



SIDNEY PEREIRA SOUZA FILHO

***Calonectria variabilis* CAUSANDO MANCHA FOLIAR E DESFOLHA EM
PLANTIOS CLONAIIS DE EUCALIPTO NO AGRESTE DA BAHIA**

LAVRAS – MG

2025

SIDNEY PEREIRA SOUZA FILHO

***Calonectria variabilis* CAUSANDO MANCHA FOLIAR E DESFOLHA EM
PLANTIOS CLONAIIS DE EUCALIPTO NO AGRESTE DA BAHIA**

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

Professora Dra. Maria Alves Ferreira
Orientadora

Dra. Gabrielle Avelar Silva
Coorientadora

**LAVRAS – MG
2025**

SIDNEY PEREIRA SOUZA FILHO

***Calonectria variabilis* CAUSANDO MANCHA FOLIAR E DESFOLHA EM
PLANTIOS CLONAIIS DE EUCALIPTO NO AGRESTE DA BAHIA**

***Calonectria variabilis* CAUSING LEAF SPOT AND DEFOLIATION IN CLONAL
EUCALYPTUS PLANTATIONS IN THE AGRESTE OF BAHIA**

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

APROVADA em 27 de fevereiro de 2025.

Dr. Reginaldo Gonçalves Mafia – UFV

Dr. Carlos Carneiro Dos Santos – UNESP

Professora Dra. Maria Alves Ferreira

Orientadora

Dra. Gabrielle Avelar Silva

Coorientadora

LAVRAS – MG

2025

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

Souza Filho, Sidney Pereira.

Calonectria variabilis Causando Mancha Foliar e Desfolha em Plantios Clonais
de Eucalipto no Agreste da Bahia / Sidney Pereira Souza Filho. - 2025.

38 p. : il.

Orientadora: Maria Alves Ferreira

Coorientadora: Gabrielle Avelar Silva

Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade Federal de Lavras, 2025.

Bibliografia.

1. Patologia Florestal. 2. Silvicultura. 3. Fitopatogenos . 4. Filogenia. I. Ferreira,
Maria Alves. II. Avelar Silva, Gabrielle. III. Universidade Federal de Lavras. IV.
Título.

DEDICO

À minha mãe, Dra. Katia Felipe Arruda Pereira Souza – 2024

Vó Joana Felipe – 2016

Vô Joaquim de Arimateia Pereira – 2018

Vô Carlito Fernandes Arruda – 2021

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Dra. Maria Alves Ferreira, pela orientação, ensinamentos e acompanhamento durante todo o mestrado. Agradeço também à minha coorientadora Gabrielle Avelar Silva, pela paciência, ensinamentos e apoio durante os momentos difíceis. Agradeço também aos integrantes do Laboratório de Patologia Florestal.

Agradecimento as instituições de fomento, não só pelo pagamento da minha bolsa que proporcionou o desenvolvimento do trabalho, mas também a aprovação de projetos no laboratório de Patologia Florestal, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

Aos amigos que fiz durante o mestrado, em especial, Valter Magalhães, Brunno Cassiano, José Cruz, Paulo Frois, Paulo César, Laura Kober e Bruno Paes, Vinícius Amaral e Tereza Arapis, entre outros amigos.

Agradeço aos meus amigos que me apoiaram e incentivaram, Iago Silva Aguiar, Mikaelle Stefany, Lucas Carvalho, Karla Resplandes, Alex Vieira, Jessica Martins, Nelcione Dias, Anna Claudia, Sebastião Martins, Sarah de Paula, Gleyce Katharine, Rafaela Maria, entre outros que se sintam abraçados por mim.

Agradeço grandemente aos meus pais Katia Felipe Arruda Pereira Souza e Sidney Pereira Souza que me auxiliaram no possível e no impossível durante esses anos de faculdade e aos meus irmãos Joao Victor Arruda de Souza, Pedro Henrique Arruda de Souza e Lucas Arruda de Souza.

A todos os meus familiares, avó Maria Ivone de Souza Pereira, à Madrinha Raquel Felipe, Tio Uilton Mota, Padrinho Daniel Pereira, Tia Juliana Nascimento, Tio (Vô) Roldão Arruda e Tia (Vó) Maria Eterna Vieira, Tia Viviane Arruda e Eliane Arruda.

RESUMO

O gênero *Calonectria* compreende um grupo de fungos fitopatogênicos amplamente distribuídos pelo mundo, com grande impacto em culturas agrícolas e florestais. No Brasil, 37 espécies já foram identificadas afetando plantios comerciais, especialmente de *Eucalyptus* spp., nos quais causam mancha foliar e desfolha, que quando severa, compromete o crescimento e a produtividade. Dentre as espécies de *Calonectria*, *C. variabilis* tem sido relatada como um importante patógeno em regiões tropicais e subtropicais. Este estudo teve como objetivo identificar isolados fúngicos obtidos em plantios comerciais de *Eucalyptus* sp. no Agreste da Bahia, Brasil, por meio de análises morfológicas e filogenéticas, além de avaliar a patogenicidade desses isolados. Para isso, folhas com sintomas típicos da doença, foram coletadas para obtenção dos isolados, os quais foram caracterizados com base nas sequências dos genes *cmdA*, *his3*, *tefl* e *tub2*, além da observação de estruturas morfológicas. Por meio dessas análises, foi possível concluir que os isolados pertencem à espécie *C. variabilis*, se agrupando com outros isolados da espécie em um clado suportado por altos valores de bootstrap e probabilidade posterior nas análises filogenéticas. Os testes de patogenicidade comprovaram que o fungo é capaz de induzir sintomas necróticos em folhas de eucalipto, indicando seu potencial fitopatogênico. Os resultados obtidos ampliam o conhecimento sobre a distribuição e diversidade de *Calonectria* spp. no Brasil e fornecem informações essenciais para o monitoramento e controle da doença em plantios comerciais de eucalipto.

Palavras-chave: Filogenia; patogenicidade; manejo de doenças florestais; patologia florestal.

ABSTRACT

The genus *Calonectria* includes a group of phytopathogenic fungi widely distributed in the world, with a high impact on agricultural and forestry crops. In Brazil, 37 species were identified affecting commercial plantations, especially *Eucalyptus* spp., causing leaf spot and defoliation, which when severe affect growth and productivity. Among the *Calonectria* species, *C. variabilis* is reported as an important pathogen in tropical and subtropical regions. The aim of this study was to identify fungal isolates obtained from commercial plantations of *Eucalyptus* sp. in Agreste of Bahia, Brazil, using morphological and phylogenetic analyses, as well as assessing the pathogenicity of these isolates. For this purpose, leaves with typical symptoms of the disease were collected to obtain the isolates, which were characterized based on the sequences of the *cmdA*, *his3*, *tef1* and *tub2* genes, as well as the observation of morphological structures. Based on these analyses, was confirmed that the isolates belong to the species *C. variabilis*, grouping together in a clade with other isolates of the species, supported by high bootstrap values and posterior probability in the phylogenetic analyses. The pathogenicity tests confirmed that the fungus is responsible for inducing necrotic symptoms on eucalyptus leaves, indicating its phytopathogenic potential. The results obtained increase knowledge about the distribution and diversity of *Calonectria* spp. in Brazil and provide essential information for monitoring and control of the disease in commercial eucalyptus plantations.

Keywords: Phylogeny; pathogenicity; forest disease management; forest pathology.

INDICADORES DE IMPACTO

Este trabalho apresenta impactos concretos e em potencial nas áreas social, tecnológica, econômica, ambiental e educacional. A pesquisa realizada contribuiu de forma significativa para o avanço no conhecimento da diversidade e da distribuição do fungo *Calonectria variabilis* em plantios clonais de eucalipto na região do Agreste da Bahia, gerando dados relevantes para a Patologia Florestal.

Do ponto de vista tecnológico, o trabalho utilizou metodologias moleculares para a caracterização dos isolados, além de análises morfológicas. Os dados gerados têm potencial para aplicação direta em programas de melhoramento genético de eucalipto, principalmente na seleção de clones mais resistentes à mancha foliar e à desfolha, o que poderá resultar em maior uniformidade e produtividade florestal.

No aspecto econômico, os plantios comerciais de eucalipto podem ter prejuízos significativos quando acometidos por desfolha severa causada por *Calonectria* spp. A identificação correta do agente etiológico e a comprovação da sua patogenicidade em diferentes clones de eucalipto oferecem subsídios importantes para a tomada de decisão pelas empresas do setor florestal.

