



GLÁUCIA MARA MOREIRA

**CARACTERIZAÇÃO DE ESPÉCIES DE
Clonostachys E AVALIAÇÃO DO PARASITISMO
A *Botrytis cinerea***

LAVRAS – MG

2012

GLÁUCIA MARA MOREIRA

**CARACTERIZAÇÃO DE ESPÉCIES DE *Clonostachys* E AVALIAÇÃO
DO PARASITISMO A *Botrytis cinerea***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador

Dr. Ludwig Heinrich Pfenning

Coorientador

Dr. Lucas Magalhães de Abreu

LAVRAS – MG

2012

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca da UFLA**

Moreira, Gláucia Mara.

Caracterização de espécies de *Clonostachys* e avaliação do parasitismo a *Botrytis cinerea* / Gláucia Mara Moreira. – Lavras : UFLA, 2012.

83 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2012.

Orientador: Ludwig Heinrich Pfenning.

Bibliografia.

1. Ascomycota. 2. *Bionectria*. 3. Controle biológico. 4. Filogenia molecular. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 589.23

GLÁUCIA MARA MOREIRA

**CARACTERIZAÇÃO DE ESPÉCIES DE *Clonostachys* E AVALIAÇÃO
DO PARASITISMO A *Botrytis cinerea***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 17 de fevereiro de 2012.

Dr. Lucas Magalhães de Abreu UFLA

Dr. Eduardo Alves UFLA

Dr. Flávio Henrique Vasconcelos de Medeiros UFLA

Orientador

Dr. Ludwig Heinrich Pfenning

LAVRAS – MG

2012

*Aos meus pais, Sebastião Elco Moreira (in memoriam) e Maria Aparecida
Moreira*

Às minhas irmãs, Renata e Vanessa

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre guiar meus passos, me iluminar nas minhas escolhas e me dar forças para prosseguir quando os obstáculos surgiram.

À Universidade Federal de Lavras, em especial ao programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, meus colegas de curso e todos os professores, e à CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

Ao meu orientador, Prof. Ludwig H. Pfenning, por ter me confiado este projeto, pela orientação e disponibilidade.

Ao meu coorientador, Dr. Lucas Magalhães de Abreu, por estar sempre à disposição quando precisei e pela grande ajuda na execução deste trabalho.

Aos professores Dr. Eduardo Alves e Dr. Flávio Henrique Vasconcelos de Medeiros, que se dispuseram a participar da banca, pela grande contribuição.

À minha mãe, que não mediu esforços para que eu prosseguisse com meus estudos, sempre com confiança e apoio, não deixando nunca que nada me faltasse. Às minhas irmãs queridas, pelo amor, companheirismo e alegria.

Ao Maurício, pelo amor, paciência, conselhos, apoio e ajuda em tudo que preciso, compartilhando comigo todos os momentos, de alegria, de dúvidas e de dificuldades.

A todos os amigos do Laboratório de Sistemática e Ecologia de Fungos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho e que proporcionaram muitos momentos de descontração. A Ana Clarice e a Elismara, pela imensa ajuda. Agradeço especialmente às grandes amigas Virgínia Elizei, Aline Vaz, Simone Ribeiro e Dayana Botrel, que sempre estiveram ao meu lado. Também agradeço à amiga Dra. Sarah Costa Guimarães, pela importante ajuda na condução deste trabalho.

RESUMO

Os objetivos deste trabalho foram caracterizar e identificar 44 isolados do gênero *Clonostachys* obtidos de diferentes substratos e locais no Brasil, utilizando marcadores morfológicos e filogenia, e avaliar a habilidade das diferentes espécies de *Clonostachys* em parasitar *Botrytis cinerea* *in vitro*. Os isolados foram cultivados em BDA, CMD e OA para avaliação das características morfológicas. Análises filogenéticas foram realizadas baseadas em sequências parciais dos genes β -tubulina e rDNA (ITS, 28S) através dos métodos *neighbor joining* e máxima parcimônia. Os 44 isolados foram identificados como *C. byssicola*, *C. candelabrum*, *C. grammicospora*, *C. pseudochroleuca*, *C. rhizophaga*, *C. rogersoniana*, *C. rosea* f. *catenulata*, *C. rosea* f. *rosea*, *C. rossmaniae* e *C. setosa*. As árvores filogenéticas geradas a partir de sequências de β -tubulina confirmaram a delimitação das espécies baseada em marcadores morfológicos, sendo que a região do rDNA apresentou menor capacidade de distinção entre espécies próximas. As espécies *C. byssicola*, *C. pseudochroleuca*, *C. rhizophaga* e *C. rosea* f. *rosea* compartilham características morfológicas semelhantes. Nesses casos a análise filogenética deu importante suporte à identificação. Os isolados identificados como *C. rosea* f. *catenulata* com base em caracteres morfológicos formaram um clado distinto de *C. rosea* f. *rosea* e de espécies próximas, e provavelmente representam uma espécie distinta. O isolado único CML1910, identificado como *C. grammicospora*, agrupou com a sequência de referência para esta espécie, entretanto sem suporte estatístico. A avaliação da capacidade de *Clonostachys* spp. de parasitar *B. cinerea* foi realizada através do pareamento de culturas em placas de Petri. Em um ensaio, foram colocadas tiras de papel celofane entre as culturas do patógeno e antagonista, posteriormente retiradas para a visualização de interações entre hifas sob microscópio de luz. Em outro ensaio, o crescimento do antagonista sobre o patógeno foi observado diretamente em placa de Petri. As interações entre hifas também foram observadas sob microscópio eletrônico de varredura, utilizando fragmentos retirados da área de interação entre um isolado de *C. byssicola* e *B. cinerea* em placa de Petri e entre *C. rosea* f. *rosea* e *B. cinerea* inoculados em folhas destacadas de morango. Foi observado que todas as espécies utilizadas neste estudo parasitaram hifas de *B. cinerea*. O gênero *Clonostachys* é representado por várias espécies no Brasil, sendo a utilização de análises filogenéticas valiosa ferramenta para a sua delimitação. Todas as espécies de *Clonostachys* avaliadas são potenciais agentes de controle biológico contra *B. cinerea*.

Palavras-chave: Ascomycota. *Bionectria*. Controle biológico. Filogenia molecular.

ABSTRACT

The objectives of this study were to characterize and identify 44 isolates of *Clonostachys* obtained from different substrates and sites in Brazil, using morphological markers and phylogeny, and to evaluate the ability of different *Clonostachys* species in parasitizing *Botrytis cinerea* *in vitro*. Strains were grown on PDA, CMD, and OA for the evaluation of morphological markers. Phylogenetic analyses were performed based on partial sequences of β -tubulin gene and nuclear rDNA (ITS and 28S) using Neighbor Joining and Maximum Parsimony methods. The 44 isolates were identified as *C. byssicola*, *C. candelabrum*, *C. grammicospora*, *C. pseudochroleuca*, *C. rhizophaga*, *C. rogersoniana*, *C. rosea* f. *catenulata* and *C. rosea* f. *rosea*, *C. rossmaniae* and *C. setosa*. The phylogenetic tree generated from β -tubulin sequences allowed clear distinction of species, while regions of rDNA showed less resolution power. *C. byssicola*, *C. pseudochroleuca*, *C. rhizophaga* and *C. rosea* f. *rosea* exhibited very similar morphological traits, but their distinction was facilitated by phylogenetic analyzes. Strains identified as *C. rosea* f. *catenulata* based on morphological characters formed a clade distinct from *C. rosea* f. *rosea* and related species, and may represent a distinct species. The single strain CML1910, identified as *C. grammicospora*, grouped with the reference sequence for this species, but without statistical support. The parasitism assays between *Clonostachys* spp. and *B. cinerea* were performed using the pairing of cultures in Petri dishes. Cellophane strips were placed between the cultures of the pathogen and antagonist, and later removed for the visualization of interactions between hyphae under light microscope. In another experiment, the growth of the antagonist on the pathogen was observed directly in Petri dishes. Interactions among hyphae were also observed under scanning electron microscope, using fragments removed from the area of interaction between an isolate of *C. byssicola* and *B. cinerea* on Petri dishes and between *C. rosea* f. *rosea* and *B. cinerea* inoculated on detached leaves of strawberry. It was observed that all *Clonostachys* species used in this study were parasites of *B. cinerea*. Thus, the genus *Clonostachys* has diversity in Brazil, requiring the use of phylogenetic analysis to delimit their species. All species of *Clonostachys* evaluated are potential biological control agents against *B. cinerea*.

Keywords: Ascomycota. Biological Control. *Bionectria*. Molecular phylogeny.

SUMÁRIO

	CAPÍTULO 1 Caracterização de espécies de <i>Clonostachys</i> e avaliação do parasitismo a <i>Botrytis cinerea</i>	9
1	INTRODUÇÃO	9
2	REFERENCIAL TEÓRICO	12
2.1	Histórico	12
2.1.1	Família bionectriaceae e gênero <i>Bionectria</i>	12
2.1.2	O gênero <i>Clonostachys</i>	14
2.1.3	<i>Clonostachys x Gliocladium</i>	15
2.2	Conceitos de espécie em fungos	16
2.3	Métodos de obtenção de árvores filogenéticas	18
2.4	Controle biológico	19
2.5	<i>Clonostachys rosea</i> como agente de controle biológico	21
	REFERÊNCIAS	25
	CAPÍTULO 2 Caracterização e identificação de espécies de <i>Clonostachys</i> de diferentes regiões brasileiras	29
1	INTRODUÇÃO	30
2	MATERIAL E MÉTODOS	31
2.1	Caracterização morfológica e identificação	31
2.2	Obtenção de culturas monospóricas	32
2.3	Extração de DNA	32
2.4	PCR, sequenciamento e análises filogenéticas	34
3	RESULTADOS	36
3.1	Caracterização morfológica	36
3.2	Análises filogenéticas	49
4	DISCUSSÃO	53
5	CONCLUSÕES	58
	REFERÊNCIAS	59
	CAPÍTULO 3 Avaliação de micoparasitismo entre espécies do gênero <i>Clonostachys</i> e <i>Botrytis cinerea</i>	61
1	INTRODUÇÃO	62
2	MATERIAL E MÉTODOS	63
2.1	Testes de parasitismo	63
2.2	Microscopia eletrônica de varredura	64
3	RESULTADOS	67
3.1	Avaliação do micoparasitismo	67
4	DISCUSSÃO	71
5	CONCLUSÃO	73
	REFERÊNCIAS	74
	APÊNDICES	76

CAPÍTULO 1

Caracterização de espécies de *Clonostachys* e avaliação do parasitismo a *Botrytis cinerea*

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Clonostachys* foi descrito por Corda em 1839, com a espécie tipo *C. araucaria*, caracterizada por conidióforo penicilado e conídios em cadeias. Por muito tempo esteve mesclado com o gênero *Gliocladium* sendo considerados como sinônimos. Posteriormente, aumentaram as evidências de que se tratava de dois gêneros distintos, baseado em estudos sobre características morfológicas e moleculares. O teleomorfo de *Clonostachys* é conhecido como *Bionectria* (SCHROERS, 2001; SCHROERS et al., 1999).

As espécies de *Clonostachys* (Bionectriaceae, Hypocreales, Ascomycota), comumente encontradas no solo e em restos de plantas, tanto em regiões de clima temperado como tropical, são caracterizadas por geralmente apresentar dois tipos de conidióforos, um verticilado (primário) e outro penicilado (secundário). Os conídios apresentam formato assimétrico, ligeiramente curvados e arranjados em cadeias, o que é determinado pela sua extrusão lateral a partir das fiálides (DOMSCH; GAMS; ANDERSON, 2007; SCHROERS, 2001; SCHROERS et al., 1999).

Dentre as espécies de *Clonostachys*, *C. rosea* é a mais bem conhecida, principalmente por sua habilidade em parasitar hifas de outros fungos e sua utilização como agente de controle biológico contra diversos patógenos, em especial *Botrytis cinerea*, causador do mofo cinzento em diversas culturas (CHATTERTON; PUNJA, 2009; COTA et al., 2008, 2009; INNOCENTI et al.,

2003; NOBRE et al., 2005; SILVERA-PÉREZ et al., 2010; SUTTON et al., 1997).

A proposta do presente estudo surgiu a partir de uma coleção de aproximadamente 50 isolados de *Clonostachys* depositados na Coleção Micológica de Lavras (CML), no Laboratório de Sistemática e Ecologia de Fungos, Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras. Esses fungos foram obtidos a partir de amostras de solo ou associados a plantas em diferentes regiões do Brasil, correspondentes aos biomas Amazônia, Cerrado e Mata Atlântica, como parte de trabalhos envolvendo diversidade de fungos de solo e endófitos.

Com base nos conhecimentos adquiridos sobre as características e os modos de interação para o controle de *Botrytis cinerea*, além da coleção de isolados de *Clonostachys* obtidos de diversos substratos e locais no Brasil, surgiram as seguintes questões: a) há diversidade de espécies de *Clonostachys* no Brasil? b) existem espécies novas no país? c) outras espécies do gênero *Clonostachys*, além de *C. rosea*, apresentam atividade antagônica contra *Botrytis cinerea*?

A partir destas questões foram delineadas as seguintes hipóteses para o desenvolvimento deste trabalho: a) existe uma grande diversidade de espécies e formas do gênero *Clonostachys* no Brasil e b) outras espécies do gênero *Clonostachys*, além de *C. rosea*, apresentam atividade antagônica contra *Botrytis cinerea*. Portanto, este estudo foi realizado com o objetivo geral de caracterizar, identificar e avaliar o potencial antagônico de isolados de *Clonostachys* obtidos de diversos substratos e locais no Brasil.

Esta dissertação está dividida em três capítulos. Neste primeiro capítulo faz-se um referencial teórico, com referência à história e as características do gênero *Clonostachys* e seu teleomorfo *Bionectria*, os conceitos de espécies em fungos e os métodos de obtenção de árvores filogenéticas. Em seguida,

discutem-se as características e as vantagens da utilização do controle biológico e o uso de espécies de *Clonostachys* como agentes de biocontrole. O segundo capítulo refere-se à caracterização, identificação e filogenia de isolados do gênero *Clonostachys*, enquanto o terceiro descreve a avaliação desses isolados como parasitas de *B. cinerea*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Histórico

2.1.1 Família Bionectriaceae e gênero *Bionectria*

O gênero *Bionectria* foi proposto por Spegazzini, em 1919, baseado em caracteres e estilo de vida de uma única espécie, *B. tonduzii*. Anos após esta descrição foi assumido o parentesco deste gênero a espécies de *Nectria* (SCHROERS, 2001; HIROOKA, KOBAYASHI, 2007). Rossman et al. (1999), baseando-se em estudos morfológicos e moleculares, estabeleceram uma nova família em Hypocreales, denominada Bionectriaceae, tipificada por *Bionectria*, na qual pertencem muitas espécies inicialmente descritas como *Nectria*. Dessa forma, assim como *Bionectria*, outros gêneros tratados anteriormente como sinônimas de *Nectria* foram recuperados.

Os fungos pertencentes à família Bionectriaceae são caracterizados por apresentar peritécios amarelos, brancos ou laranja para marrom, com crescimento superficial ou imerso no substrato. Quando tratados com solução de KOH e ácido láctico não mudam de coloração. Apresentam ascos cilíndricos a clavados, com ascósporos septados ou não, apresentando superfície espinhosa, verrucosa a estriada ou lisa (LUO; ZHUANG, 2010; ROSSMAN et al., 1999).

Os anamorfos de Bionectriaceae pertencem aos gêneros *Acremonium* Link, *Clonostachys* Corda, *Didymostilbe* Henn., *Gliocladium*-like, *Gracilistibella* Seifert, *Kutilakesa* Subram., *Myrothecium*-like, *Rhopalocladium* Schroers, *Stilbella*-like e *Verticillium*-like (LUO; ZHUANG, 2010).

Bionectria forma um grupo monofilético dentro de Bionectriaceae, a partir de análises moleculares baseadas em sequências da grande subunidade do DNA ribossômico (LSU rDNA) (ROSSMAN et al., 2001; SCHROERS, 2000),

parentesco este que também é indicado pelo estilo de vida e pelos caracteres dos anamorfos (SCHROERS, 2001).

O gênero *Bionectria*, que tem o anamorfo classificado em *Clonostachys*, apresenta caracteres típicos que o diferenciam dos demais, como estroma erumpente bem desenvolvido em cascas de árvores recentemente mortas, sobre o qual há a formação de peritécios agrupados, que são laranjas a laranja-amarronzados, quando lisos ou amarelo-claros ou quase brancos, se verrucosos. A parede dos peritécios consiste de três regiões distintas e seus ascósporos são verrucosos, com um septo. As cadeias de conídios formadas pelo anamorfo são únicas dentro de Bionectriaceae (SCHROERS, 2000, 2001).

Para uma revisão do gênero *Bionectria/Clonostachys*, Schroers (2001) utilizou isolados obtidos a partir de conídios e ascósporos e espécimes de herbário, fazendo identificação das espécies para correlacionar os anamorfos aos teleomorfos, comparando os isolados com os tipos das espécies e dados de trabalhos anteriormente publicados. Além disso, realizou análises filogenéticas utilizando sequências do DNA ribossômico (rDNA) e gene β -tubulina (*tub2*).

Dessa forma, Schroers (2001) dividiu o gênero *Bionectria* em seis subgêneros, com base nas características morfológicas do estroma, peritécio e ascósporos e a partir dos dados filogenéticos. São eles: *Bionectria*, *Zebrinella*, *Astromata*, *Myronectria*, *Epiphloea* e *Uniparietina*. Além disso, classificou as 36 espécies de *Bionectria* destas, 35 com seu anamorfo *Clonostachys* e 8 táxons *Clonostachys*, baseado em dados morfológicos e nas sequências da região ITS do rDNA e do gene *tub2*. Posteriormente, a espécie *B. pseudostriatopsis*, com seu anamorfo *C. pseudostriatopsis*, foi descrita no Japão (HIROOKA; KOBAYASHI, 2007) e o teleomorfo *B. intermedia* foi descrito na China (LUO; ZHUANG, 2010).

2.1.2 O gênero *Clonostachys*

As espécies de *Clonostachys* são caracterizadas por apresentar conidióforos penicilados que podem ser formados em esporodóquio. Seus conídios têm formato assimétrico, ligeiramente curvado e são arranjados em cadeias, o que é determinado pela sua extrusão lateral a partir das fiálides. Podem apresentar massa de conídios de coloração branca, laranja-clara ou verde e, muitas vezes, formam conidióforos dimórficos, chamados de primários (verticilados) e secundários (penicilados), sendo os últimos diferentemente expressos. Pela variação na formação de conidióforos, muitas espécies foram classificadas em outros gêneros com morfologia similar (SCHROERS, 2001; SCHROERS et al., 1999).

No gênero *Clonostachys* as espécies são saprófitas, parasitas, entomopagênicas ou liquenícolas. Nenhuma das espécies é fitopatogênica (SCHROERS, 2001; SUTTON et al., 1997; TOLEDO et al., 2006). São encontradas em florestas, solos cultivados, sedimentos estuarinos ou solos de deserto, tanto em regiões de clima temperado como tropical (DOMSCH; GAMS; ANDERSON, 2007; ROSSMAN, 1996).

Pode-se observar uma considerável plasticidade dos marcadores morfológicos dentro do gênero, o que dificulta a delimitação de espécies, como no padrão de ramificação dos conidióforos primários e secundários, formação de esporodóquio, frequência de fiálides intercalares, tamanho coincidente de conídios, taxa de crescimento e caracteres macroscópicos, como a pigmentação da colônia (SCHROERS, 2001).

2.1.3 *Clonostachys* x *Gliocladium*

O gênero *Clonostachys* foi descrito por Corda, em 1839, com a espécie tipo *Clonostachys araucaria*, caracterizada por conidióforo penicilado e conídios em cadeias. Em 1907, Bainier descreveu a espécie *Gliocladium roseum* sem fazer referência e nenhum outro autor ou, mesmo, a outro epíteto, apenas pela observação da formação de dois tipos de conidióforos, o verticilado e o penicilado. Em 1930, Thom, reconheceu que *C. araucaria* estava relacionado com *G. roseum*. *Clonostachys* foi amplamente considerado como sinônimo de *Gliocladium* e o nome *G. roseum* foi, portanto, o utilizado em estudos posteriores (SCHROERS, 2001; SCHROERS et al., 1999).

