



LETÍCIA VAZ MOLINARI

**GÊNERO *CALONECTRIA*: RESISTÊNCIA GENÉTICA E
SEQUENCIAMENTO DE GENOMAS DE DIFERENTES
ESPÉCIES**

LAVRAS-MG

2024

LETÍCIA VAZ MOLINARI

**GÊNERO *CALONECTRIA*: RESISTÊNCIA GENÉTICA E SEQUENCIAMENTO DE
GENOMAS DE DIFERENTES ESPÉCIES**

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

Profa. Dra. Maria Alves Ferreira
Orientadora

LAVRAS-MG

2024

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

Molinari, Letícia Vaz.

Gênero *Calonectria*: resistência genética e sequenciamento de genomas de diferentes espécies / Letícia Vaz Molinari. - 2024.

69 p.

Orientador(a): Maria Alves Ferreira.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2024.
Bibliografia.

1. Patologia Florestal. 2. Melhoramento Genético. 3. Montagem de Novo. I. Ferreira, Maria Alves. II. Título.

LETÍCIA VAZ MOLINARI

GÊNERO *CALONECTRIA*: RESISTÊNCIA GENÉTICA E SEQUENCIAMENTO DE GENOMAS DE DIFERENTES ESPÉCIES

THE GENUS *CALONECTRIA*: DRAFT GENOME SEQUENCE OF TWO SPECIES AND GENETIC RESISTANCE IN *EUCALYPTUS*

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

APROVADA em, Lavras MG, 27 de setembro de 2024.

Dr. Jorge Teodoro de Souza – UFLA
Dra. Nilza de Lima Pereira Sales – UFLA
Dr. Lucas Amaral de Melo – UFLA
Dr. Valter Cruz Magalhães – EMBRAPA

Profa. Dra. Maria Alves Ferreira
Orientadora

**LAVRAS-MG
2024**

A Deus, acima de tudo.

*A toda a minha família, principalmente meus pais Josiana e Carlos, meus irmãos
Carlos Henrique, Laís e Larissa, pelo apoio incondicional.*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras, especialmente ao Departamento de Fitopatologia, pela oportunidade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de mestrado.

À professora Maria Alves Ferreira, pelo carinho e ensinamentos.

[...] A todos os funcionários do DFP/UFLA.

Aos meus pais Josiana e Carlos, por serem as pessoas mais importantes da minha vida, por todo o apoio, carinho, dedicação e investimento na minha carreira.

Aos meus irmãos Carlos Henrique, Larissa e Laís, por me apoiarem diante das dificuldades e por compartilhem comigo os melhores momentos.

As minhas amigas da República FitoNelas, Cláudia, Thamires, Carol, Nevenka e Babi.

Aos meus amigos de laboratório pelos muitos momentos compartilhados.

As minhas amigas do SAIDERA, minha saudade diária.

Ao meu melhor amigo e companheiro de todas as horas e momentos, Gustavo.

Aos amigos da República Chapera, obrigada por todos os momentos juntos.

E a todos que contribuíram para a realização desse trabalho.

RESUMO GERAL

Eucalyptus é um dos gêneros de plantas mais cultivados do mundo. Estima-se que a área plantada com *Eucalyptus* spp. supere 20 milhões de hectares estabelecidos, principalmente, devido à grande diversidade de espécies, adaptação para diferentes climas e solos, taxas de crescimento rápido e utilização para múltiplos produtos como madeira, celulose, forragem, biocombustíveis, óleo essencial e produtos químicos bioativos. A produtividade desses plantios pode ser limitada por diversos fatores, dentre eles, a ocorrência de doenças. As principais áreas plantadas comercialmente no Brasil estão em locais úmidos e quentes, com clima ideal para o surgimento de doenças fúngicas, como, por exemplo, a mancha de folhas e desfolha causada por *Calonectria* spp. uma das doenças mais importantes do eucalipto em regiões tropicais. Atualmente, 45 espécies de *Calonectria* ocorrem no Brasil, sendo 14 destas associadas ao eucalipto, destacando-se a espécie *C. pteridis* com maior predominância a campo nos estados do Pará e Maranhão. O patógeno causa desfolha intensa nas plantas durante períodos chuvosos, reduzindo drasticamente a profundidade de copa. O controle desta enfermidade se dá mediante o plantio de genótipos resistentes. Portanto, o presente trabalho teve por objetivo avaliar o nível de resistência de 380 clones de *Eucalyptus* spp. quanto à desfolha e mancha foliar causadas por *Calonectria* spp. utilizando técnicas estatísticas multivariadas para a seleção e avaliação. No primeiro experimento, foram utilizados dois métodos hierárquicos distintos: Método de Pares-Grupos Não Ponderados Utilizando Médias Aritméticas (UPGMA) e Otimização de Tocher para seleção dos clones. O método de otimização de Tocher baseado na distância de Mahalanobis foi consistente na separação dos clones, corroborando os resultados obtidos pela análise de componentes principais. Por outro lado, o método UPGMA permitiu distinguir as espécies resistentes e as suscetíveis. As espécies resistentes (R) são *E. urophylla* x *E. camaldulensis*; *E. urophylla* x (*E. grandis* x *E. urophylla*); *E. grandis* x *E. brassiana*; *E. grandis* x *Eucalyptus* spp. e *E. grandis* x *E. pellita*. Portanto, recomenda-se que novos estudos sejam realizados em áreas com condições edafoclimáticas diferentes da região aqui estudada, a fim de determinar se os clones considerados resistentes neste estudo são os recomendados para as demais regiões onde a doença ocorre. O segundo experimento teve como objetivo sequenciar três genomas completos de espécies de *Calonectria* encontradas no Brasil, a fim de facilitar pesquisas futuras sobre taxonomia, genética populacional/diversidade e genes associados à patogenicidade. O sequenciamento foi realizado utilizando biblioteca padrão através da plataforma Illumina, os dados brutos foram preparados no software Spades e o processamento dos dados (filtragem e montagem) no Geneious Prime. Para validar a identidade dos isolados sequenciados, as regiões dos genes Act, cmdA, His, rpb2, Tub e EF1- α foram extraídas da montagem e uma filogenia de máxima verossimilhança foi construída usando as sequências de referência. A disponibilidade dos genomas permite a realização de estudos com genômica comparativa e populacional dentro do complexo de espécies, além disso, promoverá futuros estudos sobre genes relacionados à patogenicidade, adaptabilidade e acasalamento desses importantes fitopatógenos.

Palavras-chave: *Eucalyptus*; Seleção; Doença fúngica; Análise Multivariada; Montagem de Novo.

ABSTRAT

Eucalyptus is one of the most widely cultivated plant genera in the world. It is estimated that the area planted with *Eucalyptus* spp. exceeds 20 million hectares established, mainly due to the great diversity of these species, suitability for different climates and soils, rapid growth rates and use for multiple products such as wood, cellulose, fodder, biofuels, essential oil and bioactive chemicals. The productivity of these plantations can be limited by the occurrence of some phytopathogens, since the main areas planted commercially in Brazil are in humid and hot locations, with an ideal climate for the emergence of fungal diseases, such as leaf spot and defoliation caused by *Calonectria* spp. one of the most important diseases of *eucalyptus* in tropical regions. Currently, 45 species of *Calonectria* occur in Brazil, 14 of which are associated with *eucalyptus*, with the *C. pteridis* species being the most prevalent in the field in the states of Pará and Maranhão. The pathogen causes intense defoliation of plants during rainy periods, drastically reducing crown depth. This disease can be controlled by planting resistant genotypes. The aim of this study was therefore to evaluate the level of resistance of 380 *Eucalyptus* spp. clones to defoliation and leaf spot caused by *Calonectria* spp. using multivariate statistical techniques for selection and evaluation. In the first experiment, two different hierarchical methods were used: Unweighted Pair-Group Method Using Arithmetic Averages (UPGMA) and Tocher Optimization for selecting the clones. The Tocher optimization method based on Mahalanobis distance was consistent in separating the clones, corroborating the results obtained by principal component analysis. On the other hand, the UPGMA method made it possible to distinguish between resistant and susceptible species. The resistant species (R) are *E. urophylla* x *E. camaldulensis*; *E. urophylla* x (*E. grandis* x *E. urophylla*); *E. grandis* x *E. brassiana*; *E. grandis* x *Eucalyptus* spp. and *E. grandis* x *E. pellita*. It is therefore recommended that further studies be carried out in areas with different soil and climate conditions from the region studied here, to determine whether the clones considered resistant in this study are the ones recommended for other regions where the disease occurs. The second experiment aimed to sequence three complete genomes of *Calonectria* species found in Brazil, to facilitate future research into taxonomy, population genetics/diversity and genes associated with pathogenicity. Sequencing was carried out using a standard library on the Illumina platform, the raw data was prepared in the Spades software and the data processing (filtering and assembly) in Geneious Prime. To validate the identity of the sequenced isolates, the Act, cmdA, His, rpb2, Tub and EF1- α gene regions were extracted from the assembly and a maximum likelihood phylogeny was constructed using the reference sequences. The availability of the genomes allows comparative and population genomics studies to be carried out within the species complex and will also promote future studies on genes related to the pathogenicity, adaptability and mating of these important phytopathogens.

Keywords: *Eucalyptus*; Selection; Fungal disease; Multivariate analysis; New assembly.

INDICADORES DE IMPACTO

O primeiro artigo da tese fez o estudo da resistência genética de clones de *Eucalyptus* spp. quanto à desfolha e mancha foliar causadas por *Calonectria* spp. utilizando técnicas estatísticas multivariadas para a seleção e avaliação. Os resultados obtidos podem contribuir para a tomada de decisão sobre quais materiais genéticos são mais indicados para o plantio na região de Paragominas – PA. Tais resultados podem corroborar com o aumento de produtividade dos plantios na região estudada. Foram selecionadas cinco espécies promissoras *E. urophylla* x *E. camaldulensis*; *E. urophylla* x (*E. grandis* x *E. urophylla*); *E. grandis* x *E. brassiana*; *E. grandis* x *Eucalyptus* spp. e *E. grandis* x *E. pellita*. No segundo artigo foram sequenciados três genomas completos de espécies de *Calonectria* encontradas no Brasil, a fim de facilitar pesquisas futuras sobre taxonomia, genética populacional/diversidade e genes associados à patogenicidade. A maioria das identificações das espécies de *Calonectria* baseavam-se em características morfológicas, porém nas últimas duas décadas com o avanço das técnicas de sequenciamento pode-se identificar e determinar as espécies que ocorrem em regiões de crescimento de eucalipto no Brasil, de maneira muito mais precisa e rápida. A identificação de fontes de resistência requer um conhecimento prévio da diversidade genética e virulência das populações do patógeno, assim como, a melhor compreensão dos mecanismos moleculares presentes no processo de infecção. Ainda, pode-se usar essas informações em programas de melhoramento, auxiliando na seleção de genótipos resistentes a *Calonectria*. Os dois artigos presentes nesta tese buscam auxiliar nos programas de melhoramento genético de *Eucalyptus* spp., através da seleção fenotípica de clones resistentes ao patógeno e melhor compreensão sobre o genoma fúngico. Em 2023, a área plantada de eucalipto no Brasil atingiu 7,6 milhões de hectares, além das áreas produtivas, este setor conserva, simultaneamente, outros 6,7 milhões de hectares de mata nativa. Como uma indústria moderna, sustentável e renovável, as árvores cultivadas com manejo e conhecimento desenvolvidos no Brasil dão origem a mais de 5 mil bioprodutos. Toda essa cadeia produtiva gerou 2,6 milhões de empregos entre diretos e indiretos. Por fim, os resultados deste trabalho podem contribuir para a manutenção da produtividade do setor florestal.

IMPACT INDICATORS

The first article of the thesis studied the genetic resistance of *Eucalyptus* spp. clones to defoliation and leaf spot caused by *Calonectria* sepp. using multivariate statistical techniques for selection and evaluation. The results obtained can contribute to decision-making about which genetic materials are best suited for planting in the Paragominas - PA region. These results could help increase the productivity of plantations in the region studied. Five promising species were selected: *E. urophylla* x *E. camaldulensis*; *E. urophylla* x (*E. grandis* x *E. urophylla*); *E. grandis* x *E. brassiana*; *E. grandis* x *Eucalyptus* spp. and *E. grandis* x *E. pellita*. In the second article, three complete genomes of *Calonectria* species found in Brazil were sequenced to facilitate future research into taxonomy, population genetics/diversity and genes associated with pathogenicity. Most identifications of *Calonectria* species were based on morphological characteristics, but in the last two decades, with advances in sequencing techniques, it has been possible to identify and determine the species that occur in eucalyptus-growing regions in Brazil much more accurately and quickly. Identifying sources of resistance requires prior knowledge of the genetic diversity and virulence of the pathogen's populations, as well as a better understanding of the molecular mechanisms involved in the infection process. This information can also be used in breeding programs to help select genotypes resistant to *Calonectria*. The two articles in this thesis aim to help with *Eucalyptus* spp. breeding programs, through the phenotypic selection of clones resistant to the pathogen and a better understanding of the fungal genome. In 2023, the area planted with *eucalyptus* in Brazil reached 7.6 million hectares, and in addition to the productive areas, this sector simultaneously conserves another 6.7 million hectares of native forest. As a modern, sustainable and renewable industry, trees grown with management and knowledge developed in Brazil give rise to more than 5,000 bioproducts. This entire production chain has generated 2.6 million direct and indirect jobs. Finally, the results of this work can contribute to maintaining the productivity of the forestry sector.

SUMÁRIO

CAPÍTULO I	13
1 INTRODUÇÃO GERAL	13
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	15
2.1 <i>Eucalyptus</i> spp.....	15
2.2 <i>Calonectria</i> spp.....	16
2.3 Métodos de controle da doença	18
2.3.1 Resistência Genética.....	19
2.4 Sequenciamento de genoma	20
3 REFERÊNCIAS	22
 CAPÍTULO II: DRAFT GENOME SEQUENCE OF <i>CALONECTRIA</i> <i>PARAGOMINENSIS</i> AND <i>CALONECTRIA OVATA</i> SPECIES FROM BRAZIL, CAUSE TO LEAF SPOT AND DEFOLIATION.....	 26
INTRODUCTION	27
MATERIAL AND METHODS.....	28
RESULTS AND DISCUSSION.....	29
REFERENCES	32
 CAPÍTULO III: GENETIC RESISTANCE OF <i>Eucalyptus</i> CLONES TO LEAF SPOT AND DEFOLIATION BY <i>Calonectria</i> sp.	 37
INTRODUCTION	38
MATERIALS AND METHODS	39
Plant Material and Experimental Design.....	39
Disease for evaluating and selecting genotypes	40
Genetic Resistance.....	41
Severity of <i>Calonectria</i>	43
RESULTS.....	43
Genetic Resistance.....	43
Severity of <i>Calonectria</i>	49
DISCUSSION.....	51
CONCLUSION.....	52

ACKNOWLEDGMENTS	52
REFERENCES.....	53
APÊNDICE A – Abreviação dos clones utilizados nas análises.....	58
APÊNDICE B – Relação das espécies utilizadas para as análises estatísticas Agrupamento de Espécies e Severidade da Doença.....	67
APÊNDICE C – Agrupamento de clones de <i>Eucalyptus</i> spp. utilizando o método de otimização de Tocher baseado na distância generalizada de Mahalanobis, para as variáveis lesões foliares, desfolha e severidade da doença.....	68

ÍNDICE DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO I

Figura 1. Distribuição geográfica de *Calonectria* em eucalipto..... 16

Figura 2. Sintomas do ataque do patógeno em campo.....17

CAPÍTULO II

Figure 1. Phylogenetic tree obtained from maximum likelihood analysis of the concatenated dataset of the Act, cmdA, His, rpb2, Tub ad EF1-gene regions. The sequences were extracted from the sequenced genome assembly (bold), matched with the reference sequences. “*” indicates isolates sequenced in this study. The taxa used as outgroup is *C. gracilipes*. 31

CAPÍTULO III

Fig. 1 Monthly data of climatic variables at Fazenda Grupo Barbalho, located in the municipality of Paragominas-PA, for the year 2020.40

Fig. 2 Diagrammatic scale used to assess the experimental variables. **(A)** Location of leaf lesions. **(B)** Severity assessment. **(C)** Defoliation assessment.....41

Fig. 3 Biplot showing the first two main components with the discrimination of the 277 genotypes of *Eucalyptus* sp. Biplot for the variables leaf lesions, defoliation/crown volume and disease severity with (A) February/April; (B) February/May. Blue dots equate to resistant clones and gray dots to susceptible.....45

Fig. 4 Dendrogram based on the parameters leaf lesions, defoliation and severity of *Calonectria*. Using the UPGMA method with Mahalanobis dissimilarity distance measurement.....46

Fig. 5 (A) Area under the disease progress curve (AACPD). (B) Rate of progress evaluated in *Eucalyptus* spp. species.. 50

CAPÍTULO I

1 INTRODUÇÃO GERAL

As plantações de eucalipto foram amplamente desenvolvidas no Brasil desde a década de 1960, para atender as crescentes demandas por madeira e matérias-primas, em geral, a produção tem ficado abaixo do seu potencial, em virtude de inúmeras limitações, como origem genética, ambiental e/ou ambas. Em 2023, a área plantada de eucalipto no Brasil atingiu 7,6 milhões de hectares (IBA, 2023). A produtividade desses plantios pode ser limitada pela ocorrência de alguns fitopatógenos, uma vez que, as principais áreas plantadas comercialmente no Brasil estão em locais úmidos e quentes, com clima ideal para o surgimento de doenças fúngicas, como, por exemplo, a mancha de folhas e desfolha causada por *Calonectria* spp. uma das doenças mais importantes do eucalipto em regiões tropicais.