Do ponto de vista social e extensionista, o trabalho foi desenvolvido em parceria com a empresa Bracell, no município de Alagoinhas, envolvendo engenheiros florestais e técnicos da empresa durante o processo de coleta das amostras. Essa interação entre universidade e setor produtivo fortaleceu o vínculo institucional e promoveu a troca informações, entre a comunidade científica e os profissionais do campo. Além disso, o trabalho contou com a participação de docentes, estudantes de pós-graduação, da Universidade Federal de Lavras, totalizando pelo menos sete pessoas diretamente envolvidas na execução das atividades de campo, laboratório e análises moleculares.

O território diretamente impactado corresponde à região do Agreste da Bahia, mais especificamente aos plantios comerciais da Bracell em Alagoinhas. As ações do estudo se enquadram em três áreas temáticas da Política Nacional de Extensão Universitária: “Tecnologia e Produção”, “Meio Ambiente” e “Educação”, pois envolvem geração e difusão de conhecimento técnico-científico, conservação dos recursos florestais e formação de recursos humanos.

IMPACT INDICATORS

This work presents concrete and potential impacts in the social, technological, economic, environmental and educational areas. The research carried out contributed significantly to the advancement of the knowledge of the diversity and distribution of the fungus *Calonectria variabilis* in clonal eucalyptus plantations in the Agreste region of Bahia, generating relevant data for Forest Pathology.

From a technological point of view, the work used molecular methodologies to characterize the isolates, in addition to morphological analyses. The data generated have the potential for direct application in eucalyptus genetic improvement programs, especially in the selection of clones that are more resistant to leaf spot and defoliation, which may result in greater forest uniformity and productivity.

In the economic aspect, commercial eucalyptus plantations can have significant losses when affected by severe defoliation caused by *Calonectria* spp. The correct identification of the etiological agent and the proof of its pathogenicity in different eucalyptus clones offer important subsidies for the decision making of companies in the forestry sector.

From the social and extension point of view, the work was developed in partnership with the company Bracell, in the municipality of Alagoinhas, involving forest engineers and technicians from the company during the sample collection process. This interaction between the university and the productive sector strengthened the institutional bond and promoted the exchange of information between the scientific community and professionals in the field. In addition, the work had the participation of professors, graduate students, from the Federal University of Lavras, totaling at least seven people directly involved in the execution of field, laboratory and molecular analysis activities.

The territory directly impacted corresponds to the agreste region of Bahia, more specifically to Bracell's commercial plantations in Alagoinhas. The actions of the study fall into three thematic areas of the National Policy of University Extension: "Technology and Production", "Environment" and "Education", as they involve the generation and dissemination of technical-scientific knowledge, conservation of forest resources and training of human resources.

SUMÁRIO

1. REFERENCIAL TEÓRICO	6
1.1 Gênero <i>Calonectria</i>	6
1.2 Sintomas e ciclo de vida de <i>Calonectria</i> spp.	7
1.3 Manejo Integrado de <i>Calonectria</i> spp. em eucalipto	8
1.4 <i>Calonectria variabilis</i>	9
2. INTRODUÇÃO	11
3. MATERIAL E MÉTODOS	12
3.1 Coleta e obtenção dos isolados	12
3.2 Extração de DNA, amplificação e sequenciamento	13
3.3 Análises Filogenéticas	14
3.4 Análises morfológicas	16
3.5 Testes de patogenicidade	16
4. RESULTADOS	17
4.1 Isolados fúngicos	17
4.2 Análises filogenéticas	17
4.3 Análises morfológicas	24
4.4 Testes de patogenicidade	25
5. DISCUSSÃO	26
REFERÊNCIAS	28

1. REFERENCIAL TEÓRICO

1.1 Gênero *Calonectria*

O gênero *Calonectria*, anteriormente conhecido como *Cylindrocladium*, pertence à classe Ascomycota, ordem Hypocreales e família Nectriaceae. Possui distribuição global, causando diversas doenças em mais de 335 plantas hospedeiras, dentre elas culturas de grande importância econômica agrícola e florestal, especialmente plantios de eucalipto (Crous *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2020; Liu & Chen, 2022; Lombard *et al.*, 2010).

O gênero foi descrito em 1867, com base em amostras coletadas em folhas mortas de *Magnolia grandiflora* na Itália (De Notaris, 1867; Lombard *et al.*, 2010). Possui ampla distribuição geográfica, ocorrendo especialmente em regiões tropicais e subtropicais, onde o clima quente e úmido favorece sua dispersão e desenvolvimento (Alfenas *et al.*, 2015; Bose *et al.*, 2023; Liu *et al.*, 2020; Lombard *et al.*, 2016).

Atualmente, são reconhecidas 131 espécies do gênero (Bose *et al.*, 2023), as quais são agrupadas em dois grupos filogenéticos distintos morfologicamente pelo formato da vesícula (grupo *Prolado* e grupo *Sphaero-Naviculate*) e 11 complexos de espécies. O grupo *Prolado* abriga os complexos *C. brassicae*, *C. candelabrum*, *C. colhounii*, *C. cylindrospora*, *C. gracilipes*, *C. mexicana*, *C. pteridis*, *C. reteaudii* e *C. spathiphylli*, e o grupo *Sphaero-Naviculate*, engloba os complexos *C. kyotensis* e *C. naviculata* (Liu *et al.*, 2020; Lombard *et al.*, 2016).

Até o momento, foram relatadas 37 espécies de *Calonectria* ocorrendo no Brasil (Alfenas *et al.*, 2015; Bose *et al.*, 2023; Liu *et al.*, 2020; Sanchez-Gonzalez *et al.*, 2022), sendo que as espécies *C. cylindrospora*, *C. pteridis* e *C. candelabrum* se destacam como as principais causadoras de doença em eucalipto (Sanchez-Gonzalez *et al.*, 2022; 2023).

O primeiro relato de *Calonectria* spp. em eucalipto no Brasil, ocorreu em 1940, no Horto Florestal da Cantareira, São Paulo. Nos anos subsequentes, novos registros foram feitos em diversas regiões do Brasil, incluindo os estados do Espírito Santo, Bahia, região Amazônica, Santa Catarina, Paraná, São Paulo e Distrito Federal (Alfenas, 1986; Alfenas & Ferreira, 1979; Almeida & Bolkan, 1981; Arruda, 1940).

Na década de 1970, a ocorrência de desfolha severa em clones de *Eucalyptus* spp. foi associada a espécies de *Calonectria*, com registros indicando que até 80% das árvores de plantios nos estados de Minas Gerais e Espírito Santo, apresentavam

sintomas (Alfenas & Ferreira, 1979). Posteriormente, a mancha foliar causada por *Calonectria* spp. foi identificada nos estados da Bahia e do Pará, com destaque para o complexo *Calonectria pteridis*, que resultou em significativa desfolha em plantações comerciais (Alfenas *et al.*, 2015).

Atualmente, no Brasil, a predominância das espécies de *Calonectria* em eucalipto está associada principalmente aos complexos *C. pteridis* e *C. candelabrum* provocando manchas foliares e desfolha. Em função da expansão das plantações florestais, houve um aumento na incidência da doença, especialmente em regiões com condições climáticas favoráveis, como alta umidade e temperaturas elevadas (Alfenas *et al.*, 2015; IBÁ 2024; Sanchez-Gonzalez *et al.*, 2022, 2023).

1.2 Sintomas e ciclo de vida de *Calonectria* spp.

A infecção por *Calonectria* ocorre com maior frequência em regiões quentes e úmidas, como o Nordeste e partes do Sudeste do Brasil, onde as condições ambientais favorecem a proliferação do fungo. A doença apresenta maior incidência durante o período chuvoso, devido à alta umidade e disponibilidade de inóculo no solo e na copa das árvores, o que aumenta significativamente o risco de infecção (Ferreira *et al.*, 1995; Graça *et al.*, 2009).

Os sintomas iniciais da infecção por *Calonectria* em eucalipto geralmente se manifestam como pequenas manchas marrons ou necróticas em folhas jovens. Essas lesões podem se expandir rapidamente, resultando em necrose total da folha e, eventualmente, desfolha severa (Alfenas *et al.*, 2015; Graça *et al.*, 2009). A doença, frequentemente referida como mancha foliar de *Calonectria*, pode também afetar caules e ramos, resultando em cancro e podridão da base (Crous *et al.*, 2019; Lombard *et al.*, 2010).