Rehner e Samuels (1994) realizaram um trabalho sobre a filogenia de *Gliocladium* utilizando a LSU rDNA para estudar a relação filogenética entre *G. virens* e *G. roseum* com a espécie tipo do gênero, *G. penicillioides*, que pareciam não ser congênicas, uma vez que apresentavam caracteres morfológicos distintos. Além disto, outros gêneros apresentavam espécies com características morfológicas de *Gliocladium*. Este estudo confirmou a hipótese de que o gênero *Gliocladium* formava um grupo polifilético, sendo *G. roseum* filogeneticamente distante de *G. penicillioides* e *G. virens*.

Dessa forma, após muito tempo mesclado com o gênero *Gliocladium*, foi estabelecido que *Clonostachys* seria o gênero anamorfo de *Bionectria*, família Bionectriaceae, enquanto as espécies de *Gliocladium* pertenceriam à família Hypocreaceae, sendo anamorfos de *Sphaerostilbella*. Além do fato de pertencerem a diferentes famílias, esta separação se deu também devido a diferentes estilos de vida entre ambos os gêneros e muitas diferenças entre os caracteres morfológicos, destacando a presença de conidióforos geralmente monomórficos, formação de sinêmio e conídios solitários em *Gliocladium*, não

formados em cadeias imbricadas (DOMSCH; GAMS; ANDERSON, 2007; SCHROERS, 2001; SCHROERS et al., 1999).

2.2 Conceitos de espécie em fungos

Os conceitos de espécies utilizados para fungos são o morfológico, o biológico e o filogenético. O conceito de espécie morfológica define espécies como grupos que compartilham características morfológicas e fisiológicas consistentes, diferentes daquelas apresentadas por grupos correlatos. Já o conceito de espécie biológica define grupos de compatibilidade sexual que cruzam entre si e são reprodutivamente isolados de outros grupos. O conceito filogenético define espécies como o menor agrupamento de táxons que possuem um ancestral recente comum e que partilham de diferentes características (fenotípicas e genotípicas) derivadas de tal ancestral, formando grupos monofiléticos (TAYLOR et al., 2000).

O conceito de espécie morfológica é o mais utilizado principalmente para uma classificação inicial, uma vez que, geralmente, pode ser aplicado a qualquer táxon (LESLIE; SUMMERELL, 2006). Pode ser utilizado na comparação entre taxa existentes e novos, porém, uma espécie morfológica pode compreender mais de uma espécie biológica e filogenética. Em fungos, o conceito de espécie biológica é impossível de ser aplicado para aqueles que são assexuados, homotáticos, somente cruzam na natureza e que não são cultiváveis, sendo, portanto, restrito a alguns grupos. O conceito de espécie filogenética descreve o limite de grupos geneticamente isolados e caracteres derivados são compartilhados pelos seus membros, que formam grupos monofiléticos. Espécies filogenéticas podem ser reconhecidas utilizando-se árvores filogenéticas (TAYLOR et al., 2000).

Existem questões sobre o reconhecimento de espécies filogenéticas. Uma delas discute sobre onde seria o limite das espécies. Isto porque, se determinado gene analisado conter diferentes alelos entre indivíduos de uma espécie, na análise filogenética pode haver a separação desses indivíduos em diferentes ramos, porém, não indicando espécies distintas, mas apenas variações intraespecíficas (TAYLOR et al., 2000). Neste caso, a topologia de ramificação da árvore estaria de acordo com os alelos de genes de cada espécie, representando, assim, uma árvore de genes e não uma árvore de espécies, que reflete os caminhos evolutivos (MADDISON, 1997; PAMILO; NEI, 1988).

Outra questão sobre o reconhecimento de espécies filogenéticas seria a utilização de regiões ribossomais para a identificação de espécies, como a LSU rDNA. Embora utilizada para a identificação de alguns taxa, esta região é comumente empregada para investigações das relações filogenéticas entre certos grupos de fungos em nível de gênero ou um maior nível taxonômico, pois trata-se de uma região muito conservada e pode não separar táxons muito próximos (ZHAO; LUO; ZHUANG, 2011).

Dessa forma, para o reconhecimento de espécies filogenéticas, deve-se utilizar mais que um isolado por espécie e diferentes *loci* polimórficos para defini-las. Assim, é feita uma comparação entre diferentes genealogias de genes, método este denominado concordância genealógica. Quando há uma concordância entre as diferentes árvores geradas a partir de diferentes genes, elas apresentam a mesma topologia (ROSENBERG; NORDBORG, 2002; TAYLOR et al., 2000).

Uma espécie bem conhecida, normalmente, poderia ser descrita dentro dos três conceitos de espécie, mas, por razões biológicas, podem ocorrer erros. Por exemplo, uma mutação pode acarretar em uma mudança morfológica, resultando em uma identificação errônea ou isolados podem não ser sexualmente

férteis ou, ainda, pode ocorrer hibridização entre espécies em uma escala de tempo evolucionária (LESLIE; SUMMERELL, 2006).

Para que a descrição de espécies seja reforçada, é preciso um número considerável de isolados analisados a partir de diversificada amostragem ecológica e geográfica, pois, dessa forma, a variação dentro de uma espécie é mais bem descrita (LESLIE; SUMMERELL, 2006).

2.3 Métodos de obtenção de árvores filogenéticas

Existem dois tipos de métodos para a obtenção de árvores filogenéticas, os de distância e aqueles baseados em caracteres. Os métodos de distância convertem as sequências alinhadas em uma matriz de distância cujos elementos expressam a medida de distância evolutiva entre cada par de táxons, sendo o método mais utilizado o *neighbor joining* (NJ). Já os métodos baseados em caracteres utilizam múltiplos alinhamentos para comparar caracteres em cada sítio (coluna) no alinhamento e incluem máxima parcimônia (MP), máxima verossimilhança (ML) e análise bayesiana (HALL, 2008).

O NJ é um método rápido e apropriado para analisar um grande conjunto de dados. Produz uma única árvore que é bifurcada, ou seja, a partir de cada nó interno saem duas ramificações. Para isso, o programa calcula a divergência entre todos os taxa encontra o par que tenha a menor distância entre si e calcula a distância de cada um desses taxa para o nó que os une. A topologia final da árvore apresenta comprimentos diferentes dos ramos, que representam variações nas taxas evolutivas (CRUZ; FERREIRA; PESSONI, 2011; HALL, 2008).

Os métodos baseados em parcimônia selecionam a árvore, ou árvores, com menor número de mudanças evolutivas. Cada sítio no alinhamento de sequências pode ter diferentes estados em diferentes taxa, pela presença ou ausência de mutação em determinado loco. A MP utiliza de um algoritmo para

indicar o menor número de substituições que explica o processo evolutivo e a árvore com menor número de mudanças é a mais parcimoniosa. A vantagem da MP é que é um método simples, facilmente compreendido (CRUZ; FERREIRA; PESSONI, 2011; HALL, 2008; MIYAKI; RUSSO; PEREIRA, 2004).

O método de ML consiste em estimar a probabilidade de que as sequências em estudo tenham sido geradas seguindo as premissas de um determinado modelo evolutivo escolhido. O valor de verossimilhança é obtido considerando-se, em cada sítio (coluna) do alinhamento, todas as possibilidades de substituição de bases. A estimativa da verossimilhança para toda a sequência será igual ao produto das probabilidades de cada sítio; assim, a verossimilhança é a soma de todas as probabilidades das reconstruções possíveis de estados ancestrais. Isso é repetido para se averiguar não só todas as topologias possíveis como também as variações de comprimento dos ramos, e aquela árvore com maior verossimilhança será a escolhida. Este método tem a vantagem de apresentar menos variações, pois é menos afetado por erros de amostragem e tende a ser robusto a mudanças evolutivas (BUSO, 2005; CRUZ; FERREIRA; PESSONI, 2011; PEREIRA; MIYAKI; RUSSO, 2004).

A análise bayesiana é uma recente variação da ML e também procura por árvores com maior probabilidade de representar os dados de acordo com o modelo evolutivo. Porém, neste método, ocorrem várias análises ao mesmo tempo e em cada uma é escolhida a árvore com maior probabilidade. Assim, esta análise procura por um conjunto de árvores que tenham essa maior probabilidade e pode considerar a mesma árvore muitas vezes (HALL, 2008).

2.4 Controle biológico

O uso de agrotóxicos é bastante difundido devido à facilidade de aplicação e resultados satisfatórios com relação à diminuição de pragas e plantas

invasoras. Porém, resulta em diversos problemas relacionados ao meio ambiente, como contaminação do solo, da água e de animais, resistência de patógenos e eliminação de diversos organismos, com conseqüente redução da biodiversidade. Também resulta em problemas relacionados à saúde humana, como intoxicação alimentar e o surgimento de doenças. Com o reconhecimento destes vários problemas, entra em discussão o conceito de agricultura sustentável e, nesse enfoque, o controle biológico tem ganhado destaque no cenário agrícola (MORANDI; BETTIOL, 2009).

O controle biológico é caracterizado pela utilização de espécies antagonicas que inibam espécies patogênicas a plantas, com o objetivo de suprimir uma determinada doença o suficiente para que sejam minimizadas as perdas de produção e seja mantida a qualidade da cultura. Além da ação direta sobre o patógeno alvo, os produtos biológicos devem ser biodegradáveis, seguros ao homem, seletivos a determinados organismos e não causar desequilíbrios ecológicos. Portanto, evitam os riscos associados à exposição dos trabalhadores aos fungicidas e seus resíduos nas lavouras e no ambiente, favorecendo o meio ambiente e a saúde da população (LOPES, 2009; SUTTON et al., 1997; ZHANG et al., 2008).

O biocontrole, primeiramente, é uma ferramenta adicional ao controle de uma doença, pois oferece modos de ação diferentes aos dos pesticidas químicos. Assim, os biopesticidas podem ser utilizados em rotação com os produtos químicos para reduzir um possível desenvolvimento de resistência pelos patógenos. Além disso, podem ser aplicados em combinação com concentrações reduzidas de pesticidas ou, ainda, quando não há nenhum outro modo de controle, ou seja, quando pesticidas não são utilizados devido ao acúmulo de resíduos ou quando o produto a ser aplicado precisa ser orgânico (FRAVEL, 2005).

As interações que ocorrem entre antagonistas e patógenos podem ser a antibiose, em que um ou mais metabólitos produzidos por um organismo têm efeito danoso sobre o outro; a competição, em que os microrganismos em um mesmo substrato competem por espaço, alimento ou oxigênio e o parasitismo, no qual um microrganismo vive sobre e se alimenta de outro. Dentre esses mecanismos de interações antagônicas, o parasitismo é, talvez, o mais eficiente no controle biológico natural, pois os microrganismos parasitas são menos sujeitos a variações ambientais, uma vez que se alimentam do patógeno (BETTIOL; GHINI, 1995).

Os atributos importantes para um agente de controle biológico de sucesso seriam a habilidade de controlar eficientemente uma gama de agentes patogênicos, apresentar mais de um mecanismo de interação antagônica e sobreviver sob diferentes condições ambientais (ALVINDIA; NATSUAKI, 2008; BETTIOL; GHINI, 1995; COTA; MAFFIA; MIZUBUTI, 2008).

São poucos os trabalhos voltados para este estudo sendo, portanto, necessárias pesquisas para o entendimento das interações entre os agentes de biocontrole, os patógenos, as plantas e o meio ambiente, e se a utilização do agente será segura e controlada (MORANDI; BETTIOL, 2009).

2.5 *Clonostachys rosea* como agente de controle biológico

Clonostachys rosea (Link: Fr.) Schroers, Samuels, Seifert e W. Gams (sin. *G. roseum* Bainier, teleomorfo *B. ochroleuca* [Schwein.] Schroers e Samuels) é um fungo comum em regiões tropicais, temperadas, subárticas e desérticas em todo o mundo. É comumente encontrado no solo, mas também pode estar associado a todos os tecidos de plantas como endófitos, epífitos ou saprófitos (ALVINDIA; NATSUAKI, 2008; KURAKOV et al., 2008; MEJÍA et al., 2008; NOBRE et al., 2005).

Esta espécie apresenta atividade antagônica contra diversos fungos fitopatogênicos e seu sucesso como agente de biocontrole é devido a muitos fatores e diversos modos de ação. Sua versatilidade ecológica torna-o um agente promissor para uso na agricultura (GAN et al., 2007), apresentando o parasitismo, a antibiose, a competição por substrato e a produção de enzimas líticas como ferramentas para o controle biológico (SUTTON et al., 1997).

Um estudo sobre a ultraestrutura do micoparasitismo de *C. rosea* mostrou que a infecção dos conídios e tubos germinativos de *Botrytis cinerea* ocorre pela invasão e os subsequentes crescimento e ramificação da hifa, resultando na completa desintegração do citoplasma dos conídios e tubos germinativos infectados (LI et al., 2002).

As enzimas extracelulares quitinase e β -1,3-glucanase, capazes de degradar, respectivamente, quitina e β -1,3-glucana, componentes das paredes celulares de fungos patogênicos, foram produzidas em cultura por *C. rosea* f. *catenulata*. Ambas as enzimas inibiram o crescimento e a germinação de conídios de *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum*, enquanto β -1,3-glucanase inibiu o crescimento de *Pythium aphanidermatum*, patógenos de pepino (CHATTERTON; PUNJA, 2009).

C. rosea diminuiu a razão de crescimento (mm/dia) de *Monilinia vaccinii-corymbosi*, causador da doença mûmia-da-baga-do-mirtilo (*Vaccinium* spp.), quando um filtrado de sua cultura foi plaqueado juntamente com a cultura do patógeno, bem como utilizou as mesmas fontes de nutrientes que *M. vaccinii-corymbosi*, sugerindo ser um potencial competidor (THORNTON; SAVELLE; SCHERM, 2008).

A utilização de *C. rosea* como agente de controle biológico tem sido eficiente no controle do mofo cinzento no morango (*Fragaria x ananassa* Duch.), causado por *Botrytis cinerea* (teleomorfo *Botryotinia fuckeliana*). Em tratamentos de aplicação de *C. rosea*, comparado com remoção de restos de

cultura e aspersão de fungicidas, o controle biológico foi o mais efetivo para diminuir a incidência do mofo-cinza nas flores e nos frutos de morango e aumentou a produção da cultura, além de reduzir a formação de conidióforos de *B. cinerea* nas folhas (COTA et al., 2009).

Em condições de campo, isolados de *C. rosea* foram também eficientes no controle do mofo-cinza do morango, tendo a aplicação semanal dos agentes de biocontrole sido tão eficiente quanto ou mais eficiente do que os fungicidas cymidone (Sialex 500) e captan (Orthocide 500) na redução da colonização de *B. cinerea* nas folhas, bem como na incidência do mofo-cinza nas flores e nos frutos (COTA et al., 2008).

Podem ser encontrados, ainda, outros trabalhos nos quais relata-se o controle realizado por *C. rosea* sobre *B. cinerea* em várias plantas hospedeiras, como eucalipto, rosa, tomate, framboesa e fúcsia, entre outros (SILVERA-PÉREZ et al., 2010; MOLINA-MERCADER et al., 2006; NOBRE et al., 2005; SUTTON et al., 1997), e sobre outras espécies patogênicas, como *Rhizoctonia cerealis*, patógeno de cereais (INNOCENTI et al., 2003).

No mercado existem produtos de amplo espectro utilizados para o controle de fitopatógenos em diversas culturas, de plantas herbáceas até árvores, formulados a partir *C. rosea* f. *catenulata* (sin. *Gliocladium catenulatum*), denominados Prestop WP e Prestop Mix (CHATTERTON; PUNJA, 2009; FRAVEL, 2005).

Além de ter atividade de controle biológico contra fungos, *C. rosea* também pode fazer o controle de nematoides parasitas de plantas, cujos conídios aderem à sua cutícula, germinam e penetram no corpo do nematoide, matando-o (ZHANG et al., 2008), bem como pode fazer o controle de insetos, como *Oncometopia tucumana* e *Sonesimia grossa*, vetores de fitopatógenos (TOLEDO et al., 2006).

A partir do exposto, conclui-se que as espécies do gênero *Clonostachys* são ainda pouco estudadas. São escassas as publicações referentes a estudos de caracterização e filogenia deste gênero, sendo o trabalho realizado por Schroers (2001), que fez uma revisão sobre o grupo e classificou suas espécies, o único mais relevante. Comumente, os trabalhos relacionados ao gênero concentram-se na espécie *C. rosea* e, em geral, são concernentes à sua utilização como agentes de controle biológico. Existem poucas informações sobre outras espécies do gênero com ação antagônica contra fitopatógenos.

REFERÊNCIAS

- ALVINDIA, D. G.; NATSUAKI, K. T. Evaluation of fungal epiphytes isolated from banana fruit surfaces for biocontrol of banana crown rot disease. **Crop Protection**, Guildford, v. 27, n. 8, p. 1200-1207, Aug. 2008.
- BETTIOL, W.; GHINI, R. Controle biológico. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v. 1, p. 717-728.
- BUSO, G. S. C. **Marcadores moleculares e análise filogenética**. Brasília: EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2005. 22 p. (Documentos, 137).
- CHATTERTON, S.; PUNJA, Z. K. Chitinase and β -1,3-glucanase enzyme production by the mycoparasite *Clonostachys rosea* f. *catenulata* against fungal plant pathogens. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 55, n. 4, p. 356-367, Apr. 2009.
- COTA, L. V. et al. Biological control by *Clonostachys rosea* as a key component in the integrated management of strawberry gray mold. **Biological Control**, Orlando, v. 50, p. 222-230, Sept. 2009.
- _____. Biological control of strawberry gray mold by *Clonostachys rosea* under field conditions. **Biological Control**, Orlando, v. 46, p. 515-522, Sept. 2008.
- COTA, L. V.; MAFFIA, L. A.; MIZUBUTI, E. S. G. Brazilian isolates of *Clonostachys rosea*: colonization under different temperature and moisture conditions and temporal dynamics on strawberry leaves. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 46, n. 3, p. 312-317, Jan. 2008.
- CRUZ, C. D.; FERREIRA, F. M.; PESSONI, L. A. **Biometria aplicada ao estudo da diversidade genética**. Viçosa, MG: Suprema, 2011. p. 503-590.
- DOMSCH, K. H.; GAMS, W.; ANDERSON, T. **Compendium of soil fungi**. 2nd ed. Eching: IHW Verlag, 2007. 672 p.
- FRAVEL, D. R. Commercialization and implementation of biocontrol. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 43, p. 337-359, July 2005.

GAN, Z. et al. Cloning and expression analysis of a chitinase gene *Crchi1* from the mycoparasitic fungus *Clonostachys rosea* (syn. *Gliocladium roseum*). **The Journal of Microbiology**, Seoul, v. 45, n. 5, p. 422-430, Oct. 2007.

HALL, B. G. **Phylogenetic trees made easy: a how-to manual**. 3rd ed. Sunderland: Sinauer Associates, 2008. 233 p.

HIROOKA, Y.; KOBAYASHI, T. Taxonomic studies of nectrioid fungi in Japan II: the genus *Bionectria*. **Mycoscience**, Tokyo, v. 48, n. 2, p. 81-89, Mar. 2007.

INNOCENTI, G. et al. Efficacy of microorganisms antagonistic to *Rhizoctonia cerealis* and their cell wall degrading enzymatic activities. **Mycological Research**, Cambridge, v. 107, n. 4, p. 421-427, Apr. 2003.

KURAKOV, A. V. et al. Diversity of facultatively anaerobic microscopic mycelial fungi in soils. **Microbiology**, Wokingham, v. 77, n. 1, p. 90-98, Feb. 2008.

LESLIE, J. F.; SUMMERELL, B. A. **The fusarium laboratory manual**. Ames: Blackwell, 2006. 388 p.

LI, G. Q. et al. Ultrastructural study of mycoparasitism of *Gliocladium roseum* on *Botrytis cinerea*. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, Taipei, v. 43, n. 3, p. 211-218, July 2002.

LOPES, R. B. A indústria no controle biológico: produção e comercialização de microrganismos no Brasil. In: MORANDI, M. A. B.; BETTIOL, W. (Ed.). **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna: EMBRAPA Meio Ambiente, 2009. p. 7-14.

LUO, J.; ZHUANG, W. Y. New species and new Chinese records of Bionectriaceae (Hypocreales, Ascomycota). **Mycological Progress**, Tübingen, v. 9, n. 1, p. 17-25, Aug. 2009.

MADDISON, W. P. Gene trees in species trees. **Systematic Biology**, Oxford, v. 46, n. 3, p. 523-536, Sept. 1997.

MEJÍA, L. C. et al. Endophytic fungi as biocontrol agents of *Theobroma cacao* pathogens. **Biological Control**, Orlando, v. 46, n. 1, p. 4-14, July 2008.