A mancha das folhas causada por *Calonectria* spp. foi constatada pela primeira vez na década de 90 em plantações comerciais de *Eucalyptus grandis*, causando lesões foliares e desfolha em genótipos suscetíveis (ALFENAS et al., 2015). Desde então, o principal patógeno associado a esses danos foliares é *C. pteridis*, sendo relatado em *E. camaldulensis*, *E. cloeziana*, *E. grandis*, *E. saligna*, *E. tereticornis*, *E. urophylla* e seus híbridos *E. grandis* x *E. urophylla* (ALFENAS et al., 2009). Em grande parte dessas espécies, a doença se manifesta, primeiramente, com pequenas manchas circulares ou alongadas de coloração cinza claro a marrom claro que se estendem por todo o limbo foliar, o que resulta em queda das folhas e em alguns casos evolui para desfolha severa (ALFENAS; FERREIRA, 1979). A queda prematura das folhas pode interferir nos processos fisiológicos da planta devido à diminuição da área fotossintética (GRAÇA et al., 2009), interferir no metabolismo de ácidos nucléicos e de proteínas (CHEN et al., 2015), além de favorecer o crescimento de plantas daninhas no sub-bosque da floresta devido ao aumento de luz na serrapilheira (ALFENAS et al., 2009; ALFENAS et al., 2015).

O manejo da doença tem por objetivo reduzir a quantidade de inóculo inicial, o qual geralmente é advindo do solo e consiste em clamidósporos que ficam inertes, até formarem microescleródios no solo e restos vegetais, o que dificulta o controle do patógeno (LIU; CHEN, 2022). A identificação de fontes de resistência requer um conhecimento prévio da diversidade genética e virulência das populações do patógeno, assim como, a melhor compreensão dos mecanismos moleculares presentes no processo de infecção (FREITAS et al., 2019). Ainda, pode-se usar essas informações em programas de melhoramento, auxiliando na seleção de genótipos resistentes a *Calonectria*.

A demanda por materiais resistentes ao patógeno exige estratégias de seleção, um método eficaz para iniciar o programa de melhoramento genético é através da seleção fenotípica. Trata-se de uma seleção que leva em consideração apenas o aspecto visual das plantas, sendo um método bastante empregado devido a sua praticidade, custo baixo e rapidez com que se consegue extrair as informações. A seleção fenotípica consiste na separação dos materiais genéticos mais promissores com base apenas nos caracteres fenotípicos para as características de interesse.

Sabe-se que os fungos patogênicos atacam as plantas por meio de diversas estratégias, e quando adentram ao tecido vegetal secretam várias enzimas que atuam na degradação da parede celular, toxinas e induzem a produção de substâncias reguladoras de crescimento, entre outros mecanismos de ataque (CHEN et al., 2022). A compreensão mais profunda sobre o modo de vida patogênico, da fisiologia molecular, relação evolutiva e patogenicidade podem aprimorar o manejo das doenças. Tecnologias de sequenciamento são ferramentas importantes para a descoberta de genes funcionais de fungos ou proteínas envolvidas na virulência. O rascunho de genomas pode fornecer sequências de referência para os estudos com *Calonectria*. No entanto, as ferramentas moleculares e os recursos genômicas são limitados para os estudos com *C. paragominensis* e *C. ovata*, e nenhum estudo foi direcionado para o sequenciamento do genoma completo.

Diante do apresentado, o objetivo principal do estudo é avaliar a resistência genética e realizar o sequenciamento de genomas de diferentes espécies de *Calonectria* spp, a fim de selecionar indivíduos resistentes como suporte para a realização de estudos futuros. Os objetivos específicos são: avaliar o nível de resistência de clones de *Eucalyptus* spp. quanto à desfolha e mancha foliar causadas por *Calonectria* spp.; avaliar a resistência à mancha foliar por meio da incidência e severidade da doença em campo; ordenar e selecionar genótipos candidatos à seleção quanto a menor suscetibilidade à doença e sequenciar três genomas completos de espécies de *Calonectria* encontradas no Brasil.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 *Eucalyptus* spp.

O gênero *Eucalyptus* é nativo da Austrália (algumas poucas espécies originam-se na Nova Guiné, Indonésia e Filipinas) habitando regiões com características climáticas distintas (FLORENÇA 1986; TOMÉ et al., 2021), pertence à família Myrtaceae e subfamília Leptospermoideae. São conhecidas mais de 800 espécies que podem sobreviver aos mais diversos habitats, desde ambientes úmidos a florestas abertas, desertos, afloramentos rochosos e pântanos (THORNHILL et al., 2019).

No Brasil, o eucalipto representa 76% da área total plantada, com 7,6 milhões de hectares. Os principais produtos advindos desse setor são a celulose, papel, energia, painéis de madeira, madeira serrada, compensado etc. Os estados de Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Paraná, Rio Grande do Sul e Santa Catarina são os maiores produtores de florestas plantadas no país. Dado as boas práticas de manejo, o melhoramento genético e as condições edafoclimáticas encontradas no Brasil, a produtividade dos plantios é considerada muito alta, levando-se em consideração o volume de madeira produzido por área ao ano, além de possuir um dos mais baixos ciclos de plantio e colheita do mundo (IBA, 2023).

Segundo os dados comerciais, a produtividade média no plantio de eucalipto tem evoluído bastante ao longo dos anos, em 1970 era 10 m³ ha⁻¹ ano, tendo sido encontrada uma produtividade média de 32,7 m³ ha⁻¹ ano em 2023. O investimento em tecnologia e capacitação profissional, que possibilita avanços no manejo sustentável dos plantios florestais, controle de doenças e pragas, fertilização do solo, aliados com as condições naturais do Brasil, é fundamental para a melhoria da produtividade nas áreas de cultivo (IBA, 2023). Porém, grande parte dos plantios estão localizados em áreas onde há predomínio de clima quente e úmido, ideal para o surgimento de patógenos, como os do gênero *Calonectria*, que ataca principalmente as folhas, causando manchas, se tornando a principal doença fúngica foliar desta cultura (ALFENAS et al., 2009; ALFENAS et al., 2013; ALFENAS et al., 2015).

Os plantios comerciais são homogêneos em termos de diversidade genética, o que proporciona condições ideais para patógenos fúngicos (BOSE et al., 2022). Espécies do gênero *Calonectria* são um dos importantes patógenos (CROUS, 2002; DART et al., 2015) que afetam folhas, caule, raízes e frutos de 335 espécies herbáceas e lenhosas de florestas, espécies hortícolas e agrícolas (CROUS, 2002; LOMBARD et al., 2010). Em regiões tropicais e subtropicais a mancha das folhas por *Calonectria* é uma das principais doenças (CROUS et al., 2019; LIU et al., 2020; PHAM et al., 2022).

2.2 *Calonectria* spp.

As espécies de *Calonectria* possuem ampla distribuição geográfica (Figura 1) e causam doenças em uma gama de hospedeiros, principalmente em regiões de climas tropicais e subtropicais (VITALE et al., 2013; ALFENAS et al., 2015; WANG et al., 2019). A mancha das folhas causada por *Calonectria pteridis* é considerada uma das principais doenças foliares nos plantios comerciais de eucaliptos no Brasil (FERREIRA et al., 1995; ALFENAS et al., 2009; ALFENAS et al., 2013). Contudo, novos estudos têm mostrado a predominância de outras espécies no Brasil (SANCHEZ et al, 2022).

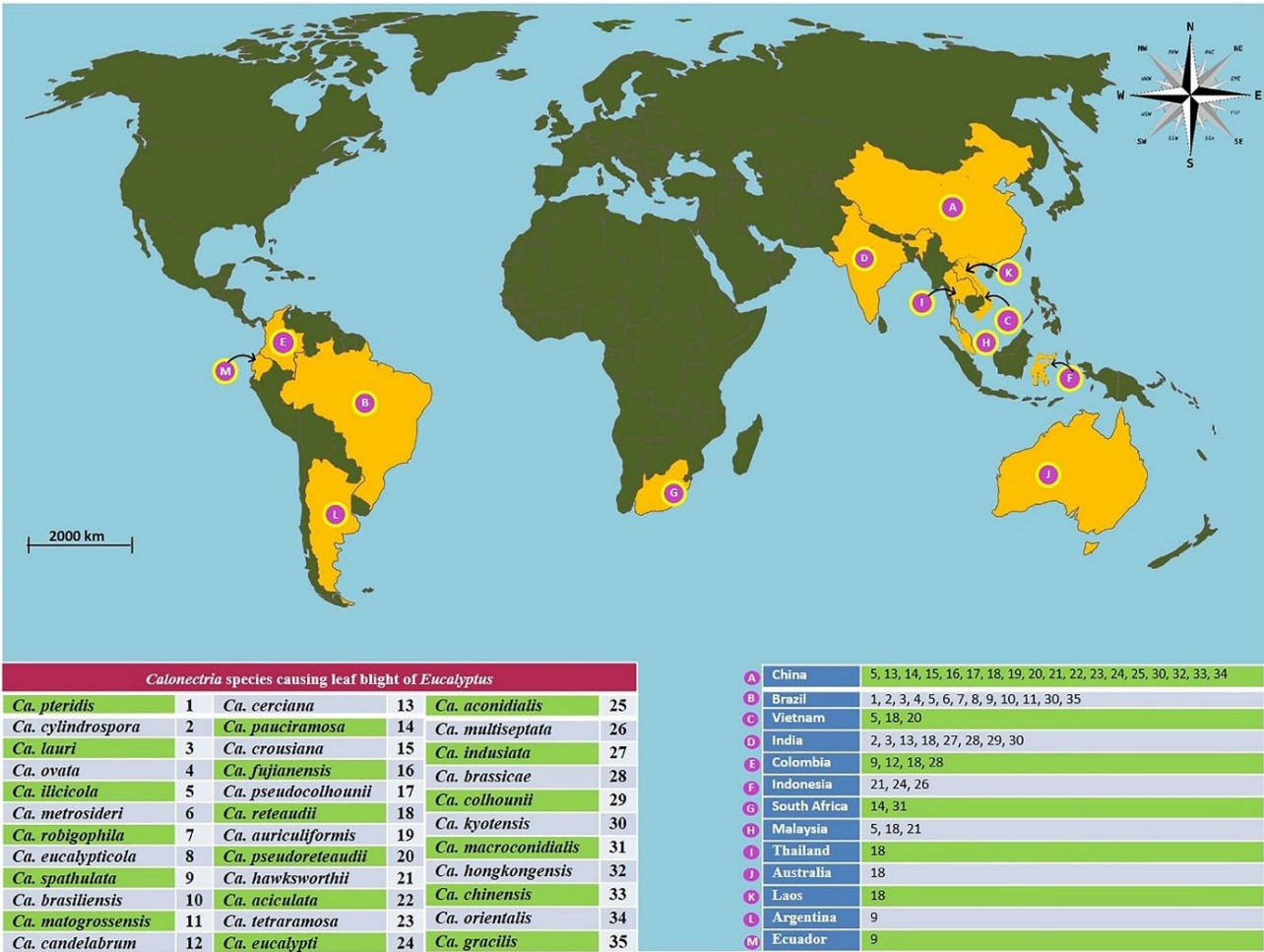


Figura 1. Distribuição geográfica de *Calonectria* em eucalipto.

Fonte: Bose et al. (2022)

O fungo caracteriza-se por apresentar peritécio brilhante, asco clavado, multisseptado hialino e fusiforme (CROUS et al., 2006) na fase sexuada. Já na fase assexuada, observam-se conídios cilíndricos uni ou multisseptados, esporulação brilhante (MORGAN, 1982)

Os primeiros relatos de ocorrência desse patógeno foram na década de 1960, nos Estados Unidos, em *E. cinerea* (SOBERS, 1968). No Brasil, *C. pteridis* foi relatada pela primeira vez em *E. grandis* na Bahia em 1990, em plantas com um ano de idade, sendo o crestamento e desfolha os sintomas mais característicos. A doença se espalhou por todo o território nacional e afeta, mais gravemente, as árvores de eucalipto de seis meses a 2-3 anos após o plantio (ALFENAS et al., 2009; GRAÇA et al., 2009). Os principais hospedeiros em plantios comerciais são *E. camaldulensis*, *E. cloeziana*, *E. grandis*, *E. saligna*, *E. tereticornis*, *E. urophylla* e o híbrido “urograndis” (ALFENAS et al., 2009; ZARPELON et al., 2015).

No campo, a doença inicia-se a partir de inóculos presentes no solo ou serrapilheira. Os sintomas incluem lesões foliares, inicialmente pequenas de 1 a 7 mm de diâmetro, redondas ou alongadas e de coloração cinza claro que progride para marrom claro. Em plantas suscetíveis, a lesão pode evoluir para necrose, seguida de desfolha prematura (Figura 2) (ALFENAS et al., 2009; ALFENAS et al., 2013).



Figura 2. Sintomas do ataque do patógeno em campo. **(A)** Manchas alongadas de coloração marrom claro no limbo foliar; **(B)** Desfolha prematura da parte basal e terço médio das plantas. Fonte: Da autora.

As infecções causadas pelo fungo, além de afetar a fotossíntese (CHEN et al., 2015), podem comprometer o metabolismo de fitoalexinas e degradar a parede celular, devido ao aumento na atividade de cutinases, pectinases e lignolítica (YE et al., 2018). A desfolha é considerada como um sintoma secundário da doença, decorrente do aumento significativo da

severidade das manchas nas folhas. Esse aumento está relacionado ao material vegetal morto depositado sobre o solo, que abriga o inóculo inicial do patógeno. Nesse sentido, as condições edafoclimáticas (temperatura, precipitação e umidade) encontradas na grande maioria dos plantios florestais contribuem para a disseminação do fungo (MIRANDA et al., 2021).

2.3 Métodos de controle da doença

A mancha das folhas causada por *Calonectria*, quando detectada nos viveiros é controlada com a aplicação de produtos químicos, porém, quando se trata de extensas áreas no campo, essa prática se torna economicamente inviável. Esses sintomas variam de acordo com o hospedeiro, a idade do hospedeiro e a espécie do patógeno (CROUS, 2002). Segundo Alfenas et al. (2009), as lesões iniciam-se na base, no ápice ou nas margens das folhas e, com o progresso da doença, essas lesões tomam grandes proporções do limbo foliar, ocasionando intensas desfolhas no primeiro ano de plantio (ALFENAS et al., 2009).

O plantio de clones resistentes é a forma mais eficaz de controlar essa doença em plantações florestais (CROUS et al., 2006; ALFENAS et al., 2009; ZARPELON et al., 2015; ZARPELON et al., 2020). A ampla variabilidade inter e intraespecífica observada no gênero *Eucalyptus* tem ampliado a busca da maximização no processo de seleção e a utilização de combinações híbridas. Dessa forma, a hibridação tem proporcionado excelentes resultados, tanto em qualidade da madeira, quanto em crescimento, além de resistência a doenças (ALFENAS et al., 2009; TRUEMAN et al., 2018). Considerando esse fato, determinar os fatores de defesa da planta é relevante para os programas de melhoramento da espécie, ainda não se sabe a base genética de resistência ao patógeno para apoiar o manejo e controle ao longo prazo da doença, porém, alguns QTLs (*Quantitative trait loci*) foram detectados usando marcadores microssatélites (ZARPELON et al., 2015).

O estado nutricional da planta é um dos principais fatores que determinam a capacidade de resposta a estresses abióticos e bióticos. A resistência das plantas quando submetida ao ataque por patógenos pode ser direta e indiretamente influenciada pelo seu estado nutricional, uma vez que, os nutrientes exercem papel importante na penetração, desenvolvimento e reprodução de diversos patógenos invasores (SOARES, 2018). Em vista disso, alguns nutrientes minerais, como o nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio etc. (DORDAS, 2008). A eficácia da fertilização como controle de doenças em plantas, está associada ao papel que esses nutrientes possuem como mensageiros secundários e na formação de barreiras físicas e/ou químicas envolvidas na resistência das plantas. Uma nutrição balanceada

representa um método eficaz de controle de patógenos, porém requer conhecimento das interações entre nutrientes e intensidade e severidade da doença (SOARES et al., 2018). O equilíbrio entre eles pode afetar as atividades biológicas, bioquímicas, fisiológica e, especialmente, a integridade das paredes celulares e a composição química do hospedeiro (DORDAS, 2008; SHOAIB; AWAN, 2021).

2.3.1 Resistência Genética

O plantio de clones resistentes é a forma mais eficiente de controlar a doença em campo, sendo assim, o grande desafio é desenvolver genótipos com todas as características desejáveis e adaptados às condições do local de plantio (FONSECA et al., 2010). O gênero *Eucalyptus* possui grande quantidade de espécies, onde se tem uma ampla variabilidade intra e interespecífica para resistência a doenças, o que permite a seleção de materiais resistentes, além do desenvolvimento de híbridos interespecíficos resistentes (SCHUMACHER; VIEIRA, 2015).

Nos programas de melhoramento trabalha-se com um grande volume de dados, com o intuito de reduzir esse volume, sem que haja perda de informações importantes pode-se utilizar de técnicas estatísticas multivariadas. As técnicas de análises multivariadas têm sido empregadas em estudos recentes, para a estimativa da divergência genética em espécies florestais como em *Pinus caribaea* var. *caribaea* (SILVA et al., 2012), *Eucalyptus camaldulensis* (COSTA et al., 2016) e *Corymbia citriodora* (LUZ et al., 2018).

Os métodos de análise multivariada podem ser empregados para estimar a divergência genética que existe entre os genótipos, como a distância euclidiana ou de Mahalanobis, estas são úteis na definição de clones potenciais em programas de melhoramento (CRUZ et al., 2014; RESENDE et al., 2014). Porém, por se tratar de muitas plantas, a identificação visual de grupos não é viável, sendo assim, se faz necessário a utilização de métodos de agrupamento, como o método de otimização de Tocher e o Método de Pares-Grupos Não Ponderados usando Médias Aritméticas (UPGMA), para facilitar análises confiáveis (CRUZ et al., 2012).

Além das técnicas de agrupamento, a análise de componentes principais pode ser empregada a fim de obter informações sobre a divergência entre genótipos. A análise de componentes principais é uma técnica multivariada, que transforma linearmente um conjunto original de variáveis, inicialmente correlacionadas entre si, num conjunto substancialmente menor de variáveis não correlacionadas que contém a maior parte da informação do conjunto original (HONGYU; SANDANIELO; JUNIOR, 2015). Essa técnica permite visualizar grupos

e genótipos mais e menos divergentes, por meio da dispersão gráfica em dois eixos coordenados a partir de uma estrutura multivariada resumida dos caracteres quantitativos, ou seja, as variáveis são substituídas por dois componentes principais que são independentes entre si e estimados de modo a reter o máximo da variação (CRUZ et al., 2012; RESENDE et al., 2014).