Fungos do gênero *Calonectria* apresentam alta capacidade de disseminação entre diferentes regiões, principalmente por meio de material vegetal ou solo contaminados. Em condições de alta umidade relativa (>90%) e temperaturas entre 20 e 30 °C, os conídios de *Calonectria* germinam rapidamente, formando estruturas que penetram nos tecidos hospedeiros por meio de aberturas naturais, como estômatos, ou através da penetração direta (Crous *et al.*, 1991). O micélio pode rapidamente iniciar a reprodução assexuada, produzindo muitos conídios em um curto intervalo de tempo, contribuindo para a disseminação e o estabelecimento da infecção (Ni *et al.*, 2011; Wilson *et al.*, 2019). Os conídios têm um papel fundamental na propagação assexuada

do fungo, sendo produzidas em conidióforos, os quais exibem uma estrutura penicilada com ramificações ordenadas e vesículas terminais de formato globoso ou elipsoidal, um atributo distintivo frequentemente usado para a identificação morfológica (Alfenas *et al.*, 2009; Lombard *et al.*, 2010).

Para garantir sua sobrevivência em períodos desfavoráveis, *Calonectria* forma microescleródios, estruturas melanizadas de resistência que podem permanecer viáveis no solo e em restos culturais por longos períodos (Crous *et al.*, 2002; Phipps *et al.*, 1976), funcionando como uma fonte primária de inóculo para infecções subsequentes. Pesquisas indicam que essas estruturas podem permanecer no solo por um período superior a um ano, dependendo das circunstâncias locais (Crous *et al.*, 2002).

A compreensão do ciclo de vida de *Calonectria* é essencial para o desenvolvimento de estratégias de manejo eficazes, como práticas culturais que minimizem a presença de material vegetal infectado no solo e a utilização de materiais genéticos resistentes, além do monitoramento do inóculo no solo (Crous *et al.*, 2021; Liu *et al.*, 2020; Miranda *et al.*, 2021; Lombard *et al.*, 2010).

1.3 Manejo Integrado de *Calonectria* spp. em eucalipto

O controle de *Calonectria* spp. em viveiro e em campo deve ser realizado por meio de estratégias integradas que combinem em especial o uso de material genético resistente, manejo nutricional e medidas culturais adequadas.

Em viveiros, *Calonectria* pode causar *damping-off*, podridão de estacas, miniestacas e raízes, sendo essencial a adoção de práticas que minimizem a presença do patógeno. A esterilização do substrato e tubetes reduz a contaminação, enquanto o controle da umidade e a ventilação adequada dos viveiros ajudam a limitar a propagação do fungo. O tratamento das mudas com fungicidas protetores e indutores de resistência pode ser uma estratégia eficaz no manejo da doença (Alfenas *et al.*, 2009; Soares *et al.*, 2018).

O manejo integrado da mancha foliar e da desfolha de *Calonectria* em plantios de eucalipto, envolve a combinação de diferentes estratégias para reduzir a incidência e severidade da doença, minimizando impactos na produtividade florestal. A seleção e propagação de genótipos resistentes é a abordagem mais eficiente e sustentável, reduzindo significativamente os danos causados pela desfolha, garantindo maior uniformidade e produtividade nas plantações (Alfenas *et al.*, 2009; Bose *et al.*, 2023; Soares *et al.*, 2018).

O uso de genótipos de eucalipto resistentes tem proporcionado ganhos significativos para a indústria florestal, permitindo a propagação de árvores com características fenotípicas desejadas de maneira rápida e precisa, mantendo a uniformidade produtiva e a resistência ao patógeno (Bose *et al.*, 2022; Grattapaglia *et al.*, 2003; Ulisses *et al.*, 2010). Clones comerciais de *Eucalyptus* apresentam diferentes níveis de resistência à infecção, sendo que a avaliação contínua desses clones permite a seleção de genótipos mais tolerantes à doença. Estudos indicam que clones resistentes possuem padrões de expressão gênica diferenciados e mecanismos de defesa mais eficientes contra o patógeno, tornando-se alternativas viáveis para programas de melhoramento genético florestal (Alfenas *et al.*, 2009; Lombard *et al.*, 2010). Contudo, a alta variabilidade genética observada entre as espécies de *Calonectria*, frequentemente, resulta em quebras de resistência, o que representa um desafio para a seleção e desenvolvimento de genótipos de *Eucalyptus* resistentes (Alfenas *et al.*, 2009; 2015; Bose *et al.*, 2022; Freitas *et al.*, 2019; Miranda *et al.*, 2021).

Além disso, no campo, o manejo cultural e nutricional (equilíbrio entre cálcio e potássio) desempenha papel fundamental na prevenção da doença. O cálcio atua como um mensageiro secundário na ativação de respostas de defesa da planta, enquanto o potássio está envolvido no metabolismo vegetal e na síntese de proteínas, ambos contribuindo para a resistência estrutural e bioquímica da planta (Alfenas *et al.*, 2015; Soares *et al.*, 2001). Já o espaçamento adequado entre árvores reduz a umidade no dossel, limitando o desenvolvimento e disseminação do fungo, enquanto a remoção e destruição de restos culturais também contribuem para minimizar a presença do inóculo no solo e reduzir a reinfecção (Alfenas *et al.*, 2015; Soares *et al.*, 2020).

O monitoramento contínuo das plantações, aliado ao diagnóstico precoce por meio de técnicas moleculares, possibilita a identificação precisa da espécie de *Calonectria* envolvida e permite a adoção de medidas preventivas eficazes (Liu & Chen, 2022; Lombard *et al.*, 2010).

1.4 *Calonectria variabilis*

A espécie *C. variabilis*, pertencente ao complexo *C. cylindrospora*, foi descrita taxonomicamente pela primeira vez por Crous *et al.*, (1993) sob a denominação *Cylindrocladium variable*, sendo posteriormente realocada para o gênero *Calonectria* (Lombard *et al.*, 2010).

O epíteto específico “variabilis” faz referência à variação na morfologia da vesícula na fase assexuada, que pode apresentar formatos clavado, esfero-pedunculado ou elipsoidal. Os macroconidióforos da espécie possuem fiálides alongadas, de formato doliforme a reniforme, não septados, produzindo macroconídios cilíndricos, hialinos, (1)3-septados, com pontas obtusas e medindo, em média, $60 \times 5 \mu\text{m}$. Já os microconidióforos apresentam fiálides terminais, simples ou agrupadas (de duas a quatro), cilíndricas, não septadas, originando microconídios cilíndricos, hialinos, 1-septados, com pontas obtusas e dimensões médias de $27 \times 4 \mu\text{m}$. É uma espécie homotática e em seu estágio sexual, forma peritécios vermelho acastanhados e ascósporos hialinos, retos a falcados, (1) 3-septados, com aproximadamente $42 \times 5 \mu\text{m}$ (Crous *et al.*, 1993).

A primeira ocorrência de *C. variabilis* foi registrada em *Didymopanax morototoni* (mandiocão) e *Theobroma grandiflorum* (cupuaçu) no estado do Pará, causando mancha foliar e podridão radicular. No Brasil, após sua descrição, a espécie foi detectada em plantações comerciais de eucalipto e em viveiros florestais no Espírito Santo, além de ter sido constatada na Bahia (Crous, 2002). Desde então, tem se destacado como um patógeno relevante, afetando diversas plantas, incluindo espécies nativas e culturas de importância econômica, como o eucalipto, causando manchas foliares e desfolha. No Panamá, estudos experimentais demonstraram a capacidade de *C. variabilis* de infectar diferentes espécies vegetais. Tellez *et al.*, (2016) observaram que isolados do fungo induziam lesões foliares em cinco espécies de árvores tropicais nativas do Parque Nacional San Lorenzo, incluindo *Brosimum utile*, *Coccoloba* sp., *Protium panamense*, *Manilkara bidentata* e *Perebea angustifolia*. Mais recentemente, Ramírez-Camejo *et al.*, (2024) relataram a ocorrência de *C. variabilis* no Panamá, identificando-o como agente causal da queima de folhas em *Anacardium occidentale* (cajueiro).

A identificação de *C. variabilis* é desafiadora, pois compartilha características morfológicas com outras espécies do gênero *Calonectria*, como o formato das vesículas, tamanho e a septação dos macroconídios. Por essa razão, o uso de ferramentas moleculares, por meio da análise de regiões gênicas como β -tubulina, His3, Tef e CmdA, tem sido essencial para diferenciar *C. variabilis* de outras espécies do gênero (Liu *et al.*, 2020). As análises filogenéticas desempenham um papel fundamental na delimitação taxonômica da espécie e na compreensão de sua diversidade genética, sendo

indispensáveis para o desenvolvimento de estratégias eficazes de manejo e controle, reduzindo impactos em culturas agrícolas e florestais.