MIYAKI, C. Y.; RUSSO, C. A. de M.; PEREIRA, S. L. Reconstrução filogenética: introdução e o método da máxima parcimônia. In: MATIOLI, S. R. (Ed.). **Biologia molecular e evolução**. Ribeirão Preto: Holos, 2004. p. 97-107.

MOLINA-MERCADER, G. et al. Selección de hongos antagonistas para el control biológico de *Botrytis cinerea* en viveros forestales en Chile. **Bosque**, Valdivia, v. 27, n. 2, p. 126-134, 2006.

MORANDI, M. A. B.; BETTIOL, W. Controle biológico de doenças de plantas no Brasil. In: _____. **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna: EMBRAPA Meio Ambiente, 2009. p. 15-28.

NOBRE, S. A. M. et al. Selection of *Clonostachys rosea* isolates from Brazilian ecosystems effective in controlling *Botrytis cinerea*. **Biological Control**, Orlando, v. 34, n. 2, p. 132-143, Aug. 2005.

PAMILO, P.; NEI, M. Relationships between gene trees and species trees. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v. 5, n. 5, p. 568-583, Sept. 1988.

PEREIRA, S. L.; MIYAKI, C. Y.; RUSSO, C. A. de M. Reconstrução filogenética: métodos probabilísticos. In: MATIOLI, S. R. (Ed.). **Biologia molecular e evolução**. Ribeirão Preto: Holos, 2004. p. 117-129.

REHNER, S. A.; SAMUELS, G. J. Taxonomy and phylogeny of *Gliocladium* analysed from nuclear large subunit ribosomal DNA sequences. **Mycological Research**, Cambridge, v. 98, p. 625-634, June 1994.

ROSENBERG, N. A.; NORDBORG, M. Genealogical trees, coalescent theory and the analysis of genetic polymorphisms. **Nature**, London, v. 3, p. 380-390, May 2002.

ROSSMAN, A. Y. Morphological and molecular perspectives on systematics of the Hypocreales. **Mycologia**, Lawrence, v. 88, n. 1, p. 1-19, Jan./Feb. 1996.

ROSSMAN, A. Y. et al. Genera of Bionectriaceae, Hypocreaceae and Nectriaceae (Hypocreales, Ascomycetes). **Studies in Mycology**, Utrecht, n. 42, p. 1-260, 1999.

_____. Molecular studies of Bionectriaceae using large subunit rDNA sequences. **Mycologia**, Lawrence, v. 93, n. 1, p. 100-110, Jan./Feb. 2001.

SCHROERS, H. J. Generic delimitation of *Bionectria* (Bionectriaceae, Hypocreales) based on holomorph characters and rDNA sequences. **Studies in Mycology**, Utrecht, n. 45, p. 63-82, May 2000.

_____. Monograph of *Bionectria* (Ascomycota, Hypocreales, Bionectriaceae) and its *Clonostachys* anamorphs. **Studies in Mycology**, Utrecht, n. 46, p. 1-214, Nov. 2001.

SCHROERS, H. J. et al. Classification of the mycoparasite *Gliocladium roseum* in *Clonostachys* as *C. rosea*, its relationship to *Bionectria ochroleuca*, and notes on other *Gliocladium*-like fungi. **Mycologia**, Lawrence, v. 9, n. 2, p. 365-385, Mar./Apr. 1999.

SILVERA-PÉREZ, A. E. et al. Controle do mofo cinzento com *Clonostachys rosea* na produção de mudas de fúcsia. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 35, n. 3, p. 163-169, May/June 2010.

SUTTON, J. C. et al. *Gliocladium roseum*: a versatile adversary of *Botrytis cinerea* in crops. **Plant Disease**, Davis, v. 81, n. 4, p. 316-328, Apr. 1997.

TAYLOR, J. W. et al. Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 31, n. 1, p. 21-32, Jan. 2000.

THORNTON, H. A.; SAVELLE, A. T.; SCHERM, H. Evaluating adverse panel of biocontrol agents against infection of blueberry flowers by *Monilinia vaccinii-corymbosi*. **Biocontrol Science and Technology**, Lethbridge, v. 18, n. 4, p. 391-407, May 2008.

TOLEDO, A. V. et al. First record of *Clonostachys rosea* (Ascomycota: Hypocreales) as an entomopathogenic fungus of *Oncometopia tucumana* and *Sonesimia grossa* (Hemiptera: Cicadellidae) in Argentina. **Journal of Invertebrate Pathology**, Riverside, v. 92, n. 1, p. 7-10, May 2006.

ZHANG, L. et al. Investigation on the infection mechanism of the fungus *Clonostachys rosea* against nematodes using the green fluorescent protein. **Applied Genetics and Molecular Biotechnology**, Heidelberg, v. 78, n. 6, p. 983-990, Apr. 2008.

ZHAO, P.; LUO, J.; ZHUANG, W. Y. Practice towards DNA barcoding of the nectriaceous fungi. **Fungal Diversity**, Kunming, v. 46, n. 1, p. 183-191, Jan. 2011.

CAPÍTULO 2

Caracterização e identificação de espécies de *Clonostachys* de diferentes regiões brasileiras

RESUMO

O presente estudo teve por objetivos caracterizar e identificar 44 isolados do gênero *Clonostachys* obtidos a partir de diferentes substratos e locais no Brasil utilizando marcadores morfológicos e filogenia. Os fungos foram cultivados nos meios BDA e CMD durante sete dias, a 25°C e fotoperíodo de 12 horas, para avaliação da pigmentação da colônia e taxa de crescimento, e cultivados em OA durante 14 dias, nas mesmas condições, para a avaliação das características micromorfológicas. As identificações a partir de caracteres morfológicos foram feitas utilizando literatura especializada. Análises filogenéticas foram realizadas através do sequenciamento do gene β -tubulina e região ITS e ITS mais parte da grande subunidade do DNA ribossômico (LSU rDNA) utilizando os métodos *neighbor joining* e máxima parcimônia. Os 44 isolados avaliados foram identificados como pertencentes às espécies *C. byssicola*, *C. candelabrum*, *C. grammicospora*, *C. pseudochroleuca*, *C. rhizophaga*, *C. rogersoniana*, *C. rossmaniae*, *C. setosa* e *C. rosea*, sendo esta representada por duas formas, *C. rosea* f. *catenulata* e *C. rosea* f. *rosea*. As espécies *C. byssicola*, *C. pseudochroleuca*, *C. rhizophaga* e *C. rosea* f. *rosea* apresentam morfologia bastante semelhante, dificultando a sua delimitação, sendo necessária a utilização de análises filogenéticas. *C. rogersoniana* se diferencia das demais espécies do subgênero *Bionectria* sendo considerada uma espécie morfológica e filogenética. Já os isolados de *C. rosea* f. *catenulata* e *C. grammicospora*, identificados com base em caracteres morfológicos, podem representar outras espécies distintas. *C. candelabrum*, *C. rossmaniae* e *C. setosa* são também delimitadas a partir de caracteres morfológicos e da filogenia utilizando as regiões gênicas do rDNA. As árvores filogenéticas geradas a partir de sequências ITS e ITS mais LSU rDNA mostraram que estas regiões geralmente não delimitam espécies de *Clonostachys*, enquanto que o gene β -tubulina permite a distinção dos isolados.

Palavras-chave: Ascomycota. Biodiversidade. *Bionectria*. Filogenia molecular. ITS. LSU rDNA. β -tubulina.

1 INTRODUÇÃO

Clonostachys é um gênero cosmopolita, no qual as espécies são saprófitas, sendo algumas conhecidas como micoparasitas. É caracterizado por apresentar conidióforos penicilados, conídios arranjados em cadeias e ligeiramente curvados, podendo ser de coloração verde, branca ou laranja-claro. A maioria das espécies apresenta conidióforos dimórficos, chamados primários (verticilados) e secundários (penicilados) (SCHROERS, 2001; SCHROERS et al., 1999).

As espécies do gênero *Clonostachys*, reconhecidas por Schroers (2001), são diferenciadas a partir de sequências da região ITS do rDNA e do gene β -tubulina e de caracteres morfológicos. Entretanto, a delimitação de espécies deste gênero a partir da morfologia, muitas vezes, é dificultada, pois se pode observar considerável plasticidade dos marcadores morfológicos, como tamanho coincidente de conidióforos e conídios, taxa de crescimento e pigmentação da colônia (SCHROERS, 2001).

Pesquisas relacionadas à diversidade e filogenia do gênero *Clonostachys* utilizando amplas coleções de fungos isolados de regiões tropicais, em especial no Brasil, são importantes para complementar os dados morfológicos e entender mais sobre a sistemática do grupo, além da possibilidade de se encontrar espécies novas. Posto isso, este trabalho foi realizado com os objetivos de caracterizar e identificar fungos do gênero *Clonostachys* isolados a partir de diferentes substratos e locais no Brasil, utilizando marcadores morfológicos e filogenia.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Neste estudo foram utilizados 44 isolados do gênero *Clonostachys* obtidos de diversos substratos e diferentes locais no Brasil (Tabela 1A, APÊNDICE A). O material encontra-se depositado na Coleção Micológica de Lavras (CML), do Laboratório de Sistemática e Ecologia de Fungos, no Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

2.1 Caracterização morfológica e identificação

A caracterização morfológica e a identificação foram realizadas segundo A monograph of Bionectria (*Ascomycota, Hypocreales, Bionectriaceae*) and its *Clonostachys* anamorphs (SCHROERS, 2001). Para isso, os isolados foram inoculados em placas de Petri de 9 cm de diâmetro, contendo meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA) e fubá-dextrose-ágar (CMD) e incubados, durante sete dias, a 25 °C, com fotoperíodo de 12 horas para avaliação da taxa de crescimento e pigmentação das colônias.

A caracterização micromorfológica foi realizada em colônias com 14 dias de crescimento, em placas de Petri de 6 cm de diâmetro, contendo meio de cultura ágar aveia (OA), incubadas nas mesmas condições descritas acima, retirando-se fragmentos da colônia para a confecção de lâminas, utilizando, para isso, corante azul de algodão. Foram observados sob microscópio de luz o tamanho e o formato dos conídios, o tamanho das métulas e fiálides, a presença, o tamanho e o padrão de ramificação de conidióforos primários e/ou secundários e a presença de seta e fiálides intercalares.

2.2 Obtenção de culturas monospóricas

Culturas monospóricas foram obtidas a partir dos isolados, por meio de suspensão de conídios (LESLIE; SUMMERELL, 2006). Com o auxílio de uma alça, foi feita uma raspagem sobre a colônia para a retirada de esporos, que foram transferidos para um tubo de ensaio contendo água destilada estéril. Este tubo foi agitado e foi retirada uma alíquota desta suspensão para avaliação da quantidade de esporos com a visualização, sob microscópio de luz, de um a dez conídios no campo de observação. O tubo de ensaio foi novamente agitado e foram retirados 100 µL da suspensão de conídios e transferidos para uma placa de Petri de 6 cm de diâmetro contendo meio de cultura MA (malte 2%), na qual se realizou o espalhamento com alça de Drigalsky. Após 24 horas de incubação à temperatura ambiente, foi observado o crescimento das colônias monospóricas, que foram transferidas para placas com meio de cultura MA.

2.3 Extração de DNA

As colônias monospóricas foram submetidas à extração de DNA realizada pelo método CTAB (LESLIE; SUMMERELL, 2006). Os fungos foram cultivados em 100 mL de meio de cultura MA líquido, durante cinco dias, sob agitação de 100 rpm em temperatura ambiente. A biomassa obtida foi filtrada utilizando-se um funil com gaze para a retirada do meio de cultura e pressionada entre folhas de papel filtro para remover o excesso de líquido.

Utilizando-se um cadinho de porcelana, as amostras foram maceradas em nitrogênio líquido, com 100 mg de polivinilpirrolidona (PVP) e cerca de 100 mg do micélio macerado foram transferidos para um microtubo de 1,5 mL e ressuspensos em 700 µL do tampão de extração CTAB 2% (Tris-HCl [pH 8,0] 100 mM; NaCl 500 mM; EDTA [pH 8,0] 50 mM; CTAB 2%; água ultrapura)

acrescido de β -mercaptoetanol (10 μ L/mL de tampão de extração). O material foi agitado no vórtex e incubado, a 65 °C, durante 30 minutos. Em seguida, foram adicionados 700 μ L de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1), vigorosamente agitado em vórtex e centrifugado, durante 5 minutos, a 12.000 rpm. Em seguida, 600 μ L do sobrenadante foram resgatados em novo microtubo e foram adicionados 600 μ L de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1). Após vigorosa agitação e centrifugação durante 5 minutos a 12.000 rpm, foram resgatados 400 μ L da fase aquosa e adicionados 400 μ L de isopropanol gelado e feita a agitação por inversão. O material foi incubado, durante 10 minutos, a aproximadamente 20 °C, centrifugado, durante 5 minutos, a 10.000 rpm. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o pelet foi lavado com 500 μ L de etanol 70% gelado, sob agitação, por 5 minutos, a 10.000 rpm. Novamente, descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o pelet em 100 μ L de TE 1x (Tris-EDTA) + 5 μ L de RNase A (0,5 mg/mL), que foi incubado em banho-maria, a 37 °C, por 30 minutos. Seguindo à digestão com RNase A, foram adicionados 400 μ L de isopropanol, deixando sob refrigeração, durante 10 minutos, para que houvesse a maior precipitação de DNA possível. Posteriormente, foi realizada a centrifugação, por 5 minutos, a 10.000 rpm. O isopropanol foi descartado e o pelet lavado e centrifugado, por 5 minutos, a 10.000 rpm, com 500 μ L de etanol 70% gelado. Em seguida, o pelet foi seco para eliminar resíduos de etanol e ressuspendido em 50 μ L de TE 1x.

O DNA extraído foi analisado em gel de agarose 1%, corado com GelRed (Biotium[®]) e seu peso molecular e concentração foram estimados por comparação com um marcador de 1 Kb ladder (Invitrogen).

2.4 PCR, sequenciamento e análises filogenéticas

O rDNA (ITS + parte da maior subunidade do DNA ribossômico) foi amplificado e sequenciado utilizando os *primers* ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') (WHITE et al., 1990) e NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3') (O'DONNELL, 1993). Para amplificação e sequenciamento do gene *tub2* (β -tubulina) foram utilizados os *primers* T1 (5'-AACATGCGTGAGATTGTAAGT-3') e T22 (5'-TCTGGATGTTGTTGGGAATCC-3') (O'DONNELL; CIGELNIK, 1997).

A amplificação foi iniciada por um período de 1 minuto a 90 °C seguido de 35 ciclos de 35 s a 94 °C, 55 s a 55 °C, 120 s a 72 °C, uma extensão final por um período de 5 minutos a 72°C, seguida por 4 °C (SCHROERS, 2000). O produto da PCR foi estimado em gel de agarose 1 % corado com GelRed (Biotium®). A partir da amplificação foram gerados produtos de 1069 pb, 496 pb e 640 pb para ITS mais LSU rDNA parcial, ITS e *tub2*, respectivamente.

Fragmentos dos genes foram sequenciados nas direções sentido e antissentido, em um sequenciador automático MEGA BACE®, no Laboratório de Genômica da Universidade Federal de Viçosa (UFV). Os eletroferogramas foram analisados visualmente, utilizando-se o programa SeqAssem® (HEPPERLE, 2004) e as sequências obtidas foram comparadas com a base de dados GenBank, do National Center for Biotechnological Information, NCBI, por meio do programa BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). Sequências de referência de *Clonostachys* correspondentes às regiões ITS mais LSU rDNA e *tub2*, previamente depositadas no GenBank, também foram acrescentadas às análises (Tabela 1A, APÊNDICE A).

No programa MEGA 5.04® (TAMURA et al., 2011) foram feitos os alinhamentos múltiplos das sequências das espécies de *Clonostachys*, bem como as análises filogenéticas, utilizando-se dois métodos para inferência filogenética,

o *neighbor joining* (NJ) e o de máxima parcimônia (MP). As regiões ITS, ITS mais LSU rDNA parcial e o gene *tub2* foram analisados em separado, utilizando-se os dois métodos, NJ e MP. Para a análise filogenética de ITS mais LSU rDNA parcial, 44 isolados de *Clonostachys* foram avaliados e 17 sequências do GenBank foram utilizadas como referência. Na análise filogenética utilizando a região ITS, os 44 isolados foram analisados, juntamente com 44 sequências de referência. Já para o gene *tub2*, as análises filogenéticas foram realizadas com sequências de 21 isolados de *Clonostachys* e 53 sequências de referência.

Também foram geradas as árvores combinadas a partir de sequências de ITS e *tub2* de 21 isolados de *Clonostachys* e 44 sequências de referência, utilizando também NJ e MP, considerando o princípio da concordância genealógica de genes para reconhecimento de espécies filogenéticas, ou *Genealogical concordance phylogenetic species recognition* - GCPSR, o qual emprega a estratégia de se estudar diferentes genes e diferentes métodos para uma melhor confiabilidade da filogenia do grupo (TAYLOR et al., 2000).

3 RESULTADOS

3.1 Caracterização morfológica

Os 44 isolados avaliados foram identificados como pertencentes a nove espécies distintas, baseado em caracteres morfológicos, representando três subgêneros de *Bionectria*. O subgênero *Bionectria* foi representado pelas espécies *C. byssicola*, *C. pseudochroleuca*, *C. rhizophaga*, *C. rogersoniana* e *C. rosea*, enquanto que as espécies *C. candelabrum*, *C. rossmaniae* e *C. setosa* representaram o subgênero *Epiphloea*. O subgênero *Zebrinella* foi representado por uma só espécie, *C. grammicospora*. Dentro da espécie *C. rosea* foram identificadas duas formas, denominadas *C. rosea* f. *rosea* e *C. rosea* f. *catenulata*, com esta última representada por maior número de isolados: dez. As espécies *C. candelabrum*, *C. grammicospora* e *C. setosa* foram representadas por apenas um isolado (Tabela 1A, APÊNDICE A). A seguir faz-se a descrição de cada espécie, mostrando suas propriedades fenotípicas.

Clonostachys byssicola

Esta espécie foi representada por cinco isolados, obtidos a partir de solo da Amazônia, associados à planta ou como micoparasita, em Minas Gerais (Tabela 1A, APÊNDICE A). Colônias têm, em média, 45 mm, podendo chegar a 50 mm, em sete dias. A superfície da colônia é não pigmentada ou laranja-claro em CMD e laranja em BDA e OA, apresentando micélio algodonoso. O reverso da colônia é laranja. Os conidióforos primários são verticilados, medindo 35-325 x 2,5 µm; fiálides divergentes medindo 13-50 x 1-3 µm; conidióforos secundários bi- ou triverticilados, convergentes, formados no micélio aéreo ou agrupados, medindo 12,5-137,5 x 2,5 µm; fiálides medindo 7-20 x 2-3 µm e métulas medindo 5-14 x 2-3 µm. Massa de conídios laranja, formando cabeças

aquosas. Conídios hialinos, ovoidais, um pouco curvados, medindo 3-7 x 2-4 μm (Tabelas 1 e 2, p. 47-48; Figura 1, p. 43; Figura 3, p. 45).

Clonostachys pseudochroleuca

Espécie representada por sete isolados, obtidos a partir de solo da Amazônia ou como endófitos, no estado de Minas Gerais (Tabela 1A, APÊNDICE A). Colônias medindo 41 - 51 mm de diâmetro, em sete dias. Superfície da colônia branca com centro amarelo em BDA, amarela ou branco amarelada em OA e não pigmentada ou amarela em CMD. Pigmento amarelo difundido no ágar em BDA e OA. Micélio algodinoso em BDA e granuloso em OA pela massa de conídios. Conidióforos dimórficos. Conidióforos primários com morfologia similar à de conidióforos penicilados, mono a triverticilados, estipe medindo 17,5-180 x 2-4 μm , ramificação convergente, geralmente duas no ápice da estipe. Fiálides convergentes medindo 8-39 x 1-3 μm . Conidióforos secundários, tri- a quarterverticilados, com estipe medindo 12,5-130 x 1-3 μm , com ramificações convergentes. Fiálides convergentes, medindo 5-18 x 1-3 μm . Métulas com 5-12 x 1-3 μm de comprimento. Massa de conídios em conidióforos primários formando cabeças aquosas, branca ou amarela pela agregação de conidióforos secundários. Conídios hialinos, elipsoidais, um pouco curvados, medindo 2-8 x 1-4 μm (Tabelas 1 e 2, p. 47-48; Figura 1, p. 43; Figura 3, p. 45).