2.4 Sequenciamento de genoma

A maioria das identificações das espécies de *Calonectria* baseavam-se em características morfológicas (ALFENAS et al., 2015), porém nas últimas duas décadas com o avanço das técnicas de sequenciamento pode-se identificar e determinar as espécies que ocorrem em regiões de crescimento de eucalipto no Brasil, de maneira muito mais precisa e rápida. O processo de sequenciamento das bases nucleotídicas, adenina, guanina, citosina e timina resultaram na molécula de DNA, sendo fundamental para a obtenção de informações sobre gene ou genoma, e posteriormente para estudos sobre as relações hereditárias e bioquímicas que refletem o comportamento dos patógenos (MEDEIROS, 2023). Nos últimos anos, tivemos várias publicações de genomas completos de *Calonectria*, disponíveis no banco de dados do NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/genome>). O estudo dos genomas depende da extração correta das informações, pois análises de comparações de genoma baseadas em identificações incorretas levam a conclusões também incorretas (HOUBRAKEN et al. 2021).

O sequenciamento de genoma completo possui maior impacto em termos de comparação com outras espécies, pois é possível avaliar divergências de vias e a expansão e contração de genes (SRIVASTAVA et al., 2014). Estes ainda podem auxiliar para o alinhamento de regiões similares entre as espécies próximas, e dessa forma, auxiliar na precisão e eficácia de projetos de montagem de genoma (SWAIN et al., 2012). Ademais, as ferramentas comparativas podem ser empregadas para anotar espécies relacionadas e caracterizar genes específicos para as espécies (KING et al., 2015). Estudos comparativos de genoma de patógenos fúngicos revelam que o conteúdo pode ser altamente variável (MOLLER; STUKENBROCK, 2017). O tamanho e o nível de ploidia dos fungos patogênicos podem variar significadamente entre os indivíduos da mesma espécie (POTGIETER et al., 2020). Essas diferenças são atribuídas à dinâmica dos elementos transponíveis, instabilidade cromossômica e a compartimentalização do genoma (MOLLER; STUKENBROCK, 2017).

A maioria dos métodos de genotipagem analisa apenas uma pequena fração do genoma de um indivíduo, em contraste com o sequenciamento completo do genoma, que

consegue comparar inúmeros isolados em um único estudo, em um tempo menor e com menos custo. Dessa forma, pode-se explorar variantes genéticas que são responsáveis por definir um genótipo individual e inúmeras aplicações taxonômicas, até estudos de genética populacional (ARAUJO; SAMPAIO-MAIA, 2018). Para apoiar estudos futuros relacionados a *Calonectria*, sequenciamos o genoma completo de duas espécies, *C. ovata* e *C. paragominensis*.

3 REFERÊNCIAS

- ALFENAS, A. C.; FERREIRA, F.A. A mancha de folha do eucalipto no Brasil causada por três espécies de *Cylindrocladium* – Uma revisão da descrição da doença. **Revista Arvore**, Viçosa, v. 3, p. 47-56, 1979.
- ALFENAS, R. F. et al. Diversity and potential impact of *Calonectria* species in *Eucalyptus* plantations in Brazil. **Studies in Mycology**, v. 54, n. 1, p. iii-iii, 2006.
- ALFENAS, A.C.; ZAUZA, E.A.V.; MAFFIA, R.G. **Clonagem e doenças do eucalipto**. 2nd. ed. Editora UFV, Viçosa, MG, Brasil, 2009.
- ALFENAS, R.F. **Taxonomy and biology of *Calonectria* in brazil**. 2013. 143 f. Tese. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2013.
- ALFENAS, R.F. et al. Diversity and potential impact of *Calonectria* species in *Eucalyptus* plantations in Brazil. *Studies in Mycology*, [Netherlands], v. 80, p. 89-130, 2015.
- ARAUJO, R.; SAMPAIO-MAIA, B. Fungal genomes and genotyping. In: Advances in applied microbiology. **Academic Press**, 2018. p. 37-81.
- BOSE, R. et al. *Calonectria* leaf blight of *Eucalyptus*: A global review. **Annals of Applied Biology**, 2022.
- CHEN, Q. et al. Transcriptome and proteome analysis of *Eucalyptus* infected with *Calonectria pseudoreteaudii*. **Journal of proteomics**, v. 115, p. 117-131, 2015.
- CHEN, X. et al. Virulence-associated genes of *Calonectria ilicola*, responsible for *Cylindrocladium* black rot. **Journal of Fungi**, v. 8, n. 8, p. 869, 2022.
- COSTA, R.B.; SILVA, J.C; SKOWRONSKI, L.; CONSTANTINO, M.; PISTORI, H.; PINTO, JVC Divergência genética em progênies de *Eucalyptus camaldulensis* no Bioma Savana em Mato Grosso, Brasil. **PLoS ONE**, v. 11, n. 9, e0163698, 2016.
- CRUZ, C.D.; REGAZZI, A.J.; CARNEIRO, P.C.S. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. Editora UFV, 2012. 480p.
- CRUZ, C.D.; REGAZZI, A.J.; CARNEIRO, P.C.S. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. Editora UFV, 2014. 668p.
- CROUS, P.W. et al. Taxonomy and pathology of *Cylindrocladium* (*Calonectria*) and allied genera. **American Phytopathological Society (APS Press)**, 2002.
- CROUS, W.P.; GROENEWALD, J.Z.; RISEDE, J.M.; SIMONEAU, P.; HYDE, K.D. *Calonectria* species and their *Cylindrocladium* anamorphs: species with clavate vesicles. **Studies in Mycology**, v. 55, p. 213-226, 2006.
- CROUS, P.W. et al. Foliar pathogens of eucalypts. **Studies in Mycology**, v. 94, p. 125-298, 2019.

DART, N. et al. Soil inoculum production, survival, and infectivity of the boxwood blight pathogen, *Calonectria pseudonaviculata*. **Plant disease**, v. 99, n. 12, p. 1689-1694, 2015.

DOES, H.C.V.D. et al. Transcription factors encoded on core and accessory chromosomes of *Fusarium oxysporum* induce expression of effector genes. **PLoS genetics**, v. 12, n. 11, p. e1006401, 2016.

DORDAS, C. Role of nutrients in controlling plant diseases in sustainable agriculture: A review. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 28, p. 33-46, 2008.

FERREIRA, F.A. et al. A foliar eucalypt disease in tropical regions of Brazil caused by *Cylindrocladium pteridis*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 20, p. 107-110, 1995.

FREITAS, R.G.; ALFENAS, R.F.; GUIMARÃES, L.M.S; BADEL, J.L.; ALFENAS, A.C. Genetic diversity and aggressiveness of *Calonectria pteridis* in *Eucalyptus* spp. **Plant Pathology**, v. 68, n.5, p. 869-877, 2019.

FLORENCE, R.G. Cultural problems of *Eucalyptus* as exotics. **The Commonwealth Forestry Review**, p. 141-163, 1986.

FONSECA, S.M.; RESENDE, M.D. V.; ALFENAS, A. C.; GUIMARÃES, L.M.S.; ASSIS, T.F.; GRATAPAGLIA, D. **Manual prático de melhoramento genético do eucalipto**. 1. ed., Viçosa: Editora UFV, 2010. 200 p.

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

IBÁ. **IBÁ - Indústria Brasileira de Árvores. 2023** Disponível em: <
<https://www.iba.org/datafiles/publicacoes/relatorios/relatorioiba2023compactado.pdf>>

HONGYU, K.; SANDANIELO, V.L.M.; DE OLIVEIRA JUNIOR, G.J. Análise de componentes principais: resumo teórico, aplicação e interpretação. **E&S Engineering and science**, v. 5, n. 1, p. 83-90, 2016.

HOUBRAKEN, Jos; VISAGIE, Cobus M.; FRISVAD, Jens C. Recommendations to prevent taxonomic misidentification of genome-sequenced fungal strains. **Microbiology Resource Announcements**, v. 10, n. 48, p. e01074-20, 2021.

KING, R. et al. The completed genome sequence of the pathogenic ascomycete fungus *Fusarium graminearum*. **BMC genomics**, v. 16, p. 1-21, 2015.

LIU, Q.L. et al. Reconsideration of species boundaries and proposed DNA barcodes for *Calonectria*. **Studies in mycology**, v. 97, n. 1, p. 100095-100095, 2020.

LIU, Q. et al. Diversity and distribution of *Calonectria* species from plantation and forest soils in Fujian Province, China. **Journal of Fungi**, v. 8, n. 8, p. 811, 2022.

LOMBARD, L. et al. species concepts in *Calonectria* (*Cylindrocladium*). **Studies in Mycology**, v. 66, p. 1-13, 2010.

LUZ, OSL; HONÓRIO, ABM; FIDELIS, RR; NASCIMENTO, IR; MORAES, CB; LEAL, TCAB Characteristics for the selection of parents of *Corymbia citriodora* aiming to the production of wood and essential oil. **Revista Árvore**, v. 42, n. 1, 2018.

MEDEIROS, C.A.A. **Genomas dos fungos *Trichoderma lentiforme* e *Trichoderma camerunense* e a interação na cultura do tomateiro e com fitopatógenos**. Tese (Doutorado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) – Programa de Pós-Graduação, Instituto Biológico, São Paulo, 2022.

MIRANDA, I.D.S. et al. Occurrence of *Calonectria* leaf blight in *Eucalyptus benthamii* progenies and potential for disease resistance. **Tropical Plant Pathology**, v. 46, n. 3, p. 254-264, 2021.

MÖLLER, M.; STUKENBROCK, E.H. Evolution and genome architecture in fungal plant pathogens. **Nature Reviews Microbiology**, v. 15, n. 12, p. 756-771, 2017.

MORGAN, A.P. Two new genera of hyphomycetes. **Botanical Gazette**, v. 17, n. 6, p. 190-192, 1892.

PHAM, N.Q. et al. Ten new species of *Calonectria* from Indonesia and Vietnam. **Mycologia**, v. 111, n. 1, p. 78-102, 2019.

POTGIETER, L. et al. On variant discovery in genomes of fungal plant pathogens. **Frontiers in microbiology**, v. 11, p. 626, 2020.

RESENDE, M.D.V.; SILVA, F.F.; AZEVEDO, C.F. Estatística matemática, biométrica e computacional: Modelos mistos, multivariados, categóricos e generalizados (REML/BLUP), inferência bayesiana, regressão aleatória, seleção genômica, QTL-GWAS, estatística espacial e temporal, competição, sobrevivência. **Suprema**, 2014. 881p.

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

SILVA, J.M.; AGUIAR, A.V.; MORI, E.S.; MORAES, M.L.T. Divergência genética entre progênies de *Pinus caribaea* var. *caribaea* com base em caracteres quantitativos. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 32, n. 69, p. 69-77, 2012.

SRIVASTAVA, S.K. et al. The genome sequence of the fungal pathogen *Fusarium virguliforme* that causes sudden death syndrome in soybean. **PLoS One**, v. 9, n. 1, p. e81832, 2014.

SOARES, T.F.F. et al. Calcium and Potassium Imbalance Favours Leaf Blight and Defoliation Caused by *Calonectria pteridis*. **Forests**, v. 9, n. 12, p. 782, 2018.

SOBERS, E.K. Morphology and host range of *Cylindrocladium pteridis*. **Phytopathology**, v. 58, p. 1265-1270, 1968.

SHOAB, A.; AWAN, Z.A. Mineral fertilizers improve defense related responses and reduce early blight disease in tomato (*Solanum lycopersicum* L.). **Journal of Plant Pathology**, [Italy], v.103, p. 217-229, 2021.

SCHUMACHER, M.V.; VIEIRA, M. **Silvicultura do eucalipto no Brasil**. Santa Maria, RS: UFSM, 2015. 308 p

SWAIN, M.T. et al. A post-assembly genome-improvement toolkit (PAGIT) to obtain annotated genomes from contigs. **Nature protocols**, v. 7, n. 7, p. 1260-1284, 2012.

THORNHILL, A.H. et al. A dated molecular perspective of eucalypt taxonomy, evolution and diversification. **Australian Systematic Botany**, v. 32, n. 1, p. 29-48, 2019.

TOMÉ, M. et al. Opportunities and challenges of *Eucalyptus* plantations in Europe: The Iberian Peninsula experience. **European Journal of Forest Research**, v. 140, n. 3, p. 489-510, 2021.

TRUEMAN, S.J.; HUNG, C.D.; WENDLING, I. Tissue culture of *Corymbia* and *Eucalyptus*. **Forests**, v. 9, n. 2, p. 1-42, 2018.

VITALE, A. et al. *Calonectria* diseases on ornamental plants in Europe and the Mediterranean basin. **Journal of Plant Pathology**, v. 95, n. 3, p. 463-476, 2013.

WANG, Q.; LIU, W.Q.; CHEN, S. Novel species of *Calonectria* isolated from soil near Eucalyptus plantations in southern China. **Mycologia**, v. 111, v. 6, p. 1028-1040, 2019.

YE, X. al. Whole genome and transcriptome analysis reveal adaptive strategies and pathogenesis of *Calonectria pseudoreteauidii* to *Eucalyptus*. **BMC genomics**, v. 19, p. 1-12, 2018.

ZARPELON, T.G. et al. Phosphorus, nitrogen and potassium nutrition on *Calonectria* leaf blight in eucalypt plants. **Forest Pathology**, v. 49, n. 6, p. e12561, 2020.

ZARPELON, T.G. et al. Genetic mapping and validation of QTLs associated with resistance to *Calonectria* leaf blight caused by *Calonectria pteridis* in *Eucalyptus*. **Tree genetics & genomes**, v. 11, n. 1, p. 1-9, 2015.

**CAPÍTULO II: DRAFT GENOME SEQUENCE OF *CALONECTRIA*
PARAGOMINENSIS AND *CALONECTRIA OVATA* SPECIES FROM BRAZIL,
CAUSE TO LEAF SPOT AND DEFOLIATION**

Draft genome sequence of *Calonectria paragominensis* and *Calonectria ovata* species from Brazil, cause to leaf spot and defoliation

Letícia Molinari¹, Enrique Ignacio Sánchez-González¹, Thaissa de Paula Farias Soares², Reginaldo Gonçalves Mafia², Maria Alves Ferreira¹

¹ Universidade Federal de Lavras, Departamento de Fitopatologia, Lavras, MG, 37200-900, Brazil

² Suzano Papel e Celulose S. A. Centro de Tecnologia, Aracruz, ES, 29197-900, Brazil.

Preparado em concordância com as normas do periódico “IMA Fungus”

INTRODUCTION

Calonectria species are one of the important pathogens, affecting leaves, stems, roots and fruits, in herbaceous and woody species (Crous 2002; Dart et al. 2015). *Calonectria* leaf blight (CLB) is one of the most devastating diseases of eucalyptus in tropical regions, as in Brazil (Pham et al. 2022). An evolution of the phylogenetic species concept, in recent years, several new species of *Calonectria* have been described (Lombard et al. 2010a; Lombard et al. 2010b; Chen et al. 2011b; Xu et al. 2012; Alfenas et al. 2013af; Lombard et al. 2016; Li et al. 2017; Liu; Chen 2017; Pham et al. 2019; Bose et al. 2022). The genus is composed of two main phylogenetic groups, Prolate group and Sphaero-Naviculate group, the differentiation is based on the shape of the vesicle in the conidiogenic phase (Lombard et al. 2010; Pham et al. 2019). Ten species complexes are found, eight of which are from the Prolate group, which includes *C. brassicae*, *C. candelabro*, *C. colhounii*, *C. cylindrospora*, *C. mexicana*, *C. pteridis*, *C. reteaudii*, and *spathiphylli* species complexes. The two other complexes, *C. kyotensis* and *C. naviculata*, belong to the Sphaero-Naviculate group. There are 172 species described of which, 99 were isolated from leaf tissues and 73 from soil samples (Lombard et

al. 2016; Marin-Felix et al. 2017; Crous et al. 2019; Pham et al. 2019; Sánchez-González et al. 2022).

Genome *Calonectria* species are available at NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/>) so far. Despite the economic importance that the pathogen has on the eucalyptus plantations in Brazil, the knowledge about the biology and genetic factors associated with virulence of *Calonectria* species still remains unclear. The objective of this work was to sequence three complete genomes of *Calonectria* species found in Brazil. To facilitate future research on taxonomy, population genetics/diversity and pathogenicity-associated genes.

MATERIAL AND METHODS

Total genomic DNA was extracted from single spore culture mycelia grown in MEA culture medium (malt extract 20g/L-1; yeast extract 2 g/L-1; sucrose 5 g/L-1) using the method described by (Sanchez-Gonzalez et al. 2022) and used to generate a paired-end library, which was then sequenced using the Illumina HiSeq 2500 platform. Whole genome sequencing was performed at the University of Iowa (Iowa, USA).

Raw Illumina data (reads) were trimmed with Trim+ Ends within Geneious Prime v.2023.1.1 software; and the genome was assembled using Spades v.3.14.0 (Bankevich et al. 2012). The resulting assembled scaffolds were filtered based on k-mer coverage ($\geq 20\%$ of average coverage) and size (≥ 500 bp). Final genomes were validated for accuracy by mapping with all reads and screened for inconsistency in continuous assembly. Inverted terminal repeat (ITR) regions were identified with Geneious Prime Repeat Finder. Genomes were annotated using Genome Annotation and Tracks.

Genome completeness was assessed with Benchmarking Universal Single-Copy Orthologs (BUSCO) v. 5.3.2, using the Sordariomycetes strain dataset (Simão et al. 2015).

The number of protein-coding gene models was estimated using the Augustus plugin v.0.1.1 in Geneious Prime, pre-defined species model for *Fusarium graminearum*. QAST v 5.0.2 (Gurevich et al. 2013) was used to evaluate metrics including contig number, total length, GC content and N50 for the genome assemblies. BUSCO and QAST were run using the Galaxy platform (Afgan et al. 2018; The Galaxy Community 2022) (<https://usegalaxy.eu/>).