2. INTRODUÇÃO

O gênero *Calonectria* compreende um grupo diversificado de fungos fitopatogênicos amplamente distribuídos pelo mundo e capazes de causar doenças em plantas de importância econômica (Bose *et al.*, 2023). Até o momento, cerca de 131 espécies desse gênero foram identificadas com base em análises filogenéticas e morfológicas (Crous *et al.*, 2021, 2019; Mohali & Stewart, 2021; Liu *et al.*, 2020; Pham *et al.*, 2022; Sanchez-Gonzalez *et al.*, 2022; Wang *et al.*, 2019). Essas espécies estão agrupadas em 11 complexos: *C. brassicae*, *C. candelabrum*, *C. colhounii*, *C. cylindrospora*, *C. gracilipes*, *C. mexicana*, *C. pteridis*, *C. reteaudii*, *C. spathiphylli*, *C. kyotensis* e *C. naviculata* (Bose *et al.*, 2023; Lombard *et al.*, 2016). No Brasil, foram registradas 37 espécies de *Calonectria* afetando especialmente *Eucalyptus* spp. (Alfenas *et al.*, 2015; Bose *et al.*, 2023; Sanchez-Gonzalez *et al.*, 2022).

A mancha foliar e desfolha causadas por *Calonectria* spp. em eucalipto comprometem o desenvolvimento de mudas e plantas jovens, podendo afetar o crescimento destas desde os seis primeiros meses até o terceiro ano de idade (Graça *et al.*, 2009). O ciclo de infecção se inicia a partir de conídios e clamidósporos presentes no solo ou em restos culturais, que germinam sob condições de alta umidade, infectando folhas e ramos em posições mais baixas da copa das árvores. As lesões surgem inicialmente na base, ápice ou margens das folhas, levando à intensa desfolha nos terços basal, médio e apical do dossel (Alfenas *et al.*, 2009; 2015; Graça *et al.*, 2009).

A identificação precisa das espécies de *Calonectria*, baseada em análises filogenéticas e morfológicas, é fundamental para o desenvolvimento de estratégias eficazes de manejo. As regiões genômicas *cmdA*, *his3*, *tefl* e *tub2* são amplamente utilizadas para a diferenciação de espécies dentro do gênero (Lombard *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2020; Pham *et al.*, 2019; Soares *et al.*, 2020).

Recentemente, durante um levantamento realizado em plantios comerciais de eucalipto na região Agreste da Bahia, foram identificadas plantas que apresentavam desfolha, das quais foram coletadas folhas com sintomas típicos de *Calonectria*. O presente estudo teve como objetivo identificar os isolados fúngicos obtidos dessas

amostras, por meio de análises filogenéticas e características morfológicas, além de avaliar sua patogenicidade em eucalipto.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta e obtenção dos isolados

As coletas de folhas sintomáticas foram realizadas em março de 2023, em três plantios florestais de eucalipto a figura (Figura 1), situados na cidade de Alagoinhas, na região Agreste do Estado da Bahia. Foram coletadas amostras de 12 árvores por talhão, totalizando 36 amostras, as quais foram armazenadas em sacos de papel e transportadas para o Laboratório de Patologia Florestal da Universidade Federal de Lavras (UFLA), para realização do isolamento. Para isso, pequenos segmentos de 1 cm² da seção de transição entre o tecido sadio e o tecido doente foram cortados de cada folha e desinfestados com hipoclorito de sódio a 1% por 1 min, etanol a 70% por 30s e lavados com água esterilizada três vezes antes do cultivo em BDA (Batata-Dextrose-Ágar) a 25°C. Após sete dias de incubação, discos de micélio de 5 mm de diâmetro foram retirados de colônias fúngicas com aspecto semelhante a *Calonectria* e transferidos para uma nova placa de Petri contendo BDA. As mesmas foram incubadas a 25°C, até que o fungo cobrisse completamente a placa. Os isolados obtidos foram armazenados seguindo o método de Castellani (1939) e depositados na coleção micológica do Laboratório de Patologia Florestal da UFLA.

Figura 1. Plantio de eucalipto com sintomas de mancha foliar e desfolha provocados por *Calonectria*. (a) Desfolha. (b) Sintomas de mancha foliar.



Fonte: Bracell.

3.2 Extração de DNA, amplificação e sequenciamento

Para a obtenção de massa de micélio para extração de DNA, foi seguida a metodologia descrita por Myburg *et al.*, (1999). Discos miceliais de 5 mm de diâmetro foram transferidos para frascos do tipo Erlenmeyer, com meio de cultura líquido contendo extrato de malte (20 g/L), extrato de levedura (2 g/L) e dextrose (5 g/L). As culturas foram incubadas por sete dias a 28°C, permitindo o crescimento do fungo. Posteriormente o micélio foi removido, filtrado, seco em papel de filtro e macerado em nitrogênio líquido. (Sanchez-Gonzalez *et al.*, 2022; Silva *et al.*, 2024;)

A extração de DNA seguiu o protocolo adaptado de Doyle & Doyle (1987). Para a lise celular, utilizou-se 10% CTAB; 100 mM Tris HCl (pH 8,0); 25mM EDTA; 2M NaCl e 2% de PVP. Para a ressuspensão, utilizou-se 50µL de água esterilizada, contendo RNase (10µg/mL). A qualidade e a concentração do DNA fúngico extraído foram avaliadas por eletroforese em gel de agarose, com visualização sob luz ultravioleta utilizando o transiluminador UV Mini BIS Pro (DNR Bio Imaging Systems, Jerusalém, Israel). A quantificação do DNA foi realizada utilizando o espectrofotômetro NanoDrop (Thermo Scientific).

As reações em cadeia da polimerase (PCRs) foram realizadas em um volume final de 25 μL , contendo 10,5 μL de água, 12,5 μL de Taq Master Mix Green 2x, 0,5 μL de cada primer e 1,0 μL de DNA com concentração de 50 ng/ μL . As condições de PCR para as regiões dos genes calmodulina (*cmdA*), histona (*his3*), fator de alongação (*tefl*) e β -tubulina (*tub2*) foram as seguintes: desnaturação inicial a 95 °C por 5 min; 35 ciclos de 94 °C por 30 s; 52 °C por 1 min; 72 °C por 2 min e extensão final a 72 °C por 5 min (Sanchez-Gonzalez *et al.*, 2023). Para amplificação das regiões genômicas foram utilizados, os seguintes pares de primers: CAL-228F e CAL-2Rd para *cmdA* (Carbone & Kohn 1999; Quaedvlieg *et al.*, 2011); CYLH3F e CYLH3R para *his3* (Crous *et al.*, 2004); EF1-728F (CARBONE & KOHN 1999) e EF2 (O'Donnell *et al.*, 1998) para *tefl* e T1 (O'Donnell & Cigelnik 1997) e CYLTUB1R (Crous *et al.*, 2004) para *tub2*.

Os produtos de PCR foram separados por gel de agarose a 1,2% corado com Diamond Nucleic Acid Dye (Promega, Madison, WI, EUA) e após confirmação de amplificação foram enviados para purificação e sequenciamento (Macrogen, Seul, Coreia).

3.3 Análises Filogenéticas

As sequências obtidas foram editadas manualmente quando necessário usando o software SeqAssem (Hepperle, 2004) e depositadas no banco de dados NCBI/GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Posteriormente, foram alinhadas com outras sequências de *Calonectria* spp. intimamente relacionadas obtidas do GenBank (Tabela1) usando a interface online do MAFFT v. 7.0 (Kato *et al.*, 2019) com a estratégia de alinhamento FFT-NS-i.

Para determinar as relações filogenéticas entre as espécies, foram realizadas análises de máxima parcimônia (MP), máxima verossimilhança (ML) e inferência bayesiana (BI) para cada uma das regiões amplificadas e para o alinhamento concatenado das regiões. O teste de homogeneidade de partição (PHT) foi realizado no software PAUP 4.0b10 para determinar se as quatro regiões poderiam ser analisadas de forma conjunta (Farris *et al.*, 1995; Swofford, 2003).

A análise de MP foi realizada utilizando o software PAUP 4.0b10 (Swofford, 2003); sendo também calculados os índices de consistência (CI), índice de homoplasia (HI), índice de retenção (RI) e índice de consistência redimensionado (RC). O suporte estatístico adotado foi de 1.000 réplicas *bootstrap*.

O melhor modelo evolutivo de substituição de nucleotídeos para cada região do gene foi selecionado de acordo com o Critério de Informação de Akaike (AIC) usando MODELTEST v. 3.4 (Posada & Crandall 1998) para análises de ML e MRMODELTEST v. 2 (Nylander, 2004) para análises de BI. As análises de ML foram realizadas usando o PAUP 4.0b10 (Swofford 2003). Os modelos de ML usados foram K2 (*cmdA*), HKY + G (*his3*), K2 + G (*tef1*) e K2 (*tub2*). O suporte estatístico de ramificação foi avaliado com 1.000 réplicas *bootstrap*. As análises de BI individuais e particionadas foram realizadas usando MRBAYES v.3.2.7a (Ronquist *et al.*, 2012).