Clonostachys rhizophaga

Esta espécie foi representada por dois isolados, um obtido de solo do Cerrado em Goiás e outro como micoparasita vindo do estado de São Paulo (Tabela 1A, APÊNDICE A). Colônias medindo até 40 mm de diâmetro, em sete dias. Superfície da colônia branco alaranjada em BDA e OA e não pigmentada em CMD. Micélio algodinoso em BDA e esparso em OA. Reverso da colônia

laranja claro. Conidióforos dimórficos, sendo o primário verticilado, medindo 15-97,5 x 2,5 μm , com fiálides divergentes que medem 9-32 x 1-3 μm . Conidióforos secundários penicilados, podendo ser obscuros, com ramificação convergente, medindo 17,5-57,5 x 2,5 μm , fiálides medindo 7-14 x 2 μm e métulas 7-15 x 2-3 μm . Conídios hialinos, um pouco curvados, medindo 3-9 x 2-4 μm (Tabelas 1 e 2, p. 47-48; Figura 1, p. 43; Figura 3, p. 45).

Clonostachys rogersoniana

Representada por sete isolados, todos obtidos de solo do Cerrado e da Amazônia (Tabela 1A, APÊNDICE A). Colônias medindo de 30 - 42 mm de diâmetro, em sete dias. Superfície da colônia branca ou branca com bordas amareladas ou marrons em OA, em BDA colônias brancas com pigmentos amarelados e marrons, geralmente no centro da colônia, em CMD não pigmentado. Micélio veludoso, esparso e granuloso, pela presença de conidióforos secundários. Crescimento em anéis concêntricos em BDA. Reverso da colônia amarelo ou amarelo com o centro marrom em BDA, não pigmentado ou amarelo claro com pontos marrons em OA. Conidióforos dimórficos, sendo os primários verticilados longos, medindo 37,5-970 x 2,5-5 μm , muitas vezes com ramificações saindo da estipe principal. Fiálides medindo 9-38 x 1-3 μm , divergentes, eventualmente presentes em muitos níveis ao longo da estipe. Conidióforos secundários solitários, podendo formar grupos ou mesmo estar ausentes; geralmente são biverticilados, com estipes medindo 40-262,5 x 2,5-7 μm . Ramificação divergente, com métulas e fiálides ainda menos divergentes. Fiálides medindo 7-16 x 1-3 μm e métulas, 5-12 x 1-4 μm ; presença de fiálides intercalares. Massa de conídios branca ou amareladas, em longas cadeias. Conídios hialinos, não curvados com extremidades arredondadas, ovoidais a elipsoidais, medindo 3-8 x 1-4 μm . Presença de clamidósporos lisos e agrupados (Tabelas 1 e 2, p. 47-48; Figura 2, p. 44; Figura 3, p. 45).

Clonostachys rosea f. catenulata

Espécie representada por dez isolados, obtidos a partir de solo nativo ou sob plantio do Cerrado (Tabela 1A, APÊNDICE A). Colônias medindo 38 - 58 mm, com média de 47 mm de diâmetro, em sete dias de crescimento. Superfície da colônia branca, amarelada ou laranja claro com esporulação verde em OA, verde, verde acinzentado ou branco esverdeado em BDA, não pigmentado ou laranja claro em CMD. Grande produção de micélio aéreo, algodonoso, mas esporulação esparsa em OA. Reverso amarelo ou amarelo claro, laranja claro ou verde amarelado. Conidióforos dimórficos. Conidióforos primários verticilados, estipe medindo 12,5-237 x 2,5-5 μm , comumente com uma ramificação surgindo da região superior da estipe, porém mais ramificações podem ser observadas. Fiálides divergentes, podendo crescer solitárias abaixo do verticilo principal, medindo 9-50 x 1-4 μm . Conidióforos secundários comumente biverticilados, podendo ser tri- ou quarterverticilado, medindo 15-112,5 x 2,5-5 μm , com ramificações convergentes ou um pouco divergentes. Fiálides medindo 6-22 x 1-4 μm e métulas 6-17 x 1-4 μm . Fiálides intercalares presentes em um isolado. Foram observados conidióforos intermediários que mesclam características de ambos conidióforos, apresentando morfologia de conidióforos primários, porém com fiálides menores, típicas de conidióforos secundários. Massa de conídios branca ou verde, pela agregação de conidióforos secundários ou conidióforos primários formando cabeças aquosas. Conídios hialinos, com um lado achatado e outro curvado, de dois tipos, um proveniente de conidióforos secundários, menor, medindo 2-6 x 2-4 μm , e um maior, vindo de conidióforos primários, medindo 6-12 x 3-5 μm (Tabelas 1 e 2, p. 47-48; Figura 2, p. 44; Figura 3, p. 45).

Clonostachys rosea f. rosea

Esta espécie foi representada por sete isolados obtidos a partir de solo nativo do Cerrado ou associados a plantas como endófitos dos estados Amazonas, Goiás, Bahia e Minas Gerais (Tabela 1A, APÊNDICE A). Colônias medindo 34 - 50 mm, em sete dias. Superfície da colônia branca com pontos laranja claro ou amarelo claro em BDA, laranja amarelado ou laranja em OA, em CMD não pigmentado, amarelo ou laranja claro. Grande produção de micélio aéreo, algodinoso ou granuloso por causa da massa de conídios. Reverso da colônia laranja, bege ou amarelo. Conidióforos assim como os de *C. rosea f. catenulata*. Conidióforos primários verticilados medindo 15-190 x 2,5-5 µm, com fiálides de 12-45 x 1-2 µm de comprimento. Conidióforos secundários, solitários ou agregados formando pústulas, eventualmente obscuros ou ausentes, medindo 17,5-110 x 2,5-5 µm, fiálides 5-18 x 1-3 µm e métulas 5-19 x 2-4 µm de comprimento. Não foram observadas fiálides intercalares. Massa de conídios laranja ou amarela pela agregação de conidióforos secundários e pela formação de cabeças aquosas de conidióforos primários. Conídios hialinos, de dois tipos, um proveniente de conidióforos secundários contendo um lado achatado e outro curvado, menor, medindo 3-6 x 2-3 µm, e outro mais reto, ovoidal, maior, proveniente de conidióforos secundários, 6-8 x 3-5 µm de comprimento (Tabelas 1 e 2, p. 47-48; Figura 2, p. 44; Figura 3, p. 45).

Clonostachys candelabrum

Esta espécie foi representada por apenas um isolado, obtido do solo da Mata Atlântica em São Paulo (Tabela 1A, APÊNDICE A). Colônias medindo de 21 - 35 mm de diâmetro, com sete dias de crescimento. Superfície da colônia branca em BDA, branco rosada em OA e incolor em CMD. Micélio algodinoso em BDA, pulverulento a granuloso e esparso em OA. Reverso da colônia marrom em BDA e laranja claro em OA. Conidióforos monomórficos,

penicilados, medindo 19-92,5 x 2-5 μm , apresentando ramificações divergentes. Métulas medindo 4-9 x 2 μm e fiálides 5-22 x 2 μm , divergentes. Presença de fiálides intercalares. Conídios em cadeias brancas, hialinos, elipsoidais a ovoidais, medindo 3-5 x 2-3 μm (Tabelas 1 e 2, p. 47-48; Figura 1, p. 43; Figura 3, p. 45).

Clonostachys rossmaniae

Espécie representada por três isolados provenientes do solo da Amazônia e da Mata Atlântica (Tabela 1A, APÊNDICE A). Colônias medindo 19 - 32 mm de diâmetro, em sete dias. Superfície da colônia branca em BDA e OA e incolor em CMD. Micélio algodonoso em BDA, pulverulento a granuloso em OA. Reverso bege amarronzada em BDA e branco em OA. Conidióforos monomórficos, penicilados, estipe medindo 22,5-125 x 2,5 μm , com ramificações convergentes. Fiálides medindo 4-20 x 2-3 μm , convergentes, e métulas medindo 4-12 x 2-3 μm . Fiálides intercalares presentes. Conídios elipsoidais a ovoidais, 3-6 x 2-3 μm (Tabelas 1 e 2, p. 47-48; Figura 2, p. 44; Figura 3, p. 45).

Clonostachys setosa

Representada por apenas um isolado proveniente de solo da Mata Atlântica (Tabela 1A, APÊNDICE A). Colônias medindo 21 - 29 mm de diâmetro, em sete dias. Superfície da colônia marrom com esporulação branca em BDA, laranja claro em OA e não pigmentada em CMD. Micélio aéreo escasso em OA, principalmente nas bordas da colônia, e algodonoso em BDA, onde também fazia um abaulamento no centro da colônia. Reverso da colônia com as mesmas colorações da superfície. Conidióforos monomórficos, penicilados, mono- a triverticilados, com estipe medindo 12,5-137,5 x 2-3 μm , ramificações convergentes, métulas medindo 6-11 x 2 μm e fiálides 6-21 x 2

μm . Presença de setas que normalmente surgem no micélio aéreo. Fiálides intercalares presentes. Conídios hialinos, elipsoidais, medindo 6-15 x 3-4 μm , podendo apresentar um septo (Tabelas 1 e 2, p. 47-48; Figura 2, p. 44; Figura 3, p. 45).

Clonostachys grammicospora

Representado por apenas um isolado, obtido do solo da Amazônia (Tabela 1A, APÊNDICE A). Colônias chegando a 29 - 39 mm de diâmetro, em sete dias. Superfície da colônia rosada com o centro laranja em BDA, laranja em OA e não pigmentado em CMD. Micélio algodinoso em BDA, esparso e granuloso em OA. Reverso da colônia amarelado com o centro laranja em BDA e laranja claro em OA. Conidióforos dimórficos, sendo os primários com morfologia similar aos penicilados, medindo 27,5-175 x 2,5 μm , ramificados ou não. Fiálides convergentes medindo 2-29 x 2-4 μm . Conidióforos secundários mono-, bi- ou terverticilados, curtos, medindo 20-33 x 2-3 μm , contendo ramificações divergentes e fiálides convergentes, que medem 8-20 x 2-3 μm ; fiálides intercalares presentes. Métulas medindo 6-11 x 2 μm . Foram observados conidióforos intermediários que mesclam características de conidióforos primários juntamente com conidióforos secundários. Massa de conídios de conidióforos secundários laranja clara, com conidióforos primários formando cabeças aquosas. Conídios com formato ovoide a elipsoidal, medindo 4-10 x 2-3 μm . Presença de clamidósporos lisos, normalmente solitários, eventualmente em grupos (Tabelas 1 e 2, p. 47-48; Figura 1, p. 43; Figura 3, p. 45).

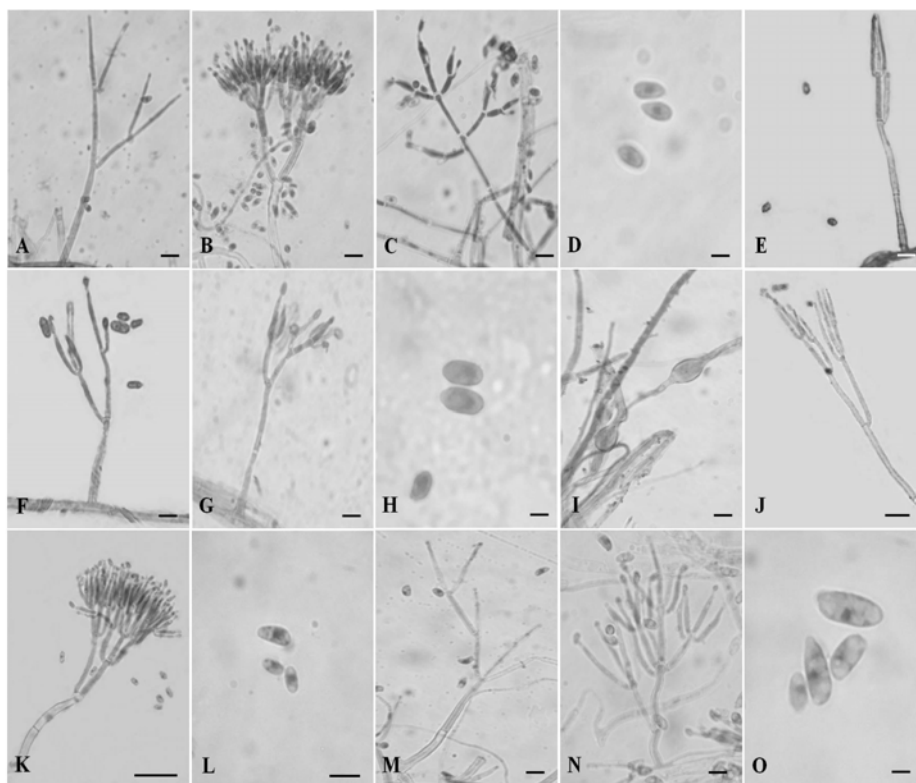


Figura 1 Características micromorfológicas das espécies de *Clonostachys*. (A-B) *C. byssicola*. A- Conidióforo primário verticilado; B- Conidióforo secundário penicilado. (C-D) *C. candelabrum*. C- Conidióforo penicilado; D- Conídios. (E-I) *C. grammicospora*. E- Conidióforo primário com morfologia similar à do penicilado; F-G Conidióforo secundário penicilado; H- Conídios; I- Clamidósporos. (J-L) *C. pseudocholeuca*. J- Conidióforo primário com morfologia similar à do penicilado; K- Conidióforo secundário penicilado; L- Conídios. (M-O) *C. rhizophaga*. M- Conidióforo primário verticilado; N- Conidióforo secundário penicilado; O- Conídios. Escala de barras: A, B, E, F, G, J, K- 10 μm ; C- 7 μm ; L- 6 μm ; I- 5 μm ; H- 3 μm ; D- 2 μm .

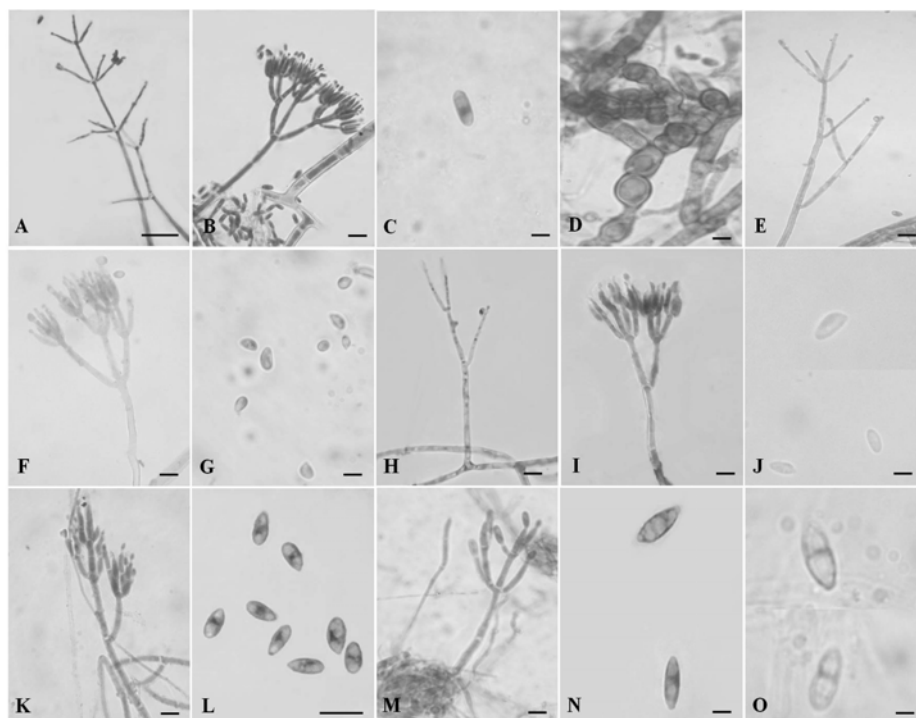


Figura 2 Características micromorfológicas das espécies de *Clonostachys*. (A-D) *C. rogersoniana*. A- Conidióforo primário verticilado; B- Conidióforo secundário penicilado; C- Conídio; D- Clamidósporos. (E-G) *C. rosea* f. *catenulata*. E- Conidióforo primário verticilado; F- Conidióforo secundário penicilado; G- Conídios. (H-J) *C. rosea* f. *rosea*. H- Conidióforo primário verticilado; I- Conidióforo secundário penicilado; J- Conídios. (K-L) *C. rossmaniae*. K- Conidióforo penicilado; L- Conídios. (M-O) *C. setosa*. M- Conidióforo penicilado e seta; N- Conídios; O- Conídios com um septo. Escala de barras: A- 15 μ m; B, E, F, H, I, K, M- 10 μ m; D, G, L- 5 μ m; C- 4 μ m; J, N, O- 3 μ m.

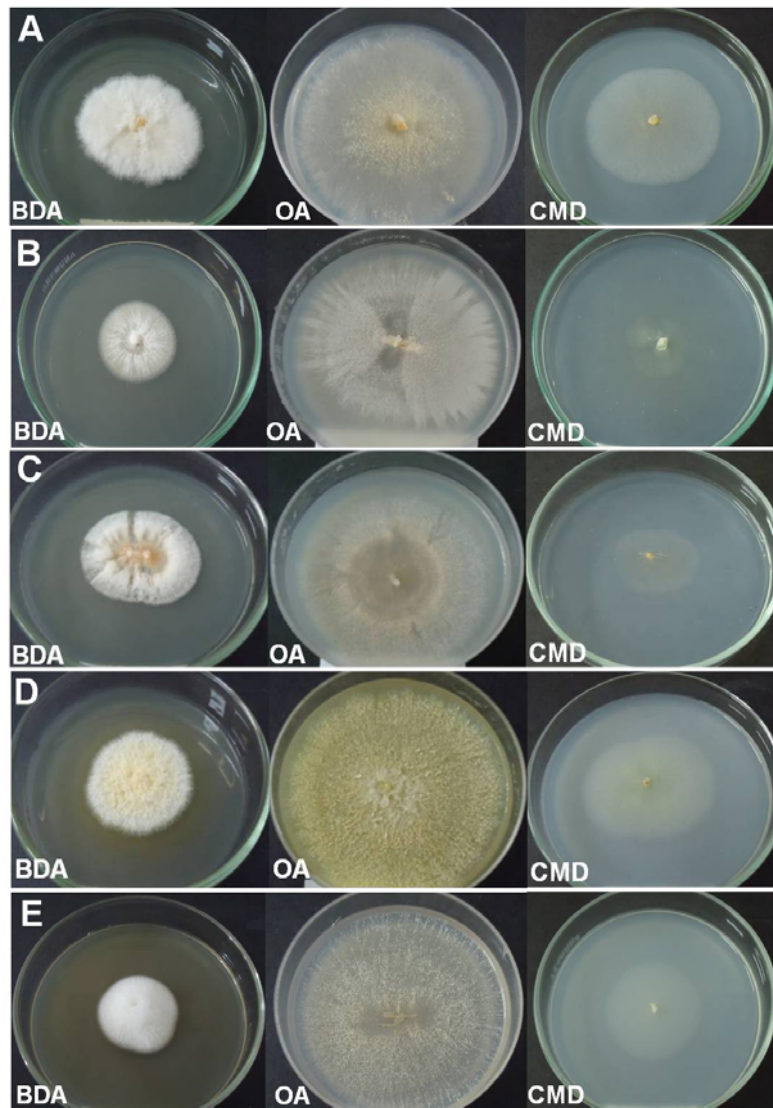


Figura 3 Características das colônias das espécies de *Clonostachys* cultivadas em BDA, OA e CMD. (A) *C. byssicola*. (B) *C. candelabrum*. (C) *C. grammicospora*. (D) *C. pseudochroleuca*. (E) *C. rhizophaga*. (F) *C. rogersoniana*. (G) *C. rosea* f. *catenulata*. (H) *C. rosea* f. *rosea*. (I) *C. rossmaniae*. (J) *C. setosa*. (...Continua...)