To validate the identity of the sequenced isolate, the *Act*, *cmdA*, *His*, *rpb2*, *Tub* and *EF1- α* gene regions were extracted from the assembly and a maximum likelihood phylogeny was constructed using the reference sequences (Alfenas et al. 2015; Lombard et al., 2016; Liu et al. 2020).

RESULTS AND DISCUSSION

The *C. paragonensis* genome has a length of 69,674,411 bp, in 1428 scaffolds, 1294 of which were longer than 1Mb. The genome has 48.5% GC, N50 value of 105,543, N90 value of 29,254 bp; L50 value of 195 and L90 value of 663. BUSCO analyses revealed 99.2% coverage, with 3785 single-copy in Sordariomycetes, of which 30 were duplicated. Gene prediction by AUGUSTUS using *F. graminearum* gene models predicted 29,697 protein-coding genes. While phylogenetic analysis of *tef*, *his* and *cmdA* genes, confirmed the identity of the isolate as *C. paragonensis*.

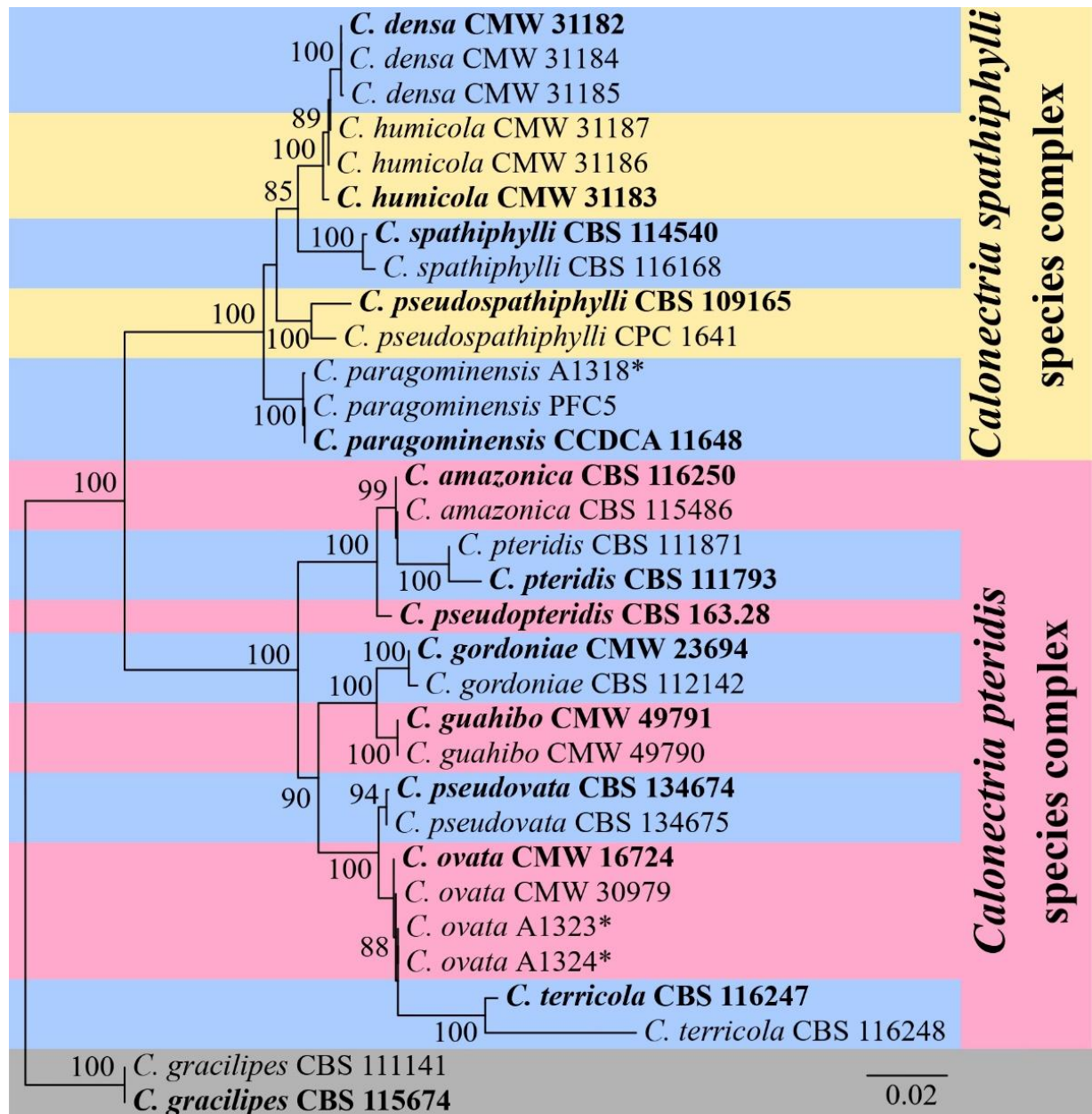
The calculated *C. ovata* (A1323) assembly was 2,367 scaffolds, with N50 of 131,438 bp. The estimated genome size was 60,417,523 bp and with GC content of 50.78%. This draft contains 18,215 gene models based on the predicted model. BUSCO analyses obtained 99.7% completeness, 3776 single-copy, 29 duplicated. With 98.9% having single-copy genes, 0.8% duplicated orthologs and 0.2% missing.

Illumina sequencing of *C. ovata* (A1324) has 1222 scaffolds, with N50 read value of 147,589 bp and N90 39,646 bp; a total of 50.94% GC and total size of 60,260,503 bp. To

assess the completeness of the genome assembly, the BUSCO dataset was applied, as 99.7% complete genes, 0.1% fragmented genes and 0.2% missing genes. Prediction of protein coding sequences using *F. graminearum* dataset returned 18,283.

The genome size and number of genes predicted for *C. paragominensis* and *C. ovata* were like other *Calonectria* species, such as *C. pteridis* (LPF059), with 1,167 scaffolds, a total size of 58,373,473 bp and a GC content of 50.21% (Queiroz et al. 2022). The availability of the genomes allows the realization of studies with comparative and population genomics within the species complex, in addition, it will promote future studies on genes related to pathogenicity, adaptability and mating of these important plant pathogens.

Figure 1. Phylogenetic tree obtained from maximum likelihood analysis of the concatenated dataset of the Act, cmdA, His, rpb2, Tub ad EF1-gene regions. The sequences were extracted from the sequenced genome assembly (**bold**), matched with the reference sequences. “*” indicates isolates sequenced in this study. The taxa used as outgroup is *C. gracilipes*.



REFERENCES

- Alfenas, RF, Lombard, L., Pereira, OL, Alfenas, AC, & Crous, PW (2015). Diversidade e impacto potencial de espécies de *Calonectria* em plantações de eucalipto no Brasil. *Studies in Mycology*, 80 (1), 89-130. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2014.11.002>
- Afgan, E., Baker, D., Batut, B., Van Den Beek, M., Bouvier, D., Čech, M., ... & Blankenberg, D. (2018). A plataforma Galaxy para análises biomédicas acessíveis, reprodutíveis e colaborativas: atualização de 2018. *Pesquisa de ácidos nucleicos*, 46 (W1), W537-W544. <https://doi.org/10.1093/nar/gky379>
- Alfenas, R. F., Pereira, O. L., Freitas, R. G., Freitas, C. S., Dita, M. A. D., & Alfenas, A. O. (2013). Mass spore production and inoculation of *Calonectria pteridis* on *Eucalyptus* species under different environmental conditions. *Tropical Plant Pathology*, 38, 406–413. <https://doi.org/10.1590/S1982-56762013000500005>
- Bankevich, A, Nurk, S, Antipov, D, Gurevich, AA, Dvorkin, M, Kulikov, AS, Pevzner, PA (2012). SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *Journal of computational biology*, 19(5), 455-477. <https://doi.org/10.1089/cmb.2012.0021>
- Bose, R., Banerjee, S., Pandey, A., Bhandari, M. S., Barthwal, S., & Pandey, S. (2023). *Calonectria* leaf blight of *Eucalyptus*: A global review. *Annals of Applied Biology*, 182(1), 6-28. <https://doi.org/10.1111/aab.12800>

Chen, Q, Guo, W, Feng, L, Ye, X, Xie, W, Huang, X, Liu, J (2015). Análise transcriptômica e proteômica de *Eucalyptus* infectados com *Calonectria pseudoreteauidii*. Journal of Proteomics, 115, 117-131. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2014.12.008>

Chen, S. F., Lombard, L., Roux, J., Xie, Y. J., Wingfield, M. J., & Zhou, X. D. (2011). Novel species of *Calonectria* associated with *Eucalyptus* leaf blight in Southeast China. Persoonia – Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi, 26(1), 1–12. <https://doi.org/10.3767/003158511x555236>

Crous, PW (2002). Taxonomia e patologia de *Cylindrocladium* (*Calonectria*) e gêneros afins . American Phytopathological Society (APS Press).

Crous, PW, Wingfield, MJ, Cheewangkoon, R, Carnegie, AJ, Burgess, TI, Summerell, BA, Edwards, J, Taylor, PWJ, Groenewald, JZ (2019). Foliar pathogens of eucalypts. Studies in Mycology, 94, 125 – 298. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2019.08.001>

Dart, N, Hong, C, Craig, CA, Fry, JT, Hu, X (2015). Soil inoculum production, survival, and infectivity of the boxwood blight pathogen, *Calonectria pseudonaviculata*. Plant disease, 99 (12), 1689-1694. <https://doi.org/10.1094/PDIS-12-14-1245-RE>

Gurevich, A., Saveliev, V., Vyahhi, N., & Tesler, G. (2013). QUAST: ferramenta de avaliação de qualidade para montagens genômicas. Bioinformatics, 29 (8), 1072-1075. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt086>

Keller, O., Kollmar, M., Stanke, M., & Waack, S. (2011). A novel hybrid gene prediction method employing protein multiple sequence alignments. *Bioinformatics*, 27(6), 757-763.

<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr010>

Liu, QL, Li, J., Wingfield, MJ, Duong, TA, Wingfield, BD, Crous, PW e Chen, SF (2020). Reconsideração dos limites das espécies e códigos de barras de DNA propostos para *Calonectria*. *Studies in Mycology*, 97 (1). <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2020.08.001>

Li, J. Q., Wingfield, M. J., Liu, Q., Barnes, I., Roux, J., Lombard, L., & Chen, S. (2017). *Calonectria* species isolated from *Eucalyptus* plantations and nurseries in South China. *IMA Fungus*, 8(2), 259–286. <https://doi.org/10.5598/ima fungus.2017.08.02.04>

Liu, F., Chen, S., Ferreira, M. A., Chang, R., Sayari, M., Kanzi, A. M., Wingfield, B. D., Wingfield, M. J., Pizarro, D., Crespo, A., Divakar, P. K., Beer, Z. W., & Duong, T. A. (2019). Draft genome sequences of five *Calonectria* species from *Eucalyptus* plantations in China, *Celoporthe dispersa*, *Sporothrix phasma* and *Alectoria sarmentosa*. *IMA Fungus*, 10(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s43008-019-0023-5>

Lombard, L, Crous, PW, Wingfield, BD, Wingfield, MJ (2010a). Species concepts in *Calonectria* (*Cylindrocladium*). *Studies in Mycology*, 66, 1–13. <https://doi.org/10.3114/sim.2010.66.01>

Lombard, L, Crous, PW, Wingfield, BD, Wingfield, MJ (2010b). Multigene phylogeny and mating tests reveal three cryptic species related to *Calonectria pauciramosa*. *Studies in Mycology*, 66, 15– 30. <https://doi.org/10.3114/sim.2010.66.02>

Lombard, L., Wingfield, M. J., Alfenas, A. C., & Crous, P. W. (2016). The forgotten *Calonectria* collection: Pouring old wine into new bags. *Studies in Mycology*, 85(1), 159-198.

<https://doi.org/10.1016/j.simyco.2016.11.004>

Marin-Felix, Y, Groenewald, JZ, Cai, L, Chen, Q, Marincowitz, S, Barnes, I, Bensch, K, Braun, U, Camporesi, E, Damm, U, Beer, ZW, Dissanayake, A, Edwards, J, Giraldo, A, Hernández-Restrepo, M, Hyde, KD, Jayawardena, RS, Lombard, L, Luangsa-Ard, J, Crous, PW (2017).

Genera of phytopathogenic fungi. *Studies in Mycology*, 86, 99– 216.

<https://doi.org/10.1016/j.simyco.2017.04.002>

Pham, NQ, Barnes, I, Chen, S, Liu, F, Dang, QN, Pham, TQ, Wingfield, MJ (2019). Ten new species of *Calonectria* from Indonesia and Vietnam. *Mycologia*, 111(1), 78-102.

<https://doi.org/10.1080/00275514.2018.1522179>

Pham, N., Marincowitz, S., Chen, S. , Yaparudin, Y. , & Wingfield, MJ (2022). Espécies de *Calonectria*, incluindo quatro novos táxons, associados com *Eucalyptus* na Malásia.

Progresso Micológico, 21, 181 – 197. <https://doi.org/10.1007/s11557-021-01768-8>

Sanchez-Gonzalez, EI, Soares, TDPF, Zarpelon, TG, Zauza, EAV, Mafia, RG, Ferreira, MA (2022) Two new species of *Calonectria* (Hypocreales, Nectriaceae) causing *Eucalyptus* leaf blight in Brazil. *MycoKeys* 91: 169–197. <https://doi.org/10.3897/mycokeys.91.84896>

Simão, F. A., Waterhouse, R. M., Ioannidis, P., Kriventseva, E. V., & Zdobnov, E. M. (2015). BUSCO: assessing genome assembly and annotation completeness with single-copy orthologs. *Bioinformatics*, 31(19), 3210-3212. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv351>

Stanke, M., Diekhans, M., Baertsch, R., & Haussler, D. (2008). Usando alinhamentos de cDNA nativos e mapeados sintenticamente para melhorar a descoberta de genes de novo. *Bioinformática*, 24 (5), 637-644. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btn013>

The Galaxy Community (2022) A plataforma Galaxy para análises biomédicas acessíveis, reprodutíveis e colaborativas: atualização de 2022. *Res de Ácidos Nucleicos*: gkac247. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac247>

Xu, J. J., Qin, S. Y., Hao, Y. Y., Ren, J., Tan, P., Ali, H. B., ... Wang, Y. (2012). A new species of *Calonectria* causing leaf disease of water lily in China. *Mycotaxon*, 122, 177–185. <https://doi.org/10.5248/122.177>

Ye, X, Zhong, Z, Liu, H, Lin, L, Guo, M, Guo, W, Wang, Z, Zhang, Q, Feng, L, Lu, G, Zhang, F, Chen, Q (2018). Whole genome and transcriptome analysis reveal adaptive strategies and pathogenesis of *Calonectria pseudoreteauidii* to *Eucalyptus*. *BMC Genomics*, 19(1), 358. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-4739-1>

**CAPÍTULO III: GENETIC RESISTANCE OF *Eucalyptus* CLONES TO LEAF SPOT
AND DEFOLIATION BY *Calonectria* sp.**

GENETIC RESISTANCE OF *Eucalyptus* CLONES TO LEAF SPOT AND DEFOLIATION BY *Calonectria* spp.

Letícia Molinari¹, Edival Angelo Valverde Zauza², Enrique Ignacio Sánchez-González¹, Thaissa de Paula Farias Soares², Reginaldo Gonçalves Mafia², Maria Alves Ferreira¹

¹ Universidade Federal de Lavras, Departamento de Fitopatologia, Lavras, MG, 37200-900, Brazil

² Suzano Papel e Celulose S. A. Centro de Tecnologia, Aracruz, ES, 29197-900, Brazil.

Preparado em concordância com as normas do periódico “Journal Forest Research”

ABSTRACT

The selection of resistant clones is of paramount importance to obtain superior eucalyptus genetic material. It enables production in places where diseases such as those of the *Calonectria* genus occur. The aim of this study was to evaluate the level of resistance of 380 clones to defoliation and leaf spot caused by naturally occurring *Calonectria* spp. in the field, using multivariate statistical selection and evaluation techniques. The data used came from an experiment conducted in the municipality of Paragominas-PA, in which commercial and semi-commercial clones of *Eucalyptus* spp. were used. The disease was quantified using a diagrammatic scale and multivariate analyses were then carried out to determine the groups of genotypes, using principal component analysis and two different hierarchical methods: Unweighted Pair-Group Method Using Arithmetic Means and Tocher Optimization. The species *E. urophylla* x *E. camaldulensis*; *E. urophylla* x (*E. grandis* x *E. urophylla*); *E. grandis* x *E. brassiana*; *E. grandis* x *Eucalyptus* spp. and *E. grandis* x *E. pellita*. showed the best results. The results provide important input for breeding programs, and with this information, new tests can be set up to select clones for different locations where the pathogen occurs.

Keywords: Multivariate Analysis; Selection; PCA; UPGMA; Tocher.

INTRODUCTION

Some species of the genus *Calonectria* are important pathogens that infect the leaves, stems, roots, and fruits of more than 335 species of herbaceous and woody plants (Crous

2002; Lombard et al. 2016; Li et al. 2021). Leaf spot caused by *Calonectria* is one of the most important *Eucalyptus* diseases in tropical regions such as Brazil, causing significant damage to commercial plantations (Pham et al. 2022).

The disease is characterized by rounded or elongated light gray leaf spots; as the disease advances, the lesions turn light brown and take up a large portion of the leaf limb, which causes early defoliation (Freitas et al. 2019). Due to interference with internal physiological processes, defoliation that occurs in the early stages of plant development can reduce the volume of wood (Alfenas et al. 2016).

Currently, there are 37 species of *Calonectria* that occur in Brazil. Of these species, twenty-three were isolated from diseased tissues or soil samples taken from *Eucalyptus* plantations, seven were isolated from different plant species, six were found in moist tropical forest soils, and one was considered a mycoparasite (Crous et al. 2018, 2019; Liu et al. 2020; Sánchez-González et al. 2022).