Tabela 1. Espécies de *Calonectria* e números de acesso do GenBank das sequências de DNA usadas neste estudo.

Espécie	Código do isolado	Origem do isolado	País	Número de acesso do GenBank			
				<i>cmdA</i>	<i>his3</i>	<i>tef</i>	<i>tub2</i>
<i>C. auriculiformis</i>	CMW 47178 ^T	Solo	Vietnã	MT335190	MT335430	MT412721	MT412944
	CMW 47179	Solo	Vietnã	MT335191	MT335431	MT412722	MT412945
<i>C. brasiliensis</i>	CBS 230.51 ^T	<i>Eucalyptus</i> sp.	Brasil	MT335200	MT335440	MT412731	MT412953
	CMW 32949	<i>Eucalyptus</i> sp.	Brasil	MT335201	MT335441	MT412732	MT412954
<i>C. cerciana</i>	CMW 25290	<i>E. urophylla</i> × <i>E. grandis</i>	China	MT335212	MT335452	MT412743	MT412964
<i>C. cylindrospora</i>	CBS 136425	<i>Blephilia ciliata</i>	Estados Unidos	MT335235	MT335475	MT412766	MT412984
	CBS 119670 ^T	<i>Pistacia lentiscus</i>	Itália	MT335236	MT335476	MT412767	MT412985
<i>C. hawksworthii</i>	CBS 111870 ^T	<i>Nelumbo nucifera</i>	Ilhas Maurício	MT335254	MT335494	MT412785	MT413003
	CMW 14878	<i>Eucalyptus</i> sp.	Indonésia	MT335378	MT335618	MT412909	MT413119
<i>C. insularis</i>	CMW 30991 ^T	Solo	Madagascar	MT335269	MT335509	MT412800	MT413017
	CMW 30992	Solo	México	MT335270	MT335510	MT412801	MT413018
<i>C. maranhensis</i>	CBS 134811 ^T	<i>Eucalyptus</i> sp.	Brasil	KM396035	KM396118	KM395861.1	KM395948.1
	CBS 134812	<i>Eucalyptus</i> sp.	Brasil	KM396036	KM396119	KM395862.1	KM395949.1
<i>C. plurilateralis</i>	CBS 111401 ^T	Solo	Equador	MT335340	MT335580	MT412871	MT413083
<i>C. propaginicola</i>	CBS 134815 ^T	<i>Eucalyptus</i> sp.	Brasil	KM396040	KM396123	KM395866.1	KM395953.1
	CBS 134816	<i>Eucalyptus</i> sp.	Brasil	KM396041	KM396124	KM395867.1	KM395954.1
<i>C. tonkinensis</i>	CMW 47430 ^T	Solo	Vietnã	MT335384	MT335624	MT412915	MT413122
<i>C. variabilis</i>	CMW 3187 ^T	<i>Schefflera morototoni</i>	Brasil	MT335392	MT335632	MT412923	MT413130
	CMW 2914	<i>Theobroma grandiflorum</i>	Brasil	MT335393	MT335633	MT412924	MT413131

<i>C. gracilipes</i>	CBS 115674 ^T	Solo	Colômbia	MT335252	MT335492	MT412783	MT413001
	CBS 111141	Solo	Colômbia	MT335253	MT335493	MT412784	MT413002
Esse estudo	RAT012P3A2	<i>Eucalyptus</i> sp.	-	-	-	-	-
	RAT012P9C2	<i>Eucalyptus</i> sp.	-	-	-	-	-
	RAT012P3A	<i>Eucalyptus</i> sp.	-	-	-	-	-
	RAT012P2B	<i>Eucalyptus</i> sp.	-	-	-	-	-
	RAT012P1C	<i>Eucalyptus</i> sp.	-	-	-	-	-
	RAT012P12A	<i>Eucalyptus</i> sp.	-	-	-	-	-
	RAT012P12B	<i>Eucalyptus</i> sp.	-	-	-	-	-
	RAT012P2A	<i>Eucalyptus</i> sp.	-	-	-	-	-
	RAT012P2C	<i>Eucalyptus</i> sp.	-	-	-	-	-
	RAT012P3D	<i>Eucalyptus</i> sp.	-	-	-	-	-
	RAT012P5D	<i>Eucalyptus</i> sp.	-	-	-	-	-

T: Isolados *ex-tipe* das espécies de *Calonectria*.

Isolados em negrito foram obtidos nesse estudo.

cmdA: calmodulina; *his3*: histona H3; *tef1*: fator de alongamento; *tub2*: β -tubulina

3.4 Análises morfológicas

Baseando-se nos dados obtidos por meio das análises filogenéticas, um isolado de *Calonectria* sp. foi selecionado para caracterização morfológica. As principais características analisadas foram o tamanho e septação dos conídios, além da largura das vesículas, que são parâmetros comuns para a diferenciação entre espécies de *Calonectria* (Liu *et al.*, 2021; Wu & Chen, 2021). Para visualização das estruturas fúngicas, foram confeccionadas lâminas utilizando ácido láctico a 85%.

As lâminas foram examinadas em microscópio de luz Labomed LX400 (Lab America, Inc., CA, EUA) acoplado com câmera digital Opton 5.1MP (modelo TA-0120-B), utilizando o software OptView (Anatomic, Ltd., SP, BR). Foram realizadas trinta medições para cada estrutura avaliada. As características das colônias como coloração e textura também foram avaliadas após o cultivo dos isolados em placas de BDA e incubadas a 27°C no escuro por sete dias.

3.5 Testes de patogenicidade

Para comprovar a patogenicidade, o isolado RAT012P9C2 foi selecionado para inoculação em ramos de três diferentes clones de eucalipto com aproximadamente um ano de idade. Cada ramo continha em média cinco folhas, sendo duas delas inoculadas com discos (5mm de diâmetro) de micélio fúngico (em média dois a três discos de

micélios por folha) e duas utilizadas como controle negativo (em média um a dois discos de BDA por folha (Wu & Chen, 2021; Liu & Chen, 2022; Sanchez-Gonzalez et al., 2023))

Os ramos com folhas inoculadas foram mantidos em câmara úmida e ambiente controlado, com temperatura de 27 °C e fotoperíodo de 12 horas. A evolução dos sintomas foi monitorada por cinco dias, registrando-se o desenvolvimento de lesões necróticas. Para cumprir os postulados de Koch, foram realizados reisolamentos a partir das folhas sintomáticas e a identidade dos fungos reisolados foi verificada com base em características morfológicas, comparando-os com o mesmo isolado utilizado na inoculação.

4. RESULTADOS

4.1 Isolados fúngicos

A partir das 36 amostras de folhas sintomáticas, foram obtidos 90 isolados com aparência das colônias similares às de *Calonectria* spp. Com base em análises filogenéticas preliminares da região genômica *tef1*, 11 isolados (Tabela 1), foram selecionados para realização de outras análises.

4.2 Análises filogenéticas

Resultados prévios obtidos por meio da ferramenta BLAST realizados com as regiões *cmdA*, *his3*, *tef1* e *tub2* mostraram que os isolados pertencem ao complexo de espécies *Calonectria cylindrospora*. Assim, as sequências obtidas foram comparadas com as de outras espécies desse complexo (Tabela 1), mantendo-se sequências de *C. gracilipes* como *outgroup*.

Para a região gênica *cmdA*, foi obtido um alinhamento de 447 pares de bases (pb), 404 pb para histona (*his3*), 447 pb para *tef1* e 496 pb para *tub2*.

O teste PHT gerou um valor de $p=0,01$, porém trabalhos anteriores sugerem que as regiões sejam analisadas de forma concatenada para melhor precisão filogenética e tal abordagem já foi seguida em vários estudos de *Calonectria* spp. (Liu et al., 2020; Liu et al., 2021; Lombard et al., 2016; Pham et al., 2019; Sanchez-Gonzalez et al., 2022). Assim, para o conjunto de dados concatenados, foi obtido um alinhamento de 1794 pb, dos quais 1567 são constantes, 202 caracteres informativos de parcimônia e 25 caracteres não informativos de parcimônia.

As topologias das árvores obtidas foram semelhantes para as análises de MP, ML e BI das regiões individuais (Figura 2 – 5) e concatenadas (Figura 6). Os 11 isolados obtidos se agruparam no mesmo clado de *C. variabilis* com altos valores de bootstrap (100) para as análises de ML e MP e de probabilidade posterior (1) para BI (Figura 2). Foi observada ainda a formação de um subclado de *C. variabilis* devido à substituição de um par de bases na região (*his3*) do alinhamento.