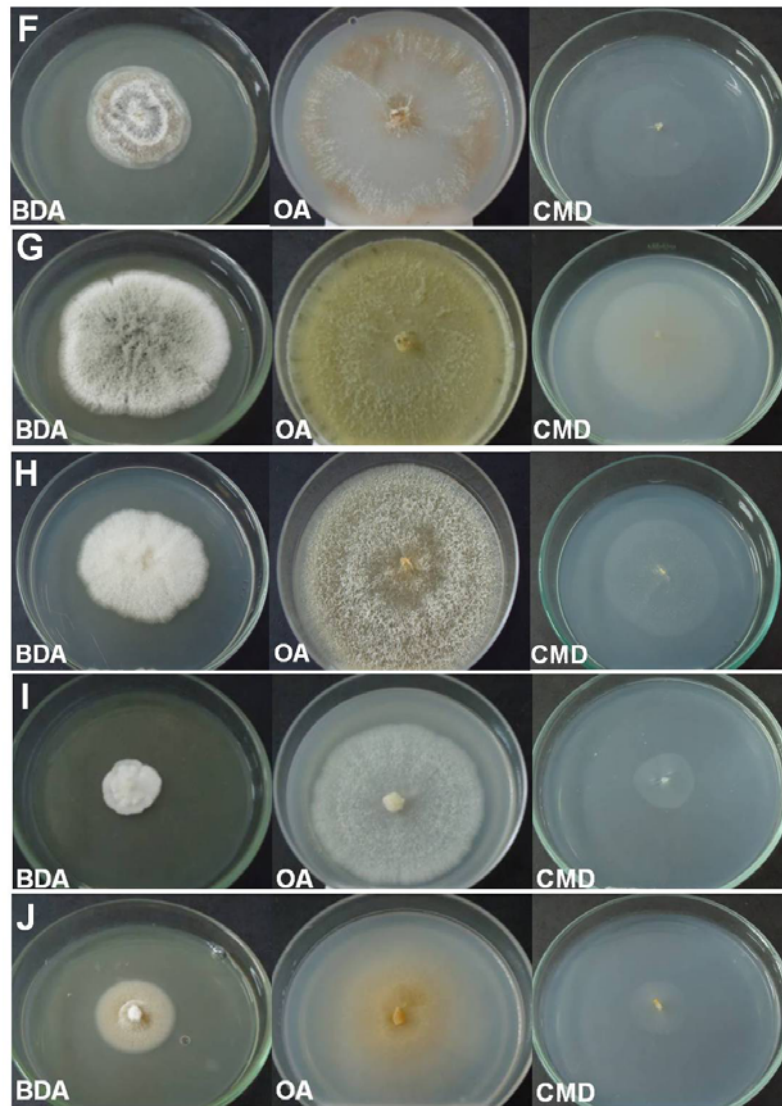


Tabela 1 Características das espécies de *Clonostachys* em meio de cultura BDA, CMD e OA, incubadas a 25 °C com fotoperíodo de 12 horas.

Espécie	Coloração da colônia			Diâmetro da colônia (mm)	
	BDA	CMD	OA	BDA	CMD
<i>C. byssicola</i>	Laranja	Não pigmentada; laranja-clara	Laranja	46	48
<i>C. candelabrum</i>	Branco	Não pigmentada	Branco-rosada	32	26
<i>C. grammicospora</i>	Laranja	Não pigmentada	Laranja	39	29
<i>C. pseudochroleuca</i>	Branco-amarelada	Não pigmentada; amarela	Branco-amarelada; amarela	44	45
<i>C. rhizophaga</i>	Branco-alaranjada	Não pigmentada	Laranja-clara	33	36
<i>C. rogersoniana</i>	Branco com pontos marrons	Não pigmentada	Branca; branca com bordas marrons	37	40
<i>C. rosea</i> f. <i>catenulata</i>	Branco-esverdeada; verde-acinzentada	Não pigmentada; branco-alaranjada	Laranja-clara; branca com pontos verdes	46	48
<i>C. rosea</i> f. <i>rosea</i>	Branco-alaranjada; amarelada	Não pigmentada; laranja-clara; amarela	Laranja; laranja-amarelada	42	47
<i>C. rossmaniae</i>	Branca; branco-alaranjada	Não pigmentada	Branco	27	23
<i>C. setosa</i>	Marrom	Não pigmentada	Laranja-clara	28	24

Tabela 2 Características micromorfológicas das espécies de *Clonostachys* em meio OA, incubadas a 25 °C com fotoperíodo de 12 horas durante catorze dias.

Espécie	Conidióforos		Fiálide		Intercalar	Métulas	Conídios	
	Prim.	Secund.	Conid. Prim.	Conid. Secund.			Tamanho	Forma
<i>C. byssicola</i>	35-325 x 2,5	12,5-137,5 x 2,5	13-50 x 1-3	7-20 x 2-3	Ausentes	5-14 x 2-3	3-7 x 2-4	Ovoidal, um pouco curvado
<i>C. candelabrum</i>	Ausentes	19-92,5 x 2-5	Ausentes	5-22 x 2	Presentes	4-9 x 2	3-5 x 2-3	Ovoidal / elipsoidal
<i>C. grammicospora</i>	27,5-175 x 2,5	20-33 x 2-3	2-29 x 2-4	8-20 x 2-3	Presentes	6-11 x 2	4-10 x 2-3	Ovoidal / elipsoidal
<i>C. pseudochroleuca</i>	17,5-180 x 2-4	12,5-130 x 1-3	8-39 x 1-3	5-18 x 1-3	Ausentes	5-12 x 1-3	2-8 x 1-4	Elipsoidal
<i>C. rhizophaga</i>	15-97,5 x 2,5	17,5-57,5 x 2,5	9-32 x 1-3	7-14 x 2	Ausentes	7-15 x 2-3	3-9 x 2-4	Elipsoidal, um pouco curvado
<i>C. rogersoniana</i>	37,5-970 x 2,5-5	40-262,5 x 2,5-7	9-38 x 1-3	7-16 x 1-3	Presentes	5-12 x 1-4	3-8 x 1-4	Ovoidal
<i>C. rosea</i> f. <i>rosea</i>	15-190 x 2,5-5	17,5-110 x 2,5-5	12-45 x 1-2	5-18 x 1-3	Ausentes	5-19 x 2-4	3-6 x 2-3 6-8 x 3-5	Um lado curvado, outro lado achatado; Ovoidal
<i>C. rosea</i> f. <i>catenulata</i>	12,5-237 x 2,5-5	15-112,5 x 2,5-5	9-50 x 1-4	6-22 x 1-4	Presentes, mas raras	6-17 x 1-4	2-6 x 2-4 6-12 x 3-5	Um lado curvado, outro lado achatado
<i>C. rosmaniae</i>	Ausentes	22,5-125 x 2,5	Ausentes	4-20 x 2-3	Presentes	4-12 x 2-3	3-6 x 2-3	Ovoidal / elipsoidal
<i>C. setosa</i>	Ausentes	12,5-137,5 x 2-3	Ausentes	6-21 x 2	Presentes	6-11 x 2	6-15 x 3-4	Elipsoidal

Abreviações: Prim.- primário; Secund. - secundário; Conid. - conidióforo

3.2 Análises filogenéticas

Em todas as árvores geradas são indicados os nomes de cada espécie somente para os grupos monofiléticos com suporte estatístico (valores de bootstrap maiores que 50 %). Nas árvores geradas a partir de NJ e MP para cada região gênica, bem como para as árvores combinadas, observa-se que a topologia das mesmas é bastante similar. As árvores geradas utilizando de sequências de ITS não foram informativas, tanto para NJ quanto para MP, pois não separaram as espécies de *Clonostachys* em clados com suporte estatístico, ficando os isolados de *C. byssicola*, *C. pseudochroleuca* e *C. rosea* f. *rosea* dispersos na árvore e, portanto, não são aqui mostradas. Já as árvores geradas a partir de sequências ITS mais parte da região LSU rDNA foram mais informativas (Figuras 1 e 2, APÊNDICE B), ficando a maioria das espécies bem definidas, porém, há poucas sequências de referência disponíveis, inclusive nenhuma sequência de *C. rosea* f. *rosea* (SCHROERS, 2001), o que torna difícil a delimitação das espécies. Nessas árvores alguns clados específicos ficaram sem suporte estatístico (valores menores que 50 % de bootstrap), entretanto, pode-se observar a separação entre as espécies *C. byssicola*, *C. rhizophaga*, *C. rosea* f. *rosea*, *C. rogersoniana*, *C. rossmaniae* e *C. setosa*. Os isolados identificados como *C. rosea* f. *catenulata* formaram um clado diferente daquele de *C. rosea* f. *rosea*, indicando que são linhagens distintas e não formas dentro de uma mesma espécie. Isolados de *C. pseudochroleuca* formaram um grupo polifilético, pois não se agruparam em um mesmo clado.

A partir de sequências de *tub2*, as árvores geradas foram informativas, separando as espécies em diferentes clados. Nestas árvores, as espécies *C. pseudochroleuca*, *C. rhizophaga*, *C. rogersoniana* e a forma *C. rosea* f. *rosea* formaram grupos monofiléticos com bom suporte estatístico, enquanto *C. byssicola* formou um grupo polifilético, no qual os isolados CML422 e

CML1943 permaneceram fora do agrupamento, juntamente com a sequência de referência, porém, sem suporte estatístico (Figuras 3 e 4, APÊNDICE B).

A topologia das árvores combinadas das regiões ITS e *tub2* foi bastante similar à topologia da árvore individual do gene *tub2* (Figuras 4 e 5), apresentando boa resolução das espécies com maior suporte estatístico. As espécies *C. pseudochroleuca*, *C. rhizophaga*, *C. rogersoniana* e *C. rosea* formaram grupos monofiléticos, estão incluídas no clado de *C. rosea* sequências de referência para as duas formas, *C. rosea* f. *catenulata* e *C. rosea* f. *rosea*, e somente um isolado de *C. rosea* f. *rosea* deste estudo, CML2310, foi incluído. Entretanto, os isolados que foram denominados *C. rosea* f. *catenulata* (CML1919 e CML1921) não formaram um grupo monofilético com *C. rosea* f. *rosea*, mas também não se agruparam com nenhum outro clado identificado, formando, porém, um grupo irmão àquele de *C. rhizophaga*. Assim, há indícios de que esses isolados pertençam a uma linhagem independente daquelas já descritas.

C. byssicola formou um grupo monofilético na árvore combinada gerada utilizando o NJ, porém, sem suporte estatístico (Figura 4), enquanto na árvore de MP formou um grupo polifilético, no qual os isolados CML422 e CML1943 permaneceram fora do agrupamento com a sequência de referência (Figura 5).

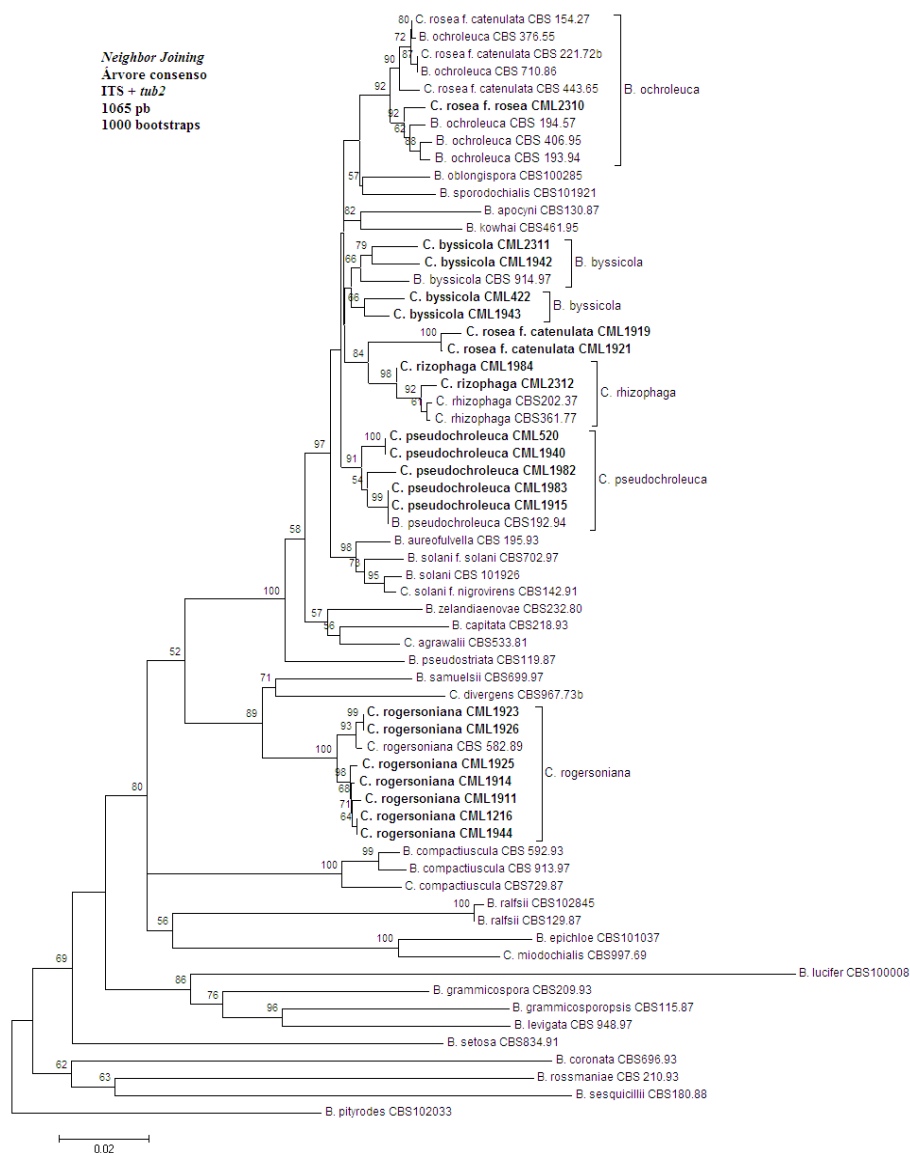


Figura 4 Árvore consenso gerada pelo método *neighbor joining* a partir do alinhamento combinado de seqüências de ITS e β -tubulina, em um total de 1.065 pb. Os nomes em negrito representam os isolados de *Clonostachys* deste estudo. Os demais nomes são concernentes a seqüências de referência (SCHROERS, 2001) obtidas do GenBank. Valores de bootstrap (1.000 replicações) estão indicados acima dos nós.

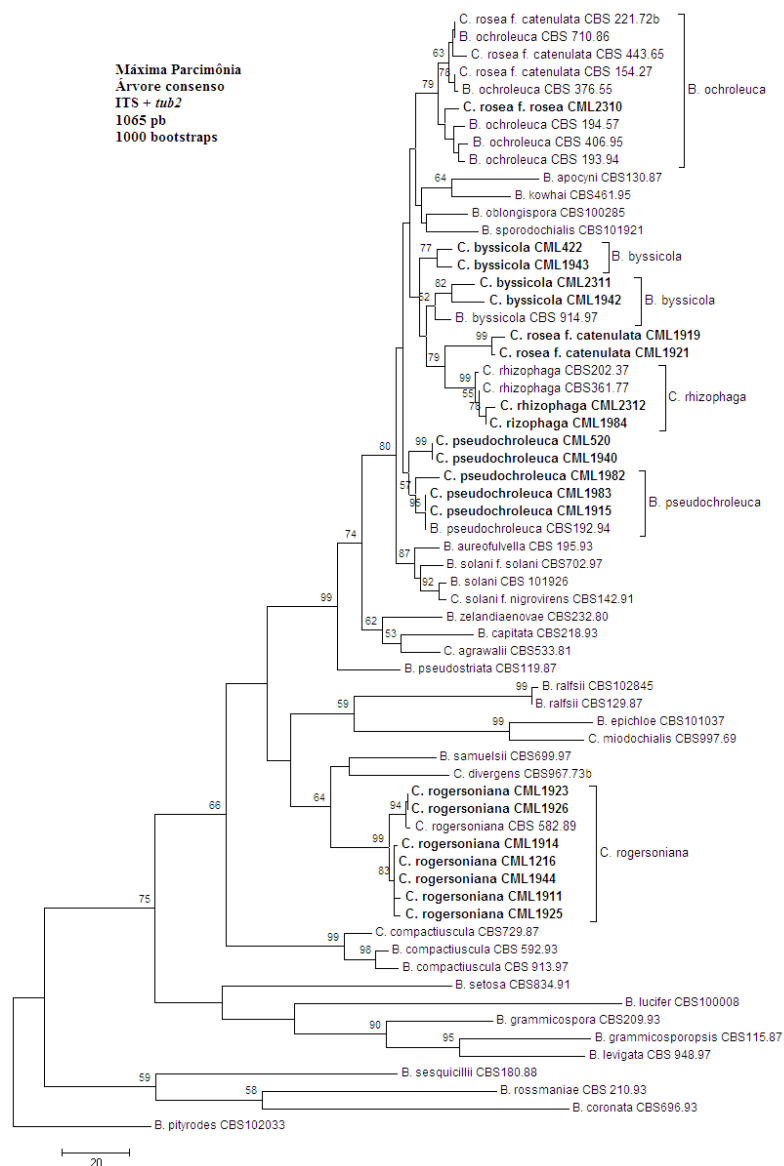


Figura 5 Árvore consenso obtida pelo método de máxima parcimônia, gerada a partir de 16 árvores mais parcimoniosas, utilizando o alinhamento combinado de seqüências de ITS e β -tubulina, em um total de 1.065 pb. Os nomes em negrito representam os isolados de *Clonostachys* deste estudo. Os demais nomes são concernentes a seqüências de referência (SCHROERS, 2001) obtidas do GenBank. Valores de bootstrap (1.000 replicações) estão indicados acima dos nós.

4 DISCUSSÃO

Dos 44 isolados de *Clonostachys* foram identificadas as seguintes espécies: *C. byssicola*, *C. candelabrum*, *C. grammicospora*, *C. pseudochroleuca*, *C. rhizophaga*, *C. rogersoniana*, *C. rosea*, *C. rossmaniae* e *C. setosa*, o que sugere grande diversidade deste gênero no Brasil, uma vez que, dentre poucos isolados, foram identificadas diferentes espécies. Todas essas espécies são consideradas comuns, tanto em regiões tropicais como de clima temperado (SCHROERS, 2001), sendo *C. candelabrum*, *C. pseudochroleuca*, *C. rhizophaga* e *C. setosa*, pela primeira vez relatadas no Brasil. Todas as espécies tiveram representantes isolados a partir de amostras de solo, confirmando que *Clonostachys* é um gênero comumente encontrado em material vegetal em decomposição ou serrapilheira, sendo saprófito (SCHROERS, 2001).

O gênero *Bionectria* é dividido em seis subgêneros (SCHROERS, 2001), dos quais três estão presentes neste estudo. O subgênero *Bionectria* compreende um maior número de espécies e seus anamorfos são caracterizados por apresentarem conidióforos tipicamente dimórficos e raramente ocorre a presença de fiálides intercalares nos conidióforos secundários. Foi aqui representado por maior número de espécies, sendo elas *C. byssicola*, *C. rosea*, *C. pseudochroleuca*, *C. rhizophaga* e *C. rogersoniana*. Dentre estas, *C. byssicola*, *C. rosea*, *C. rhizophaga* e *C. rogersoniana* apresentam conidióforos primários e secundários distintos, com fiálides divergentes nos conidióforos primários. Já *C. pseudochroleuca* apresenta conidióforos primários convergentes e semelhantes aos penicilados.

As variações entre espécies do subgênero *Bionectria* são pequenas o que torna difícil a sua delimitação baseada apenas em caracteres morfológicos (Tabelas 1 e 2). Com exceção de *C. rogersoniana*, as espécies são morfológicamente parecidas. A distinção entre *C. byssicola* e *C. rosea*, segundo

Schroers (2001), está nos conidióforos primários, em que as fiálides de *C. byssicola* estão, geralmente, em ângulos agudos em relação à estipe e suas ramificações surgem na base do conidióforo, enquanto em *C. rosea* as fiálides são divergentes e as ramificações surgem da parte superior da estipe. Entretanto, dentre os isolados do presente estudo, foi observado que os conidióforos primários de *C. byssicola* normalmente apresentam ramificação bastante divergente, assim como ocorre entre os isolados de *C. rosea* f. *rosea*, sendo morfológicamente semelhantes a eles (Figuras 1 e 2). A espécie *C. rhizophaga* difere de *C. byssicola* e *C. rosea* pela formação de conidióforos com ramificação em ângulo mais aberto, além disso, pode formar massa de conídios verdes. Entretanto, esta característica não foi observada no presente estudo. Já a espécie *C. pseudochroleuca* (CML18, CML520, CML824, CML1940) difere das demais pela formação de conidióforos primários com ramificação convergente. Entretanto, os isolados CML1915, CML1982 e CML1983 apresentam conidióforos primários ramificados divergentemente em ângulos agudos, característica esta que torna estes isolados semelhantes a *C. byssicola*, descrita por Schroers (2001). Dessa forma, a delimitação correta dessas espécies neste estudo foi possível por meio das análises filogenéticas.

O subgênero *Epiphloea* é caracterizado por apresentar somente conidióforos penicilados contendo fiálides intercalares e algumas espécies podem formar setas, como observado em *C. setosa*. Neste trabalho, este subgênero foi representado pelas espécies *C. candelabrum*, *C. rossmaniae* e *C. setosa*. Dentre as espécies do subgênero *Epiphloea*, *C. candelabrum* e *C. rossmaniae* são bastante semelhantes, sendo distintas pela ramificação dos conidióforos, que se apresenta divergente em *C. candelabrum* e convergente em *C. rossmaniae*. Já *C. setosa* apresenta, além das setas, conídios maiores do que os dos demais (Tabela 2).