Brazil is one of the world's largest producers of forest products, with 76% of the total area (around 7.6 million hectares) planted with *Eucalyptus* (Ibá 2023). However, in the last decade, due to expansion into hot and humid regions in the north and northeast of the country, leaf spot caused by *Calonectria* has become one of the crop's main diseases (Sanchez et al. 2022; Alfenas et al. 2015). The pathogen causes intense defoliation of plants in rainy periods, drastically reducing the number of leaves on the aerial part. The disease starts from spores/microsclerotia found in the soil and leaf litter (Graça et al. 2009). The pathogen most severely affects eucalyptus plants from six months to two and three years after planting, when the crown has already formed (Graça et al. 2009). As the use of chemical methods is economically unviable, the disease is controlled in the field by planting resistant genotypes (Alfenas et al. 2009; Zarpelon et al. 2015, 2020).

The combination of phytopathology and genetic improvement can contribute to increasing productivity by selecting resistant genotypes. The aim of this study was to evaluate the level of resistance of 380 *Eucalyptus* clones to defoliation and leaf spot caused by *Calonectria* spp. using multivariate statistical selection and evaluation techniques.

MATERIALS AND METHODS

Plant Material and Experimental Design

The experiment was set up in April 2018 in the municipality of (02°59'45"S, 47°21'10"W), in the state of Pará, Brazil. The climate is tropical hot and humid (Am) according to the

Koppen classification, with an average annual temperature of 24.5 °C and relative humidity of 80% (Figure 1). The evaluations were carried out in the first year of planting, which comprised the period between planting and the “rainy season”. Three hundred and eighty *Eucalyptus* spp. genotypes (clones), both commercial and semi-commercial (Appendix A), were selected for the evaluations. As a susceptible control, the *E. urophylla* genotype was used, the susceptibility of which is well defined; this material was planted on the edges of the experimental area.

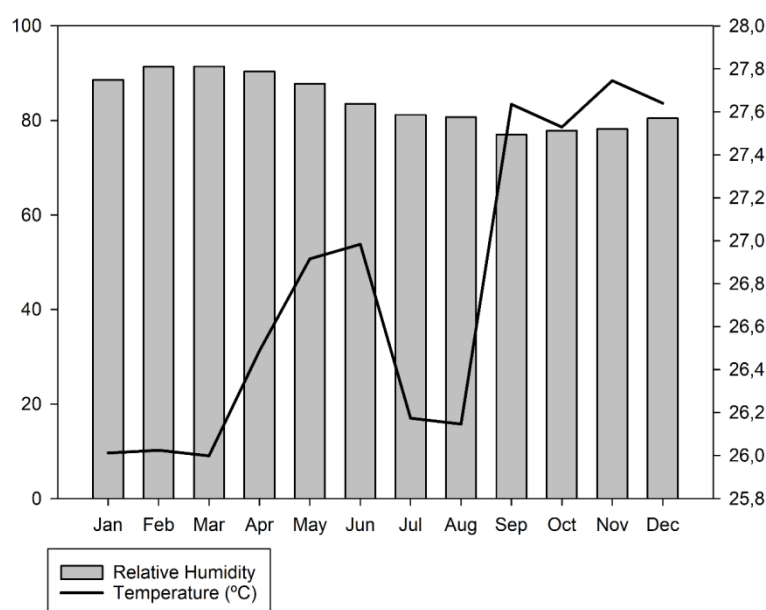


Fig. 1 Monthly data of climatic variables at Fazenda Grupo Barbalho, located in the municipality of Paragominas-PA, for the year 2019.

The experimental design was in six completely randomized blocks, with six replications, six linear plants per plot, a total area of 7.2ha, using a spacing of 3m x 1m. The experiment was set up in a location naturally infested with pathogens of the genus *Calonectria* spp. to facilitate the selection of genotypes resistant to the disease.

Disease for evaluating and selecting genotypes

The assessments used a diagrammatic scale with three variables: (A) location of the leaf lesions; the progression of the spots/necroses along the tree was checked; (B) severity assessment; the severity of the disease was assessed in terms of necrosis on the leaf limb; (C) defoliation assessment; the percentage of defoliation caused by the presence of the pathogen.

For the leaf lesion location variable, the diagrammatic scale proposes score 1 - plant without lesions; score 2 - lesions located only in the basal third; score 3 - lesions that progress

from the basal third to the middle third; score 4 - necrotic leaf lesions throughout the canopy. For severity we have score 1 - no lesions on the leaves; score 2- most leaves with necrotic leaf lesions < 50%; score 3 - most leaves with necrotic leaf lesions > 50%. For the defoliation variable we propose score 1 – plant without defoliation; score 2 – ascending defoliation up to 25% of the crown; score 3 – ascending defoliation up to 50% of the crown; score 4 – ascending defoliation > 50% of crown.

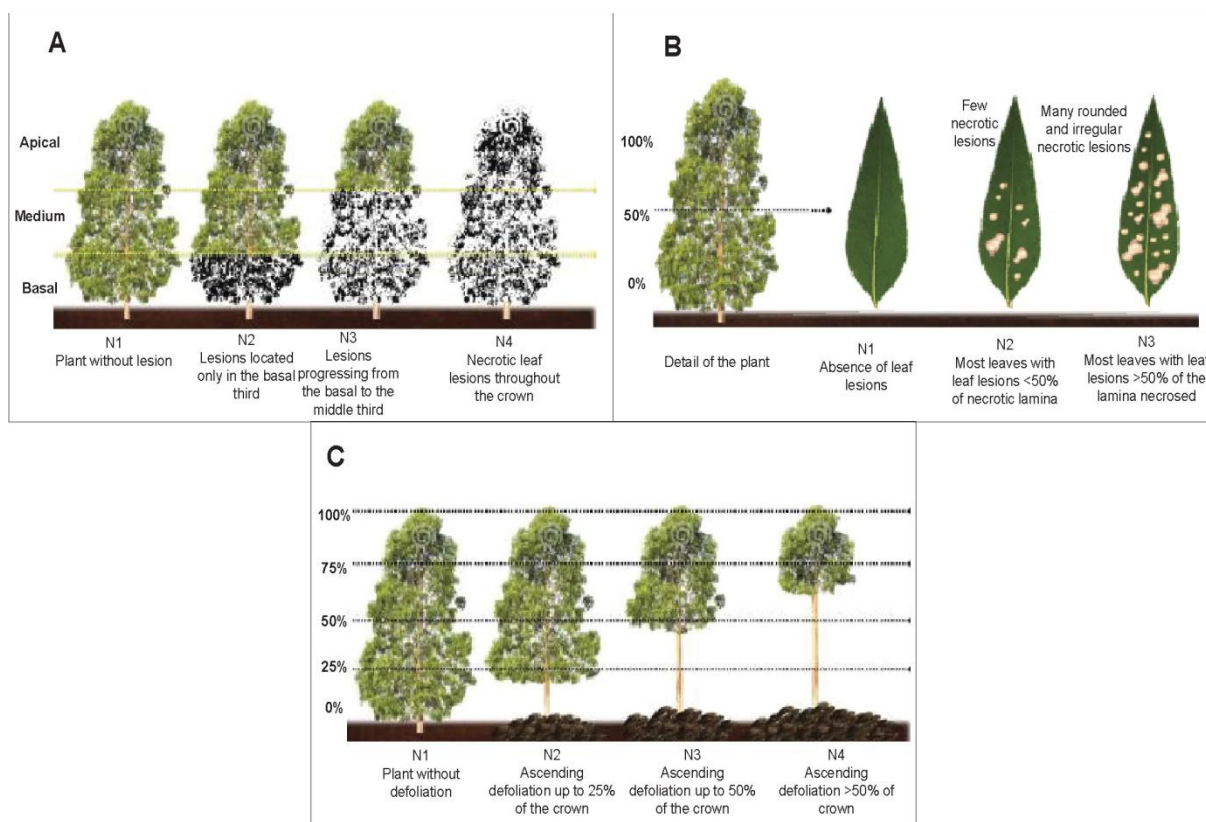


Fig. 2 Diagrammatic scale used to assess the experimental variables. **(A)** Location of leaf lesions. **(B)** Severity assessment. **(C)** Defoliation assessment.

Genetic Resistance

The data was analyzed using multivariate statistical techniques. Principal component analysis was applied considering only clones with scores above zero, since all clones (repetitions) with a score of zero (dead plants) were removed from the analysis to reduce experimental error. In total, the bank contains 277 clones that were used for the calculations of this exploratory multivariate technique. A two-dimensional graph was generated based on the scores obtained from the first two principal components.

Obtaining the principal components involved decomposing the covariance matrix of the random vector of interest. Once the principal components had been determined, their scores (values) were calculated for each element of the sample. The values of each component could then be analyzed using usual statistical techniques, such as analysis of variance (Mingoti 2005). The discriminatory power of each variable in a component was measured by the formula:

$$r_{xj}(cp_h) = (a_{jh}\sqrt{\lambda_h})/S_j$$

In this formula, S_j = standard deviation of variable j , a_{jh} = coefficient of variable j in the h -th principal component and λ_h = h -th characteristic root (eigenvalue) of the covariance matrix (Hair et al. 2005). All the analyses were processed in the R software version 3.0.3 (R Core Team 2018), after standardizing the variables (zero mean and unit variance). Considering the entire evaluation period (approximately 360 days), there was no clear pattern in the distribution of genetic materials, so the period selected for analysis was February/April and February/May, given that this is the most significant period for the disease in the field.

To rank the species (Appendix B), a hierarchical grouping analysis was carried out using the Mahalanobis dissimilarity matrix. The results of the analysis were expressed by the unweighted pair group method using arithmetic averages (UPGMA). To determine the reliability of the data and the coherence of the grouping, the coefficient of co-phenetic correlation was estimated. The Mantel test (1967) was applied, based on 1000 resamplings, to analyze the correlation between the original distance matrix and the graphical matrix to infer the consistency of the grouping and its graphical representation in a dendrogram, using the computational resources of the InfoGen program (Balzarini and Rienzo 2004; Neto et al. 2010). Based on this method, the 380 clones were grouped into 27 species, evaluated between February and May.

Based on the variables collected in the field (380 clones), analysis was carried out using the mutually exclusive Tocher Optimization Method (Rão 1952), with the “Tocher” function in the biotools package (Silva et al. 2017), using the R Studio statistical software (R Core Team 2018). This method adopts the inclusion of clones in the group as a criterion, where η = number of clones that make up the original group; α = addition limit; $D^2(\text{Group})_i$ = average distance within the group, for the formation or inclusion of a new member. If the clone is included in the group; on the other hand, if clone “I” is not included in the group

$$\left(\frac{D^2(\text{Group})_i}{n}\right) \leq \alpha \left(\frac{D^2(\text{Group})_i}{n}\right) > \alpha.$$

Severity of *Calonectria*

The severity of leaf spot caused by the pathogen was assessed using the proportion of leaf area affected by the disease in 27 clones selected at random and pre-marked for being of the species grouped using the UPGMA method. The disease was scored using the following scale: 1 - no leaf lesions; score 2 - most leaves with necrotic leaf lesions < 50%; score 3 - most leaves with necrotic leaf lesions > 50%. The evaluation began in February and continued until May 2019, considering that this was the most representative period for the disease in the field. The area under the disease progress curve (AACPD) was calculated using the formula Shanner and Finley (1977) and the rate of progress of the disease over the period.

$$AACPD = \sum_{i=1}^{n-1} \frac{(Y_i + Y_{i+1})}{2} * (T_{i-1} - T_i) \quad r = \frac{Disease\ Tf - Disease\ Ti}{Time\ Tf - Time\ Ti}$$

In which:

AACPD= area under the disease progress curve.

Y_i = disease proportion in the i-th observation.

T_i = time in days at the i-th observation.

T_f = end time

n = total number of observations.

The data were submitted to analysis of variance (Anova), using the R software, version 3.0.3 (R Core Team 2018), with the aid of the ExpDes package, version 1.1.2 (Ferreira et al. 2013). Variables that did not present normal distribution in the Shapiro-Wilk test at 5% significance level were transformed by $(\sqrt{x+1})$. The Scott-Knott test was applied to significant variables at a significant level of 5%.

RESULTS

Genetic Resistance

The principal component analysis was carried out between the months of February/May, the most favorable period for the development of the disease, since from March onwards the dry season begins, and conditions become unfavorable for infection. It should also be noted that the disease occurs more frequently during the first year. The

analyses showed that the first two main components allowed to explain 98.1 % of the variance contained in the original variables. The main component 1 (CP1) and the main component 2 (CP2) contributed 90.6% and 7.5%, respectively, of the remaining variance in the February/April period (Table 1). The third main component, although with an eigenvalue of 1.9%, was not considered since it did not add relevant information. In the February/May evaluation, similar results were observed to the previous ones, with a contribution of 85.6% (CP1) and 12.9% (CP2), respectively (Table 1).

Table 1. Eigenvalues, the proportion of variability between the original variables and the first two components (PC).

	February/April		February/May	
Characteristic	PC1	PC2	PC1	PC2
Leaf Lesions	0.98	-0.09	0.98	-0.14
Defoliation/canopy volume	0.95	-0.27	0.94	-0.32
Disease severity	0.93	0.38	0.86	0.51
Eigenvalue	2.72	0.22	2.58	0.39
% total variation	0.91	0.07	0.86	0.13
cumulative %	0.91	0.98	0.86	0.99
Cophenetic correlation	0.998		0.999	

Thus, the variables highlighted in the first two main components CP1 and CP2 are considered important for the selection of genotypes of *Eucalyptus* sp., for the region of Paragominas-PA. It can be observed that the positive correlations are responsible for the discrimination of the genotypes located to the right of CP1 (resistant) and the negative correlation by the discrimination of the genotypes, to the left of CP1 (susceptible and intermediate), and the variables with negative correlation are responsible for the discrimination of the genotypes located in the lower part of CP2 (susceptible) (Figure 3).

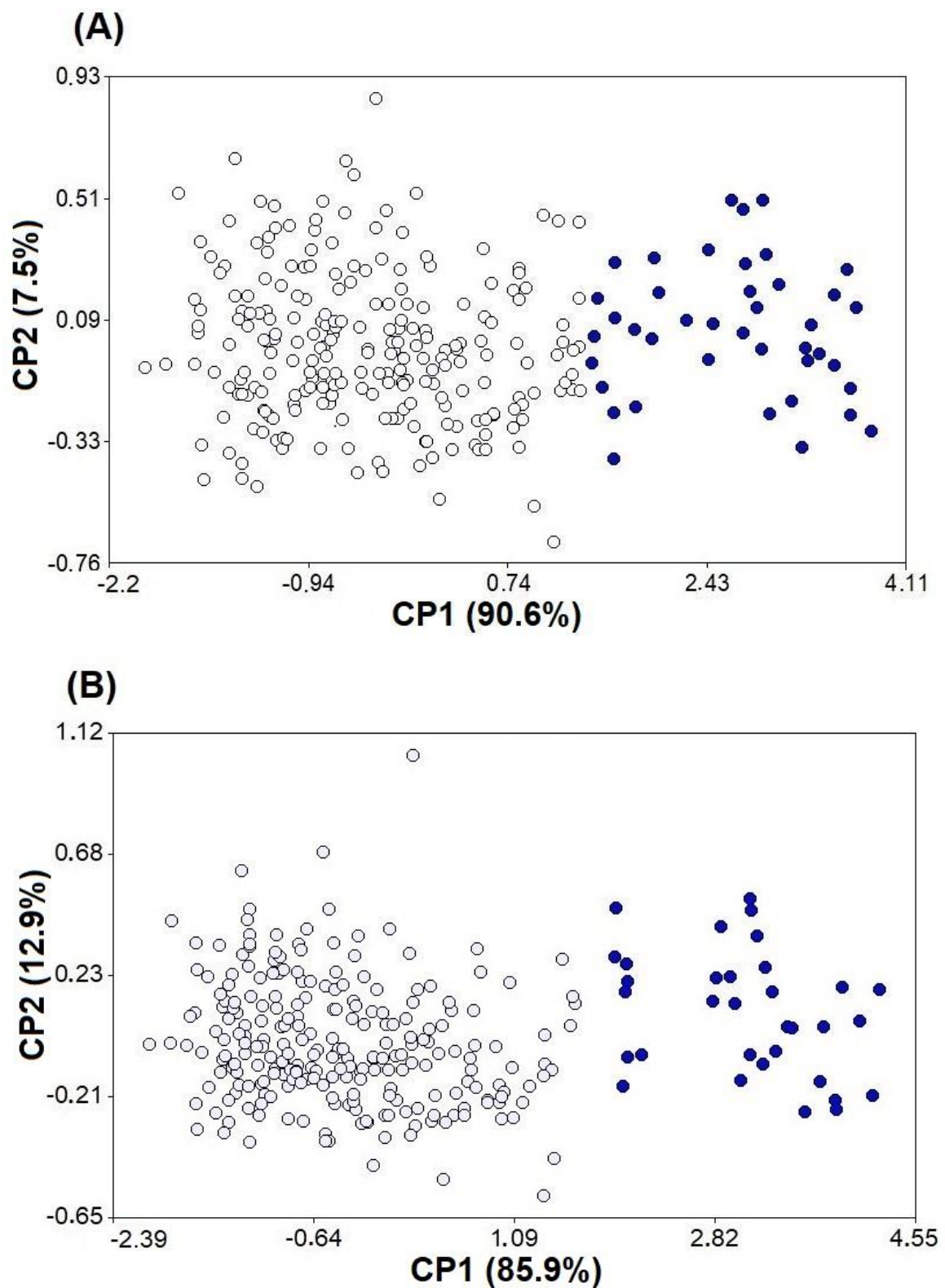


Fig. 3 Biplot showing the first two main components with the discrimination of the 277 genotypes of *Eucalyptus* sp. Biplot for the variables leaf lesions, defoliation/crown volume and disease severity with (A) February/April; (B) February/May. Blue dots equate to resistant clones and gray dots to susceptible.

The analyses by the hierarchical grouping method through dendrogram indicated the formation of three distinct clusters, for the evaluation periods, February/May. Analyzing by species, it is observed that the resistant species (R) are *E. urophylla* x *E. camaldulensis*; *E. urophylla* x (*E. grandis* x *E. urophylla*); *E. grandis* x *E. brassiana*; *E. grandis* x *Eucalyptus* spp. and *E. grandis* x *E. pellita*; were found in both evaluation periods (Figure 5). However, in the dendrogram the species *E. grandis* x *E. tereticornis* and *E. urophylla* x (*E. urophylla* x *E. brassiana*) the most susceptible (S). By forming three clusters, the hierarchical analyses by species resulted in clusters identical to those of the clone dendrogram.

