIO

RESUMO.....	6
ABSTRACT	7
1 INTRODUÇÃO	8
2 REFERÊNCIAL TEÓRICO	10
2.1 Revisão taxonômica de <i>Chrysosporthe</i>	10
2.2 Importância de <i>Chrysosporthe</i>	12
2.3 Controle	13
3 MATERIAL E MÉTODOS	15
3.1 Obtenção e preservação de isolados de <i>Chrysosporthe</i>	15
3.2 Extração de DNA.....	15
3.2 Amplificação e purificação dos fragmentos	16
3.3. Sequenciamento de DNA e análises filogenéticas.....	17
3.3 Patogenicidade	19
3.3.1 Preparo das mudas, inóculo e inoculação	19
3.3.2 Resistência de clones de eucalipto.....	20
3.3.3 Análises estatísticas	21
4 RESULTADOS	22
4.1 Obtenção dos isolados	22
4.2 Análises filogenéticas	22
4.3 Caracterização morfológica	31
4.4 Patogenicidade	35
4.4.1 Inoculação cruzada	35
4.4.2 Resistência de clones de eucalipto.....	37
4.4.2.1. Avaliação da área abaixo da curva de progresso da doença	38
4.4.2.2. Avaliação da área da lesão interna.....	40
4.4.2.3 Correlação lesão externa x interna... Erro! Indicador não definido.	
5 DISCUSSÃO	42
6 CONCLUSÕES	46
ANEXOS	47

1 INTRODUÇÃO

O fungo *Chrysosporthe cubensis*, patógeno do cancro em *Eucalyptus* spp., ameaça plantações comerciais em diversos países por causar danos em troncos de árvores, que podem levar a quebra e à morte de plantas (Hodges et al. 1976, 1979, Sharma et al. 1985). Há também relatos de sua ocorrência em outros hospedeiros, como *Tibouchina granulosa* e *Marlierea edulis* (Seixas et al., 2004; Baretto et al., 2006). O patógeno possui importância na arborização urbana, por atacar *T. granulosa*, uma importante espécie utilizada em projetos de paisagismo. O fungo ocorre em países da América Central e do Sul, África Central, Sudeste da África e Austrália (Gryzenhout et al., 2004; Nakabonge et al., 2006; Roux et al., 2005).

Até 2004, a posição taxonômica do patógeno era confusa e imprecisa e, diversas vezes, foi transferido para táxons distintos, devido à classificação errônea baseada apenas em características morfológicas. Estudos recentes envolvendo a análise de sequências da região ITS e o gene beta-tubulina, confirmaram que este fungo é filogeneticamente distante de espécies do gênero *Cryphonectria* (Myburg et al., 2004), como foi classificado anteriormente. Gryzenhout et al, (2004) descreveu o novo gênero *Chrysosporthe* reclassificando-o como *Chrysosporthe cubensis*, em substituição a *Cryphonectria cubensis*. No entanto, são poucos os estudos no Brasil sobre as espécies que ocorrem em eucalipto e outras espécies arbóreas.

O Brasil foi o primeiro país a utilizar a propagação vegetativa de árvores resistentes a *Chrysosporthe* (Wingfield, 2003; Alfenas et al., 2009). Por demonstrar ser um método de controle efetivo e econômico a este patógeno em *Eucalyptus* spp., programas de seleção e criação de progênies resistentes vêm

sendo realizadas por companhias florestais em diversos países. (Alfenas et al., 2009; Sharma et al., 1985; Van Heerden e Wingfield, 2002; Wingfield, 2003; Van Herrden et al., 2005).

Frente a isso, a caracterização molecular de *Chrysosporthe* pode demonstrar quais linhagens são patogênicas e verificar se as linhagens que causam cancro em *T. granulosa* são as mesmas que levam a morte plantas de *Eucalyptus* spp. Nesse sentido, os principais objetivos do presente estudo foram identificar as espécies de *Chrysosporthe* que ocorrem em eucalipto e quaresmeira; estudar a patogenicidade e agressividade dos isolados de hospedeiros distintos e verificar os níveis de diferentes clones de *Eucalyptus*.

2 REFERÊNCIAL TEÓRICO

2.1 Revisão taxonômica de *Chrysoporthe*

A posição taxonômica de *Chrysoporthe cubensis* foi problemática desde a sua descoberta, em 1917, sendo que, somente em 2004, a espécie foi acomodada dentro do gênero *Chrysoporthe* (Gryzenhout et al., 2004). O fungo foi, originalmente, descrito como *Diaporthe cubensis* Bruner (Bruner, 1917), mas foi transferido para *Cryphonectria* devido às características culturais e morfológicas que se assemelhavam aos deste gênero (Hodges, 1980). Entretanto, estudos moleculares baseados nas sequências dos genes LSU e SSU mostraram claramente que *C. cubensis* era distante, filogeneticamente, de outras espécies do gênero *Cryphonectria* (Zhang e Blackwell 2001, Castlebury et al. 2002).

Dados de sequências mais variáveis, como dos genes ITS e beta-tubulina, confirmaram que *C. cubensis* era mesmo filogeneticamente distinto de *Cryphonectria* (Myburg et al. 2004) e o que antes era chamado de *Cryphonectria cubensis* foi recolocado em dois novos gêneros, *Chrysoporthe* e *Chrysoporthella* e três novas espécies foram descritas: *Chrysoporthe cubensis*, *Chrysoporthe austroafricana*, originária da África do Sul e *Chrysoporthella hodgesiana*, isolada de *Tibouchina* spp., na Colômbia.

Muitas vezes, *Chrysoporthella hodgesiana* e *Chrysoporthe cubensis* podem ser confundidos por dividirem hospedeiros em comum, como *Miconia* spp. e *Tibouchina* spp. (Rodas et al., 2005). Trabalhos posteriores, baseados em diferenças morfológicas e em sequências de regiões genômicas, levaram a descrição de mais três espécies dentro do que antes era denominado *Cryphonectria cubensis*, sendo elas *Chrysoporthe doradensis*, *Chrysoporthe inopina* e *Chrysoporthe deuterocubensis* (Gryzenhout et al., 2005; Gryzenhout

et al., 2006, van der Merwe et al., 2010) A descrição das espécies *C. doradensis* e *C. inopina* pode ser suportada por características morfológicas que são claramente distintas de *C. cubensis* (Gryzenhout et al., 2005, Gryzenhout et al., 2006). Todavia, *C. cubensis* e *C. deuterocubensis* são praticamente indistinguíveis morfológicamente (Gryzenhout et al., 2004) portanto, o reconhecimento destes dois taxa como espécies distintas foi suportado por análises filogenéticas de sequências de quatro regiões genicas variáveis. Aqueles que residiram no clado do Sudeste Asiático representaram a nova espécie *Chrysosporthe deuterocubensis* e o clado sul americano representou *C. cubensis* (Van der Merwe et al., 2010).

A segregação de *C. cubensis* em várias espécies tem importantes implicações de quarentena. Antes, estes fungos foram previamente considerados como uma única espécie que causava cancro em *Eucalyptus* spp. (Gryzenhout et al. 2004, 2009), e atualmente, engloba seis espécies, com intervalos geográficos que não se sobrepõem. A patogenicidade de *C. cubensis* foi estabelecida em ensaios de inoculação em *Eucalyptus* spp. (Boerboom e Maas, 1970; Hodges et al., 1976; Wingfield, 2003). *Chrysosporthe deuterocubensis* está associada a sintomas em eucalipto no Sudeste da Ásia, que são muito semelhantes às causadas por *C. cubensis* na América do Sul. Por exemplo, testes de patogenicidade em *Eucalyptus* foram realizados com *C. deuterocubensis* na Indonésia, com resultados muito semelhantes aos de *C. cubensis* (Wingfield, 2003). Ambas as espécies também têm a capacidade de infectar plantas lenhosas nativas das famílias *Melastomataceae* e *Myrtaceae* e poderia, assim, causar sérios danos se elas fossem introduzidas acidentalmente em novos ambientes (Gryzenhout et al. 2009).

Estas mudanças taxonômicas sucessivas de *C. cubensis* compete ao crescente uso de ferramentas moleculares para caracterizações associadas com

análises de biologia e morfologia que auxiliam na distinção e/ou classificação de novos taxa. Porém, mesmo que hipoteticamente o gênero *Chrysoporthe* tenha sido taxonomicamente elucidado, estudos filogenéticos consecutivos são importantes não apenas para observar mudanças entre grupos taxonômicos, mas também para avaliar sua correlação com a variabilidade genética e/ou patogênica que isolados de regiões distintas podem apresentar. Tais resultados podem auxiliar nas medidas de controle do patógeno.

2.2 Importância de *Chrysoporthe*

Conhecido como patógeno do cancro em plantações comerciais de *Eucalyptus* spp. (Gryzenhout et al., 2004), *C. cubensis* causa cancro em troncos de árvores, reduzindo seu crescimento, levando a ruptura das hastes e até a morte da planta (Hodges et al. 1976, 1979, Sharma et al. 1985). No Brasil, além do *Eucalyptus* sp., o patógeno já foi relatado em *T. granulosa* e *M. edulis* (Seixas et al., 2004; Baretto et al., 2006), embora estes relatos devem provavelmente representar *C. cubensis*, a identidade do fungo nestes hospedeiros necessita ser verificado com sequências de DNA (Gryzenhout et al., 2004; Baretto et al., 2006).

Em *Eucalyptus* spp., o fungo pode atacar plantas de cinco meses de idade até o final do ciclo. Mortes esporádicas associadas às lesões nas regiões basais do caule em plantios jovens ocorrem sem a manifestação do sintoma típico do cancro. O diâmetro reduzido do caule em plantas jovens facilita o anelamento na sua base pelo cancro, levando-as a morte (Ferreira, 1989). Em plantas mais velhas, as lesões resultam em pouco ou abundante trincamento até

cancros típicos. Relatos sobre a sintomatologia de plantas mais novas em *T. granulosa* e *M. edulis* não foram encontrados na literatura.

O fungo geralmente ocorre em países de clima tropical, em que a umidade e temperatura são mais altas (Boerboom e Maas 1970, Hodges et al. 1976, 1979, Sharma et al. 1985). Em 1970, o Brasil registrou severas perdas econômicas na eucaliptocultura pela alta incidência da doença, caracterizando o cancro do eucalipto como a enfermidade mais importante da cultura no país (Ferreira et al., 2004). Diversas empresas eucaliptocultoras em Minas Gerais, São Paulo e Espírito Santo, recorreram por conta disso, a métodos de controle eficazes, baseados no entendimento da suscetibilidade e resistência de espécies, procedências e clones de *Eucalyptus* spp.

2.3 Controle

Existem várias opções para o manejo de *C. cubensis*. O controle químico pode ser utilizado, mas não é economicamente viável (Sharma et al., 1985). Já o Controle biológico, com estirpes hipovirulentas do agente patogênico, pode se mostrar vantajoso, mas é uma opção a longo prazo (Van Heerden et al., 2001). Atualmente, a abordagem mais viável é selecionar árvores de eucalipto resistentes a doenças (Alfenas et al., 1983; Wingfield, 1990). Implantação de plantios de *Eucalyptus* spp. selecionados naturalmente resistentes reduziu as perdas nas plantações, devido à *C. cubensis* na década de 70 e 80 (Campinhos e Ikemori, 1983; Conradie et al., 1992). Plantações monoclonais são atraentes para empresas florestais, devido à uniformidade de clones selecionados e sua maior produtividade em períodos mais curtos de tempo.

No entanto, as combinações das condições ambientais favoráveis e da uniformidade genética destas plantações podem causar perdas substanciais se

clones com fraca resistência são inadvertidamente plantados. Praticamente, nada se sabe sobre a variabilidade genética e patogênica de *Eucalyptus* spp. à infecção por *C. cubensis*. No entanto, assume-se que a resistência ao patógeno é uma característica quantitativa. Isto é devido à ampla gama de suscetibilidade exibida em ensaios de inoculação por descendência resultante de um cruzamento entre clones de *Eucalyptus* spp. resistentes e suscetíveis (Ferreira *et al.*, 1977; Alfnas *et al.*, 1983; Van Heerden and Wingfield, 2002; Guimarães *et al.*, 2010).