O subgênero *Zebrinella*, representado pela espécie *C. grammicospora*, é intermediário aos subgêneros *Bionectria* e *Epiphloea*, pois forma conidióforos mono ou dimórficos, podendo ser observadas fiálides intercalares. Seus conídios são mais retos, enquanto os conídios dos subgêneros *Bionectria* e *Epiphloea* são um pouco curvados com um lado achatado.

Os isolados de *C. rosea* f. *catenulata* foram assim denominados pela formação de massa de conídios verdes, pois suas características micromorfológicas são iguais às de *C. rosea* f. *rosea*, sendo a diferença entre ambas a coloração dos conídios (Figura 3 G, H) (SCHROERS, 2001). As formas de *C. rosea* têm padrão de ramificação dos conidióforos idêntico, em que os conidióforos primários são verticilados, com ramificações divergentes surgindo na região superior da estipe, conidióforos secundários convergentes e o diâmetro das colônias é praticamente o mesmo (Figura 2 E-J; Tabela 1). Entretanto quando se observa as árvores filogenéticas geradas a partir de sequências das regiões ITS e *tub2* (Figuras 4 e 5) essas duas formas formam clados distintos. No entanto, Schroers (2001) observou que isolados das duas formas se agrupavam, porém geralmente sem suporte bootstrap.

No presente trabalho, os isolados de *C. rosea* f. *catenulata* estão mais próximos de *C. rhizophaga* (Figuras 4 e 5), que também pode formar massa de conídios verde. Portanto, de acordo com a filogenia, os isolados denominados *C. rosea* f. *catenulata* não pertencem à espécie *C. rosea*, mas também não fazem parte da espécie *C. rhizophaga* e podem, portanto, representar uma espécie ainda não descrita. No trabalho realizado por Schroers (2001), isolados de *C. rosea* f. *catenulata* não se agrupam no mesmo clado que *C. rosea* f. *rosea* isolados a partir de ascósporos. Isso ocorre porque *C. rosea* f. *catenulata* não tem ligação com o teleomorfo de *C. rosea* f. *rosea*, *B. ochroleuca*, o que também sugere que *C. rosea* f. *catenulata* seja uma espécie distinta de *C. rosea*.

Como observado nas árvores geradas a partir de sequências de ITS mais LSU rDNA (Figuras 1 e 2, APÊNDICE B), a maioria dos isolados de *C. rosea* f. *catenulata* parece ser formada por linhagens clonais, não se diferenciando entre si. Isso ocorreu, provavelmente, porque todos foram isolados de um mesmo substrato em uma mesma região (Tabela 1A, APÊNDICE A).

Nas análises filogenéticas feitas a partir de sequências de *tub2* (Figuras 3 e 4, APÊNDICE B) e sequências combinadas de ITS e *tub2* pelo método de MP (Figura 5), os isolados CML422, CML1942, CML1943 e CML2311 formam um grupo polifilético, no qual CML422 e CML1943 permanecem fora do agrupamento, indicando que há uma variação entre os isolados com relação a este gene, variação esta presente, inclusive, na sequência de referência que se agrupa com esses isolados nas árvores de *tub2* (Figuras 3 e 4, APÊNDICE B).

O isolado CML1910, identificado como *C. grammicospora*, pode representar outra espécie, porém, bem próxima de *C. grammicospora*, pois, nas análises filogenéticas geradas com sequências de ITS mais parte da LSU rDNA (Figuras 1 e 2, APÊNDICE B), ambos os isolados estão no mesmo clado, porém, há uma distância significativa entre eles. No entanto, não é coerente uma afirmação de que seja outra espécie, uma vez que a sequência do gene *tub2* deste isolado, que poderia ser mais informativa, não foi incluída nas análises filogenéticas.

No presente estudo, as árvores geradas a partir de sequências de ITS mais LSU rDNA parcial foram parcialmente informativas para os isolados do subgênero *Bionectria*, porém, as árvores geradas a partir de sequências de *tub2* e também aquelas combinadas para ITS e *tub2* já separaram as espécies, o que foi também observado por Schroers (2001). Dessa forma os isolados que foram identificados a partir de caracteres morfológicos e não têm sequências de *tub2* estão identificados em nível de espécie por inferência daqueles isolados que se

agruparam com sequências de referência na árvore de ITS mais LSU rDNA parcial.

A delimitação das espécies de *Clonostachys* realizada por Schroers (2001) foi feita a partir de caracteres morfológicos, mas já com indícios que o conceito de espécie morfológica nem sempre pode ser aplicado para as espécies de *Clonostachys*, uma vez que foi observado que isolados com mesmas características morfológicas foram agrupados em clados distintos. Entretanto, todos os isolados de *C. rogersoniana* foram agrupados em um mesmo clado e apresentam as mesmas características morfológicas, típicas da espécie. Trata-se, portanto, de uma boa espécie morfológica e filogenética.

A maioria dos trabalhos realizados com *Clonostachys* é referente à utilização da espécie *C. rosea* como agente de controle biológico, atuando, principalmente, como micoparasita. A partir do presente estudo, pode-se inferir que, muitas vezes, pode ter sido feita uma identificação errônea de isolados deste gênero em outros trabalhos, uma vez que espécies próximas a *C. rosea* apresentam morfologia bastante semelhante e, geralmente, se utilizam caracteres morfológicos para a delimitação dessas espécies. Dessa forma, sugere-se que muitas espécies do gênero também possam ser utilizadas como agentes de controle biológico e que a capacidade de parasitar pode estar dispersa e ser uma característica do gênero. Além do mais, podem ainda existir espécies não descritas com morfologia similar à daquelas já conhecidas.

5 CONCLUSÕES

O gênero *Clonostachys* apresenta-se com grande diversidade de espécies no Brasil.

As espécies do subgênero *Bionectria* apresentam caracteres morfológicos com diferenças bastante sutis, sendo necessária a utilização de análises filogenéticas para a sua delimitação.

Os isolados identificados como *C. rosea* f. *catenulata*, com base na morfologia, não formam um grupo monofilético com isolados *C. rosea* f. *rosea*.

Sequências do gene β -tubulina apresentam boa resolução para a delimitação de espécies do gênero *Clonostachys*, enquanto a região rDNA apresenta resolução baixa entre espécies próximas. No entanto, a análise combinada dessas regiões gênicas aumenta a confiabilidade da identificação das espécies, pois apresenta maior suporte estatístico.

REFERÊNCIAS

- HEPPERLE, D. **SeqAssem**©: a sequence analysis tool contig assembler and trace data visualization tool for molecular sequences. Klein Raden: Sequentix, 2004. Disponível em: <<http://www.sequentix.de>>. Acesso em: 10 out. 2010.
- LESLIE, J. F.; SUMMERELL, B. A. **The fusarium laboratory manual**. Ames: Blackwell, 2006. 388 p.
- O'DONNELL, K. *Fusarium* and its near relatives. In: REYNOLDS, D. R.; TAYLOR, J. W. (Ed.). **The fungal holomorph: mitotic, meiotic and pleomorphic speciation in fungal systematic**. Wallingford: CAB International, 1993. p. 225-233.
- O'DONNELL, K.; CIGELNIK, E. Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Chicago, v. 7, n. 1, p. 103-116, Feb. 1997.
- SCHROERS, H. J. Generic delimitation of *Bionectria* (Bionectriaceae, Hypocreales) based on holomorph characters and rDNA sequences. **Studies in Mycology**, Utrecht, n. 45, p. 63-82, May 2000.
- _____. Monograph of *Bionectria* (Ascomycota, Hypocreales, Bionectriaceae) and its *Clonostachys* anamorphs. **Studies in Mycology**, Utrecht, n. 46, p. 1-214, Nov. 2001.
- SCHROERS, H. J. et al. Classification of the mycoparasite *Gliocladium roseum* in *Clonostachys* as *C. rosea*, its relationship to *Bionectria ochroleuca*, and notes on other *Gliocladium*-like fungi. **Mycologia**, Lawrence, v. 9, n. 2, p. 365-385, Mar./Apr. 1999.
- TAMURA, K. et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 28, n. 10, p. 2731-2739, May 2011.
- TAYLOR, J. W. et al. Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 31, n. 1, p. 21-32, Jan. 2000.

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

CAPÍTULO 3

Avaliação de micoparasitismo entre espécies do gênero *Clonostachys* e *Botrytis cinerea*

RESUMO

Este estudo foi realizado com o objetivo de avaliar a habilidade de 44 isolados de *Clonostachys*, pertencentes a nove espécies distintas, em parasitar hifas de *B. cinerea*, *in vitro*. Foram realizados pareamentos entre todos os isolados de *Clonostachys* e *B. cinerea* inoculados em lados opostos da placa de Petri contendo meio de cultura SNA, incubados, a 25 °C, com fotoperíodo de 12 horas. Os pareamentos foram avaliados de duas maneiras: primeiro, utilizando-se tiras de papel celofane colocadas entre as culturas do patógeno e antagonista, as quais foram retiradas para a visualização de interações entre hifas sob microscópio de luz e, segundo, sem a utilização de papel celofane, para a observação do crescimento do antagonista sobre o patógeno na placa de Petri. As interações entre hifas também foram observadas sob microscópio eletrônico de varredura, utilizando um fragmento retirado da área de encontro entre colônias de um isolado de *C. byssicola* e *B. cinerea* em SNA e em folhas destacadas de morango, nas quais foram inoculadas suspensões de conídios de *C. rosea* f. *rosea* e *B. cinerea*. As observações feitas sob microscopia indicaram que todas as espécies utilizadas neste estudo são parasitas de *B. cinerea*, mostrando interações típicas de parasitismo, como crescimento direcionado ao hospedeiro, ao qual o antagonista se prende, resultando no entrelaçamento de hifas e estrangulamento do patógeno. Os pareamentos realizados sem a utilização de papel celofane mostraram que, à exceção de *C. grammicospora* e *C. setosa*, todas as espécies crescem e esporulam sobre *B. cinerea*, sendo que *C. rosea* f. *rosea*, *C. rosea* f. *catenulata* e *C. rogersoniana* apresentaram um crescimento mais vigoroso sobre o hospedeiro. Desta forma, todas as espécies de *Clonostachys* avaliadas são potenciais agentes de controle biológico contra *B. cinerea*.

Palavras-chave: Antagonismo. Controle biológico. Mofo cinzento. Parasitismo.

1 INTRODUÇÃO

Botrytis cinerea é um fitopatógeno cosmopolita que pode infectar diversas espécies vegetais em seus variados órgãos, resultando na doença denominada mofo-cinzento, que causa perdas, principalmente na pós-colheita. O crescimento deste patógeno é favorecido pela alta umidade e temperatura moderada, sem as quais não há esporulação (SOSA-ALVAREZ; MADDEN; ELLIS, 1995; WILLIAMSON et al., 2007).

O controle do mofo-cinzento é feito por meio de práticas culturais, aplicação de fungicidas e, mais recentemente, uso do controle biológico. Dentre os microrganismos utilizados no biocontrole desta doença está *Clonostachys rosea*, espécie conhecida como micoparasita, que reduz significativamente a esporulação de *B. cinerea*. Em vários trabalhos comprovou-se a utilidade de isolados de *C. rosea* como agente de controle biológico contra o agente causador do mofo-cinzento (COTA et al., 2008; MORANDI; SUTTON; MAFFIA, 2000; NOBRE et al., 2005; SILVERA-PÉREZ et al., 2010).

Embora existam indícios, não há relatos de outras espécies de *Clonostachys*, além de *C. rosea*, que apresentam ação antagônica contra fitopatógenos. Dessa forma, este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar a habilidade de diferentes espécies de *Clonostachys* em parasitar *B. cinerea*, *in vitro*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Neste estudo, foram utilizados 42 isolados de *Clonostachys*, pertencentes a dez espécies obtidas de diversos substratos e diferentes locais no Brasil, além de dois isolados, CML2309 (*C. byssicola* - GF04) e CML2310 (*C. rosea* f. *rosea* - GSAL), cedidos pela Embrapa Uva e Vinho, Bento Gonçalves, RS, com eficiência comprovada no controle do mofo-cinzento causado por *Botrytis cinerea* (SILVERA-PÉREZ et al., 2010; Tabela 1A, APÊNDICE A). Um isolado de *B. cinerea* (CML2317) foi obtido de frutos de morango comercial. Todo o material encontra-se depositado na Coleção Micológica de Lavras (CML), no Laboratório de Sistemática e Ecologia de Fungos, no Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

2.1 Testes de parasitismo

Cada isolado de *Clonostachys* foi testado com o fitopatógeno *B. cinerea*. O teste de parasitismo foi feito inoculando-se um disco de micélio de 6 mm de *Clonostachys* a, aproximadamente, 2 cm da borda de uma placa de Petri com 6 cm de diâmetro contendo meio de cultura *Spezieller Nährstoffarmer Agar* (SNA). No centro da placa foram colocadas duas tiras de papel celofane estéreis de 15 por 20 mm e esta foi incubada, a 25 °C, com fotoperíodo de 12 horas. Após 48 horas, inoculou-se um disco de micélio de 6 mm de *B. cinerea* do lado oposto ao disco de micélio de *Clonostachys*. As culturas permaneceram incubadas por até 14 dias, quando foram removidas as tiras de papel celofane, que foram postas sobre lâminas e cobertas com lamínulas e a área de interação entre as colônias foi observada sob microscópio de luz Leica DMLS, utilizando a objetiva de imersão em um aumento de 1.000x.

Cada pareamento foi realizado em três repetições e as interações entre hifas foram fotografadas. Esse procedimento foi repetido, porém, sem a utilização de tiras de papel celofane e com período de incubação de vinte dias, para a observação do parasitismo em placa.

2.2 Microscopia eletrônica de varredura

As amostras foram obtidas de duas formas: a partir de cortes da área de interação entre CML2309 isolado de *C. byssicola* e *B. cinerea* nos testes de cultura pareada em meio de cultura SNA descritos acima, e cortes da região de interação em folhas destacadas de morango, inoculadas com suspensão de conídios do isolado de *C. rosea* f. *rosea* CML1210 e *B. cinerea*. Também foram visualizados, sob microscopia eletrônica de varredura, cortes de folhas contendo, isoladamente, *C. rosea* f. *rosea* e *B. cinerea*.

O experimento em folhas destacadas foi adaptado de Mamarabadi et al. (2008), no qual as folhas de morango foram coletadas e, em seguida, submetidas à desinfestação superficial, sendo submersas em etanol 70%, durante 30 segundos, hipoclorito 1,5%, durante 30 segundos e água destilada estéril, durante 2 minutos, por três vezes. Após as lavagens, as folhas foram colocadas em placas de Petri de 9 cm e secas ao ar, durante 10 minutos. As placas foram revestidas com papel de filtro estéril umedecido recoberto com um pedaço de papel alumínio estéril, no qual foram feitos pequenos orifícios, para que houvesse a passagem de umidade sem que a folha entrasse em contato com a água. Após o período de secagem, as folhas tiveram a superfície superior central ferida com o auxílio de canudos de plástico estéreis. Foram feitas suspensões dos conídios retirados de culturas com sete dias de crescimento de *B. cinerea* e do isolado de *C. rosea* f. *rosea* CML1210, em solução Tween 80 estéril, nas concentrações de 1×10^6 , para o antagonista e de 1×10^5 , para o patógeno e estas

suspensões foram pulverizadas nas folhas sobre o ferimento utilizando um borrifador. As placas foram incubadas, a 20 °C, com fotoperíodo de 12 horas, durante sete dias.

Todo o procedimento de processamento de amostras e a visualização sob microscópio eletrônico de varredura foram realizados no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultraestrutural, no Departamento de Fitopatologia da UFLA.

As amostras foram transferidas para microtubos de 1,5 mL, aos quais foi adicionado o fixador Karnovsky (glutaraldeído 2,5%, formaldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,05 M, pH 7,2; CaCl₂ 0,01 M), com volume cerca de 10 vezes maior do que o da amostra. As amostras permaneceram por 24 horas embebidas neste fixador sob refrigeração.

Após a fixação primária, procedeu-se à pós-fixação. As amostras foram lavadas em aldeído com três passagens de 10 minutos em tampão cacodilato 0,05 M e imersas em tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato 0,05 M, pH 7,2, durante uma hora. Após este período, as amostras foram submetidas a cortes em nitrogênio líquido, com um bisturi.

Na etapa de desidratação, as amostras fixadas em tetróxido de ósmio foram lavadas em água destilada por três vezes e, a seguir, submetidas a lavagens com soluções de concentração crescente de acetona (25%, 50%, 75%, 90% e 100%), permanecendo por 10 minutos em cada solução, tendo a lavagem com acetona, na concentração 100%, sido realizada por três vezes. As amostras devidamente identificadas foram colocadas em gaiolas individuais e levadas ao aparelho de ponto crítico para a retirada da acetona.

Suportes de alumínio com 13 mm de diâmetro foram cobertos com papel alumínio e sobre este foi colocado pedaço de fita dupla face, para que as amostras ficassem devidamente presas. Dessa forma, as amostras foram colocadas sobre a fita com uma pinça e levadas ao sputtering, para o banho de

ouro. As amostras foram, então, submetidas à visualização em microscópio eletrônico de varredura Carl Zeiss SEM EVO 40.

3 RESULTADOS

3.1 Avaliação do micoparasitismo

Todas as espécies do gênero *Clonostachys* utilizadas neste estudo apresentaram-se parasitas a *Botrytis cinerea*. Quando se aproximavam das hifas do patógeno, muitas vezes, os isolados de *Clonostachys* produziam ramos laterais orientados em direção às hifas de *B. cinerea* (Figuras 6A e 7C) ou, ainda, as hifas de *Clonostachys* cresciam em direção às do hospedeiro e se prendiam a elas através de estruturas tipo apressório (Figura 6B). Quando em contato, antagonista podia apresentar um crescimento espiralado sobre o patógeno (Figura 6C), mas, normalmente, as hifas de *Clonostachys* se entrelaçavam fortemente às de *B. cinerea*, como em um estrangulamento (Figura 6D; Figura 7D, E). Alguns isolados formaram estruturas em forma de ganchos (Figura 6E) e, algumas vezes, penetravam dentro das hifas do patógeno (Figura 6F). Foram observados a fragmentação de hifas (Figura 6G) e o crescimento interrompido de *B. cinerea*, após interação com hifas de *Clonostachys* (Figura 6H).

Nos pareamentos realizados sem a utilização das tiras de papel celofane entre as colônias de *Clonostachys* e *B. cinerea*, com exceção de *C. grammicospora* e *C. setosa*, foram observados o crescimento e a esporulação de todos os isolados antagonistas sobre o patógeno. Dentre as espécies de *Clonostachys*, *C. rogersoniana*, *C. rosea* f. *catenulata* e *C. rosea* f. *rosea* foram as que tiveram um crescimento mais vigoroso sobre *B. cinerea* (Figura 8).

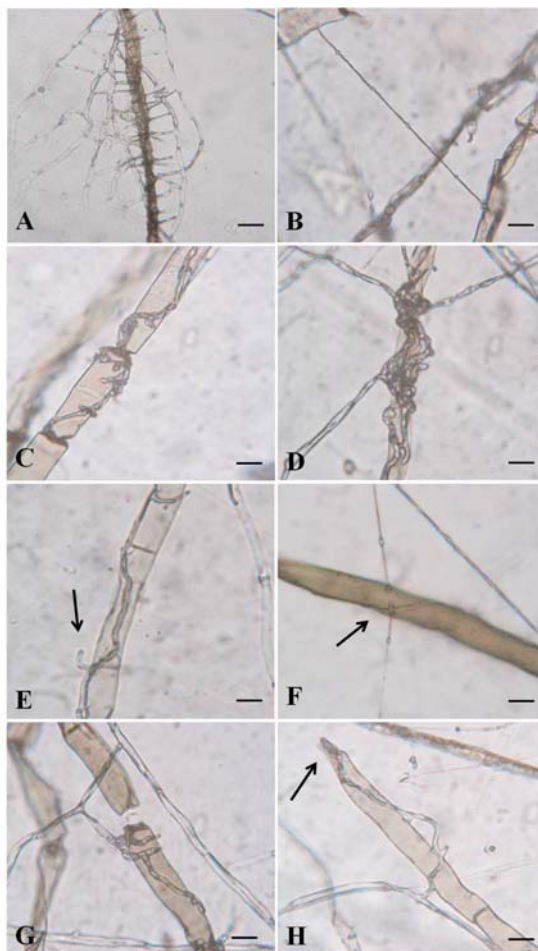


Figura 6 Interações de parasitismo de hifas de *Clonostachys* sobre *Botrytis cinerea* observadas sob microscópio de luz. (A) Ramos laterais de hifas de *Clonostachys* orientados em direção a *B. cinerea* (*C. rogersoniana*, CML1216). (B) Hifa do antagonista se prende ao hospedeiro (*C. rogersoniana*, CML1923). (C) Hifas de *Clonostachys* apresentam crescimento espiralado sobre o patógeno (*C. rogersoniana*, CML1923). (D) Entrelaçamentos das hifas de *Clonostachys* naquelas de *B. cinerea* (*C. rosea* f. *rosea*, CML1820). (E) Formação de gancho pelas hifas do antagonista, indicado pela seta (*C. rogersoniana*, CML1944). (F) Hifa do antagonista penetra hifa do patógeno, indicado pela seta (*C. pseudochroleuca*, CML520). (G) Fragmentação de hifa e (H) crescimento interrompido de *B. cinerea*, indicado pelas setas, após interação com hifas de *Clonostachys*. (G- *C. rogersoniana*, CML1923; H- *C. pseudochroleuca*, CML824). Aumento de 1000x. Escala de barras: 10 μ m.