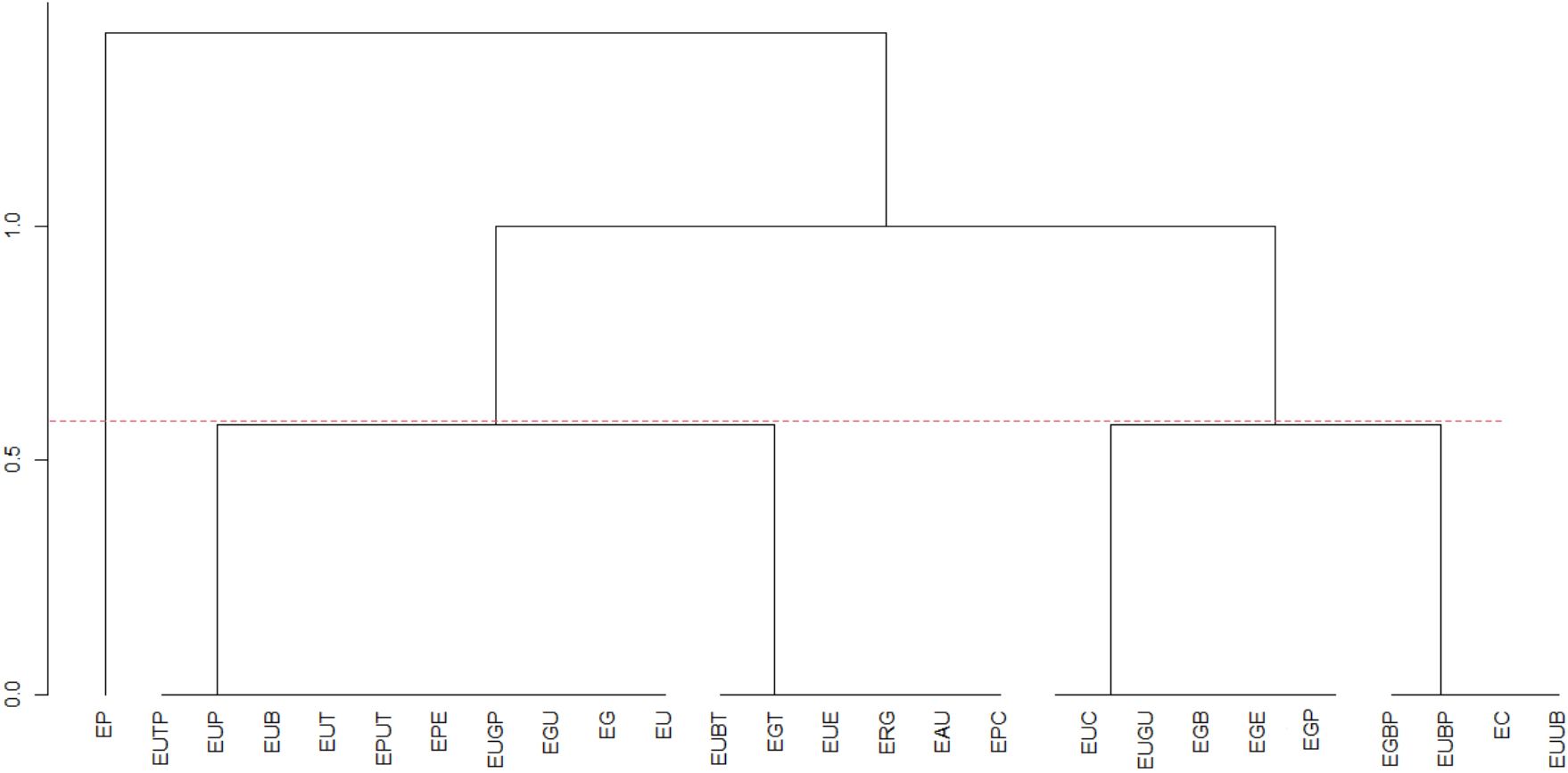
Based on the Tocher method, seven different groups were obtained (Appendices C) among the 380 clones. In general, it was not possible to establish a relationship in the formation of clone groups, except for group 7 which included only clones of *E. urophylla*, and group 6 which was formed only by clones of *E. grandis*. The cophenetic correlation found in the cluster was 0.989, *p-value* (0.001) based on the Mantel test.

Group 1 and 2 included the largest number of clones evaluated, 44.47% and 49.47%, respectively. The intercluster analysis showed that the greatest distance occurred between groups 5 and 6 ($D^2 = 35,377$). Group 5 is composed of clones of *E. urophylla* and *E. grandis*, while group 6 is composed only of clones of *E. grandis*.

Considering the results of the UPGMA and Tocher, some similarities were observed between the groups obtained, but they do not correspond completely. Clones identified by the Tocher method as the group of clones with the greatest similarity (groups 1 and 2), were also grouped by UPGMA, but were included in two groups (Figure 4).

Fig. 4 Dendrogram based on the parameters leaf lesions, defoliation and severity of *Calonectria*. Using the UPGMA method with Mahalanobis dissimilarity distance measurement. **EG** - *E. grandis*; **EAU** - *E. grandis* x *E. urophylla*; **EU** - *E. urophylla*; **IN** - *Indefinido*; **EGP** - *E. grandis* x *E. pellita*; **EPC** - *E. pellita* x *E. camaldulensis*; **EGE** - *E. grandis* x *Eucalyptus* spp; **EGU** - *E. grandis* x *E. urophylla*; **EUGP** - *E. urophylla* x (*E. grandis* x *E. pellita*); **ERG** - *E. robusta* x *E. grandis*; **EUE** - *E. urophylla* x *Eucalyptus* spp; **EC** - *E. camaldulensis*; **EPE** - *E. pellita* x *Eucalyptus* spp; **EPUT** - *E. pellita* x (*E. urophylla* x *E. tereticornis*); **EUT** - *E. urophylla* x *E. tereticornis*; **EUB** - *E. urophylla* x *E. brassiana*; **EGB** - *E. grandis* x *E. brassiana*; **EGT** - *E. grandis* x *E. tereticornis*; **EUP** - *E. urophylla* x *E. pellita*; **EUGU** - *E. urophylla* x (*E. grandis* x *E. urophylla*); **EUC** - *E. urophylla* x *E. camaldulensis*; **EP** - *E. pellita*; **EUUB** - *E. urophylla* x (*E. urophylla* x *E. brassiana*); **EUBT**

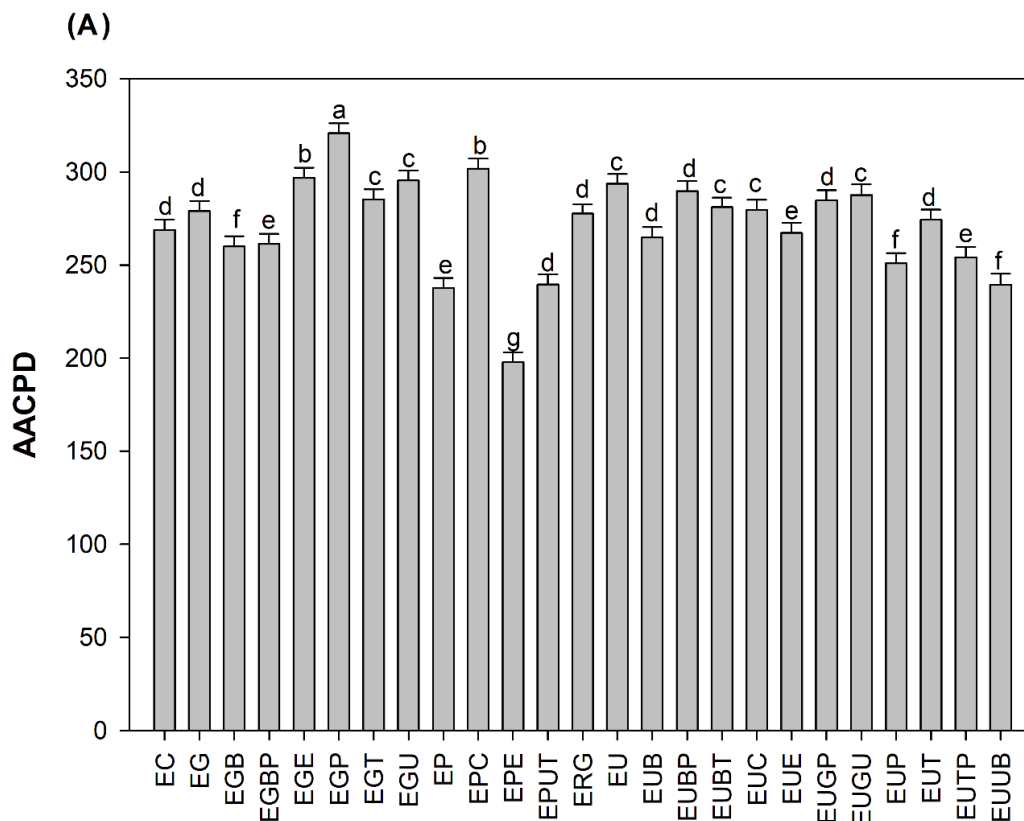
- *E. urophylla* x (*E. urophylla* x *E. brassiana*); **EUBP** - (*E. urophylla* x *E. brassiana*) x *E. pellita* ; **EGBP** - *E. grandis* x (*E. brassiana* x *E. pellita*) ; **EUTP** - (*E. urophylla* x *E. tereticornis*) x *E. pellita*.



Severity of *Calonectria*

Area under the disease progress curve (AACPD) and rate of progress evaluated in *Eucalyptus* spp. species. Figure 5. Area under the disease progress curve (AACPD) and rate of progress evaluated in *Eucalyptus* spp. species groups do not fully match. For the grouping of UPGMA species, the estimate of cophenetic correlation was 0.936, with significance by the Mantel p -value test (0.001). The closest individuals are *E. urophylla* and *E. urophylla* $\times$ *E. pellita*; on the other hand, the most distant individuals are *E. camaldulensis* and *E. urophylla* $\times$ *E. camaldulensis*.

The AACPD calculated for the evaluation period (February/May) has a significant difference between species ($p>0.05$) (Figure 5A). The lowest AACPD (185.00) occurred in the species *E. pellita* $\times$ *Eucalyptus* spp., on the other hand, the highest was observed in *E. grandis* $\times$ *E. pellita* (314,097). Regarding the rate of disease progress, similar results were observed to the previous ones, with a significant difference ($p>0.05$), where the species *E. pellita* presented the highest rate in the period (0.010), in contrast to (*E. urophylla* $\times$ *E. brassiana*) $\times$ *E. pellita* and *E. pellita* $\times$ *E. camaldulensis* presented the lowest averages for the period (-0.004) (Figure 5B).



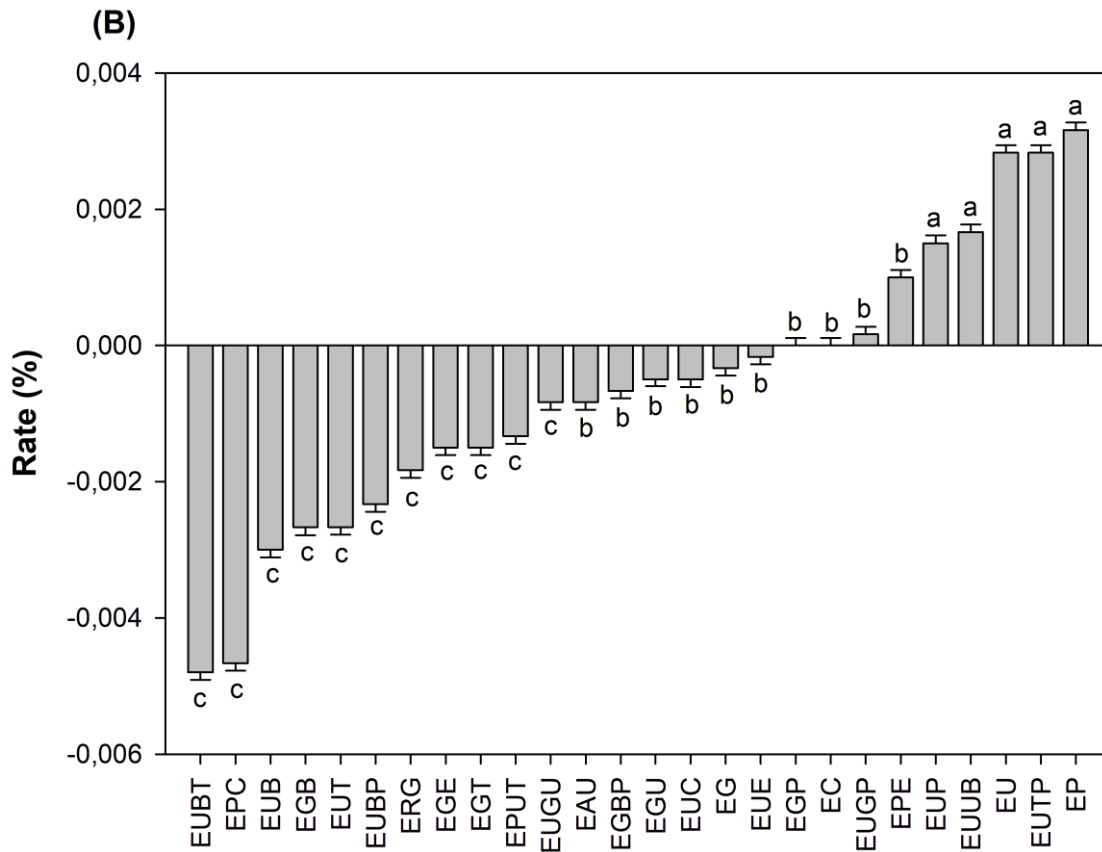


Fig. 5 (A) Area under the disease progress curve (AACPD). (B) Rate of progress evaluated in *Eucalyptus* spp. species. **EG** - *E. grandis* ; **EAU** - *E. grandis* x *E. urophylla* ; **EU** - *E. urophylla* ; **IN** – Indefinido ; **EGP** - *E. grandis* x *E. pellita* ; **EPC** - *E. pellita* X *E. camaldulensis* ; **EGE** - *E. grandis* x *Eucalyptus* spp ; **EGU** - *E. grandis* x *E. urophylla* ; **EUGP** - *E. urophylla* x (*E. grandis* x *E. pellita*) ; **ERG** - *E. robusta* x *E. grandis* ; **EUE** - *E. urophylla* x *Eucalyptus* spp ; **EC** - *E. camaldulensis* ; **EPE** - *E. pellita* x *Eucalyptus* spp ; **EP** - *E. pellita* ; **EUUB** - *E. urophylla* x (*E. urophylla* x *E. brassiana*) ; **EUBT** - *E. urophylla* x (*E. urophylla* x *E. brassiana*) ; **EUBP** - (*E. urophylla* x *E. brassiana*) x *E. pellita* ; **EGBP** - *E. grandis* x (*E. brassiana* x *E. pellita*) ; **EUTP** - (*E. urophylla* x *E. tereticornis*) x *E. pellita*.

DISCUSSION

Although the characteristics of leaf lesions, defoliation and severity are correlated, they should not be excluded in studies of selection of superior materials and diversity studies, since they are important for forest improvement. The use of the Mahalanobis distance can be an alternative, because it standardizes and compensates for the existing correlation between the characteristics, also considering the magnitude of the variance and the residual covariance (Andrade et al. 2020). The results of this study showed that hybridization between species may favor the inclusion of characters of interest in genetic materials. *Eucalyptus* spp. is a large genus, known for its high propensity to hybridization (Griffin et al. 1988; Larcombe et al. 2015), which generates new genetic combinations that can influence adaptation and maximize traits of commercial interest (Robins et al. 2021).

As observed in other studies with *Eucalyptus* (Guimarães et al. 2010; Alfenas et al. 2016), in the present study *E. grandis* and *E. pellita* were the predominant species in the selected clones. The inter- and intraspecific variability for resistance of *Eucalyptus* spp. can facilitate the selection of resistant genotypes, which can be employed in commercial plantations or for genetic improvement (Alfenas et al. 2016). Thus, the introgression of resistant genes of different *Eucalyptus* species can broaden the genetic basis for resistance in breeding populations as well as in commercial plantations (Fonseca et al. 2010).

It is possible to find resistant genotypes within susceptible species, as in the case of *E. urophylla* (Alfenas et al. 2009), which the results of the present study, showed resistance to the pathogen, when crossed with other species, in this case, with *E. tereticornis* and *E. grandis*. Thus, intraspecific resistance can be exploited for the selection of resistant genotypes (Guimarães et al. 2010). In this work, the progress of the disease was evaluated monthly through a scale of grades, however, this method can be influenced by the natural defoliation that occurs in growing eucalyptus plants. However, the use of the grade scale can be a more practical and faster alternative to assess the severity of the disease, if applied before the occurrence of severe defoliation of the plant (Freitas et al. 2019).

According to the results, it was found that between 60-90 days is the ideal period to evaluate the differences between the clones, this is because it reflected the progression of the lesions in the canopy that cause the intense defoliation of the plants. Similar results were observed by Graça et al. (2009) and Miranda et al. (2021) who found a strong relationship between the severity of leaf lesions and defoliation caused by *Calonectria*, which corroborates that defoliation is a secondary symptom of the occurrence of the disease. The increase in

severity may still be related to environmental factors such as temperature, precipitation and humidity that can influence the pathogen. The region of planting of the clones studied is characterized by a hot and humid climate ideal for the development of the disease, which corroborates the observations of Schultz et al. (2015), where high temperatures and heavy rainfall can increase the severity of the disease caused by the pathogen *Calonectria candelabrum* in young *E. benthamii* plantations.

Regarding the clusters by the UPGMA method and Tocher's optimization, these are like each other, and both can be used to identify the distances between species and clones. Both presented cophenetic correlation coefficients above 0.9. This coefficient describes the similarity between the Mahalanobis distance matrix and the cophenetic matrix of each method evaluated, that is, it indicates the Mahalanobis distance in the groups formed (Sokal and Rohlf 1962).