Um dos meios de selecionar plantas resistentes a doenças é através de inoculação artificial. Este método foi eficaz na seleção de árvores de eucalipto resistentes ao cancro de *C. cubensis* (Alfnas *et al.*, 1983; Van Heerden e Wingfield, 2002). Ensaios associados, tais como aqueles que avaliam a capacidade de clones de eucalipto para cicatrizar feridas após danos mecânicos têm mostrado uma correlação positiva com a resistência à doença causada por *C. cubensis* (Van Zyl e Wingfield, 1999). Do mesmo modo, genótipos com forte efeito do ambiente foram demonstrados utilizando testes de inoculação com o fungo em diferentes áreas da África do Sul (Van Heerden e Wingfield, 2002).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção e preservação de isolados de *Chrysosporthe*

Os isolados de *Chrysosporthe* utilizados neste estudo, foram obtidos de árvores de *Eucalyptus* sp. e de *Tibouchina* sp. dos Estados de Minas Gerais e Maranhão. Foram coletados fragmentos do caule e casca que apresentaram cancos típicos e corpos de frutificação.

O isolamento direto foi realizado através da retirada e transferência de massa de ascósporos ou de conídios para placa de Petri, contendo meio Batata Dextrose Agar (BDA) e incubados a $\pm 28^{\circ}\text{C}$ por 7-10 dias, com fotoperíodo de 12h. Os isolados foram armazenados em microtubos contendo NaCl 0,85% e mantidos em temperatura ambiente (Castellani, 1939) e em microtubos com glicerol 15% e conservados a -80°C . O método de Castellani foi utilizado para manutenção dos isolados durante a realização dos experimentos.

3.2 Extração de DNA

Os isolados foram cultivados em meio BDA durante 10 dias e o micélio foi raspado, macerado em nitrogênio líquido e a extração de DNA foi realizada através do kit Wizard[®] Genomic DNA purification (Promega do Brasil), de acordo com as especificações do fabricante.

3.2 Amplificação e purificação dos fragmentos

Para a amplificação de fragmentos das regiões ITS (espaçador interno transcrito), β -tubulina (conjunto de primers BT1 e BT2), Actina (ACT) (White et al. 1990; Glass e Donaldson 1995; Carbone e Kohn 1999), foram utilizados os primers ITS1 (F; 5'-GTAACAAGGTTTCCGTAGGTG-3') e ITS4 (R; 5'-TTCTTTTCCTCCGCTTATTGATATGC-3'), ACT-512 (F; 5'-ATG-TGC-AAG-GCC-GGT-TTC-GC-3') e ACT-783 (R; 5'-TAC-GAG-TCC-TTC-TGG-CCC-AT-3'), Bt1a (F; 5'-TTCCCCGCTCTCCACTTCTTCATG-3') e Bt1b (5'-GACGAGATCGTTCATGTTGAACTC-3'), Bt2a (F; 5'-GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC-3') e Bt2b (R; 5'-ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC 3').

As reações de PCR foram realizadas no termociclador My Cycler™ (BIO-RAD). As condições para a amplificação da região ITS foram: 94 °C, por 1 minuto; 34 ciclos: 94 °C, por 40 segundos; 55 °C, por 55 segundos; 72 °C, por 2 minutos e 72 °C, por 5 minutos (White et al., 1990). Para BT1 foram: 94 °C, por 1 minuto; 34 ciclos: 94 °C, por 1 minuto; 55 °C, por 1 minuto; 72 °C, por 2 minutos e 72 °C, por 10 minutos, BT2 foram: 94 °C, por 1 minuto; 34 ciclos: 94 °C, por 30 segundos; 61 °C, por 45 segundos; 72 °C, por 1 minuto e 72 °C, por 5 minutos (Glass e Donaldson 1995) e para ACT o ciclo foi 95 °C, por 4 minutos; 34 ciclos: 95 °C, por 30 segundos; 55 °C, por 30 segundos; 72 °C, por 45 segundos e 72 °C, por 7 minutos (Carbone e Kohn, 1999). A temperatura de anelamento foi ajustada para o primer BT2. Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,2% corado com GelRed (Biotium®), com posterior visualização realizada em fotodocumentador MiniBis Pro (Uniscience). Os fragmentos amplificados foram purificados utilizando-se o

kit GenElute PCR Clean-up Kit (Sigma-Aldrich), para posterior sequenciamento.

3.3. Sequenciamento de DNA e análises filogenéticas

Foram selecionados 20 isolados de acordo com a localização geográfica para análise filogenética de três regiões gênicas BT1 e BT2, ITS, e ACT (Glass e Donaldson, 1995; O'Donnell et al., 1998).

O sequenciamento foi realizado no Laboratório de Patologia Florestal da Universidade Federal de Viçosa e na Empresa Macrogen, EUA. Os eletroferogramas gerados foram editados por meio do programa SeqAssem (Hepperle, 2004) e as sequências foram comparadas com as depositadas na base de dados GenBank (Tabela 1) do National Center for Biotechnological Information –NCBI, por meio da ferramenta BLAST. Para as análises filogenéticas, sequências de referência de espécies de *Chrysosporthe* correspondentes aos genes ITS, BT1, BT2 e ACT, previamente, depositadas no GenBank, foram acrescentadas as análises (Tabela 1).

1 Tabela 1. Isolados de *Chrysosporthe*, origem, hospedeiro e números de acesso GenBank para sequências de DNA
 2 utilizadas neste estudo.

Espécies	Nº isolado ^a	Origem geográfica	Hospedeiro	Número de acesso no GenBank			
				ACT	BT1	BT2	ITS
<i>Chrysosporthe cubensis</i>	CMW 10028	Colombia	<i>Miconia rubiginosa</i>	QG290161	GQ290175	GQ290186	GQ290153
	CMW 10669	República do Congo	<i>Eucalyptus</i> sp.	GQ290171	GQ290177	GQ290188	GQ2900154
	CMW 12734	México	<i>Rhynchanthera mexicana</i>	GQ290159	DQ368791	GQ290191	DQ368769
<i>C. austroafricana</i>	CMW 10192	África do Sul	<i>S. cordatum</i>	GQ290163	GQ290176	GQ290187	AY142299
	CMW 9327	África do Sul	<i>T. granulosa</i>	GQ290173	GQ290185	GQ290194	GQ290158
<i>C. inopina</i>	CMW 12727	Colômbia	<i>T. lepidota</i>	GQ290169	GQ290180	DQ368806	DQ368777
	CMW 12731	Colômbia	<i>T. lepidota</i>	GQ290168	GQ290182	DQ368811	DQ368779
	CMW 12729	Colômbia	<i>T. lepidota</i>	GQ290166	DQ368808	DQ368809	DQ368778
<i>C. doradensis</i>	CMW 11287	Ecuador	<i>E. grandis</i>	GQ290167	GQ290179	GQ290190	GQ290156
<i>C. deuterocubensis</i>	CMW 8650	Indonésia	<i>S. aromaticum</i>	GQ290172	AY084024	GQ290193	AY084001
	CMW 10778	Brasil	<i>Syzygium aromaticum</i>	GQ290165	GQ290178	GQ290189	GQ290155
	CMW 12745	Singapura	<i>T. urvilleana</i>	GQ290160	GQ290183	DQ368781	DQ368764
	CMW 17178	Tailândia	<i>T. urvilleana</i>	GQ290164	DQ368785	GQ290192	DQ368766
<i>Chrysosporthella hodgesiana</i>	CMW 9995	Colômbia	<i>T. semidecandra</i>	GQ290162	AY956978	AY956977	AY956969
	CMW 10625	Colômbia	<i>T. theaezans</i>	GQ290170	AY262391	AY956979	AY262399
<i>Amphilogia gyrosa</i> ^b	YMJ91123101	Taiwan		EF025600	EF025615	EF025615	EF026147

3 ^aCMW = Forest e Agricultural Biotechnology Institute (FABI), University of Pretoria, Pretoria, África do Sul.

4

Alinhamentos múltiplos das sequências de nucleotídeos foram gerados utilizando-se a ferramenta CLUSTALW (Thompson et al., 1994), implementado pelo programa MEGA 6.0 e foram corrigidos manualmente. As árvores filogenéticas foram construídas e editadas nos softwares PAUP* 4.0b10 (Swofford, 2002) e MrBayes v. 3.2.1 (Ronquist et al., 2012), utilizando os métodos de Máxima Parsimônia (MP) e Inferência Bayesiana. Sequências de *Amphilogia gyrosa* foram definidas como outgroup, com base nos resultados obtidos por Nicolas et al. (2010).

3.3 Patogenicidade

3.3.1 Preparo das mudas, inóculo e inoculação

O estudo da patogenicidade dos isolados de *C. cubensis* de eucalipto e quaresmeira foi conduzido utilizando-se três clones de híbridos de eucalipto (*E. urograndis*) (T1, T2 e T3) e mudas de *T. granulosa*, a fim de caracterizar a patogenicidade dos isolados e verificar se existe especificidade entre os hospedeiros (Denoyes e Baudry, 1995; Muniz et al., 1998; Furtado et al., 1999; Peres et al., 2003). Dois isolados de *Eucalyptus* spp. (CE6 de *C. cubensis* e CE38 de *C. doradensis*) e dois de *T. granulosa* (CT2 e CT5) foram selecionados para a realização do teste.

Mudas de eucalipto (híbrido *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*) com 70 dias de idade foram transplantadas para vasos de 3L contendo substrato agrícola (Tosprato[®]), onde foram adicionados 100 g de NPK (4-14-8) e 50 gramas de MAP para cada 25 kg de substrato. Na sequência, as mudas cultivadas receberam cortes em bisel no caule, com auxílio de um bisturi, para a retirada da casca e exposição do lenho, de acordo com a metodologia descrita por Ferreira (1989). Os isolados utilizados foram cultivados em placa de Petri de 6 cm de

diâmetro, contendo meio BDA e mantidos por 10 dias a 25 °C, com fotoperíodo de 12h. Discos de micélio de 5 mm de diâmetro foram depositados no local do ferimento, para indução do contato interno com os tecidos da planta. O fragmento foi recoberto com filme plástico para a proteção da lesão contra dessecação. Esta proteção foi mantida durante um período de 30 dias após a inoculação (D.A.I.). As testemunhas receberam apenas um disco contendo BDA, sem o fungo. Ao completar 75 dias, os caules foram seccionados para avaliação da colonização interna do xilema, através da medição do tamanho da lesão. O postulado de Koch foi realizado por meio do reisolamento dos isolados inoculados.

3.3.2 Resistência de clones de eucalipto

Os isolados utilizados para avaliar a resistência dos clones foram CE6 e CE38, selecionados com base nos resultados das análises filogenéticas, representando as espécies *C. cubensis* e *C. doradensis*, respectivamente.

Buscando-se avaliar a resistência de material genético de eucalipto ao cancro de *Chrysoporthe*, foram utilizados 10 clones (T3, T4, T5, T6, T7, T8, T9, T10, T11 e T12), com idade de seis meses, cedidos pela empresa FIBRIA S. A.. Este experimento consistiu em avaliar o processo de compartimentalização externa (lesão na casca) aos 15, 30, 45, 60 e 75 dias após a inoculação e o comprimento da lesão interna (lesão no xilema).

As avaliações da lesão externa basearam-se nas medidas de comprimento e diâmetro da lesão em função do tempo, devido ao processo de compartimentalização ser nas direções longitudinal e vertical. As medições da lesão externa foram utilizadas para o cálculo da área abaixo da curva de

progresso da doença (AACPD) (Campbell e Madden, 1990), que corresponde a integrações numéricas da proporção de doença *versus* tempo, expressa pela fórmula: $AACPD = \Sigma [((y1 + y2)/2)*(t2-t1)]$, onde $y1$ e $y2$ são duas avaliações consecutivas realizadas nos tempos $t1$ e $t2$, respectivamente.

Após 75 dias, os caules foram seccionados, removendo-se a casca para expor a lesão interna e medir o comprimento da lesão interna. O postulado de Koch foi completado por meio do reisolamento.

3.3.3 Delineamento experimental e análises de dados

Os testes de patogenicidade foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado, com oito repetições no teste de infecção cruzada, e cinco repetições no teste de resistência de clones de eucalipto. Foi realizado teste de normalidade (Shapiro-wilk) dos dados obtidos das avaliações de ambos os testes. Quando não atenderam aos pressupostos da normalidade, os dados foram transformados em $\text{Log}(x+1)$. Realizou-se a análise de variância e as médias de cada tratamento foram agrupadas e diferenciadas pelo teste de Scott e Knott, a 5% de significância.

As análises estatísticas foram realizadas em software estatístico SISVAR v. 4.3 Build 45, do Departamento de Ciências Exatas da UFLA, 1999-2004. Para a confecção dos gráficos, utilizou-se o programa Sigma Plot 13.0.