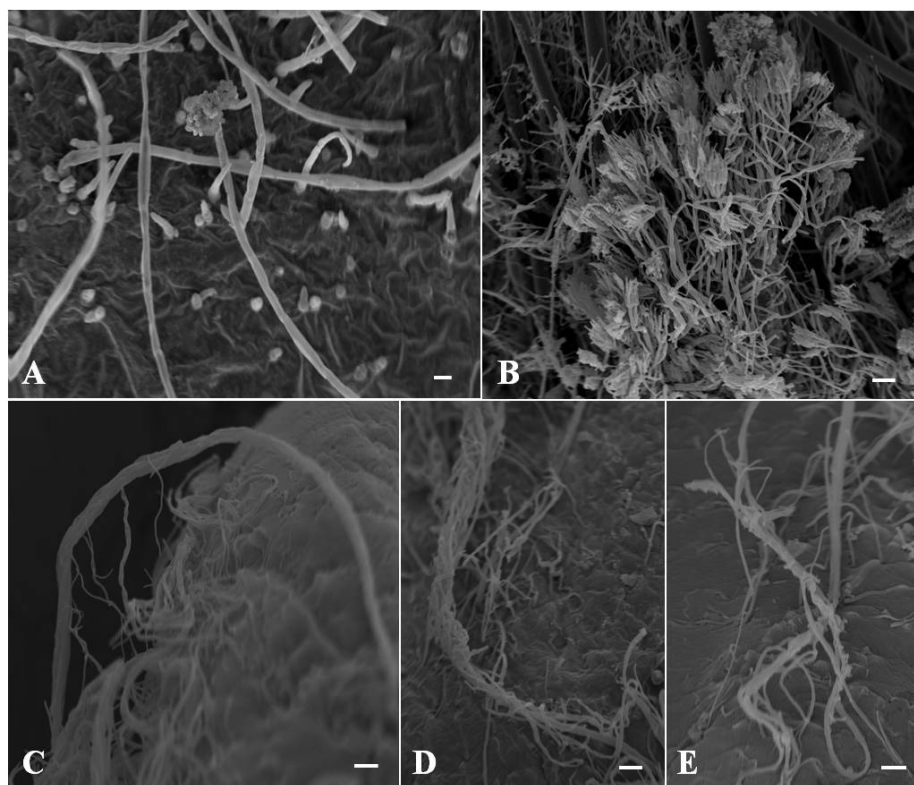


Figura 7 Eletromicrografia de varredura mostrando hifas e conidióforos de *Botrytis cinerea* (A) e do isolado CML1210 de *Clonostachys rosea* f. *rosea* (B) em folhas de morango e as interações de parasitismo de hifas de *C. byssicola* (CML2309) sobre hifas de *B. cinerea* em meio de cultura SNA, sendo observadas hifas do antagonista orientadas em direção ao hospedeiro (C) e entrelaçamentos das hifas de *C. byssicola* naquelas de *B. cinerea* (D-E). Escala de barras: 20 μ m.

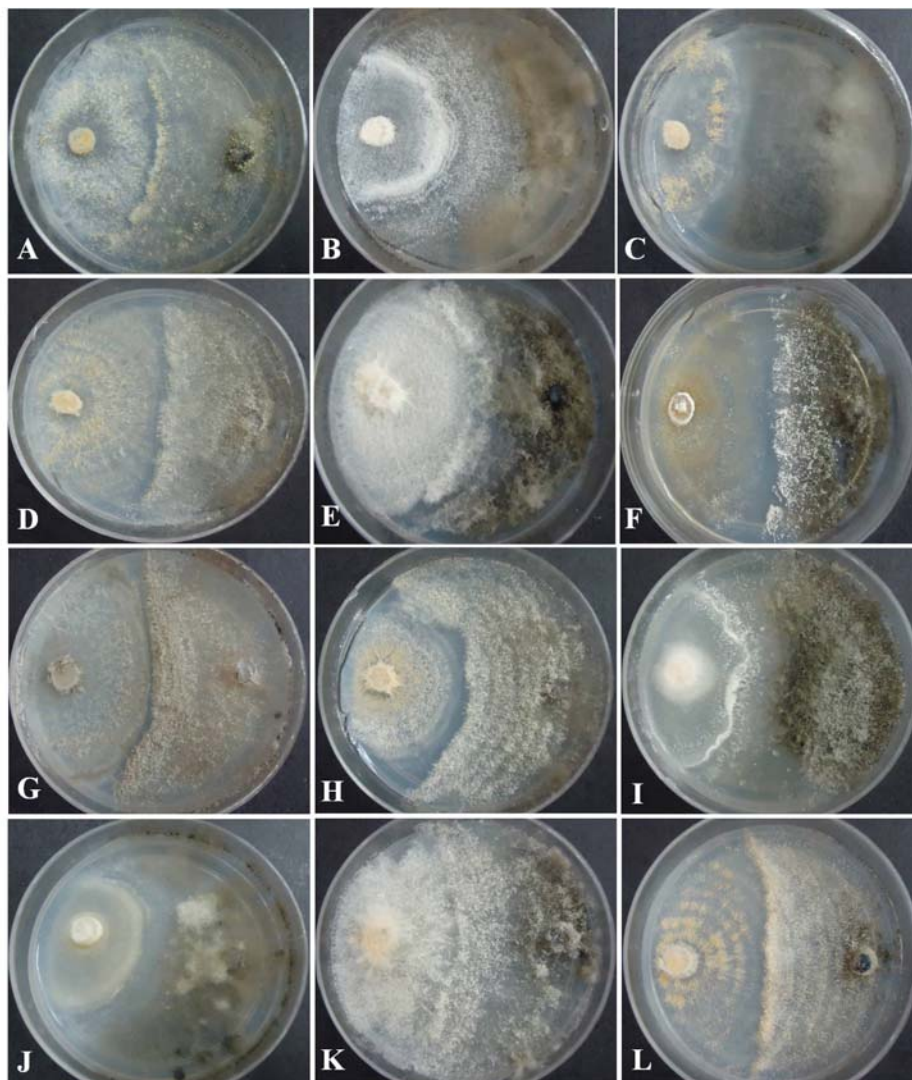


Figura 8 Pareamentos entre espécies de *Clonostachys* e *Botrytis cinerea* após vinte dias de incubação em placas de 60 mm contendo meio de cultura SNA, mostrando crescimento e esporulação do antagonista sobre o patógeno. (A) *C. byssicola*. (B) *C. candelabrum*. (C) *C. grammicospora*. (D) *C. pseudochroleuca*. (E) *C. rhizophaga*. (F) *C. rogersoniana*. (G) *C. rosea* f. *catenulata*. (H) *C. rosea* f. *rosea*. (I) *C. rossmaniae*. (J) *C. setosa*. (K) *C. rosea* f. *rosea*, isolado CML2310. (L) *C. byssicola*, isolado CML2309.

4 DISCUSSÃO

A região de interação entre colônias em culturas pareadas de isolados do gênero *Clonostachys* e *Botrytis cinerea* foi observada sob microscópio de luz e microscópio eletrônico de varredura. O diâmetro das hifas de *Clonostachys* é visivelmente menor do que daquele de *B. cinerea*, o que facilita a distinção de ambos e a visualização das interações entre as hifas (Figura 7A, B). Dessa forma, no presente estudo, foi observado que todas as espécies utilizadas são antagonistas a *B. cinerea* e não somente às formas de *C. rosea*. Este resultado já era esperado, uma vez que, no gênero *Clonostachys*, a delimitação de espécies utilizando marcadores morfológicos muitas vezes é difícil, pois algumas espécies são morfológicamente semelhantes (SCHROERS, 2001) e podem frequentemente ter sido erroneamente identificadas como *C. rosea*, que é a espécie mais comum e amplamente conhecida como parasita de *B. cinerea* (INNOCENTI et al., 2003; LI et al., 2002; XUE, 2003). Além do mais, em alguns trabalhos utilizam-se isolados do gênero sem identificação de espécie e mostram sua atividade antagônica (e.g. NOBRE et al., 2005).

As formas de parasitismo apresentadas pelos isolados deste estudo são as mesmas já observadas em trabalhos anteriores (MCQUILKEN; GEMMELL; LAHDENPERÄ, 2001; XUE, 2003), mostrando que estes potenciais agentes de biocontrole agem, principalmente, por meio de entrelaçamento e estrangulamento de hifas.

Dessa forma, o parasitismo dos isolados de *Clonostachys* a *B. cinerea* neste trabalho apresentou as etapas sucessivas características desta interação (INBAR; CHET, 1994). As hifas de *Clonostachys*, muitas vezes, crescem em direção ao patógeno, indicando que este não é um fenômeno ao acaso, mas que estas são estimuladas a realizar esta ação, estímulo este que pode ser físico ou químico. Chegando à hifa do hospedeiro, *Clonostachys* se entrelaça ou produz

um apressório, se prendendo ao patógeno e, eventualmente, ocorre a penetração no patógeno, provavelmente por ação de enzimas hidrolíticas.

Com exceção de *C. grammicospora* e *C. setosa*, os pareamentos realizados entre os isolados de *Clonostachys* e *B. cinerea* sem a utilização de tiras de papel celofane entre as colônias comprovaram a atividade parasítica das espécies utilizadas neste estudo sobre o patógeno, pois, quando em contato, *B. cinerea* cessa seu crescimento, enquanto *Clonostachys* cresce e esporula sobre o hospedeiro (Figura 8). Embora *C. grammicospora* e *C. setosa* não tenham apresentado crescimento visível sobre o patógeno, estas espécies são parasitas a *B. cinerea*, pois foram observadas interações entre suas hifas e do hospedeiro sob microscópio de luz.

Os resultados de testes *in vitro* não refletem necessariamente o que ocorre no ambiente, entretanto, são úteis para identificar prováveis candidatos ao controle biológico e possibilitam prever por quais mecanismos um antagonista inibe um patógeno, uma vez que aquele pode ter mais de um modo de ação (ALVINDIA; NATSUAKI, 2008; LISBOA et al., 2007; MEJÍA et al., 2008).

5 CONCLUSÃO

Com base nos resultados, pode-se concluir que todas as espécies de *Clonostachys* avaliadas são potenciais agentes de controle biológico contra *Botrytis cinerea*.

REFERÊNCIAS

- ALVINDIA, D. G.; NATSUAKI, K. T. Evaluation of fungal epiphytes isolated from banana fruit surfaces for biocontrol of banana crown rot disease. **Crop Protection**, Guildford, v. 27, n. 8, p. 1200-1207, Aug. 2008.
- COTA, L. V. et al. Biological control of strawberry gray mold by *Clonostachys rosea* under field conditions. **Biological Control**, Orlando, v. 46, p. 515-522, Sept. 2008.
- INBAR, J.; CHET, I. A newly isolated lectin from the plant pathogenic fungus *Sclerotium rolfsii*: purification, characterization and role in mycoparasitism. **Microbiology**, Wokingham, v. 140, p. 651-657, Mar. 1994.
- INNOCENTI, G. et al. Efficacy of microorganisms antagonistic to *Rhizoctonia cerealis* and their cell wall degrading enzymatic activities. **Mycological Research**, Cambridge, v. 107, n. 4, p. 421-427, Apr. 2003.
- LI, G. Q. et al. Ultrastructural study of mycoparasitism of *Gliocladium roseum* on *Botrytis cinerea*. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, Taipei, v. 43, n. 3, p. 211-218, July 2002.
- LISBOA, B. B. et al. Eficiência de *Trichoderma harzianum* e *Gliocladium viride* na redução da incidência de *Botrytis cinerea* em tomateiro cultivado sob ambiente protegido. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, n. 5, p. 1255-1260, set./out. 2007.
- MAMARABADI, M. et al. Real-time RT-PCR expression analysis of chitinase and endoglucanase genes in the three-way interaction between the biocontrol strain *Clonostachys rosea* IK726, *Botrytis cinerea* and strawberry. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 285, n. 1, p. 101-110, June 2008.
- MCQUILKEN, M. P.; GEMMELL, J.; LAHDENPERÄ, M. L. *Gliocladium catenulatum* as a potential biological control agent of damping-off in bedding plants. **Journal of Phytopathology**, Oxford, v. 149, p. 171-178, Apr. 2001.
- MEJÍA, L. C. et al. Endophytic fungi as biocontrol agents of *Theobroma cacao* pathogens. **Biological Control**, Orlando, v. 46, n. 1, p. 4-14, July 2008.

MORANDI, M. A. B.; SUTTON, J. C.; MAFFIA, L. A. Effects of host and microbial factors on development of *Clonostachys rosea* and control of *Botrytis cinerea* in rose. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 106, n. 5, p. 439-448, June 2000.

NOBRE, S. A. M. et al. Selection of *Clonostachys rosea* isolates from Brazilian ecosystems effective in controlling *Botrytis cinerea*. **Biological Control**, Orlando, v. 34, n. 2, p. 132-143, Aug. 2005.

SCHROERS, H. J. Monograph of *Bionectria* (Ascomycota, Hypocreales, Bionectriaceae) and its *Clonostachys* anamorphs. **Studies in Mycology**, Utrecht, n. 46, p. 1-214, Nov. 2001.

SILVERA-PÉREZ, A. E. et al. Controle do mofo cinzento com *Clonostachys rosea* na produção de mudas de fúcsia. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 35, n. 3, p. 163-169, May/June 2010.

SOSA-ALVAREZ, M.; MADDEN, L. V.; ELLIS, M. A. Effects of temperature and wetness duration on sporulation of *Botrytis cinerea* on strawberry leaf residues. **Plant Disease**, Davis, v. 79, n. 6, p. 609-615, June 1995.

WILLIAMSON, B. et al. *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. **Molecular Plant Pathology**, London, v. 8, n. 5, p. 561-580, July 2007.

XUE, A. G. Biological control of pathogens causing root rot complex in field pea using *Clonostachys rosea* strain ACM941. **Biological Control**, Orlando, v. 93, n. 3, p. 329-335, Mar. 2003.

APÊNDICES

APÊNDICE A

Tabela 1A Espécies e formas de *Clonostachys* utilizadas neste estudo e sequências de referência correspondentes às regiões gênicas rDNA e *tub2* depositadas no GenBank e utilizadas nas análises filogenéticas

Espécie	Substrato / Local	aCódigo de acesso	Acesso GenBank		
			b <i>tub2</i>	cITS	dITS + LSU
<i>B. aereofulvella</i>	Casca de árvore, Victoria Austrália	CBS 102837	AF358220		
	Raiz de árvore, Nova Zelândia	*CBS 195.93	AF358181	AF358226	
<i>B. byssicola</i>	<i>Fragaria ananassa</i> , Brasil	CML 2309			
	Parasitando colônia de <i>Sordaria</i> sp., MG, Brasil	^f CML 2311			
	Solo próximo a pastagem, Amazônia, AM, Brasil	^f CML 422			
	Solo da Amazônia, AM, Brasil	^f CML 1942			
	Solo da Amazônia, AM, Brasil	^f CML 1943			
	Tronco de <i>Persea americana</i> , Nova Zelândia	CBS 101918	AF358150		
	Ohio, EUA	CBS 293.78	AF358152		
	Madeira, Venezuela	CBS 364.78	AF358153		
<i>B. capitata</i>	Madeira, Venezuela	CBS 365.78	AF358154		
	<i>Alchorea</i> , Uganda	*CBS 914.97	AF358151	AF358252	
	Casca de árvore, Japão	*CBS 218.93	AF358188	AF358240	
	Casca de <i>Fagus</i> sp. morta, Carolina do Norte, EUA	*CBS 913.97	AF358194	AF358245	
<i>B. compactiuscula</i>	Casca de <i>Fagus</i> sp., França	*CBS 592.93	AF358192	AF358247	
	Galhos de <i>Acer</i> sp., Virgínia, EUA	CBS 919.97			AF210690
	Folhas de <i>Buxus sempervirens</i> , França	*CBS 696.93	AF358215	^o AF210667	
<i>B. coronata</i>	<i>Sasa</i> sp., Japão	*CBS 101037	AF358209	^o AF210675	
<i>B. epichloë</i>	Solo da Amazônia, AM, Brasil	CML 1910			
	Árvore morta, Guiana Francesa	*CBS 209.93	AF358206	^o AF210678	
<i>B. grammicospora</i>	Casca de <i>Metrosideros</i> sp., Nova Zelândia	CBS 115.87	AF358204	^o AF210679	
<i>B. grammicosporopsis</i>	Casca de ? <i>Sophora microphylla</i> , Nova Zelândia	*CBS 461.95	AF358170	AF358250	
<i>B. kowhaii</i>	Ramo de ? <i>Buxus sempervirens</i> morto	*CBS 948.97	AF358196	^o AF210680	
<i>B. levigata</i>	Casca de <i>Casearia arborea</i> recentemente morta, Porto Rico, EUA	*CBS 100008	AF358208	AF210683	
<i>B. lucifer</i>	Casca de <i>Orixa japonica</i> morrendo, Japão	*CBS 100285	AF358169	AF358248	
<i>B. oblongispora</i>	<i>Fragaria ananassa</i>	^f CML 2310			
<i>B. ochroleuca</i>	<i>Lychnophora pinaster</i> , MG, Brasil	CML 817			
	Solo sob plantio de <i>Glycine max</i> , GO, Brasil	CML 1210			

Tabela 1A, continuação

	<i>Theobroma cacao</i> , BA, Brasil	CML 1670			
	<i>Theobroma cacao</i> , AM, Brasil	CML 1820			
	Solo sob vegetação nativa de Cerrado, GO Brasil	CML 1920			
	Solo sob vegetação nativa de Cerrado, GO, Brasil	CML 1924			
	Ar em mina de urânio, República Tcheca	CBS 438.68	AF358163		
	Folhas mortas de <i>Yucca</i> sp., México	CBS 916.97	AF358164		
	Bulbo de <i>Lilium auratum</i> em decomposição, EUA	*CBS 194.57	AF358165	AF358237	
	Casca de <i>Salix</i> sp., França	*CBS 406.95	AF358167	AF358249	
	Raque viva de <i>Pteridium aquilinum</i> , Guiana	*CBS 193.94	AF358159	AF210686	
	Solo de parque urbano, Vienna, Áustria	Rd0801			**HQ115728
	Tubérculo de <i>Solanum tuberosum</i> , França	CBS 117.23	AF358201		
	Raízes de cenoura armazenadas, Nova Iorque, EUA	CBS 226.48	AF358198		
	Solo, Nova Jersey, EUA	CBS 704.97	AF358197		
	Solo, sobre esclerócio de <i>Sclerotinia minor</i> , Holanda	*CBS 710.86	AF358161	AF358235	
	<i>Acer palmatum</i> , Massachusetts, EUA	*CBS 376.55	AF358162	AF358239	
		CBS 113336			**EU552110
<i>B. pityrodes</i>	Casca de árvore, Ilhas Maurício	*CBS 102033	AF358212	°AF210672	
<i>B. pseudochroleuca</i>	<i>Solanum tuberosum</i> , Santa Rita de Caldas MG	CML 18			
	<i>Phoradendron perrottetii</i> , MG, Brasil	†CML 520			
	<i>Lychnophora pinaster</i> , MG, Brasil	CML 824			
	Solo da Amazônia, AM, Brasil	†CML 1915			
	<i>Phoradendron perrottetii</i> , MG, Brasil	†CML 1940			
	Solo da Amazônia, AM, Brasil	†CML 1982			
	Solo da Amazônia, AM, Brasil	†CML 1983			
	Palmeira decaída, Guiana Francesa	CBS 191.94	AF358173		
	Palmeira, Guiana Francesa	CBS 220.93	AF358172		
	Casca de árvore, Guiana Francesa	*CBS 192.94	AF358171	AF358238	
<i>B. pseudostrata</i>	Casca de árvore, Indonésia	*CBS 119.87	AF358183	AF358251	
<i>B. ralfsii</i>	Casca de árvore, Victoria Austrália	*CBS 102845	AF358219	AF358253	
	Casca de árvore, Victoria Austrália	CBS 102851	AF358218		
	Casca de árvore, Nova Zelândia	CBS 703.97	AF358217		
	Casca de árvore, Nova Zelândia	*CBS 129.87	AF358195	°AF210676	
<i>B. rossmaniae</i>	Solo de Mata Atlântica, SP, Brasil	CML 2316			
	Solo de Mata Atlântica, SP, Brasil	CML 2315			
	Solo da Amazônia, AM, Brasil	CML 1913			