Figura 2. Árvore filogenética baseada na análise de Máxima Verossimilhança da região *tub2*. Valores de suporte de bootstrap para as análises de Máxima Verossimilhança (ML), Máxima Parcimônia e valores de probabilidade posterior para Inferência Bayesiana (BI) são apresentados nos nós (ML / MP / BI). Os isolados destacados em negrito foram sequenciados neste estudo e estão indicados em lilás. *Calonectria gracilipes* foi utilizado como grupo externo (*outgroup*).

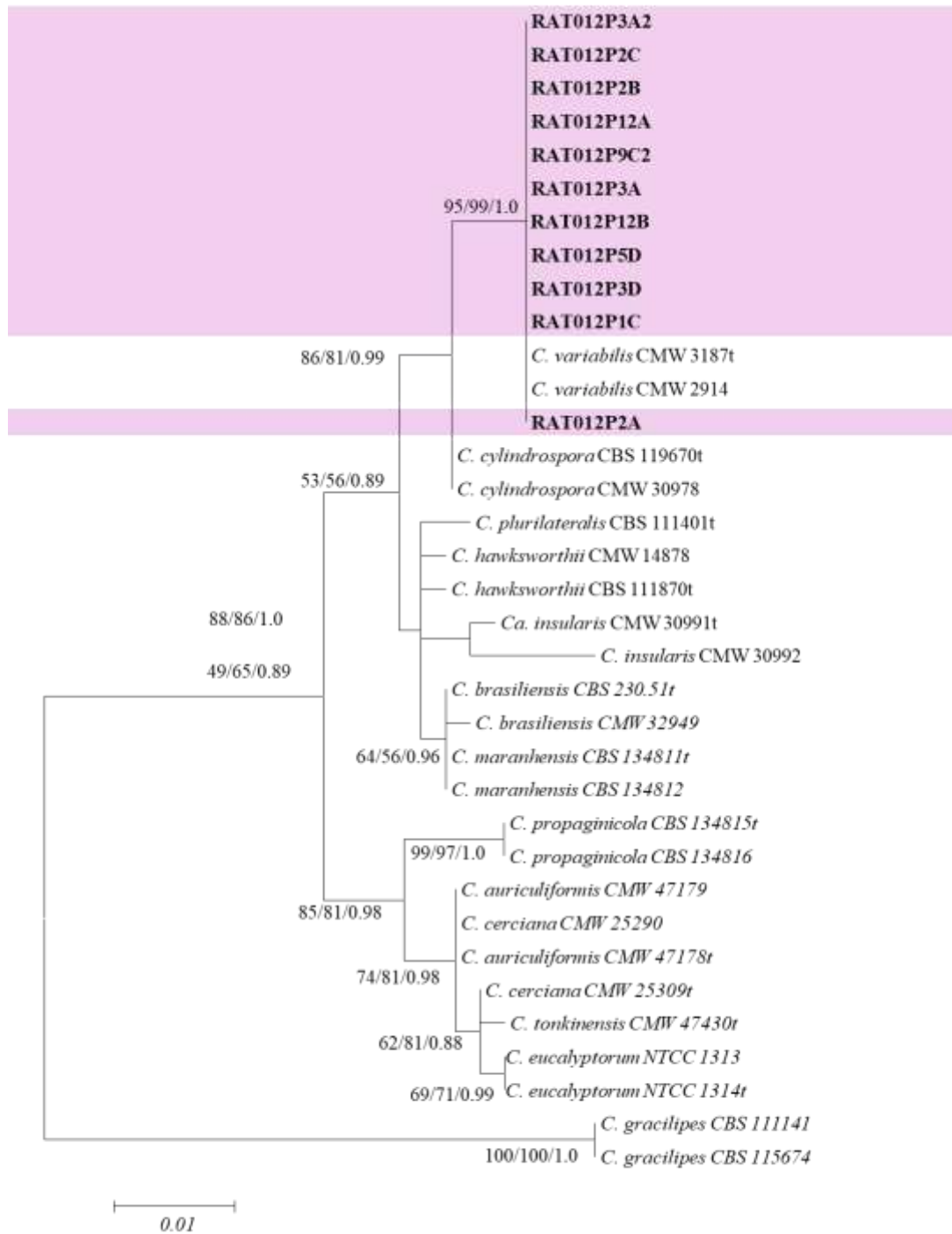


Figura 3. Árvore filogenética baseada na análise de Máxima Verossimilhança da região *cmdA*. Valores de suporte de bootstrap para as análises de Máxima Verossimilhança (ML), Máxima Parcimônia e valores de probabilidade posterior para Inferência Bayesiana (BI) são apresentados nos nós (ML / MP / BI). Os isolados destacados em negrito foram sequenciados neste estudo e estão indicados em lilás. *Calonectria gracilipes* foi utilizado como grupo externo (*outgroup*).

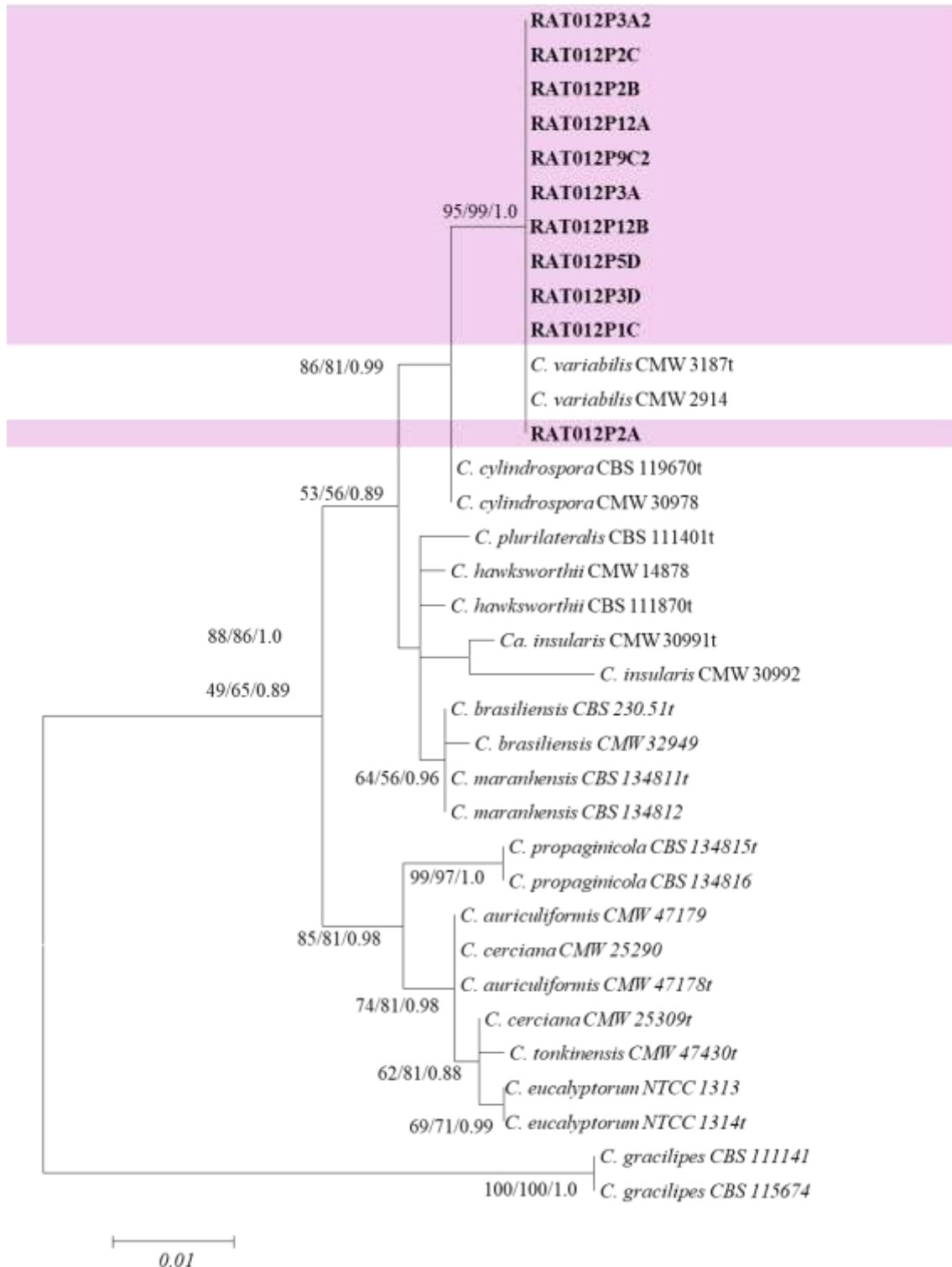


Figura 4. Árvore filogenética baseada na análise de Máxima Verossimilhança da região *Tef1*. Valores de suporte de bootstrap para as análises de Máxima Verossimilhança (ML), Máxima Parcimônia e valores de probabilidade posterior para Inferência Bayesiana (BI) são apresentados nos nós (ML / MP / BI). Os isolados destacados em negrito foram sequenciados neste estudo e estão indicados em lilás. *Calonectria gracilipes* foi utilizado como grupo externo (*outgroup*).