4 RESULTADOS

4.1 Obtenção dos isolados

Foram obtidos 64 isolados de *Chrysoporthe* associados a eucalipto e quaresmeira nos Estados de Minas Gerais e Maranhão. Destes, 45 foram coletados de plantas de eucalipto (43 em plantações comerciais no estado do Maranhão e duas em Minas Gerais), e dezenove provenientes de árvores de duas espécies de *Tibouchina* sp. (*T. granulosa*, *T. heteromalla*) de Minas Gerais que apresentaram cancos típicos contendo corpos de frutificação. Foi observada a morte das árvores de *T. granulosa* com a presença do patógeno quando utilizadas para arborização urbana (Figura 1D). Nas amostras coletadas em *T. heteromalla* e *T. granulosa* que ocorrem, naturalmente, nos locais de coleta observaram-se estruturas típicas do fungo (Figuras 1B, 1E e 1F). Os cancos contendo estruturas típicas do fungo estavam associados à morte de galhos e/ou ramos de quaresmeiras.

4.2 Análises filogenéticas

Árvores filogenéticas foram geradas pelos métodos de Máxima Parcimônia (MP) e Inferência Bayesiana (MB) para as regiões gênicas ITS, BT1, BT2 e ACT, individualmente e combinadas, e então comparadas. As 20 sequências parciais da região ITS de *Chrysoporthe* apresentaram 466 caracteres, sendo 441 conservados, 21 variáveis e destes, 5 informativos. A árvore gerada para a região BT1 apresentou 416 caracteres, sendo 175 conservados, 224 variáveis e destes 18 informativos, para BT 2, 408 caracteres sendo 339 conservados, 49 variáveis e destes 14 informativos e para ACT continha 300

caracteres sendo 232 conservados, 38 variáveis e destes, nove informativos (Máxima Parcimônia).

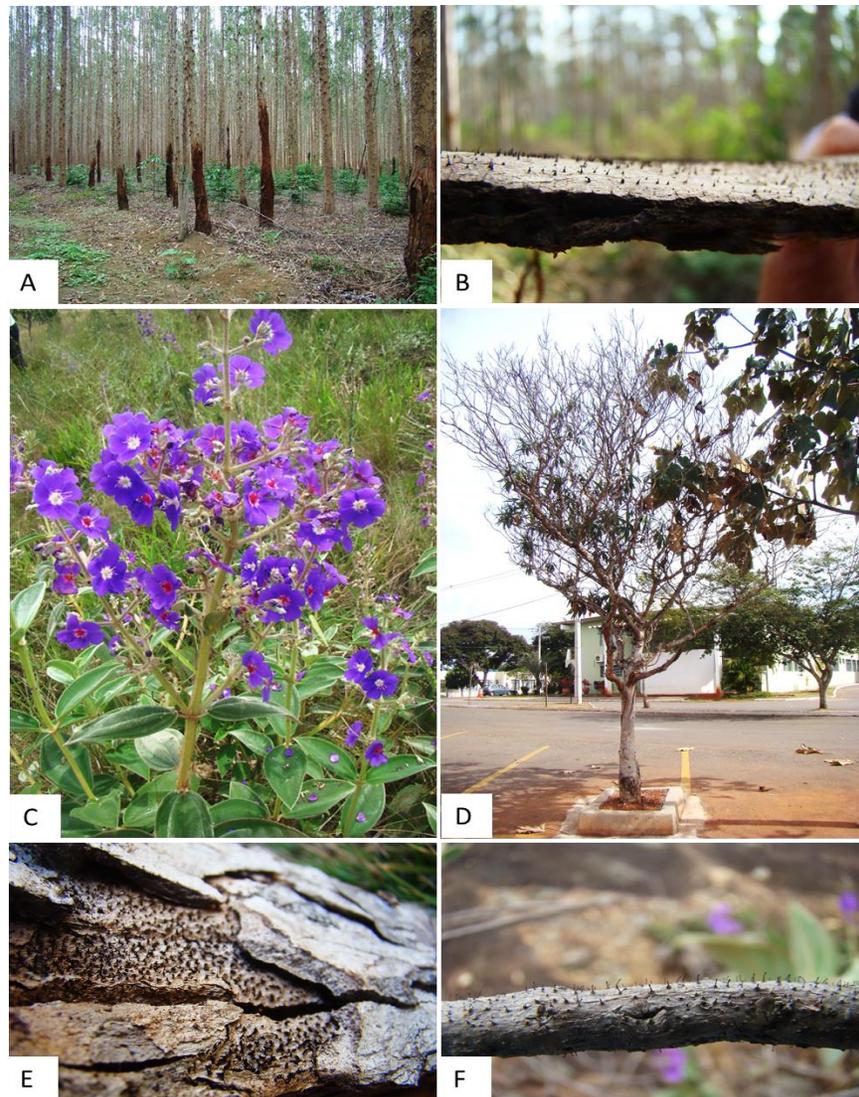


Figura 1. Hospedeiros de *Chrysoporthe* sp.. Cancros na base de árvores de *Eucalyptus* sp. infectadas (A). Corpos de frutificação sob a casca em eucalipto (B), e *Tibouchina heteromalla* (C); Árvore morta de *T. granulosa* (D); Corpos de frutificação sob a casca de *T. granulosa* (E) e *T. heteremalla* (F).

Tabela 2. Isolados de *Chrysoporthe* usados neste estudo.

Isolados	Hospedeiro	Local de coleta
CE3	<i>Eucalyptus</i> sp.	Bom Jardim/MA
CE6	<i>Eucalyptus</i> sp.	Bom Jardim/MA
CE12	<i>Eucalyptus</i> sp.	Bom Jardim/MA
CE22	<i>Eucalyptus</i> sp.	Bom Jardim/MA
CE26	<i>Eucalyptus</i> sp.	Bom Jardim/MA
CE34	<i>Eucalyptus</i> sp.	Bom Jardim/MA
CE37	<i>Eucalyptus</i> sp.	Bom Jardim/MA
CE38	<i>Eucalyptus</i> sp.	Bom Jardim/MA
CE45	<i>Eucalyptus</i> sp.	Lavras/MG
CC3	<i>Eucalyptus</i> sp.	Bom Jardim/MA
CC4	<i>Eucalyptus</i> sp.	Bom Jardim/MA
CT2	<i>Tibouchina granulosa</i>	Lavras/MG
CT5	<i>T. granulosa</i>	Lavras/MG
CT6	<i>T. granulosa</i>	Lavras/MG
CT7	<i>T. granulosa</i>	São João Del Rei/MG
CT10	<i>T. granulosa</i>	São João Del Rei/MG
CT13	<i>T. granulosa</i>	Tiradentes/MG
CT24	<i>T. granulosa</i>	São João Del Rei/MG
CT25	<i>T. heteromalla</i>	Itumirim/MG
CT30	<i>T. heteromalla</i>	Itumirim/MG

As análises filogenéticas foram realizadas de forma individual com as regiões genômicas de ITS (466 pb), BT1 (416 pb), BT2 (408 pb) e ACT (273 pb) e combinadas das três regiões gênicas: ITS, BT1-BT2 e ACT (1.054 pb).

As árvores geradas nas análises individuais dos genes BT1, BT2 e ACT foram distintas daquelas geradas para a região ITS (Anexo A). As árvores de consenso e individuais dos genes BT1, BT2 e ACT geradas pelas análises de MP e MB foram altamente similares em suas topologias (Anexos B e C, respectivamente). Os anexos A e C correspondem a utilização de um maior número de acessos do GenBank nas análises individuais das regiões.

O Teste de Homogeneidade de Partição revelou que, embora com baixa probabilidade, todas as regiões estudadas podem ser combinadas ($P = 0,01$). A baixa probabilidade de THP pode ser explicada devido à inserção do gene ITS na análise, uma vez que, a análise individual desta região apresentou topologia distinta das demais. Porém, não alterou a topologia de consenso, quando comparado com a árvore combinada das regiões ACT, BT1 e BT2 ($P = 0,02$) (Anexo C).

A análise combinada das três regiões gerou um número menor de árvores mais parcimoniosas, em comparação com as análises das regiões individuais. Os clados com suporte das outras análises foram mantidos, entretanto, com valores maiores de *bootstrap* na árvore consenso. Na análise combinada das regiões ITS, BT1, BT2 e ACT foram utilizadas 144 sequências, com 1.520 caracteres. A árvore consenso gerada pela análise de MP apresentou congruência com as árvores inferidas pelas análises individuais anteriores para estas regiões, quanto aos agrupamentos formados e aos valores de suporte para esses clados. A topologia da árvore concatenada apresentou alto valor de suporte de *bootstrap* e probabilidade posterior quando comparada com as árvores individuais (Figura 2).

A árvore de consenso das três regiões gênicas mostrou que os isolados sequenciados neste estudo agruparam-se, separadamente, em três clados distintos. O grupo 1, formado pelos isolados de *T. granulosa* coletados em São João Del Rei e Tiradentes-MG (CT7, CT10 e CT13) formaram um clado distinto dos demais, não agrupando com nenhuma espécie de *Chrysoporthe* já descrita, com alto valor de *bootstrap* (100%).

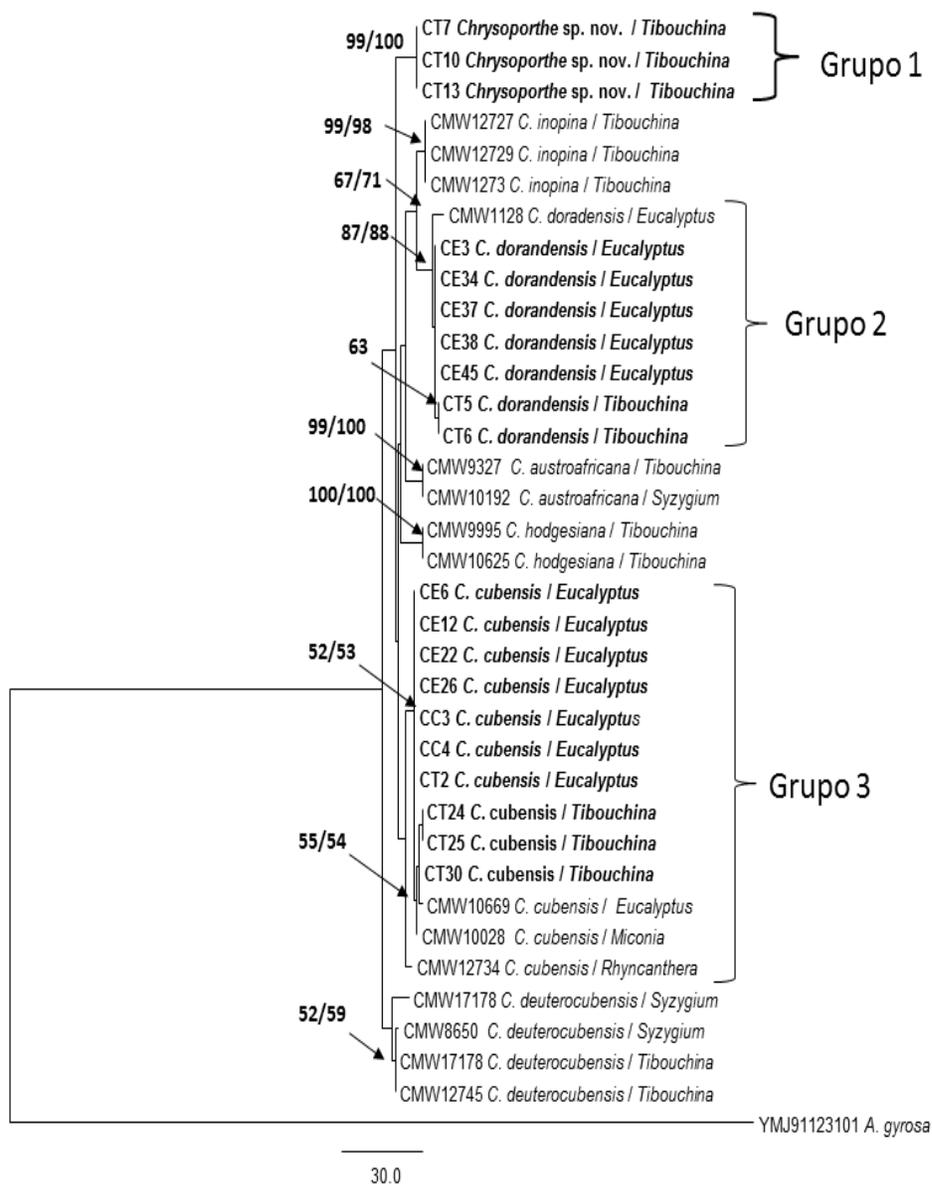


Figura 2. Árvore de consenso dos dados combinados das regiões ITS, BT1, BT2 e ACT gerada pela análise de Máxima Parcimônia e Inferência Bayesiana. Isolados em negrito foram sequenciados neste estudo. Os valores de *bootstrap* e probabilidade posterior (>50%) dos cladogramas são mostrados a direita e esquerda, respectivamente, nos ramos. *Amphilogia gyrosa* foi definido como *outgroup*.