When evaluating a population of individuals, they may exhibit different behaviors in relation to the disease, with levels of resistance that can be explored within the breeding. The results of this work offer useful information about *Eucalyptus* hybrids with different resistance levels. Thus, further tests with the selected clones are suggested to evaluate the severity in different field conditions.

CONCLUSION

The Tocher optimization method based on Mahalanobis distance was consistent in separating the clones, corroborating the results obtained by principal component analysis. On the other hand, the UPGMA method made it possible to distinguish the species into three groups of individuals. The species considered resistant in this study were *E. urophylla* x *E. camaldulensis*; *E. urophylla* x (*E. grandis* x *E. urophylla*); *E. grandis* x *E. brassiana*; *E. grandis* x *Eucalyptus* spp. and *E. grandis* x *E. pellita*. It is therefore recommended that further studies be carried out in areas and soil and climatic conditions other than the region studied here, to determine whether the clones considered resistant in this study are those recommended for other regions where the disease occurs.

ACKNOWLEDGMENTS

The present study was conducted with the support of the Brazilian Federal Agency for the Support and Evaluation of Graduate Education (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES) and National Council for Scientific and Technological

Development (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq); and Suzano S.A.

REFERENCES

- Alfenas AC, Zauza EAV, Mafia RG, Assis TF (2009) Clonagem e doenças do eucalipto. Editora UFV, Viçosa, MG, Brazil.
- Alfenas R, Lombard L, Pereira O, Alfenas A, Crous P (2015) Diversity and potential impact of *Calonectria* species in *Eucalyptus* plantations in Brazil. *Studies in Mycology* 80: 89 – 130. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2014.11.002>
- Alfenas R, Freitas R, Pereira O, Coutinho M, Zarpelon T, Cândido T, Alfenas A (2016) Screening of *Corymbia* and *Eucalyptus* species for resistance to *Calonectria pteridis* leaf blight. *Forest Pathology* 46: 76 –81. <https://doi.org/10.1111/efp.12222>
- Andrade M, Fernandes A, Siqueira L, Tambarussi E (2020) The use of genetic distance and grouping methods to predict *Eucalyptus pellita* F. Muell genitors for hybridization. *Cerne* 26: 414 –426. <https://doi.org/10.1590/01047760202026032744>
- Balzarini M, Rienzo JD (2004) Info-Gen: Software para análisis estadístico de datos genéticos. Universidad Nacional de Córdoba. Córdoba, Argentina.
- Cantelli D, Hamawaki O, Rocha M, Nogueira A, Hamawaki R, Sousa L, Hamawaki C (2016) Analysis of the genetic divergence of soybean lines through hierarchical and Tocher optimization methods. *Genetics and Molecular Research* 15: 1–15. <https://doi.org/10.4238/gmr.15048836>
- Carvalho F, Maciel G, Marques O, Da Silva I, Braga G, Marquez G, Neto L (2019) Analysis of genetic divergence in sweet corn genotypes through hierarchical optimization methods. *Genetics and Molecular Research* 18: 1–10. <https://doi.org/10.4238/gmr18384>
- Chen Q, Wenshuo G, Lizhen F, Xiao ZY, Wanfeng X, Xiuping H, Jinyan L (2015) Transcriptome and Proteome Analysis of *Eucalyptus* Infected with *Calonectria*

- Pseudoreteaudi*. Journal of Proteomics 115: 117–31.
<https://doi.org/10.1016/j.jprot.2014.12.008>
- Crous PW (2002) Taxonomy and pathology of *Cylindrocladium* (*Calonectria*) and allied genera. American Phytopathological Society (APS Press).
- Crous P, Groenewald J, Risède J, Simoneau P, Hyde K (2006) *Calonectria* species and their *Cylindrocladium* anamorphs: Species with clavate vesicles. Studies in Mycology 55: 213–226. <https://doi.org/10.3114/sim.55.1.213>
- Danojevic, D, Medic-Pap S (2018) Different multivariate analysis for fruit traits in sweet pepper breeding. Genetika 50: 121–129. <https://doi.org/10.2298/GENSR1801121D>
- Dart N, Hong C, Craig C, Fry J, Hu X (2015) Soil Inoculum Production, Survival, and Infectivity of the Boxwood Blight Pathogen *Calonectria pseudonaviculata*. Plant Disease 99: 1689–1694. <https://doi.org/10.1094/PDIS-12-14-1245-RE>
- Fei N, Qi Y, Meng T, Fu J, Yan X (2018) First Report of Root Rot Caused by *Calonectria ilicicola* on Blueberry in Yunnan Province, China. Plant Disease 102: 1036. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-17-1337-PDN>
- Ferreira EB, Cavalcanti PP, Nogueira DA (2013) ExpDes: Experimental Designs package. R package version 1.1.2. 2013.
- Fernandes E, Schuster I, Scapim C, Vieira E, Coan M (2015) Genetic diversity in elite inbred lines of maize and its association with heterosis. Genetics and Molecular Research 14: 6509–6517. <https://doi.org/10.4238/2015.June.12.3>
- Freitas R, Alfenas R, Guimarães L, Badel J, Alfenas A (2019) Genetic diversity and aggressiveness of *Calonectria pteridis* in *Eucalyptus* spp. Plant Pathology 68: 869–877. <https://doi.org/10.1111/ppa.13008>
- Graça R, Alfenas A, Maffia L, Titon M, Alfenas R, Lau D, Rocabado J (2009) Factors influencing infection of eucalypts by *Cylindrocladium pteridis*. Plant Pathology 58: 971–

981. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2009.02094.x>

Golfari L, Caser RL, Moura VP (1978) Zoneamento ecológico esquemático para reflorestamento no Brasil (2a. aproximação). Belo Horizonte: PRODEPEF.

Griffin AR, Burgess IP, Wolf L (1988) Patterns of Natural and Manipulated Hybridisation in the Genus *Eucalyptus* Review. Australian Journal of Botany 36: 41–66.

Iba, Indústria Brasileira de Árvores (2022) Annual Report. <https://www.iba.org/datafiles/publicacoes/relatorios/relatorio-anual-iba2022-compactado.pdf>

Jackson DA, Somers KM, Harvey HH (1989) Similarity coefficients: measures of co-occurrence and association or simply measures of occurrence? The American Naturalist 133: 436–453.

Larcombe M, Holland B, Steane D, Jones R, Nicolle D, Vaillancourt R, Potts B (2015) Patterns of Reproductive Isolation in *Eucalyptus*-A Phylogenetic Perspective. Molecular Biology and Evolution 32: 1833–1846. <https://doi.org/10.1093/molbev/msv063>

Liu Q, Li J, Wingfield M, Duong T, Wingfield B, Crous P, Chen S (2020) Reconsideration of species boundaries and proposed DNA barcodes for *Calonectria*. Studies in Mycology 97: 100095. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2020.02.001>

Mingoti S, Glória F (2005) Comparando os métodos paramétrico e não-paramétrico na determinação do valor crítico do teste estatístico de médias proposto por Hayter e Tsui. Associação Brasileira de Engenharia de Produção 15: 251–262. <https://doi.org/10.1590/S0103-65132005000200009>

Miranda I, Auer C, Dos Santos I, Ferreira M, Tambarussi E, Da Silva R, Rezende E (2021) Occurrence of *Calonectria* leaf blight in *Eucalyptus benthamii* progenies and potential for disease resistance. Tropical Plant Pathology 46: 254–264. <https://doi.org/10.1007/s40858-021-00426-4>

Neto FV, Leal NR, Gonçalves LS, Morais Rêgo Filho L, Amaral Júnior T (2010) Quantitative

descriptors to estimative genetic divergence in castor bean genotypes based on multivariate analysis. *Revista Ciência Agronômica* 41: 294–299. <https://doi.org/10.1590/S1806-66902010000200018>

Pham N, Marincowitz S, Chen S, Yaparudin Y, Wingfield M (2022) *Calonectria* species, including four novel taxa, associated with *Eucalyptus* in Malaysia. *Mycological Progress* 21: 181–197. <https://doi.org/10.1007/s11557-021-01768-8>

Rao CR (1952) Advanced statistical methods in biometric research.

Robins T, Binks R, Byrne M, Hopper S (2021) Landscape and taxon age are associated with differing patterns of hybridization in two *Eucalyptus* (Myrtaceae) subgenera. *Annals of Botany* 127: 49–62. <https://doi.org/10.1093/aob/mcaa164>

R Core Team. 2018. R: A language and environment for statistical computing R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.

Rohlf FJ, Chang WS, Sokal RR, Kim J (1990) Accuracy of estimated phylogenies: effects of tree topology and evolutionary model. *Evolution* 44: 1671–1684.

Sanchez-Gonzalez, EI, Soares, TDPF, Zarpelon, TG, Zauza, EAV, Mafia, RG, Ferreira, MA (2022) Two new species of *Calonectria* (Hypocreales, Nectriaceae) causing *Eucalyptus* leaf blight in Brazil. *MycKeys* 91: 169–197. <https://doi.org/10.3897/mycokeys.91.84896>

Schultz B, Sbravatti JAJ, Auer CG, Santos AF (2015) Impacto da mancha foliar causada por *Cylindrocladium candelabrum* em plantios jovens de *Eucalyptus benthamii* em Rio Negrinho-SC. *Ciência Florestal* 25: 307–316. <https://doi.org/10.5902/1980509818448>

Shaner G, Finley RF (1977) The effects of nitrogen fertilization on the expression of slow mildewing in know wheat. *Phytopathology* 70: 1183-86, 1977.

Silva AR, Silva MA (2023) Package ‘biotools’. Available online at: <https://CRAN.R-project.org/package=~biotools>.

- Silva Guimaraes L, Titon M, Lau D, Rosse L, Soares Oliveira L, Goncalves Rosado C, Alfenas A (2010) *Eucalyptus pellita* as a source of resistance to rust, *Ceratocystis* wilt and leaf blight. *Crop Breeding and Applied Biotechnology* 10: 124–131. <https://doi.org/10.12702/1984-7033.v10n02a04>
- Sokal RR, Rohlf FJ (1962) The comparison of dendrograms by objective methods. *Taxon* 1: 33–40.
- Trueman S, Hung C, Wendling I (2018) Tissue Culture of *Corymbia* and *Eucalyptus*. *Forests* 9: 1– 84. <https://doi.org/10.3390/f9020084>
- Zanatto B, Paula R, Paula N, Freitas M, Araújo M (2021) Divergência genética entre progênes de polinização aberta de *Eucalyptus tereticornis* Smith para caracteres de crescimento e de qualidade da madeira. *Scientia Forestalis* 48: e3327. <https://doi.org/10.18671/scifor.v48n128.15>
- Zarpelon T, Silva A, Santos A, Freitas C, Coutinho M, Barros N, Santini A (2019) Phosphorus, nitrogen and potassium nutrition on *Calonectria* leaf blight in eucalypt plants. *Forest Pathology* 49: e12561. <https://doi.org/10.1111/efp.12561>
- Zarpelon TG, Silva Guimarães LM, Faria DA, Coutinho MM, Cápua Neto B., Teixeira RU, Alfenas AC (2015) Genetic mapping and validation of QTLs associated with resistance to *Calonectria* leaf blight caused by *Calonectria pteridis* in *Eucalyptus*. *Tree genetics & genomes* 11: 1–9. <https://doi.org/10.1007/s11295-014-0803-4>

APÊNDICE A – Abreviação dos clones utilizados nas análises.

Abbreviation	Clone	Species
EG	A1	<i>E. grandis</i>
EG	A2	<i>E. grandis</i>
EGU	A3	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>
EGU	A4	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>
EU	A5	<i>E. urophylla</i>
EU	A6	<i>E. urophylla</i>
EU	A7	<i>E. urophylla</i>
EGU	A8	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>
EGU	A9	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>
EGU	A10	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>
EGU	A11	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>
EGU	A12	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>
EG	A13	<i>E. grandis</i>
EG	A14	<i>E. grandis</i>
EGU	A15	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>
EGU	A16	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>
EGU	A17	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>
EGU	A18	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>
EGU	A19	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>
EGU	A20	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>
EGU	A21	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>
EGU	A22	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>
EGU	A23	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>
EGU	A24	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>
EU	A25	<i>E. urophylla</i>
EU	A26	<i>E. urophylla</i>
EGU	A27	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>
IN	A28	Indefinido
EU	B1	<i>E. urophylla</i>
EGP	B2	<i>E. grandis</i> x <i>E. pellita</i>
EU	B3	<i>E. urophylla</i>
EU	B4	<i>E. urophylla</i>
EPC	B5	<i>E. pellita</i> X <i>E. camaldulensis</i>
EGP	B6	<i>E. grandis</i> x <i>E. pellita</i>
EGE	B7	<i>E. grandis</i> x <i>Eucalyptus spp</i>
EGE	B8	<i>E. grandis</i> x <i>Eucalyptus spp</i>
EPC	B9	<i>E. pellita</i> X <i>E. camaldulensis</i>
EU	B10	<i>E. urophylla</i>
EGE	B11	<i>E. grandis</i> x <i>Eucalyptus spp</i>
EGE	B12	<i>E. grandis</i> x <i>Eucalyptus spp</i>
EGE	B13	<i>E. grandis</i> x <i>Eucalyptus spp</i>
EGE	B14	<i>E. grandis</i> x <i>Eucalyptus spp</i>

EGE	B15	<i>E. grandis</i> x <i>Eucalyptus</i> spp
EGE	B16	<i>E. grandis</i> x <i>Eucalyptus</i> spp
EG	B17	<i>E. grandis</i>
EG	B18	<i>E. grandis</i>
EG	B19	<i>E. grandis</i>
EG	B20	<i>E. grandis</i>
EG	B21	<i>E. grandis</i>
EG	B22	<i>E. grandis</i>
EG	B23	<i>E. grandis</i>
EG	B24	<i>E. grandis</i>
EG	B25	<i>E. grandis</i>
EG	B26	<i>E. grandis</i>
EG	B27	<i>E. grandis</i>
EG	B28	<i>E. grandis</i>
EG	B29	<i>E. grandis</i>
EGE	B30	<i>E. grandis</i> x <i>Eucalyptus</i> spp
EGE	B31	<i>E. grandis</i> x <i>Eucalyptus</i> spp
EG	B32	<i>E. grandis</i>
EGE	B33	<i>E. grandis</i> x <i>Eucalyptus</i> spp
EGE	B34	<i>E. grandis</i> x <i>Eucalyptus</i> spp
EGU	B35	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>
EGU	B36	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>
EGU	B37	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>
EG	B38	<i>E. grandis</i>
EG	B39	<i>E. grandis</i>
EG	B40	<i>E. grandis</i>
EG	B41	<i>E. grandis</i>
EG	B42	<i>E. grandis</i>
EG	B43	<i>E. grandis</i>
EG	B44	<i>E. grandis</i>
EG	B45	<i>E. grandis</i>
EG	B46	<i>E. grandis</i>
EG	B47	<i>E. grandis</i>
EG	B48	<i>E. grandis</i>
EG	B49	<i>E. grandis</i>
EG	B50	<i>E. grandis</i>
EG	B51	<i>E. grandis</i>
EGU	B52	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>
EU	B53	<i>E. urophylla</i>
EU	B54	<i>E. urophylla</i>
EGU	B55	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>
EGU	B56	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>
EGU	B57	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>
EUGP	B58	<i>E. urophylla</i> x (<i>E. grandis</i> x <i>E. pellita</i>)
EUGP	B59	<i>E. urophylla</i> x (<i>E. grandis</i> x <i>E. pellita</i>)

EUGP	B60	<i>E. urophylla</i> x (<i>E. grandis</i> x <i>E. pellita</i>)
EUGP	B61	<i>E. urophylla</i> x (<i>E. grandis</i> x <i>E. pellita</i>)
EUGP	B62	<i>E. urophylla</i> x (<i>E. grandis</i> x <i>E. pellita</i>)
EUGP	B63	<i>E. urophylla</i> x (<i>E. grandis</i> x <i>E. pellita</i>)
EUGP	B64	<i>E. urophylla</i> x (<i>E. grandis</i> x <i>E. pellita</i>)
EUGP	B65	<i>E. urophylla</i> x (<i>E. grandis</i> x <i>E. pellita</i>)
EUGP	B66	<i>E. urophylla</i> x (<i>E. grandis</i> x <i>E. pellita</i>)
EGU	B67	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>
ERG	B68	<i>E. robusta</i> x <i>E. grandis</i>
ERG	B69	<i>E. robusta</i> x <i>E. grandis</i>
ERG	B70	<i>E. robusta</i> x <i>E. grandis</i>
ERG	B71	<i>E. robusta</i> x <i>E. grandis</i>
ERG	B72	<i>E. robusta</i> x <i>E. grandis</i>
EU	B73	<i>E. urophylla</i>
EU	B74	<i>E. urophylla</i>
EGU	B75	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>
EUE	B76	<i>E. urophylla</i> x <i>Eucalyptus</i> spp
EUE	B77	<i>E. urophylla</i> x <i>Eucalyptus</i> spp
EGU	B78	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>
EUE	B79	<i>E. urophylla</i> x <i>Eucalyptus</i> spp
EU	B80	<i>E. urophylla</i>
EGU	B81	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>
EGU	B82	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>
EU	B83	<i>E. urophylla</i>
EG	B84	<i>E. grandis</i>
EGU	B85	<i>E. urophylla</i> x <i>E. grandis</i>
EGU	B86	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>
EGU	B87	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>
EGU	B88	<i>E. urophylla</i> x <i>E. grandis</i>
EGU	B89	<i>E. urophylla</i> x <i>E. grandis</i>
EGU	B90	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>
EGU	B91	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>
EGU	B92	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>
EGU	B93	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>
EGU	B94	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>
EGU	B95	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>
EGE	B96	<i>E. grandis</i> x <i>Eucalyptus</i> spp
EGE	B97	<i>E. grandis</i> x <i>Eucalyptus</i> spp
EGU	B98	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>
EGE	B99	<i>E. grandis</i> x <i>Eucalyptus</i> spp
EGU	B100	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>
EGE	B101	<i>E. grandis</i> x <i>Eucalyptus</i> spp
EGE	B102	<i>E. grandis</i> x <i>Eucalyptus</i> spp
EGE	B103	<i>E. grandis</i> x <i>Eucalyptus</i> spp
EGE	B104	<i>E. grandis</i> x <i>Eucalyptus</i> spp