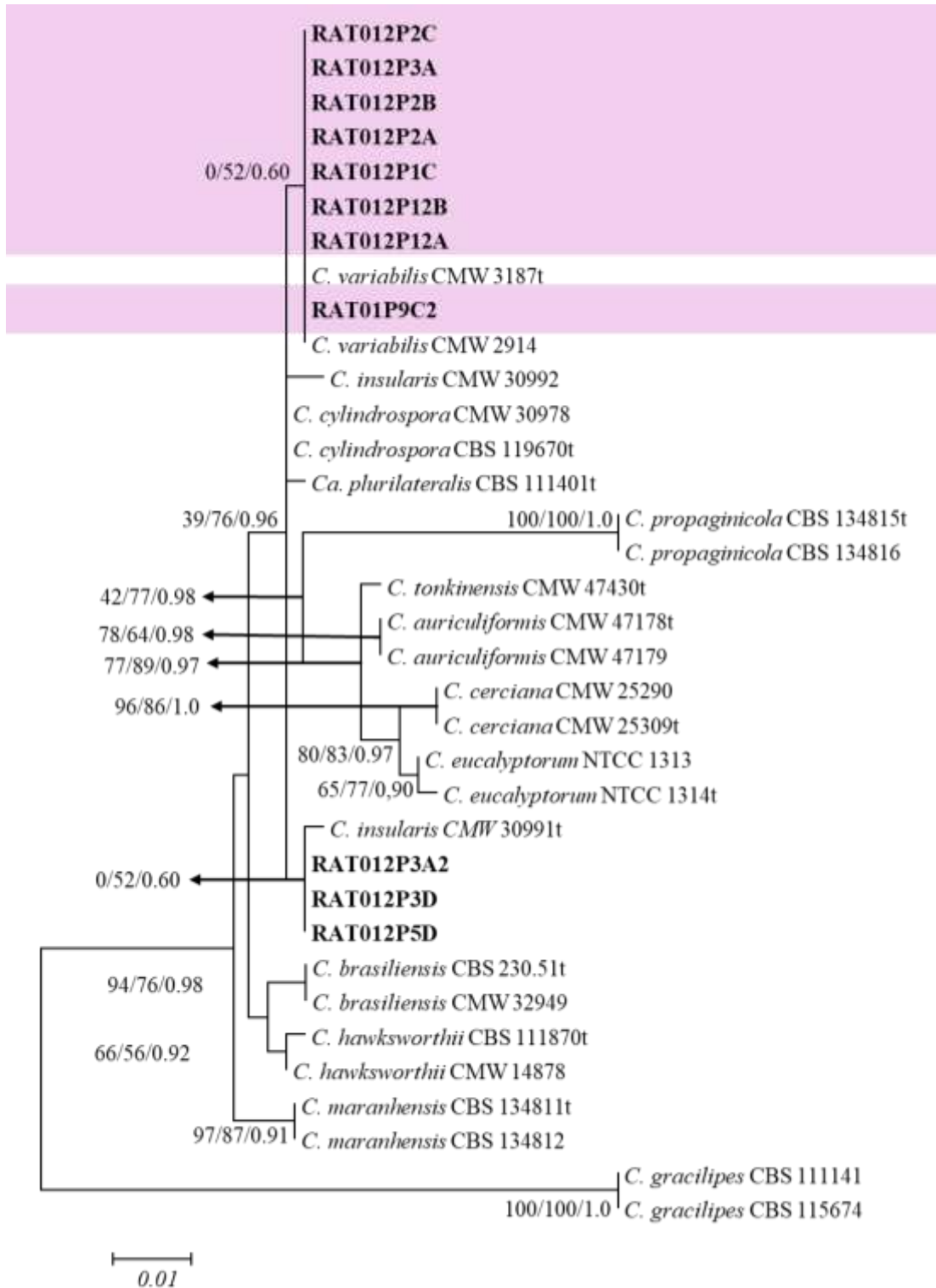


Figura 5. Árvore filogenética baseada na análise de Máxima Verossimilhança da região *his3*. Valores de suporte de bootstrap para as análises de Máxima Verossimilhança (ML), Máxima Parcimônia e valores de probabilidade posterior para Inferência Bayesiana (BI) são apresentados nos nós (ML / MP / BI). Os isolados destacados em negrito foram sequenciados neste estudo e estão indicados em lilás. *Calonectria gracilipes* foi utilizado como grupo externo (*outgroup*).

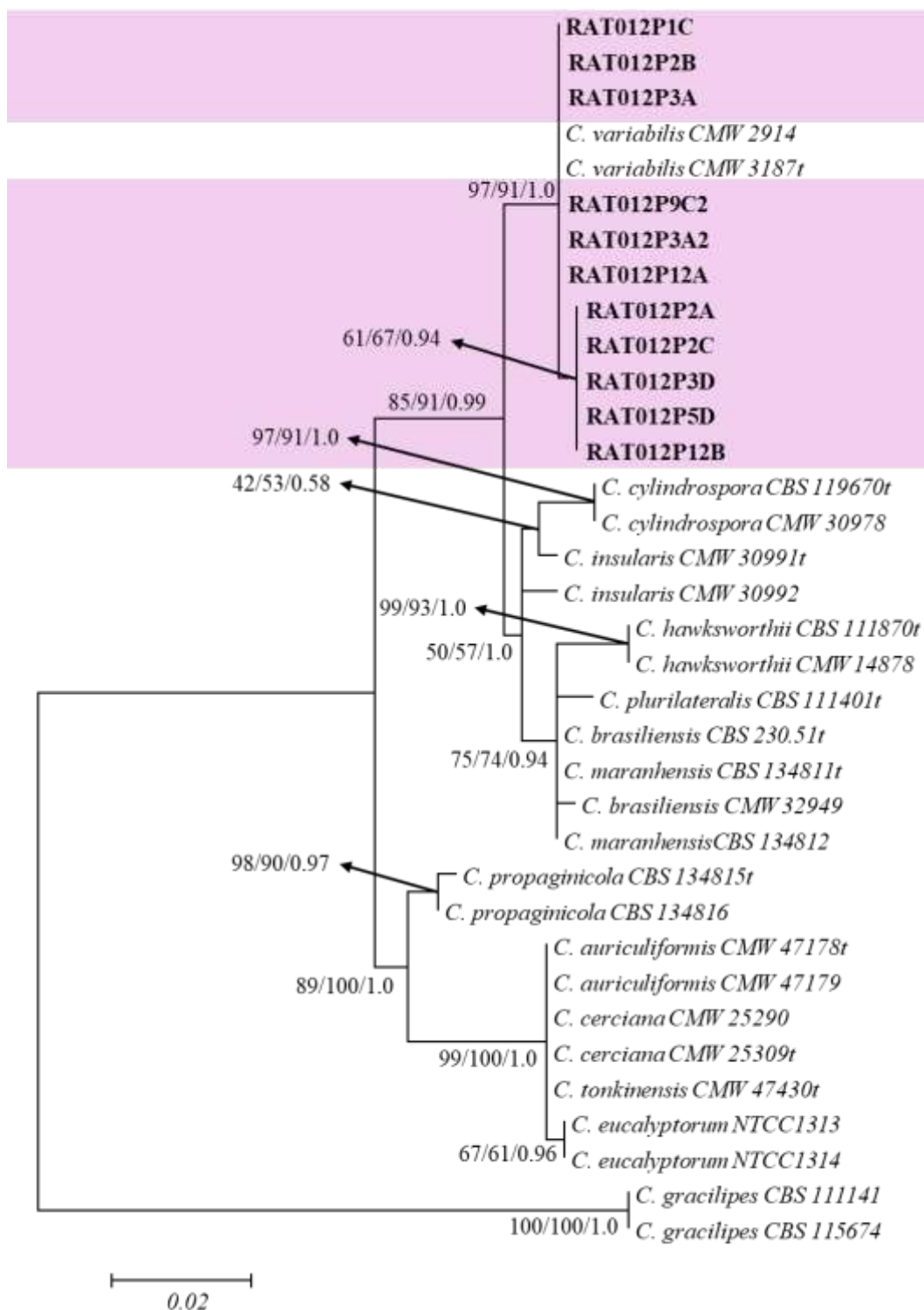
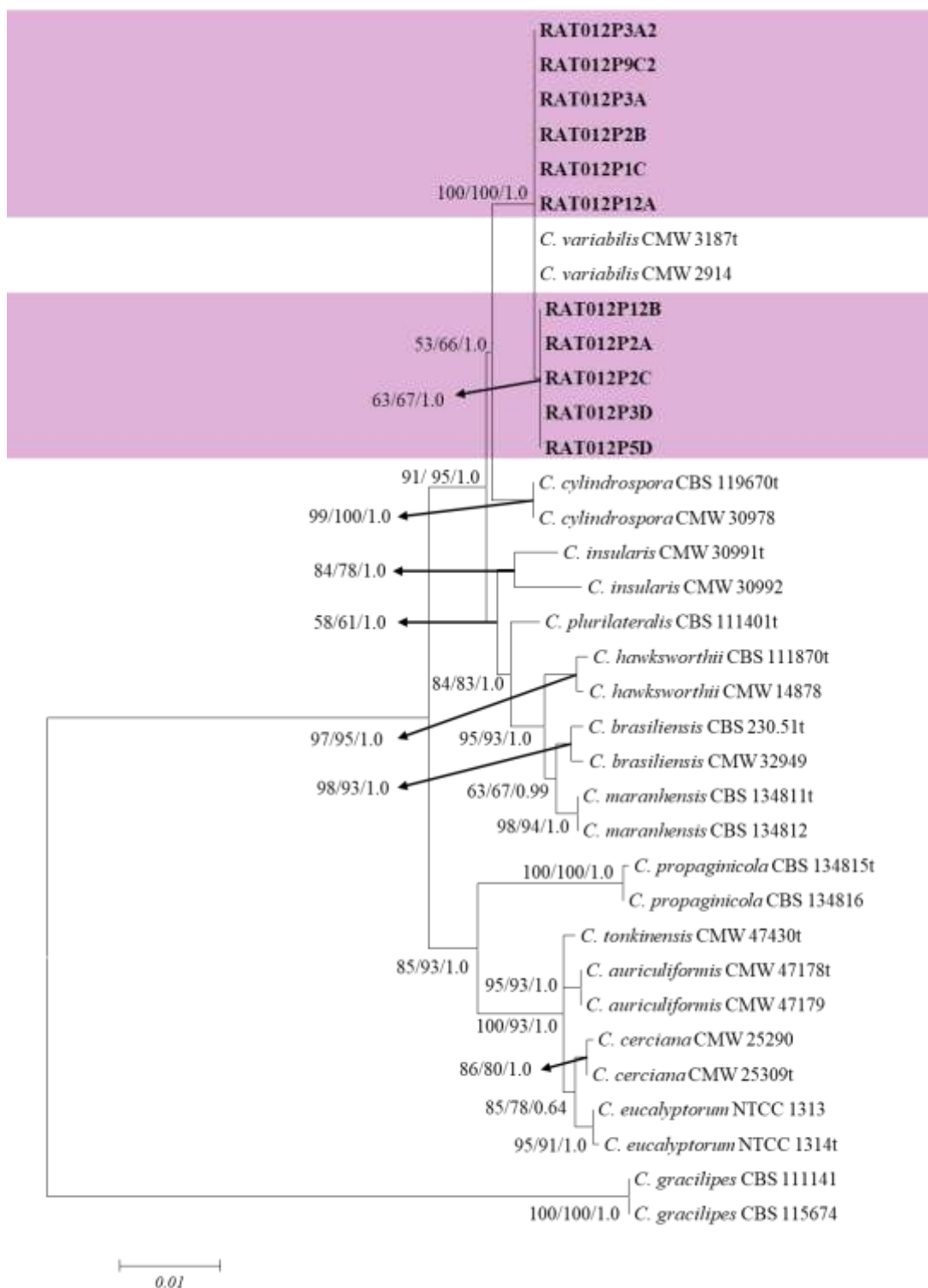