1 Os isolados CE3, CE34, CE37, CE38, CE45, CT5 e CT6 (Grupo 2)
2 agruparam com a espécie *C. doradensis* (*bootstrap* = 88%). O grupo 3 (CE6,
3 CE12, CE22, CE26, CC3, CC4, CT2, CT24, CT25 e CT30) agrupou-se com
4 isolados de *C. cubensis*, porém este clado obteve baixo valor de *bootstrap* (53%)
5 quando comparado com as análises individuais dos genes BT1, BT2 e ACT.
6 Dentro do clado formado por este grupo filogenético, observou-se a presença de
7 um subclado na análise combinada, suportado por um baixo valor de *bootstrap*
8 (54%) que distanciou filogeneticamente os isolados de *T. heteromalla* dos
9 isolados de eucalipto.

10 Os sub-clados (Grupos 1, 2 e 3) formados na análise combinada
11 resultaram de nucleotídeos polimórficos (NP) característicos para cada grupo
12 filogenético. A maioria desses nucleotídeos polimórficos foi fixa nos três grupos
13 filogenéticos e estavam distribuídos ao longo das sequências das regiões
14 estudadas (Tabela 3). No conjunto de dados combinados, 22 bases foram
15 polimórficas. Um total de sete NPs foram compartilhadas apenas entre dois
16 grupos filogenéticos em duas espécies de *Chrysoporthe* sp. e cinco foram
17 exclusivos do grupo 1, elucidando a formação de um clado distinto para os
18 isolados pertencentes a esse grupo. Alguns dos isolados apresentaram variações
19 individuais com substituições que foram únicas para o isolado.

20 O clado com alto suporte estatístico formado pelos isolados do grupo 1
21 na análise combinada não foi observado nas análises individuais do gene ITS
22 (Anexo A), demonstrando que esta região gênica não é suficiente para
23 discriminar este clado das demais espécies já descritas de *Chrysoporthe*.
24 Ademais, esta região mostrou-se também insuficiente para a distinção dos
25 isolados do grupo 2, que agruparam-se com *C. doradensis* na árvore consenso
26 dos genes ACT, BT1 e BT2. Altos valores de *bootstrap* foram observados nos
27 clados que diferenciaram espécies de *Chrysoporthe* nas análises de consenso e

28 individuais dos genes BT1, BT2 e ACT (Apêndice B e C). Tal suporte não foi
29 observado nas análises individuais da região gênica de ITS.

30 **Tabela 3.** Resumo dos nucleotídeos polimórficos (NPs) encontrados entre as regiões β -tubulina 1, β -tubulina 2 e Actina
 31 associados aos grupos filogenéticos encontrados nesse estudo.

Espécies	β -tubulina (Bt1a/1b)												β -tubulina (Bt2a/2b)						Actina			
	127	128	129	140	147	148	177	180	187	240	318	365	27	75	96	97	152	202	269	50	119	133
<i>Chrysoporthe</i> sp.*	T	T	T	C	G	G	T	T	T	C	C	T	T	C	T	T	C	A	C	C	C	G
<i>C. cubensis</i>	C	T	C	C	G	A	T	T	C	T	C	T	C	C	C	T	C	A	C	C	T	A
<i>C. austroafricana</i>	C	C	C	G	G	G	C	C	C	C	C	T	C	C	C	T	C	A	C	C	C	G
<i>C. doradensis</i>	C	C	C	T	A	G	C	C	C	C	A	T	C	C	C	C	T	G	T	A	C	G
<i>C. inopina</i>	C	C	C	C	G	G	G	C	C	C	C	T	C	C	C	C	T	A	T	C	C	G
<i>C. deuterocubensis</i>	C	C	C	C	G	G	T	T	C	C	C	T	C	C	C	C	C	A	T	C	C	G
<i>C. hodgesiana</i>	C	C	C	C	G	G	T	T	C	C	C	T	C	C	C	T	C	A	C	C	C	G

32 *Os nucleotídeos mostrados são de um isolado representativo do grupo filogenético 1.

33

34 NPs presente apenas no grupo filogenético 1.

35 4.3 Caracterização morfológica

36

37 Isolados representativos dos grupos formados nas análises filogenéticas
38 foram selecionados para a caracterização morfológica, que foram CE22 (*C.*
39 *cubensis*), CE37 (*C. doradensis*), CT13 (*Chrysoporthe* sp.) e CT25 (Sub-clado
40 dentro do clado de *C. cubensis*). Observou-se a presença de peritécios e
41 picnídios nas amostras provenientes de eucalipto, contudo, nas amostras
42 coletadas de *Tibouchina* sp., observou-se apenas a presença da fase anamórfica.
43 Não foram observadas variações na coloração e morfologia da cultura dos
44 isolados quando cultivados em meio BDA.

45 A caracterização morfológica da fase sexuada e assexuada foi baseada
46 no comprimento e largura dos ascos e ascósporos, conídios e conidióforos
47 (Tabela 4). Os corpos de frutificação e características morfológicas dos isolados
48 representativos dos grupos filogenéticos 1, 2 e 3 podem ser observados nas
49 figuras 3 e 4.

50 Os isolados do grupo 3 apresentaram ascos, ascósporos, conídios e
51 conidióforos similares aos descritos na literatura para *C. cubensis*. As
52 características morfológicas observadas no isolado representativo do grupo 2
53 apresentaram-se diferentes em todos os parâmetros analisados neste estudo de *C.*
54 *cubensis*, porém semelhantes a *C. doradensis*.

55 O isolado representativo do grupo 1 apresentou características
56 morfológicas distintas daquelas observadas para *C. cubensis* e *C. doradensis*. As
57 dimensões mensuradas para conídios e conidióforos para este grupo foram de
58 2,3-4,0 x 1,2-2,1 e 9,2-17,0 µm, respectivamente. Este grupo filogenético
59 destacou-se por apresentar dimensões dos caracteres observados ligeiramente
60 menores daquelas descritas para outras espécies de *chrysoporthe*.

61

62 Tabela 4. Características morfológicas das fases assexuada e sexuada dos isolados representativos dos grupos
 63 filogenéticos (μm) associados ao eucalipto e quaresmeira.

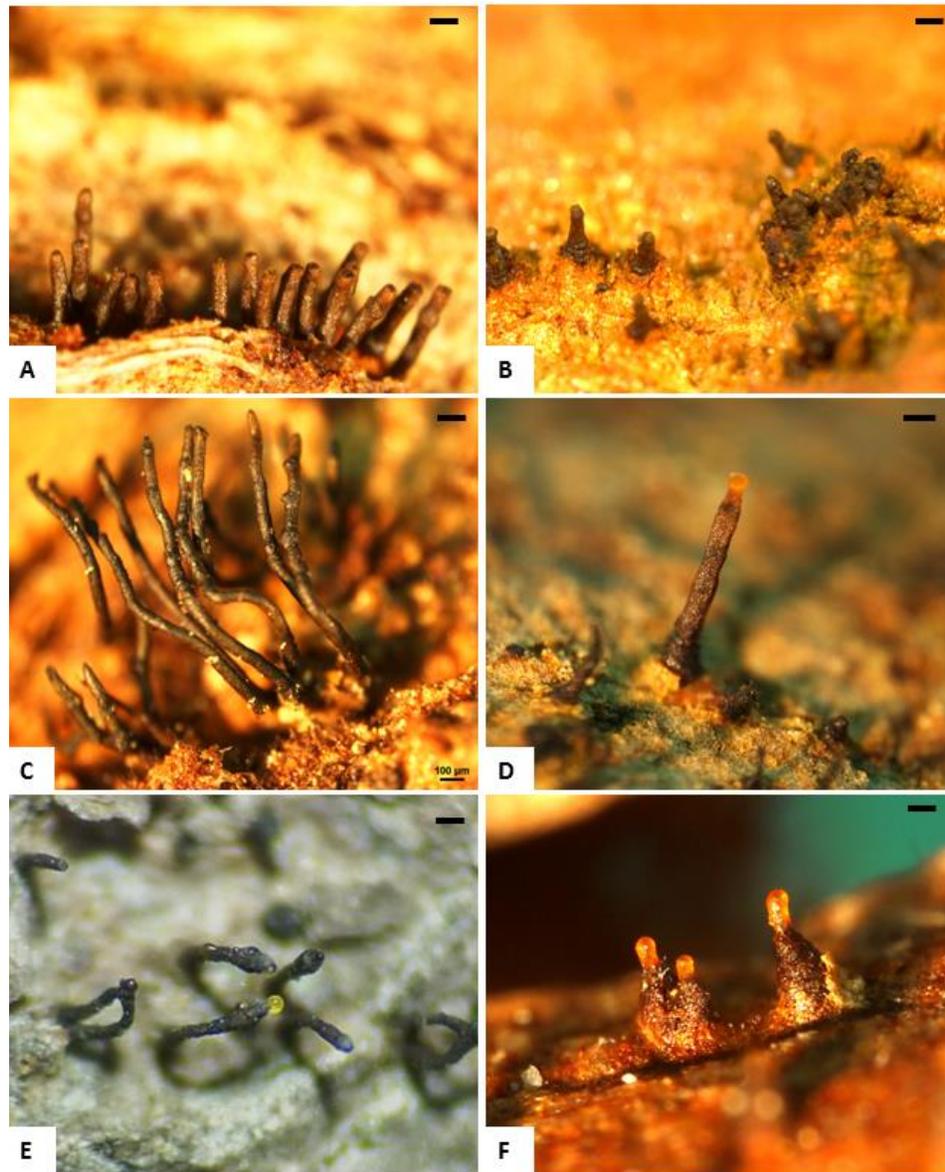
64

Isolados	Conidióforo	Conídio	Asco	Ascósporo
	Comp./Largura	Comp./Largura	Comp./Largura	Comp./Largura
Grupo 1*	9,2-17,0	2,3-4,0 x 1,2-2,1	-	-
Grupo 2*	15,9-21,5	3,5-4,5 x 1,6-2,2	20,2-24,5 x 4,5-6,5	5,0-6,5 x 2,0-2,5
Grupo 3*	10,0-17,2	2,5-3,3 x 1,5-2,1	18,5-24,0 x 4,5-6,5	4,5-6,0 x 2,0-2,5
<i>C. cubensis</i> **	12,0-24,5	3,0-5,0 x 1,5-2,5	19-28,0 x 4,5-7,0	5,5-8,0 x 2,0-3,0
<i>C. doradensis</i> **	9,5-22,5	3,0-6,5 x 1,5-2,5	19,5-25,0 x 4-7,0	4,5-8,5 x 2,0-2,5

71 *Isolados representativos de cada grupo filogenético.

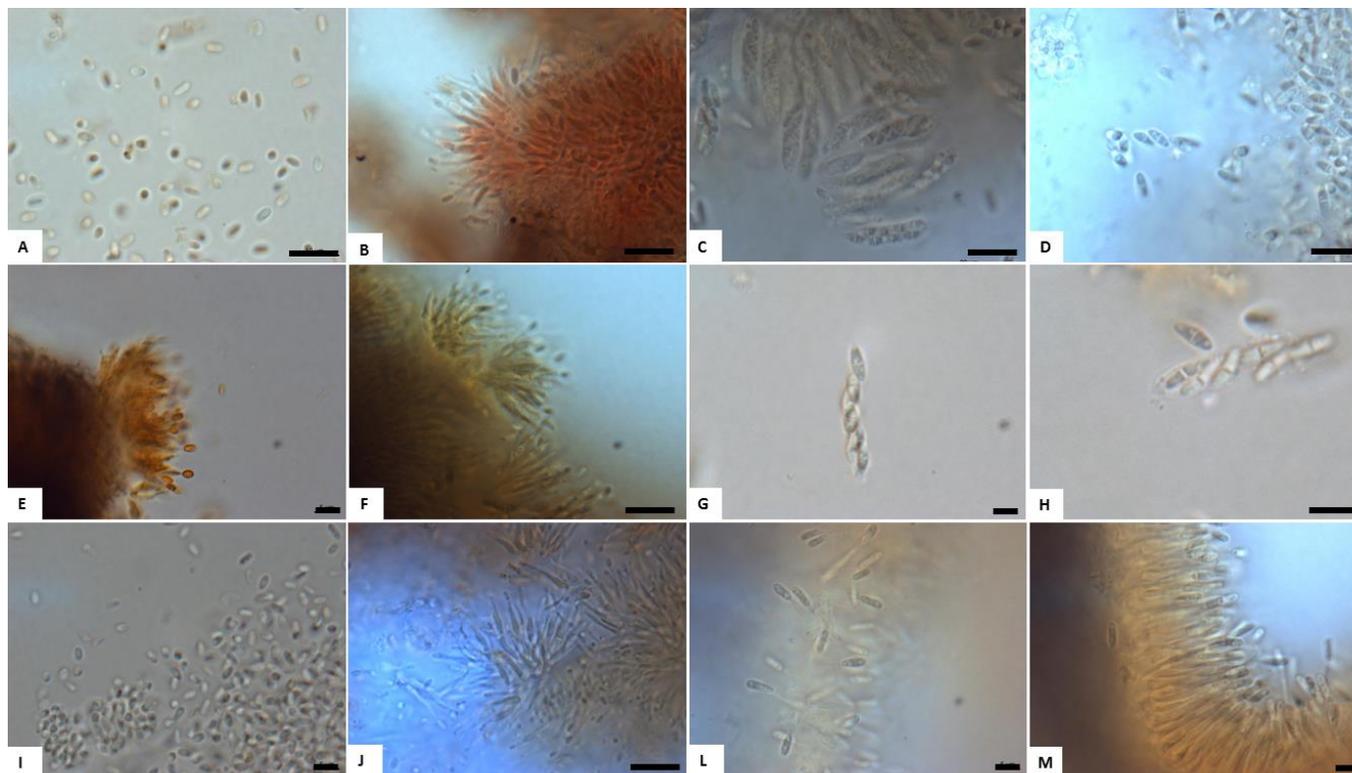
72 ** Espécimes tipo (Bruner, 1916; Gryzenhout et al, 2005).