EGU	B105	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>
EGU	B106	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>
EGU	B107	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>
EU	B108	<i>E. urophylla</i>
EG	B109	<i>E. grandis</i>
EG	B110	<i>E. grandis</i>
EU	B111	<i>E. urophylla</i>
EU	B112	<i>E. urophylla</i>
ERG	B113	<i>E. robusta</i> x <i>E. grandis</i>
EGU	B114	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>
EGU	B115	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>
EGU	B116	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>
EGU	B117	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>
EGU	B118	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>
EGU	B119	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>
EGU	B120	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>
EGU	B121	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>
EGU	B122	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>
EU	B123	<i>E. urophylla</i>
EGU	B124	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>
EGU	B125	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>
EGU	B126	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>
EGE	B127	<i>E. grandis</i> x <i>Eucalyptus</i> spp
EGU	B128	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>
EG	B129	<i>E. grandis</i>
EGU	B130	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>
IN	B131	<i>Indefinido</i>
EC	C1	<i>E. camaldulensis</i>
EG	D1	<i>E. grandis</i>
EU	E1	<i>E. urophylla</i>
EU	F1	<i>E. urophylla</i>
EU	F2	<i>E. urophylla</i>
EGU	F3	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>
EGU	F4	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>
EGU	F5	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>
EU	F6	<i>E. urophylla</i>
EGU	F7	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>
EGU	F8	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>
EU	F9	<i>E. urophylla</i>
EPE	F10	<i>E. pellita</i> x <i>Eucalyptus</i> spp.
EG	G1	<i>E. grandis</i>
EG	G2	<i>E. grandis</i>
EGU	H1	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>
EGU	H2	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>
EGU	H3	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>

EGU	H4	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>
EGU	H5	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>
EGU	H6	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>
EGU	H7	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>
EGU	H8	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>
EGU	H9	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>
EGU	H10	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>
EGU	H11	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>
EGU	H12	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>
EGU	H13	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>
EGU	H14	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>
EGU	H15	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>
EG	H16	<i>E. grandis</i>
EGU	H17	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>
EG	H18	<i>E. grandis</i>
EG	H19	<i>E. grandis</i>
EG	H20	<i>E. grandis</i>
EG	H21	<i>E. grandis</i>
EG	H22	<i>E. grandis</i>
EGU	H23	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>
EG	H24	<i>E. grandis</i>
EGU	H25	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>
EGU	H26	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>
EGU	H27	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>
ERG	I1	<i>E. robusta</i> x <i>E. grandis</i>
ERG	I2	<i>E. robusta</i> x <i>E. grandis</i>
ERG	I3	<i>E. robusta</i> x <i>E. grandis</i>
ERG	I4	<i>E. robusta</i> x <i>E. grandis</i>
EPUT	I5	<i>E. pellita</i> x (<i>E. urophylla</i> x <i>E. tereticornis</i>)
EU	M1	<i>E. urophylla</i>
EU	M2	<i>E. urophylla</i>
EUT	M3	<i>E. urophylla</i> x <i>E. tereticornis</i>
EUT	M4	<i>E. urophylla</i> x <i>E. tereticornis</i>
EUB	M5	<i>E. urophylla</i> x <i>E. brassiana</i>
EGB	M6	<i>E. grandis</i> x <i>E. brassiana</i>
EGT	M7	<i>E. grandis</i> x <i>E. tereticornis</i>
EGB	M8	<i>E. grandis</i> x <i>E. brassiana</i>
EGB	M9	<i>E. grandis</i> x <i>E. brassiana</i>
EG	M10	<i>E. grandis</i>
EG	M11	<i>E. grandis</i>
EG	M12	<i>E. grandis</i>
EG	M13	<i>E. grandis</i>
EG	M14	<i>E. grandis</i>
EG	M15	<i>E. grandis</i>
EG	M16	<i>E. grandis</i>

EUT	M17	<i>E. urophylla</i> x <i>E. tereticornis</i>
EUT	M18	<i>E. urophylla</i> x <i>E. tereticornis</i>
EUT	M19	<i>E. urophylla</i> x <i>E. tereticornis</i>
EUP	M20	<i>E. urophylla</i> x <i>E. pellita</i>
EGU	M21	<i>E. urophylla</i> x <i>E. grandis</i>
EUT	M22	<i>E. urophylla</i> x <i>E. tereticornis</i>
EUT	M23	<i>E. urophylla</i> x <i>E. tereticornis</i>
EUT	M24	<i>E. urophylla</i> x <i>E. tereticornis</i>
EGU	M25	<i>E. urophylla</i> x <i>E. grandis</i>
EUGU	M26	<i>E. urophylla</i> x (<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>)
EUP	M27	<i>E. urophylla</i> x <i>E. pellita</i>
EUP	M28	<i>E. urophylla</i> x <i>E. pellita</i>
EUC	M29	<i>E. urophylla</i> x <i>E. camaldulensis</i>
EGU	M30	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>
EUT	M31	<i>E. urophylla</i> x <i>E. tereticornis</i>
EU	M32	<i>E. urophylla</i>
EGU	M33	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>
EU	M34	<i>E. urophylla</i>
EU	M35	<i>E. urophylla</i>
EU	M36	<i>E. urophylla</i>
EP	P1	<i>E. pellita</i>
EGT	P2	<i>E. grandis</i> x <i>E. tereticornis</i>
EUUB	P3	<i>E. urophylla</i> x (<i>E. urophylla</i> x <i>E. brassiana</i>)
EUBT	P4	<i>E. urophylla</i> x (<i>E. urophylla</i> x <i>E. brassiana</i>)
EUBT	P5	(<i>E. urophylla</i> x <i>E. brassiana</i>) x <i>E. tereticornis</i>
EUBT	P6	(<i>E. urophylla</i> x <i>E. brassiana</i>) x <i>E. tereticornis</i>
EUBT	P7	(<i>E. urophylla</i> x <i>E. brassiana</i>) x <i>E. tereticornis</i>
EUBT	P8	(<i>E. urophylla</i> x <i>E. brassiana</i>) x <i>E. tereticornis</i>
EUBT	P9	(<i>E. urophylla</i> x <i>E. brassiana</i>) x <i>E. tereticornis</i>
EUBT	P10	(<i>E. urophylla</i> x <i>E. brassiana</i>) x <i>E. tereticornis</i>
EUBT	P11	(<i>E. urophylla</i> x <i>E. brassiana</i>) x <i>E. tereticornis</i>
EUBP	P12	(<i>E. urophylla</i> x <i>E. brassiana</i>) x <i>E. pellita</i>
EUBP	P13	(<i>E. urophylla</i> x <i>E. tereticornis</i>) x <i>E. pellita</i>
EUBP	P14	(<i>E. urophylla</i> x <i>E. tereticornis</i>) x <i>E. pellita</i>
EUBP	P15	(<i>E. urophylla</i> x <i>E. tereticornis</i>) x <i>E. pellita</i>
EUBP	P16	(<i>E. urophylla</i> x <i>E. tereticornis</i>) x <i>E. pellita</i>
ETG	P17	<i>E. tereticornis</i> x <i>E. grandis</i>
EGBP	P18	<i>E. grandis</i> x (<i>E. brassiana</i> x <i>E. pellita</i>)
EUP	P19	<i>E. urophylla</i> x <i>E. pellita</i>
EUP	P20	<i>E. urophylla</i> x <i>E. pellita</i>
EUB	P21	<i>E. urophylla</i> x <i>E. brassiana</i>
EUB	P22	<i>E. urophylla</i> x <i>E. brassiana</i>
EUB	P23	<i>E. urophylla</i> x <i>E. brassiana</i>
EPUT	P24	<i>E. pellita</i> x (<i>E. urophylla</i> x <i>E. tereticornis</i>)
EPUT	P25	<i>E. pellita</i> x (<i>E. urophylla</i> x <i>E. tereticornis</i>)

EPUT	P26	<i>E. pellita</i> x (<i>E. urophylla</i> x <i>E. tereticornis</i>)
EPUT	P27	<i>E. pellita</i> x (<i>E. urophylla</i> x <i>E. tereticornis</i>)
EPUT	P28	<i>E. pellita</i> x (<i>E. urophylla</i> x <i>E. tereticornis</i>)
EUP	P29	<i>E. urophylla</i> x <i>E. pellita</i>
EUP	P30	<i>E. urophylla</i> x <i>E. pellita</i>
EUTP	P31	(<i>E. urophylla</i> x <i>E. tereticornis</i>) x <i>E. pellita</i>
ERG	P32	<i>E. robusta</i> x <i>E. grandis</i>
EUB	P33	<i>E. urophylla</i> x <i>E. brassiana</i>
EUB	P34	<i>E. urophylla</i> x <i>E. brassiana</i>
ERG	P35	<i>E. robusta</i> x <i>E. grandis</i>
EUB	P36	<i>E. urophylla</i> x <i>E. brassiana</i>
EUB	P37	<i>E. urophylla</i> x <i>E. brassiana</i>
IN	Q1	<i>Eucalyptus</i> spp.
IN	Q2	<i>Eucalyptus</i> spp.
IN	Q3	<i>Eucalyptus</i> spp.
IN	Q4	<i>Eucalyptus</i> spp.
IN	Q5	<i>Eucalyptus</i> spp.
IN	Q6	<i>Eucalyptus</i> spp.
IN	Q7	<i>Eucalyptus</i> spp.
IN	Q8	<i>Eucalyptus</i> spp.
IN	Q9	<i>Eucalyptus</i> spp.
IN	Q10	<i>Eucalyptus</i> spp.
IN	S1	<i>Eucalyptus</i> spp.
EG	S2	<i>E. grandis</i>
EG	S3	<i>E. grandis</i>
EGU	S4	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>
EGU	S5	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>
EG	S6	<i>E. grandis</i>
EGU	S7	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>
EGU	S8	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>
EGU	S9	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>
EGU	S10	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>
EGU	S11	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>
EGU	S12	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>
EG	S13	<i>E. grandis</i>
EG	S14	<i>E. grandis</i>
EG	S15	<i>E. grandis</i>
EGU	S16	<i>E. urophylla</i> x <i>E. grandis</i>
EGU	S17	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>
EGU	S18	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>
EGU	S19	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>
EGU	S20	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>
EGU	S21	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>
EGU	S22	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>
EGU	S23	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>

EGU	S24	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>
EG	S25	<i>E. grandis</i>
EG	S26	<i>E. grandis</i>
IN	S27	<i>Eucalyptus</i> spp.
EG	S28	<i>E. grandis</i>
EGU	S29	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>
EG	S30	<i>E. grandis</i>
EG	S31	<i>E. grandis</i>
EG	S32	<i>E. grandis</i>
EGU	S33	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>
EG	S34	<i>E. grandis</i>
EG	S35	<i>E. grandis</i>
EG	S36	<i>E. grandis</i>
EG	S37	<i>E. grandis</i>
EG	S38	<i>E. grandis</i>
EG	S39	<i>E. grandis</i>
IN	S40	<i>Eucalyptus</i> spp.
IN	S41	<i>Eucalyptus</i> spp.
IN	S42	<i>Eucalyptus</i> spp.
IN	S43	<i>Eucalyptus</i> spp.
EGU	S44	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>
EGU	S45	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>
EGU	S46	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>
EGU	S47	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>
EG	S48	<i>E. grandis</i>
EGU	S49	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>
EG	S50	<i>E. grandis</i>
EGU	S51	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>
EU	U1	<i>E. urophylla</i>
EU	U2	<i>E. urophylla</i>
EU	U3	<i>E. urophylla</i>
EU	U4	<i>E. urophylla</i>
EU	U5	<i>E. urophylla</i>
EU	U6	<i>E. urophylla</i>
EU	U7	<i>E. urophylla</i>
EU	U8	<i>E. urophylla</i>
EU	U9	<i>E. urophylla</i>
EU	U10	<i>E. urophylla</i>
EU	U11	<i>E. urophylla</i>
EU	U12	<i>E. urophylla</i>
EU	U13	<i>E. urophylla</i>
EU	U14	<i>E. urophylla</i>
EU	U15	<i>E. urophylla</i>
EU	U16	<i>E. urophylla</i>
EU	U17	<i>E. urophylla</i>

EU	U18	<i>E. urophylla</i>
EU	U19	<i>E. urophylla</i>
EU	U20	<i>E. urophylla</i>
EU	U21	<i>E. urophylla</i>
EU	U22	<i>E. urophylla</i>
EU	U23	<i>E. urophylla</i>
EU	U24	<i>E. urophylla</i>
EU	U25	<i>E. urophylla</i>
EU	U26	<i>E. urophylla</i>
EU	U27	<i>E. urophylla</i>
EU	U28	<i>E. urophylla</i>
EU	U29	<i>E. urophylla</i>
EU	U30	<i>E. urophylla</i>
EU	U31	<i>E. urophylla</i>
EU	U32	<i>E. urophylla</i>
EU	U33	<i>E. urophylla</i>
EU	U34	<i>E. urophylla</i>
EU	U35	<i>E. urophylla</i>
EU	U36	<i>E. urophylla</i>
EU	U37	<i>E. urophylla</i>
EU	U38	<i>E. urophylla</i>
EGU	V1	<i>E. grandis</i> × <i>E. urophylla</i>
EU	V2	<i>E. urophylla</i>

APÊNDICE B – Relação das espécies utilizadas para as análises estatísticas Agrupamento de Espécies e Severidade da Doença.

Espécies	Clone (s)
<i>(E. urophylla x E. brassiana) x E. pellita</i>	1
<i>(E. urophylla x E. brassiana) x E. tereticornis</i>	7
<i>(E. urophylla x E. tereticornis) x E. pellita</i>	5
<i>E. camaldulensis</i>	1
<i>E. grandis</i>	73
<i>E. grandis x (E. brassiana x E. pellita)</i>	1
<i>E. grandis x E. brassiana</i>	3
<i>E. grandis x E. pellita</i>	2
<i>E. grandis x E. tereticornis</i>	2
<i>E. grandis x E. urophylla</i>	108
<i>E. grandis x Eucalyptus spp</i>	20
<i>E. pellita</i>	1
<i>E. pellita x (E. urophylla x E. tereticornis)</i>	5
<i>E. pellita X E. camaldulensis</i>	2
<i>E. pellita x Eucalyptus spp</i>	1
<i>E. robusta x E. grandis</i>	8
<i>E. tereticornis x E. grandis</i>	1
<i>E. urophylla</i>	55
<i>E. urophylla x (E. grandis x E. pellita)</i>	9
<i>E. urophylla x (E. grandis x E. urophylla)</i>	1
<i>E. urophylla x (E. urophylla x E. brassiana)</i>	2
<i>E. urophylla x E. brassiana</i>	8
<i>E. urophylla x E. camaldulensis</i>	1
<i>E. urophylla x E. grandis</i>	6
<i>E. urophylla x E. pellita</i>	7
<i>E. urophylla x E. tereticornis</i>	9
<i>E. urophylla x Eucalyptus spp</i>	3
Indefinido	38
Total Clones	380

APÊNDICE C – Agrupamento de clones de *Eucalyptus* spp. utilizando o método de otimização de Tocher baseado na distância generalizada de Mahalanobis, para as variáveis lesões foliares, desfolha e severidade da doença.

Group	Clones	Number of clones
Cluster 1	A1 A21 A27 B9 B10 B25 B39 B47 B57 B59 B66 B73 B91 B95 B98 B107 B112 B117 B121 B129 F1 F3 F10 G2 H2 H5 H9 H10 H11 H13 H19 H22 H24 I2 M1 M2 M16 M20 M24 M33 M35 P2 P4 P21 P22 P25 P26 P27 P31 S2 S3 S24 S28 S38 S42 S51 U9 U16 U17 U19 U21 U22 U23 U27 U28 U34 U38 A8 A11 A23 A24 A25 B6 B7 B12 B13 B17 B18 B20 B23 B29 B38 B43 B44 B45 B46 B49 B50 B51 B52 B54 B55 B60 B62 B64 B71 B76 B78 B80 B81 B84 B86 B87 B88 B92 B94 B97 B101 B102 B104 B106 B108 B109 B113 B114 B122 B130 B131 D1 F2 F6 F8 H1 H6 H7 H12 H14 H17 H18 H20 H23 H25 H26 M4 M5 M19 M21 M22 M25 P5 P7 P10 P20 P34 P35 Q1 Q3 Q7 Q8 Q9 Q10 S1 S13 S35 S37 S39 S49 U3 U4 U8 U15 U18 U20 U24 U29 U33	169
Cluster 2	A2 A3 A4 A5 A6 A7 A9 A10 A12 A13 A14 A15 A16 A17 A19 A22 A26 A28 B2 B4 B5 B8 B11 B14 B16 B19 B21 B24 B27 B28 B30 B31 B33 B35 B36 B37 B40 B41 B42 B48 B53 B56 B58 B61 B67 B68 B70 B72 B74 B75 B79 B82 B83 B85 B89 B90 B93 B96 B99 B100 B103 B105 B110 B111 B116 B118 B125 B126 B127 B128 F4 F5 F7 F9 H3 H4 H8 H15 H27 I3 I4 I5 M6 M7 M8 M10 M11 M12 M15 M23 M26 M29 M31 M34 P6 P8 P11 P12 P17 P19 P32 P33 Q2 Q6 S4 S6 S8 S9 S10 S11 S12 S15 S17 S18 S20 S21 S22 S23 S25 S27 S29 S30 S32 S33 S34 S40 S43 S44 S46 S47 S48 S50 U1 U2 U5 U10 U11 U12 U25 U26 U31 U32 U35 V1 V2 A20 B1 B3 B15 B22 B26 B34 B63 B69 B77 B115 B119 B120 B123 B124 C1 E1 G1 I1 M3 M9 M14 M17 M18 M28 M30 M36 P3 P9 P13 P14 P15	188

	P16 P18 P23 P24 P30 P36 P37 Q4 Q5 S16 S19 S36 U6 U14	
Cluster 3	A18 B65 M27 P1 P28 P29 S5	7
Cluster 4	B32 S41	2
Cluster 5	H16 H21 S7 S14 S31 S45 U37	7
Cluster 6	M13 U7 M32 S26 U30 U36	6
Cluster 7	U13	1