Tabela 1A, continuação

	Casca de galhos, Guiana Francesa	*CBS 210.93	AF358213	AF358227	
	Casca de liana viva, Guiana Francesa	CBS 211.93			AF210665
<i>B. samuelsii</i>	Casca de árvore, Venezuela	*CBS 699.97	AF358190	AF358236	
<i>B. sesquicilli</i>	Galhos e líquen, Guiana	*CBS 180.88	AF358214	°AF210666	
<i>B. solani</i>	Inflorescências decaídas de palmeira, Venezuela	*CBS 101926	AF358179	AF358230	
	<i>Hypoxylon</i> sp. em casca de árvore, Jamaica	CBS 101924		AF358232	
<i>B. sporodochialis</i>	Casca de árvore, Porto Rico, EUA	*CBS 101921	AF358149	AF210685	
<i>B. subquaternata</i>	Madeira, Venezuela	CBS 107.87	AF358207		
<i>B. zelandiaenovae</i>	Casca de <i>Coprosma</i> sp., Nova Zelândia	*CBS 232.80	AF358185	°AF210684	
<i>C. agrawalli</i>	Decomposição de chifre de búfalo, Índia	*CBS 533.81	AF358187	AF358241	
<i>C. apocyni</i>	Haste morta de <i>Apocynum cannabinum</i> , Nova Iorque, EUA	*CBS 130.87	AF358168	AF210688	
<i>C. candelabrum</i>	Solo de Mata Atlântica, SP, Brasil	CML 2313			
<i>C. divergens</i>	Solo, Alemanha	*CBS 967.73b	AF358191	°AF210677	
<i>C. intermedia</i>	Solo, Holanda	CBS 508.82		AF210682	
<i>C. miodochialis</i>	Solo, Holanda	*CBS 997.69	AF358210	°AF210674	
<i>C. phyllophila</i>	Folhas de <i>Viscum album</i> , França	CBS 921.97			AF210664
<i>C. rhizophaga</i>	Parasitando colônia de <i>Fusarium oxysporum</i> , SP, Brasil	†CML 2312			
	Solo sob vegetação nativa de Cerrado, GO, Brasil	†CML 1984			
	?Solo, EUA	CBS 100004	AF358157		
	Solo, Chile	CBS 906.72a	AF358155		
	Raízes de <i>Ulmus americana</i> , Ohio, EUA	*CBS 202.37	AF358156	AF358225	
	Contaminante de cultura, Suíça	*CBS 361.77	AF358158	AF358228	
<i>C. rogersoniana</i>	Solo sob vegetação nativa de Cerrado, GO, Brasil	†CML 1216			
	Solo da Amazônia, AM, Brasil	†CML 1911			
	Solo da Amazônia, AM, Brasil	†CML 1914			
	Solo sob vegetação nativa de Cerrado, GO, Brasil	†CML 1923			
	Solo sob vegetação nativa de Cerrado, GO, Brasil	†CML 1925			
	Solo sob vegetação nativa de Cerrado, GO, Brasil	†CML 1926			
	Solo, AM, Brasil	†CML 1944			
	Solo, Brasil	*CBS 582.89	AF358189	AF210691	
<i>C. rosea</i> f. <i>catenulata</i>	Solo sob vegetação nativa de Cerrado, GO, Brasil	CML 1213			
	Solo sob vegetação nativa de Cerrado, GO, Brasil	CML 1912			
	Solo sob vegetação nativa de Cerrado, GO, Brasil	CML 1916			
	Solo sob vegetação nativa de Cerrado, GO, Brasil	CML 1917			

Tabela 1A, conclusão

	Solo sob vegetação nativa de Cerrado, GO, Brasil	CML 1918		
	Solo sob vegetação nativa de Cerrado, GO, Brasil	^f CML 1919		
	Solo sob vegetação nativa de Cerrado, GO, Brasil	^f CML 1921		
	Solo sob vegetação nativa de Cerrado, GO, Brasil	CML 1922		
	Solo sob vegetação nativa de Cerrado, GO, Brasil	CML 1927		
	Solo sob vegetação nativa de Cerrado, GO, Brasil	CML 1941		
	Solo, Ucrânia	CBS 126.72	AF358202	
	Solo, Utah, EUA	[*] CBS 154.27	AF358160	AF358231
	Solo, Wyoming, EUA	[*] CBS 443.65	AF358166	AF358233
	Solo, Alemanha	[*] CBS 221.72b	AF358203	AF358234
		NRRL 22970		^{**} HM751081
<i>C. setosa</i>	Solo de Mata Atlântica, SP, Brasil	CML 2314		
	<i>Trophis racemosa</i> , Cuba	[*] CBS 834.91	AF358211	[°] AF210670
<i>C. solani</i> f. <i>nigrovirens</i>	Solo, Holanda	CBS 183.30	AF358222	
	Solo, Alemanha	CBS 223.72b	AF358223	
	Tubérculo de <i>Solanum tuberosum</i> , Holanda	CBS 229.74	AF358224	
	Ovo de <i>Arion ater</i> , Alemanha	[*] CBS 142.91	AF358178	AF358244
<i>C. solani</i> f. <i>solani</i>	Casca de árvore, Alemanha	CBS 697.88	AF358216	
	Casca de árvore, Alemanha	CBS 752.68	AF358221	
	Frutos podres de <i>Aesculus hippocastanum</i> , França	[*] CBS 702.97	AF358177	AF210687

^aAbreviações das coleções de culturas: CML = Coleção Micológica de Lavras, Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brasil; NRRL: *National Centre for Agricultural Utilization Research*, Peoria, IL, EUA; CBS: *Centraalbureau voor Schimmelcultures*, Utrecht, Holanda. Os isolados com código CML foram utilizados neste estudo para caracterização e sequenciamento; os demais somente tiveram suas sequências utilizadas como referência. ^bSequências do gene *tub2* obtidas do GenBank, NCBI. ^cSequências da região ITS obtidas do GenBank, NCBI. ^dSequências da região ITS + LSU rDNA parcial obtidas do GenBank, NCBI. ^eSequências de referência utilizadas tanto para análise filogenética utilizando somente a região ITS, como para ITS + LSU rDNA parcial. ^fIsolados deste estudo que tiveram a região *tub2* sequenciada e foram utilizados nas análises combinadas, juntamente com sequências ITS. ^{*}Isolados com sequências de referência utilizadas nas árvores combinadas. ^{**}Sequências de referência que não foram utilizadas por Schroers (2001).

APÊNDICE B

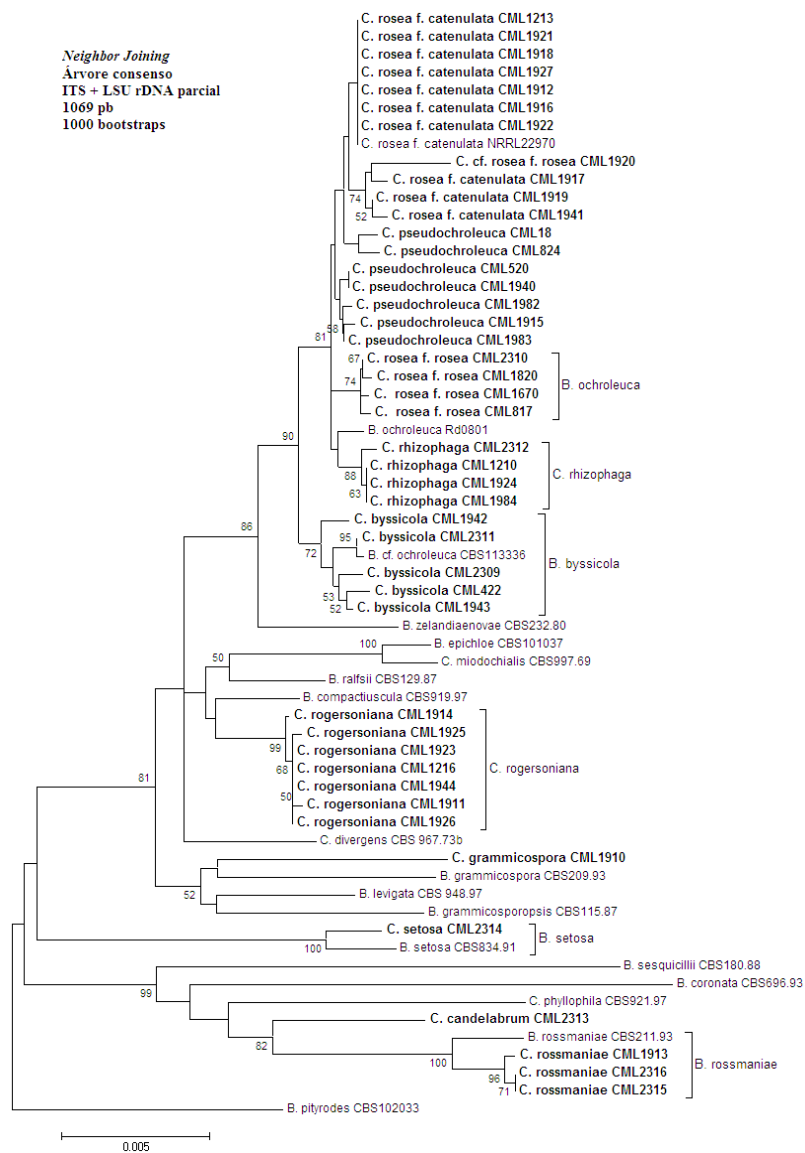


Figura 1 Árvore consenso gerada pelo método *neighbor joining* a partir de sequências de ITS mais LSU rDNA parcial de 1.069 pb. Os nomes em negrito representam os isolados de *Clonostachys* deste estudo; os demais nomes são concernentes a sequências de referência obtidas do GenBank. Valores de bootstrap (1.000 replicações) estão indicados acima dos nós.

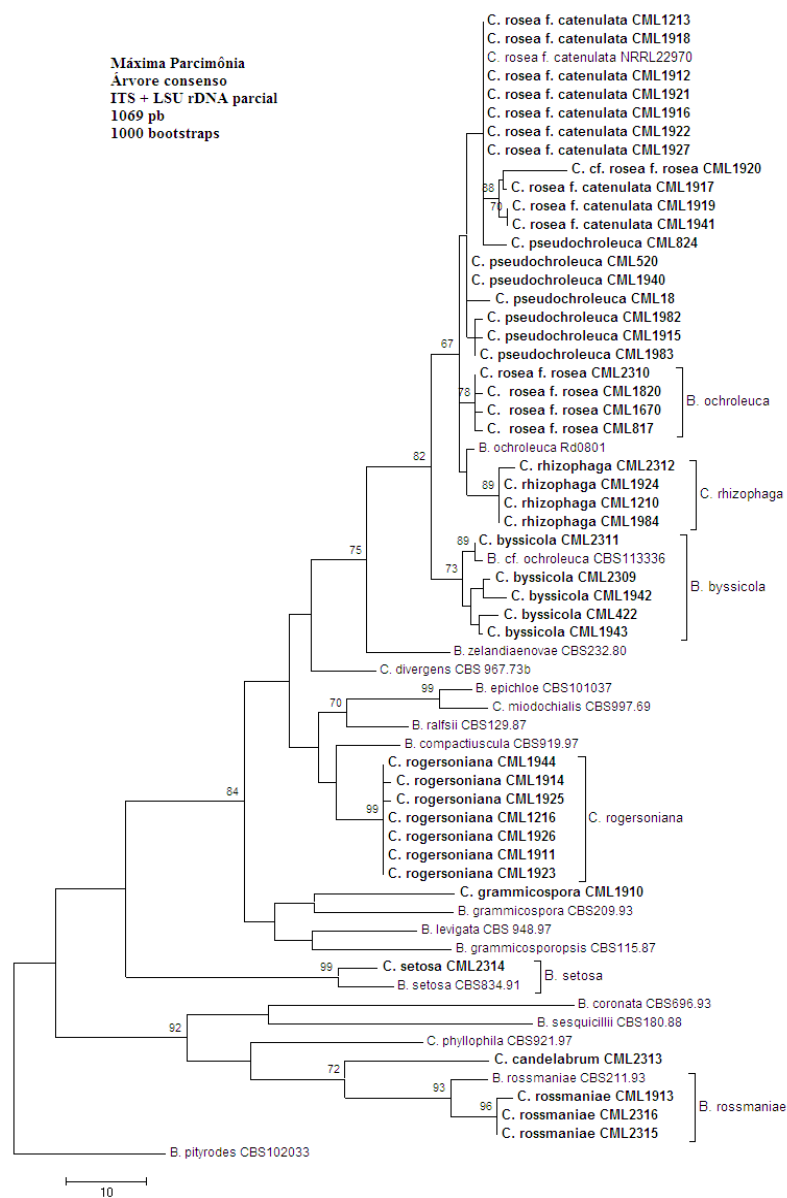


Figura 2 Árvore consenso obtida pelo método de máxima parcimônia, gerada a partir de 109 árvores mais parcimoniosas, utilizando sequências de ITS mais LSU rDNA parcial de 1.069 pb. Os nomes em negrito representam os isolados de *Clonostachys* deste estudo; os demais nomes são concernentes a sequências de referência obtidas do GenBank. Valores de bootstrap (1.000 replicações) estão indicados acima dos nós.

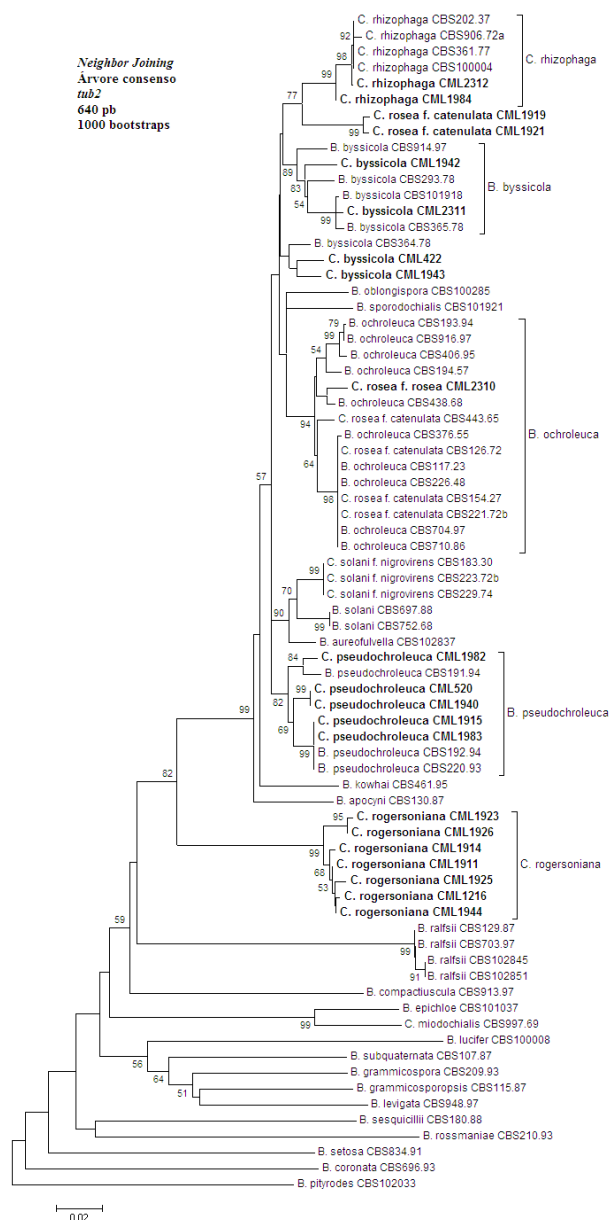


Figura 3 Árvore consenso gerada pelo método *neighbor joining* a partir de seqüências de β -tubulina de 640 pb. Os nomes em negrito representam os isolados de *Clonostachys* deste estudo; os demais nomes são concernentes a seqüências de referência (SCHROERS, 2001) obtidas do GenBank. Valores de bootstrap (1000 replicações) estão indicados acima dos nós.

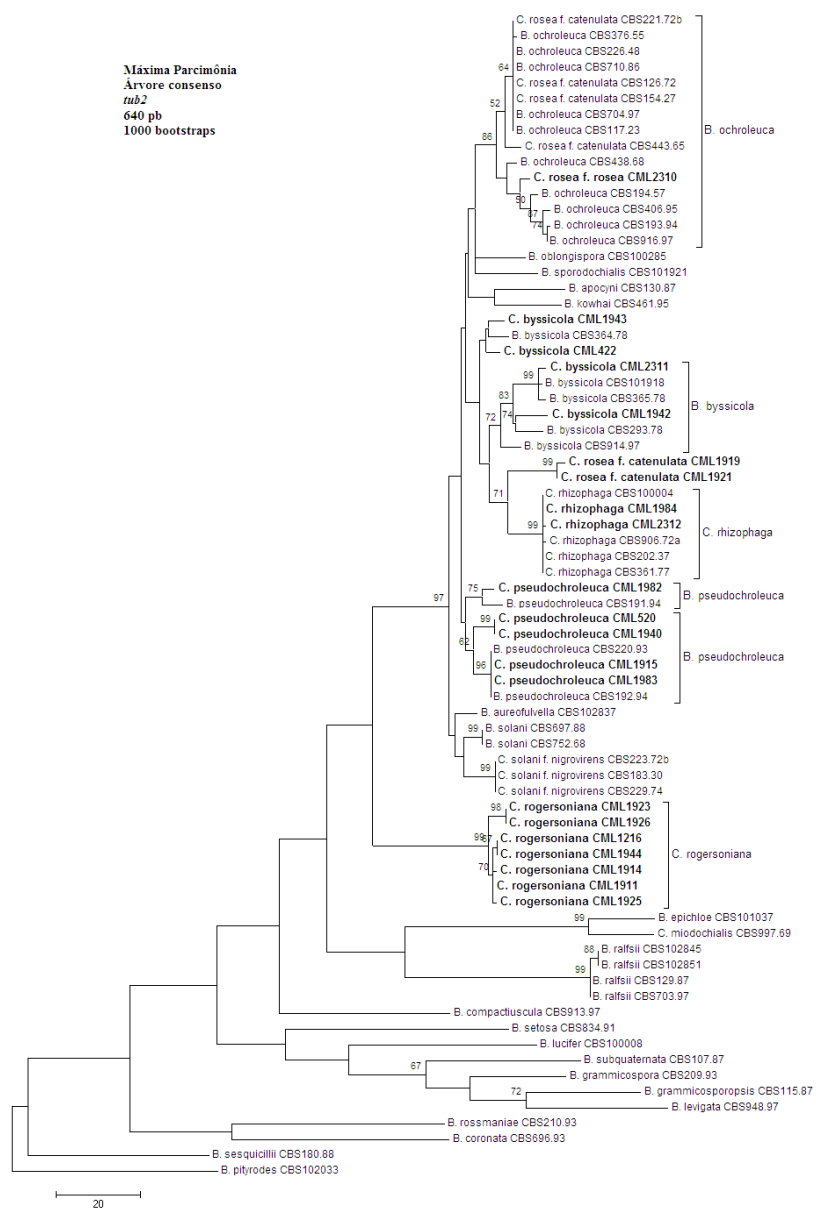


Figura 4 Árvore consenso obtida pelo método de máxima parcimônia, gerada a partir de 44 árvores mais parcimoniosas, utilizando seqüências de β -tubulina de 640 pb. Os nomes em negrito representam os isolados de *Clonostachys* deste estudo; os demais nomes são concernentes a seqüências de referência (SCHROERS, 2001) obtidas do GenBank. Valores de bootstrap (1000 replicações) estão indicados acima dos nós.