73



74

75 **Figura 3.** Corpos de frutificação de isolados representativos de cada grupo filogenético.
 76 Ascostroma (A) e pcnídio (B) em casca de eucalipto do isolado CE22.
 77 Ascostroma (C) e pcnídio com massa de esporos (D) de CE37. Pcnídios de
 78 CT25 (E) e CT13 (F). Barra de escala = 100 µm



79

80 **Figura 4.** Características morfológicas dos isolados representativos de cada grupo filogenético. Conídios, conidióforos, ascos e81 ascósporos de CE22 (**A, B, C, D**) e CE37 (**E, F, G, H**), respectivamente. Conídios (**I**) e conidióforos (**J**) de CT13.82 Conídios (**L**) e conidióforos (**M**) de CT25. Barra de escala: A, B, C, D, F e J = 10 μm ; E, G, H, I, L e M = 5 μm ;

83 4.4 Patogenicidade

84 4.4.1 Inoculação cruzada

85

86 As lesões progrediram verticalmente no lenho das plantas inoculadas
87 (Figura 5). Todos os isolados foram patogênicos a eucalipto, diferindo
88 estatisticamente da testemunha. Em quaresmeira, apenas o isolado CT2 não
89 diferiu estatisticamente da testemunha, já que os demais foram considerados
90 patogênicos a este hospedeiro (Figura 6).

91



92

93 **Figura 5.** Comprimento da lesão interna (cm) causada por *C. cubensis* em **A.** eucalipto e
94 **B.** quaresmeira

95

96 Houve diferença significativa para os clones ($P = 0,00$), tratamentos ($P =$
97 $0,00$) e suas interações ($P = 0,01$). A comparação de médias pelo teste de Scott-
98 knott indicou que os clones agruparam em dois grupos distintos. Entre os clones
99 T3 e T1 não houve diferença significativa, porém, estes diferiram do clone T2,
100 que apresentou as maiores lesões (Tabela 5).

101 Nos clones T1, T2 e T3, todos os isolados testados diferiram
102 significativamente da testemunha sendo, portanto, todos patogênicos a eucalipto.

103 Porém não houve diferença significativa entre os isolados testados nos clones T2
 104 e T3. Para o clone T1, apenas o isolado T2 diferiu dos demais, causando
 105 menores lesões, com média de 3,43 cm (Tabela 5).

106

107 **Tabela 5.** Comprimento das lesões (cm) no xilema causada por 4 isolados de
 108 *Chrysosporthe* sp. em três diferentes clones de eucalipto.

Isolados	Clones de eucalipto		
	T1	T2	T3
<i>Chrysosporthe cubensis</i> (CT2)	3,43 Ba*	8,67 Bb*	4,27 Ba*
<i>C. doradensis</i> (CT5)	6,53 Cb	6,97 Bb	4,50 Ba
<i>C. cubensis</i> (CE6)	6,68 Ca	9,37 Bb	6,45 Ba
<i>C. doradensis</i> (CE38)	6,31 Cb	7,91 Bb	4,23 Ba
T**	1,11Aa	1,21 Aa	0,97 Aa

109 *Médias seguidas por letras distintas maiúsculas nas colunas e minúsculas
 110 nas linhas diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste Scott-Knott. **T:
 111 Testemunha.

112

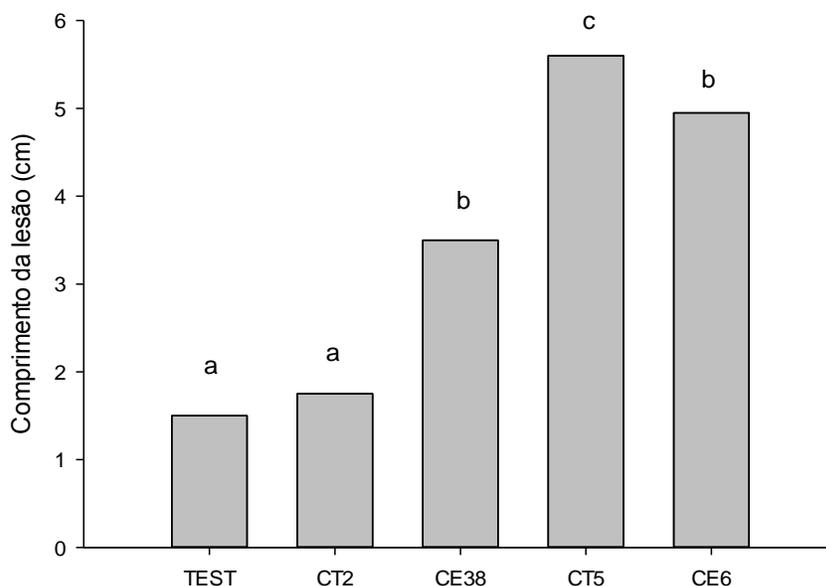
113 Em quaresmeira, os isolados CT5, CE6 e CE38 diferiram
 114 estatisticamente da testemunha, demonstrando sua patogenicidade a este
 115 hospedeiro. Os isolados CE6 e CE38 não diferiram estatisticamente entre si
 116 (Figura 7) e o isolado CT5 revelou ser o mais agressivo a quaresmeira, com
 117 média de lesão de 5,65 cm. Apenas o isolado CT2 não diferiu estatisticamente
 118 da testemunha, demonstrando ser avirulento para este hospedeiro.

119

120

121

122



123

124 **Figura 6.** Comprimento da lesão (cm) interna no caule de quaresmeira causada por
125 diferentes isolados de *Chrysosporthe*.

126

127 Os isolados patogênicos reisolados das plantas apresentaram culturas
128 típicas dos isolados inoculados, completando os postulados de Koch.

129

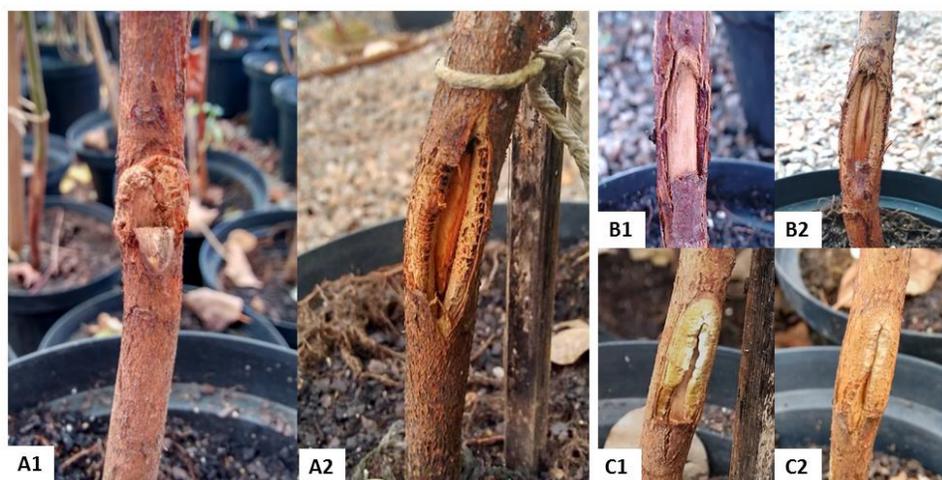
130 **4.4.2 Resistência de clones de eucalipto**

131

132 Na primeira avaliação, realizada aos 15 dias após a inoculação, já foi
133 possível observar o desenvolvimento de cancrios, em diferentes níveis de
134 desenvolvimento nos 10 clones avaliados. O progresso da lesão e
135 compartimentalização do lenho nos tratamentos inoculados assumiu uma forma
136 elipsoidal, enquanto que nas testemunhas (inoculadas apenas com BDA) a

137 evolução da compartimentalização foi de forma circular (Figura 7. A1-A2).
 138 Verificou-se compartimentalização completa em todas as testemunhas aos 75
 139 dias após o ferimento. Houve diferença estatística quanto à resistência entre os
 140 clones e a testemunha.

141



142

143 **Figura 7.** Lesão e compartimentalização após 75 dias da inoculação. A1) testemunha,
 144 com completa compartimentalização em formato circular. A2) lesão com
 145 evolução elipsoidal no sentido longitudinal e formação de calo em muda
 146 inoculada; B) clone CL11 e C) clone CL8: processo de compartimentalização
 147 da lesão aos 15 dias (B1,C1) e aos 75 dias (B2, C2) após a inoculação.

148

149

150

151 4.4.2.1. Avaliação da área abaixo da curva de progresso da doença

152

153 Houve diferença significativa entre os clones, isolados e sua interação (P
 154 = 0,00) (Tabela 6). Todos os tratamentos diferiram, significativamente, da
 155 testemunha. Com base no agrupamento do teste de Scott-Knott, foi possível
 156 classificar a resistência dos clones em quatro grupos para os dois isolados
 157 inoculados, quando considerados os valores de AACPD (Tabela 6): para o

158 isolado CE6, a classificação foi de resistente (R) (73,3- 80,8), moderadamente
 159 resistente (MR) (99,7), moderadamente suscetível (MS) (122,6-126,3) e
 160 suscetível (S) (198,9-220,4). O isolado CE38 obteve amplitudes de 63,2 – 66,1
 161 (R), 79,3-90,7 (MR), 113,3 (MS) e 159,1-166,7 (S).

162

163 **Tabela 6.** Área abaixo da curva de progresso da doença em clones de eucalipto em
 164 resposta a inoculação à *Cryosporthe cubensis* e *C. doradensis*.

Clones	Grupos		AACPD		
	<i>C. cubensis</i>	<i>C. doradensis</i>	<i>C. cubensis</i>	<i>C. doradensis</i>	T**
T3	R	S	80,9 Ab*	166,7 Dc*	53,5 Ba*
T4	MS	R	126,2 Cc	63,2 Ab	38,6 Aa
T5	S	MR	198,9 Dc	83,8 Bb	36,2 Aa
T6	MR	MR	99,7 Bb	90,7 Bb	53,7 Ba
T7	R	MS	73,3 Ab	113,3 Cc	51,4 Ba
T8	R	MR	73,4 Ab	87,0 Bb	35,8 Aa
T9	R	MR	77,9 Ab	79,3 Bb	47,1 Ba
T10	MS	R	122,6 Cb	66,1 Aa	60,0 Ba
T11	S	S	220,4 Dc	159,1 Db	58,1 Ba
T12	MS	MR	126,3 Cc	83,0 Bb	53,6 Ba

165 *Médias seguidas por letras distintas maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas diferem entre
 166 si ao nível de 5% de propabilidade pelo teste Scott-Knott; os dados foram transformados pela
 167 função $\log x + 1$. **Testemunha

168

169

170

171 A menor área de lesão do tronco foi observada nos clones que pertencem
 172 aos grupos R e MR, que variou de 73,3 a 99,7, para o isolado CE6 e de 63,2 a
 173 90,7 no isolado CE38. Prevaleceu a classificação dos clones em R e MR, quando
 174 inoculados com CE38, sendo eles T4, T10, T9, T12, T5, T8 e T6, enquanto que
 175 no isolado CE6, apenas cinco clones (T7, T8, T9, T3 e T6) tiveram esta
 176 classificação.

177

178 Observaram-se nos clones que foram classificados como R e MR, as
179 formações de um tecido caloso e/ou saliente, que se desenvolvia a partir da
180 região cambial, recobrando o local de inoculação, em que o lenho foi exposto
181 (Figura 7-A1).

182 O clone T11 foi classificado como suscetível aos dois isolados, por
183 apresentar valores de AACPD de 220,4 e 159,1, quando inoculado com os
184 isolados CE6 e CE38, respectivamente (Tabelas 6). O clone T6 foi classificado
185 como MR para ambos isolados, com valores de AACPD de 99,7 e 90,7, nos
186 isolados CE6 e CE38, respectivamente. Os demais clones não obtiveram
187 classificações equivalentes em ambos isolados inoculados.

188 A área da lesão externa, em função da AACPD, evidenciou que os
189 clones T11 e T5 foram os mais suscetíveis ao isolado CE6, e os clones T7, CL8,
190 T9 e T3 foram os mais resistentes a este mesmo isolado, não diferindo
191 estatisticamente entre si. Para o isolado CE38, os clones mais resistentes foram
192 T4 e T10, não diferindo estatisticamente entre si. Os clones T11 e T3 foram os
193 que apresentaram maior AACPD, sendo os mais suscetíveis a CE38 (Tabela 6).

194 Houve uma resposta diferenciada de cada clone com os isolados,
195 indicando que os mesmos respondem de maneira distinta às duas espécies de
196 *Chrysosporthe*. O isolado CE6 (*C. cubensis*) foi o mais agressivo, causando as
197 maiores lesões na maioria dos clones estudados, quando comparado com os
198 valores de AACPD do isolado CE38 (*C. doradensis*).

199

200 **4.4.2.2. Avaliação da área da lesão interna**

201

202 O teste demonstrou que há diferença estatística significativa entre os
203 clones, isolados e suas interações ($P = 0,00$), sem a possibilidade de separação
204 dos clones em grupos de resistência. Entretanto, observou-se que os clones T9 e

205 T11 se destacaram por serem altamente suscetíveis às duas espécies de
206 *Chrysosporthe* (Tabela 7).

207 Os clones T4 e T5 obtiveram as menores lesões para ambas às espécies,
208 assim como T10 e T12 para o isolado CE38. Portanto, foram considerados os
209 mais resistentes quando avaliado comprimento da lesão interna. *C. cubensis*
210 (CE6) destacou-se por apresentar-se mais agressivo à maioria dos clones
211 testados, como foi igualmente observado nas avaliações da área da lesão externa.

212

213

214 **Tabela 7.** Comprimento da lesão interna (cm) em clones de eucalipto em resposta a
215 inoculação a dois isolados de *Crysosporthe* sp..

216

Clones	<i>C. cubensis</i>	<i>C. doradensis</i>
T3	1,71 Ba*	3,55 Db*
T4	0,72 Aa	0,30 Aa
T5	0,40 Aa	0,46 Aa
T6	7,42 Fb	2,60 Ca
T7	4,57 Ea	4,24 Ea
T8	3,91 Db	1,00 Ba
T9	10,40 Hb	7,25 Ga
T10	2,87 Cb	0,19 Aa
T11	8,25 Gb	5,84 Fa
T12	4,00 Db	0,36 Ab

217 * Médias seguidas por letras distintas maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas diferem
218 entre si ao nível de 5% de propabilidade pelo teste Scott-Knott. Os dados foram transformados
219 pela função $\log(x + 1)$.

220

221

222

223

224 5 DISCUSSÃO

225

226 Análises filogenéticas utilizando os métodos de Máxima Parcimônia e
227 Inferência Bayesiana das sequências parciais combinadas dos genes ACT, BT1,
228 BT2 e ITS demonstraram a presença de três grupos nos isolados de
229 *Chrysosporthe* estudados. Neste estudo, *C. cubensis* foi isolado de árvores de *T.*
230 *heteromalla* que ocorrem naturalmente em Minas Gerais na região de Cerrado.
231 A formação de um sub-clado dentro do clado em que o grupo três está inserido,
232 demonstrou maior proximidade filogenética de isolados de *T. heteromalla* à *C.*
233 *cubensis* do que isolados de *Eucalyptus* sp. Wingfield (2003) inferiu que *C.*
234 *cubensis* foi originado na América do Sul a partir da infecção em espécies da
235 família Melastomataceae. Entretanto, não há evidências científicas sobre o
236 centro de origem de *C. cubensis* no país. As análises filogenéticas e
237 morfológicas de *C. cubensis* encontrados nesse estudo foram compatíveis com o
238 trabalho de Gryzenhout et al. (2004).

239 O isolados CE3, CE34, CE37, CE38, CE45, CT5 e CT6, formaram o
240 grupo 2 juntamente com a espécie *C. doradensis* com valor de *bootstrap*
241 relativamente alto (88%), confirmando a ocorrência desta espécie no Brasil, até
242 o momento relatada apenas no Equador. Não houve especificidade por
243 hospedeiro para os isolados que agruparam com *C. doradensis*, uma vez que no
244 grupo 2 há isolados de *T. granulosa* e *Eucalyptus* sp. Gryzenhout et al. (2005)
245 ao descrever *C. doradensis*, observou que a característica morfológica mais
246 pronunciada suportando a distinção filogenética dos isolados do Equador está
247 relacionada a forma dos conídios e na diferença de coloração na massa de
248 esporos, distinta de outras espécies. Neste estudo, os isolados do grupo 2
249 apresentaram similaridades nas dimensões dos ascos, ascósporos, conídios e
250 conidióforos daquelas descritas para *C. doradensis*.

251 Entretanto não se sabe se *C. doradensis* é nativo também do Brasil. A
252 utilização indiscriminada de clones de eucalipto provenientes de regiões
253 produtoras distintas no Brasil auxilia no aumento da variabilidade genética do
254 fungo, uma vez que alteram as condições climáticas em que o patógeno foi
255 inserido. Isto pode explicar a presença de nucleotídeos polimórficos verificados
256 nestes isolados que agruparam com *C. doradensis*. Nesse estudo, verificou-se
257 que não existe especificidade por hospedeiro ou separação de acordo com a
258 origem de coleta para os isolados pertencentes ao grupo 2, pois isolados
259 coletados no mesmo local e no mesmo hospedeiro agruparam em clados
260 distintos.

261 Considerando as três regiões concatenadas, verificou-se a formação de
262 um clado distinto para os isolados de *T. granulosa* da região de São João Del Rei
263 e Tiradentes, MG. O alto valor *bootstrap* e as características morfológicas
264 diferenciaram das espécies estudadas. As medidas equivalentes aos conídios e
265 conidióforos do isolado representativo de *T. granulosa* do grupo 3 diferiram
266 daquelas descrita para a espécie *C. cubensis* e outras espécies de *Chrysosporthe*,

A característica morfológica mais pronunciada para o grupo 1 está relacionada ao tamanho de conídios e conidióforos, que apresentaram dimensões menores de todas as espécies de *Chrysoporthe* descritas na literatura. Nesse grupo constatou-se a presença de cinco nucleotídeos polimórficos ausentes em outras espécies de *Chrysoporthe* e nos grupos 2 e 3. Gryzenhout et al (2004) observou que isolados de *Tibouchina* spp. da Colômbia previamente tratados como *C. cubensis* agruparam separadamente de outros grupos filogenéticos. Foi observado o clado representado pelo grupo 1, provavelmente uma nova espécie, apresentou cinco nucleotídeos polimórficos nas regiões ITS e β -tubulina que não ocorriam nos demais isolados estudados. Para tanto, foi descrito um gênero anamorfo para acomodar este fungo, denominado como *Chrysoporthella hodgesiana*.

Neste estudo, houve a formação de um clado distinto dos isolados do grupo 3 e 2 baseado nas análises filogenéticas e nas características morfológicas, que se distinguiram ligeiramente no tamanho de conídios e conidióforos. Tal clado provavelmente trata-se de uma nova espécie de *Chrysoporthe* ainda não relatada. A região ITS não foi suficiente para discriminar a formação do grupo 1 e grupo 2, presente apenas nas análises das regiões β -tubulina e actina.

Os resultados obtidos no teste de inoculação cruzada mostraram que isolados de quaresmeira são capazes de infectar eucalipto e vice versa, confirmando que não existe especificidade por hospedeiro (Wingfield, 2003; Woolhouse et al., 2005). Van der Merwe et al. (2013) discutiram que a infecção cruzada pode ser uma eficiente estratégia em espécies de *Chrysoporthe cubensis* para acelerar a infecção em diferentes genótipos, ou diferentes hospedeiros, sem perder sua infectividade ao longo do tempo.

Quanto à reação dos clones de eucalipto às duas espécies de *Chrysoporthe*, foi possível observar que houve diferença nas respostas dos clones após inoculação com um período de 75 dias. Observou-se que, em geral,

há correlação entre a velocidade de progresso externo da doença e a infecção no xilema, embora o coeficiente de correlação de *Pearson* tenha sido baixo. Estes resultados concordam com o estudo realizado por Van Zyl et al. (1999), que observaram que clones que demonstraram capacidade de fechamento mais rápida foram considerados os mais resistentes à infecção ao patógeno *C. cubensis*.

Entretanto, ao considerar neste estudo, os clones que não apresentaram correlação entre lesão externa e interna, é possível afirmar que, ainda que haja correlação positiva para alguns tratamentos, o melhor método para avaliar a resistência de clones é através da mensuração do tamanho da lesão interna, uma vez que, no xilema as lesões foram mais extensas, como observado também por Guimarães et al (2010). Além disso, é altamente desejável a busca de métodos mais rápidos e eficientes para avaliar a suscetibilidade de clones de eucalipto à infecção de *Chrysoporthe*.

Os isolados utilizados neste estudo para avaliar a patogenicidade de *C. cubensis* e *C. doradensis*, tanto na infecção cruzada como na resistência de clones, demonstraram diferenças no comprimento da lesão. Observou-se maior agressividade do isolado CE6 para a maioria dos tratamentos, em ambos os testes (infecção cruzada e resistência de clones), identificado como *C. cubensis*, espécie altamente patogênica a *Eucalyptus* sp.

O isolado CE38, classificado como *C. doradensis* se mostrou menos agressivo nos testes de patogenicidade nos clones de eucalipto quando comparado ao isolado de *C. cubensis*. Entretanto, em estudos de patogenicidade realizados por Gryzenhout (2005), foi observado que esta espécie foi altamente agressiva a espécies de *E. grandis*. Neste estudo, observou-se que nos clones provenientes do Brasil, a espécie *C. cubensis* é potencialmente mais agressiva que *C. doradensis*.

6 CONCLUSÕES

- Contatou-se a ocorrência de três grupos de *Chrysoporthe* no Brasil, sendo o grupo 1, representado por uma nova espécie, o grupo 2 por *C. doradensis* e o grupo 3 por *C. cubensis*.
- Verificou-se que não houve especificidade por hospedeiro, considerando as duas espécies de *Chrysoporthe* estudadas. A patogenicidade dos isolados testados variou de acordo com os clones de eucalipto e mudas de quaresemira testados.
- Quanto à reação a inoculação, os clones de eucalipto foram classificados como suscetíveis, moderadamente suscetíveis, moderadamente resistentes e resistentes às duas espécies de *Chrysoporthe* testadas.

REFERÊNCIAS

ALFENAS, A. C. et al. **Clonagem e doenças do eucalipto**. 2. ed. Viçosa, MG: UFV, 2009. 500 p.

ALFENAS, A. C.; JENG, R.; HUBBES, M. Virulence of *Cryphonectria cubensis* on *Eucalyptus* species differing in resistance. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 13, p. 179-205, 1983.

BARETTO, R. W.; ROCHA, F. B.; FERREIRA, F. A. First record of natural infection of *Marlierela edulis* by the eucalyptus canker fungus *Chrysosporthe cubensis*. **Plant Pathology**, Loughborough, v. 55, n. 4, p. 577-577, 2006.

BOERBOOM, J. H. A.; MAAS, P. W. T. Canker of *Eucalyptus grandis* and *E. saligna* in Surinam caused by *Endothia havanensis*. **Turrialba**, San José, v. 20, p. 94-99, 1970.

BRUNER, S. C. Una enfermedad gangrenosa de los eucaliptos. **Estación Experimental Agronómica**, Santiago de las Vegas, v. 37, p. 1-33, 1917.

CAMPBELL, C. D.; MADDEN, L. V. **Introduction to plant disease epidemiology**. New York: J. Willey, 1990. 532 p.

CAMPINHOS, E.; IKEMORI, Y. K. Mass production of *Eucalyptus* spp. by rooting cuttings. **Silvicultura**, Rio de Janeiro, v. 8, p. 770-775, 1983.

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

CASTELLANI, A. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. **Journal of Tropical Medicine & Hygiene**, Austin, v. 24, p. 270-276, 1939.

CASTLEBURY, L. A. et al. A preliminary overview of the *Diaporthales* based on large subunit nuclear ribosomal DNA sequences. **Mycologia**, New York, v. 94, n. 6, p. 1017-1031, Nov./Dec. 2002.

CONRADIE, E.; SWART, W. J.; WINGFIELD, M. J. Susceptibility of *Eucalyptus grandis* to *Cryphonectria cubensis*. **European Journal Forest**, New York, v. 22, n. 5, p. 312-315, 1992.

DENOYES, B.; BAUDRY, A. Species identification and pathogenicity study of French *Colletotrichum* strains isolated from strawberry using morphological and cultural characteristics. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 85, n. 1, p. 53-57, 1995.

FERREIRA, F. A. **Patologia florestal: principais doenças florestais no Brasil**. Viçosa, MG: UFV; SIF, 1989. 570 p.

FERREIRA, F. A. et al. Avaliação da resistência de *Eucalyptus* spp ao cancro causado por *Diaporthe cubensis* Bruner. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 2, p. 225-241, 1977.

FERREIRA, A. F.; MILANI, D. Avaliação de resistência de clones de Eucalipto às infecções naturais de *Cryphonectria cubensis*, com nova metodologia. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 28, n. 2, p. 313-316, mar./abr. 2004.

FURTADO, E. L. et al. Caracterização morfológica, patogênica, e isoenzimática de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* de seringueira. **Summa Phytopathologia**, Botucatu, v. 25, n. 2, p. 222-227, abr./jun. 1999.

GLASS, N. L.; DONALDSON, G. C. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, p. 1323-1330, 1995.

GUIMARÃES, L. M. S. et al. Genetic control of *Eucalyptus urophylla* and *E. grandis* resistance to canker caused by *Chrysosporthe cubensis*. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 33, n. 3, p. 525-531, July 2010.

GRYZENHOUT, M. et al. *Chrysosporthe*, a new genus to accommodate *Chryphonectria cubensis*. **Studies in Mycology**, Berlin, v. 50, p. 119-142, 2004.

GRYZENHOUT, M. et al. *Chrysosporthe doradensis* sp. nov. pathogenic to *Eucalyptus* in Ecuador. **Fungal Diversity**, Hong Kong, v. 20, n. 2, p. 39-57, Mar. 2005.

GRYZENHOUT, M. et al. Novel hosts of the *Eucalyptus* canker pathogen *Chrysosporthe cubensis* and a new *Chrysosporthe* species from Colombia. **Mycological Research**, Cambridge, v. 110, n. 7, p. 833-845, July 2006.

GRYZENHOUT, M.; WINGFIELD, B. D.; WINGFIELD, M. J. **Taxonomy, phylogeny, and ecology of bark-infecting and tree killing fungi in the Cryphonectriaceae**. Saint Paul: American Phytopathological Society Press, 2009. Disponível em: <<http://treebase.org/treebase-web/search/study/summary.html?id=2011>>. Acesso em: 10 mar. 2015.

HEERDEN, S. W. van et al. Characterization of South African *Cryphonectria cubensis* isolates infected with a *C. parasitica* hypovirus. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 91, n. 7, p. 628-632, July 2001.

HEERDEN, S. W. van et al. Relative pathogenicity of *Chryphonectria cubensis* on *Eucalyptus* clones differing in their resistance to *c. cubensis*. **Plant Disease**, Quebec, v. 89, n. 6, p. 659-662, June 2005.

HEERDEN, S. W. van; WINGFIELD, M. J. Effect of environment on the response of *Eucalyptus* clones to inoculation with *Cryphonectria cubensis*. **Forest Pathology**, Hamburg, v. 32, p. 395-402, 2002.

HEPPERLE, D. **SeqAssem**[®]: a sequence analysis tool contig assembler and trace data visualization tool for molecular sequences. Win32-Version. 2004. Acesso em: <<http://www.sequentix.de>>. Acesso em: 10 mar. 2015.

HODGES, C. S. The taxonomy of *Diaporthe cubensis*. **Mycologia**, New York, v. 72, p. 542-548, 1980.

HODGES, C. S. et al. O cancro do eucalipto causado por *Diaporthe cubensis*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 1, p. 129-170, 1976.

HODGES, C. S.; GEARY, T. F.; CORDELL, C. E. The occurrence of *Diaporthe cubensis* on *Eucalyptus* in Florida, Hawaii and Puerto Rico. **Plant Disease Reporter**, Washington, v. 63, p. 216-220, 1979.

MERWE, N. A. van der et al. Host switching between native and non-native trees in a population of the canker pathogen *Chrysosporthe cubensis* from Colombia. **Plant Pathology**, Honolulu, v. 62, n. 5, p. 642-648, 2013.

MERWE, N. A. van der et al. Multigene phylogenetic and population differentiation data confirm the existence of a cryptic species within *Chrysosporthe cubensis*. **Fungal Biology**, Oxford, v. 114, n. 11/12, p. 966-979, Nov./Dec. 2010.

MUNIZ, M. F. S.; SANTOS, R. C. R.; BARBOSA, G. V. S. Patogenicidade de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* sobre algumas plantas frutíferas. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 24, n. 2, p. 177-179, 1998.

MYBURG, H. et al. A reassessment of the fungal genera *Cryphonectria* and *Endothia* based on DNA sequence data. **Mycologia**, New York, v. 96, p. 990-1001, 2004.

NAKABONGE, G. et al. *Celoporthe dispersa* gen. et sp. Nov. from native Myrtales in South Africa. **Studies in Mycology**, Berlin, v. 55, p. 255-267, 2006.

NICOLAAS, A. et al. Wingfield, multigene phylogenetic and population differentiation data confirm the existence of a cryptic species within *Chrysosporthe cubensis*. **Fungal Biology**, Oxford, v. 114, p. 11-12, 2010.

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 Natural Academy of Sciences**, Boston, v. 95, n. 5, p. 2044-2049, 1998.

PERES, A. P. et al. Variabilidade morfo-cultural e genética de fungos associados à podridão peduncular do mamão. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 5, p. 1053-1062, set./out. 2003.

RODAS, C. A. et al. Discovery of the *Eucalyptus* canker pathogen *Chrysosporthe cubensis* on native *Miconia* (Melastomataceae) in Colombia. **Plant Pathology**, Honolulu, v. 54, n. 4, p. 460-470, Aug. 2005.

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

ROUX, J. et al. Diseases of plantation forestry tree species in eastern and southern Africa. **South African Journal of Science**, Johannesburg, v. 101, n. 3, p. 409-413, 2005.

SEIXAS, C. D. S. et al. *Cryphonectria cubensis* on an indigenous host in Brazil: a possible origin for eucalyptus canker disease? **Mycologist**, New York, v. 18, n. 1, p. 39-45, Feb. 2004.

SHARMA, J. K.; MOHANAN, C.; FLORENCE, E. J. M. **Disease survey in nurseries and plantations of forest tree species grown in Kerala**: research report. Kerala: Kerala Forest Research Institute, 1985. 268 p.

SWOFFORD, D. L. **PAUP* phylogenetic analyses using Parsimony**: and other methods. Version 4,0 beta. Duke: Duke University, 2002.

THOMPSON, J. D. et al. Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 22, n. 22, p. 4673-4680, Nov. 1994.

WHITE, T. J. et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenies. In: INNES, M. A. et al. (Ed.). **PCR protocols: a guide to methods and applications**. San Diego: Academic, 1990. p. 315-322.

WINGFIELD, M. J. Current status and future prospects of forest pathology in South Africa. **South African Journal of Science**, Johannesburg, v. 86, n. 2, p. 60-62, 1990.

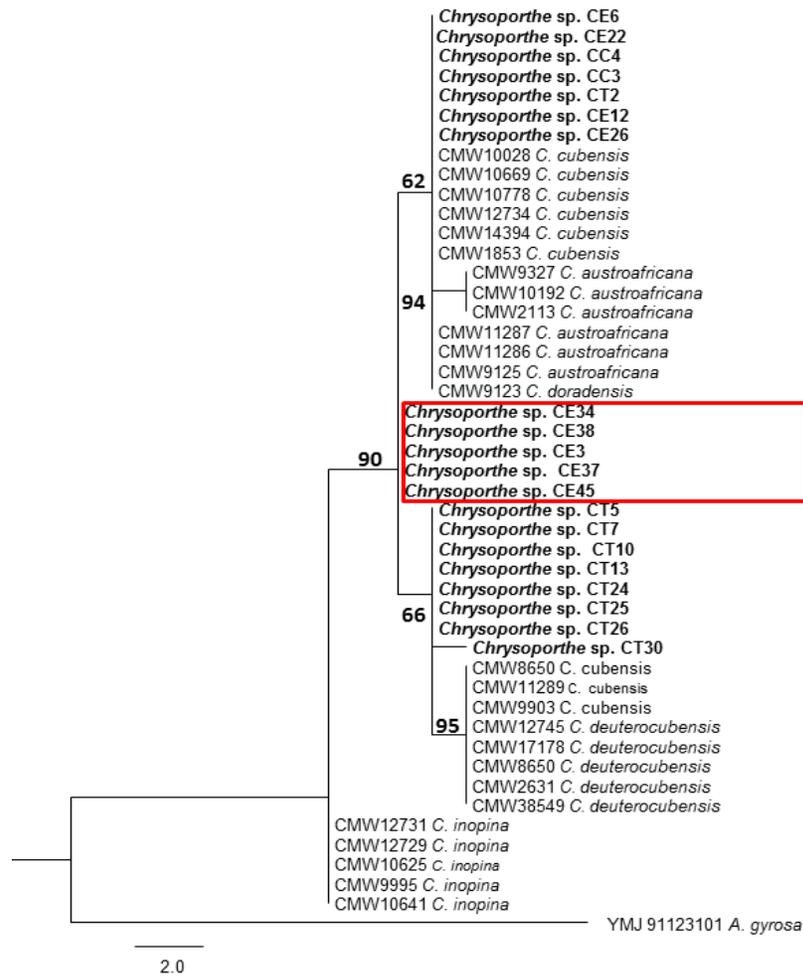
WINGFIELD, M. J. Daniel McAlpine memorial lecture: increasing threat of diseases to exotic plantation forests in the Southern Hemisphere: lessons from *Chryphonectria* canker on *Tibouchina* in Colombia. **Forest Pathology**, New York, v. 32, n. 2, p. 133-139, 2003.

WOOLHOUSE, M. E. J.; HAYDON, D. T.; ANTIA, R. Emerging pathogens: the epidemiology and evolution of species jumps. **Trends in Ecology and Evolution**, Amsterdam, v. 20, n. 5, p. 238-244, May 2005.

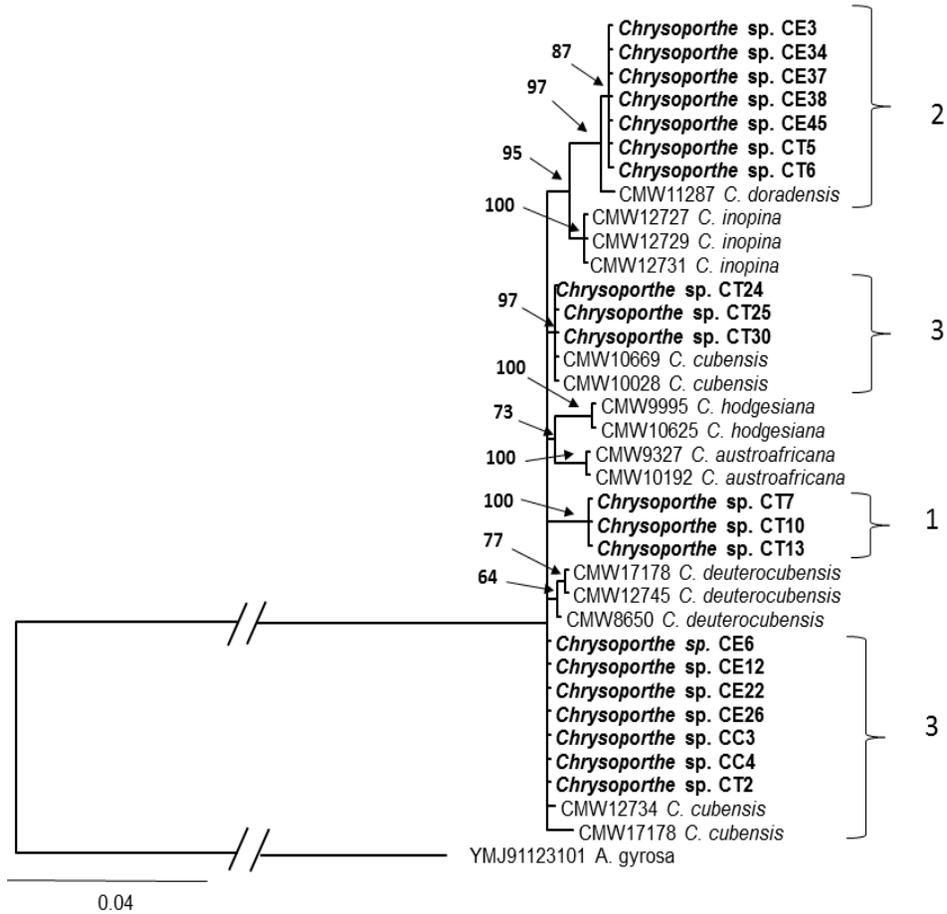
ZHANG, N.; BLACKWELL, M. Molecular phylogeny of dogwood anthracnose fungus (*Discula destructiva*) and the Diaporthales. **Mycologia**, New York, v. 93, n. 2, p. 355-365, Mar./Apr. 2001.

ZYL, L. M. van; WINGFIELD, M. J. Wound response of *Eucalyptus* clones after inoculation with *Cryphonectria cubensis*. **European Journal Forest**, New York, v. 29, n. 2, p. 161-167, 1999.

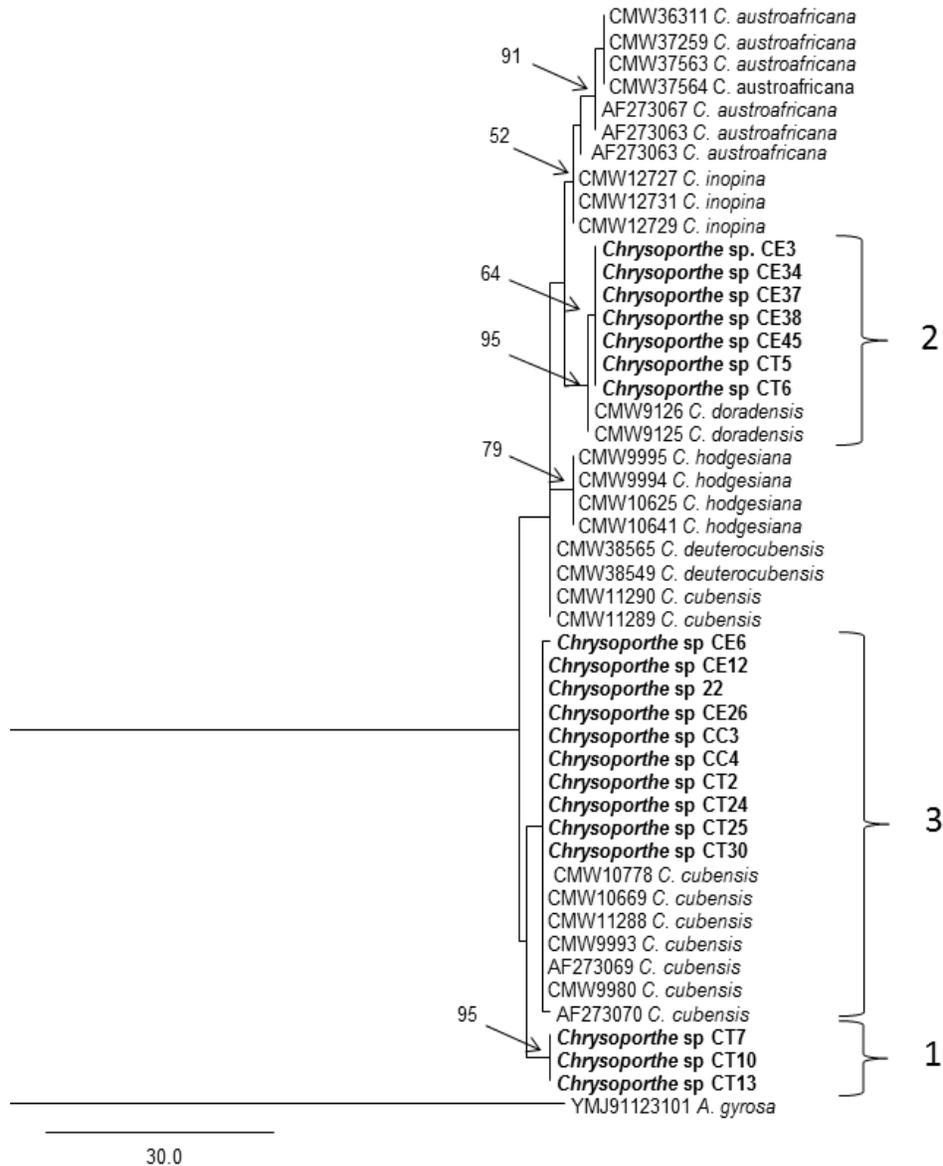
ANEXOS



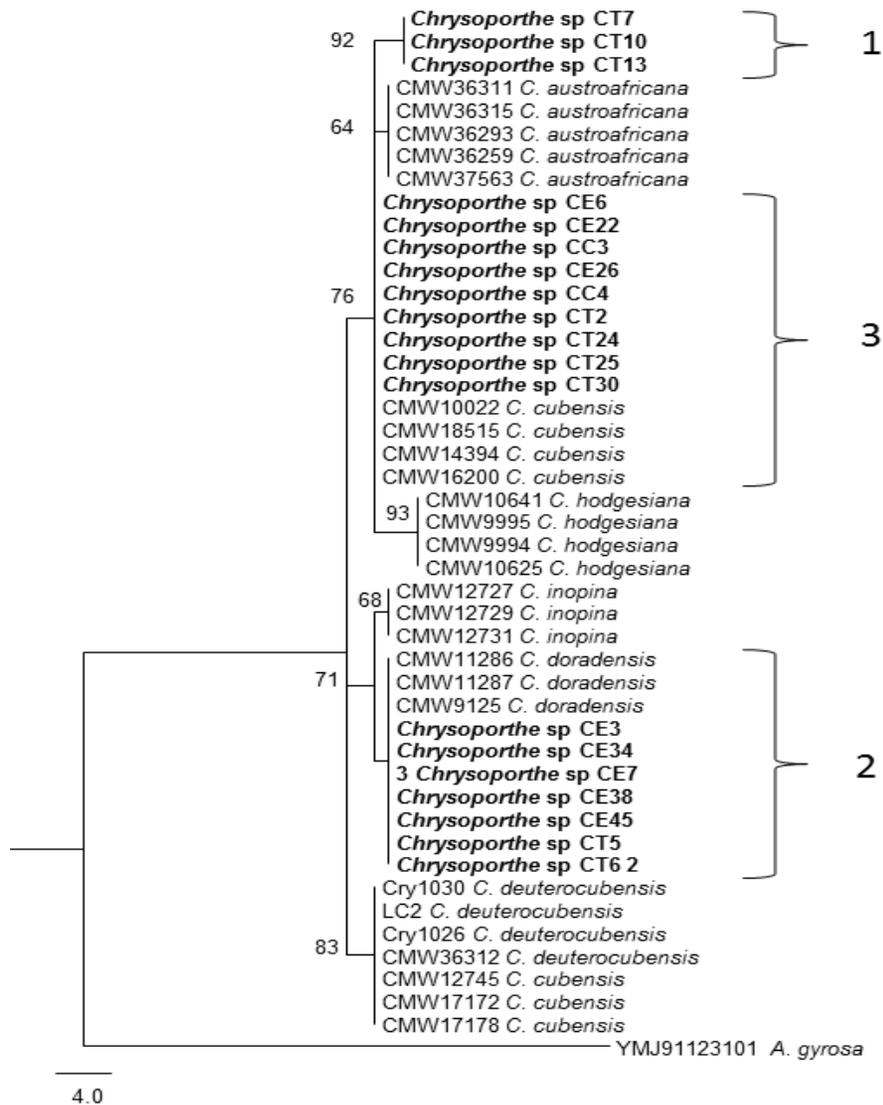
Anexo A. Árvore filogenética gerada pela análise de inferência Bayesiana do gene ITS. Isolados em negrito foram sequenciados neste estudo. Caixa vermelha representa um agrupamento irresolúvel. Os valores de probabilidade posterior (PP) são indicados em porcentagem acima e abaixo dos internódios. Árvore gerada demonstra infeficácia da região ITS em discriminar grupos e espécies de *Chrysoporthe*. *Amphilogia gyrosa* foi definido como *outgroup*.



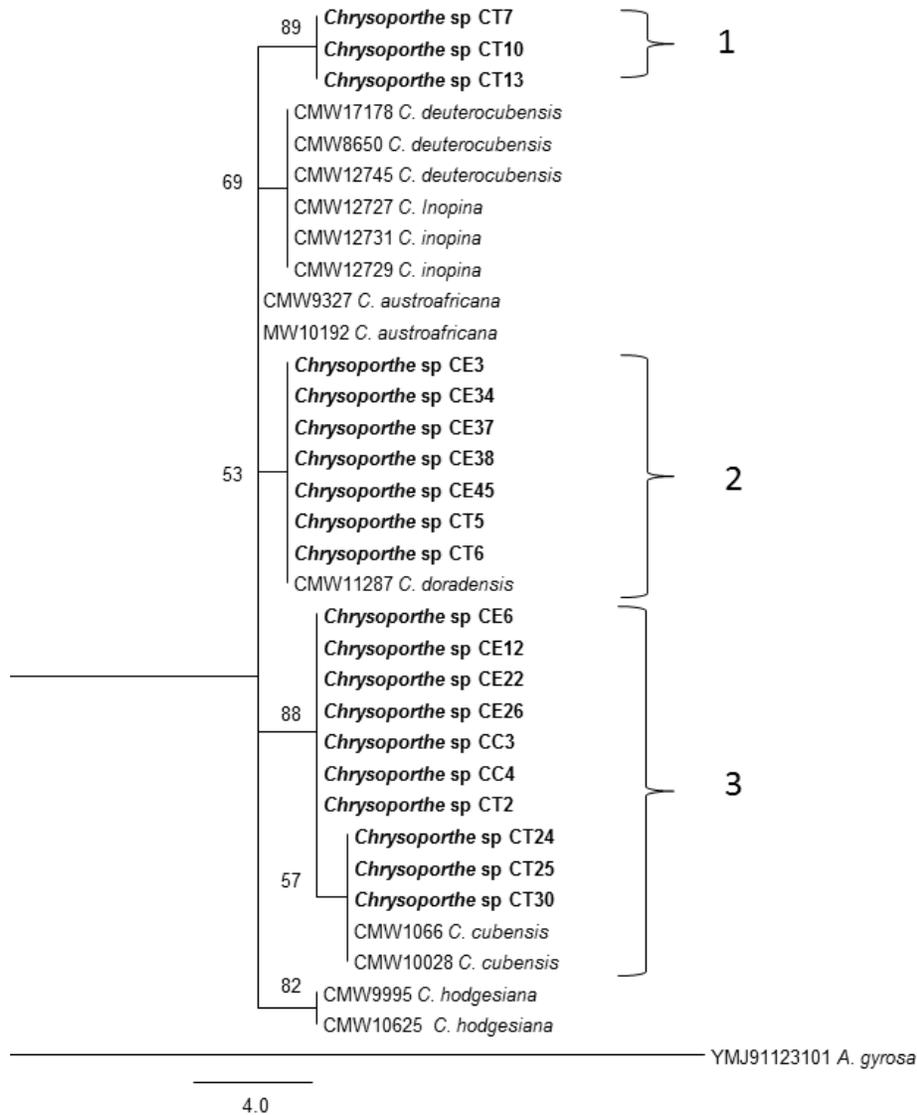
Anexo B. Árvore de consenso derivada da análise bayesiana dos dados combinados das regiões ACT, BT1 e BT2. Isolados em negrito foram sequenciados neste estudo. Número acima ou abaixo dos ramos são as probabilidades posteriores, que servem de suporte aos clados. *Amphilogia gyrosa* foi definido como *outgroup*.



Anexo C-1. Árvore filogenética gerada pela análise de Máxima Parcimônia do gene BT1. Isolados em negrito foram sequenciados neste estudo. Os valores de *bootstrap* (>50%) dos clados são mostrados acima ou abaixo dos ramos. *Amphilogia gyrosa* foi definido como *outgroup*.



Anexo C-2. Árvore filogenética gerada pela análise de Máxima Parcimônia do gene BT2. Isolados em negrito foram sequenciados neste estudo. Os valores de *bootstrap* (>50%) dos clados são mostrados acima ou abaixo dos ramos. *Amphilogia gyrosa* foi definido como *outgroup*.



Anexo C-3. Árvore filogenética gerada pela análise de Máxima Parcimônia do gene ACT. Isolados em negrito foram sequenciados neste estudo. Os valores de *bootstrap* (>50%) dos clados são mostrados acima ou abaixo dos ramos. *Amphilogia gyrosa* foi definido como *outgroup*.