Figura 6. Árvore filogenética baseada na análise de Máxima Verossimilhança das regiões gênicas concatenadas (*cmdA*, *his3*, *tef1* e *tub2*). Valores de suporte de bootstrap para as análises de Máxima Verossimilhança (ML), Máxima Parcimônia e valores de probabilidade posterior para Inferência Bayesiana (BI) são apresentados nos nós (ML / MP / BI). Os isolados destacados em negrito foram sequenciados neste estudo e estão indicados em lilás. *Calonectria gracilipes* foi utilizado como grupo externo (*outgroup*).

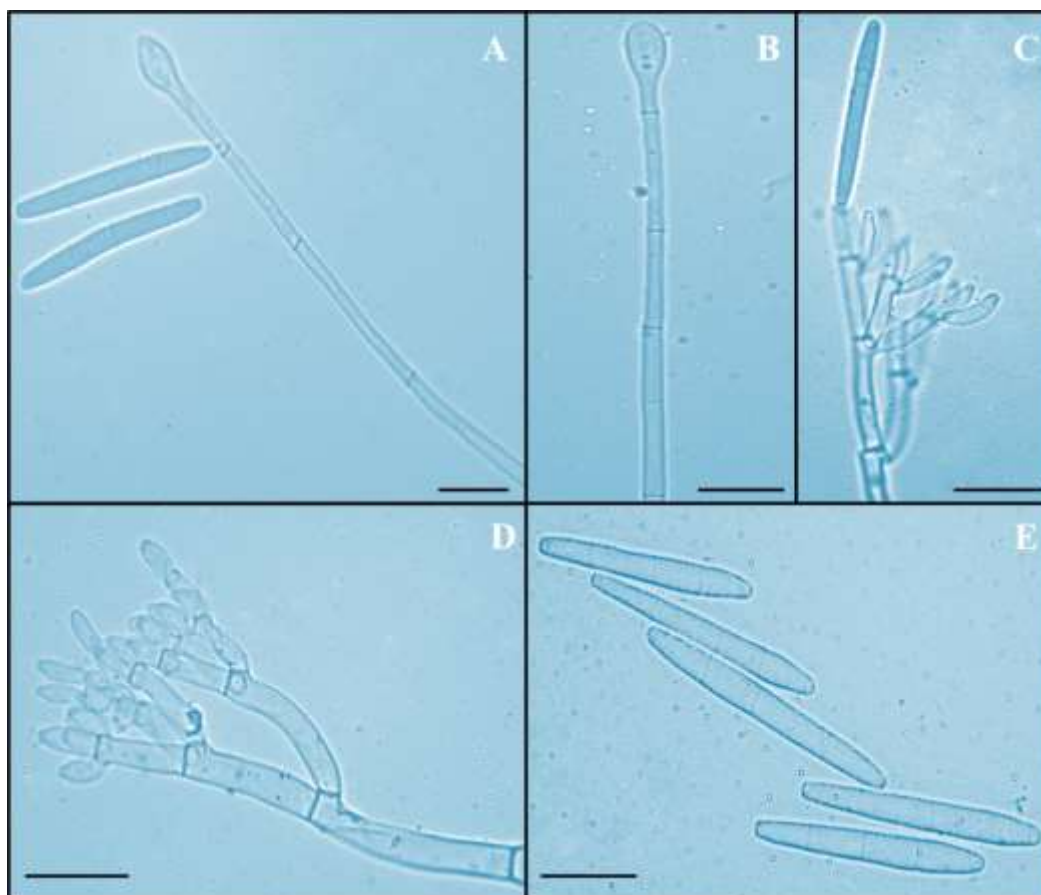


4.3 Análises morfológicas

Após sete dias de incubação a 27°C no escuro, as colônias de *C. variabilis* crescidas em BDA, apresentaram micélio aéreo esparso com margens irregulares e esporulação moderada.

Os macroconidióforos consistiram em arranjos penicilados de ramos férteis, uma extensão do estipe e uma vesícula terminal de formato elipsoidal a estreitamente obpiriforme medindo de 7 a 4 µm de diâmetro. O aparelho conidiogênico (Figura 7c-d) apresentou de 44 a 117 µm de comprimento e 60 a 132 µm de largura com ramos primários, secundários e terciários asseptados, com cada ramo terminal produzindo de uma a 2 fíalides (Figura 7c), doliformes a reniformes, hialinas, asseptadas, medindo de 9 a 17 x 2 a 4 µm. Os conídios (Figura 7e) apresentaram formato cilíndrico, arredondados em ambas as extremidades, septados, com 2 a 3 septos, medindo de 23 a 60 µm de comprimento e 2 a 6 µm de largura.

Figura 7. *Calonectria variabilis*. vesículas elipsoidais a estreitamente obpiriformes (A, B). fíalide (C), aparelho conidiogênico (D), macroconídios (E). Barras de escala: 10 µm.

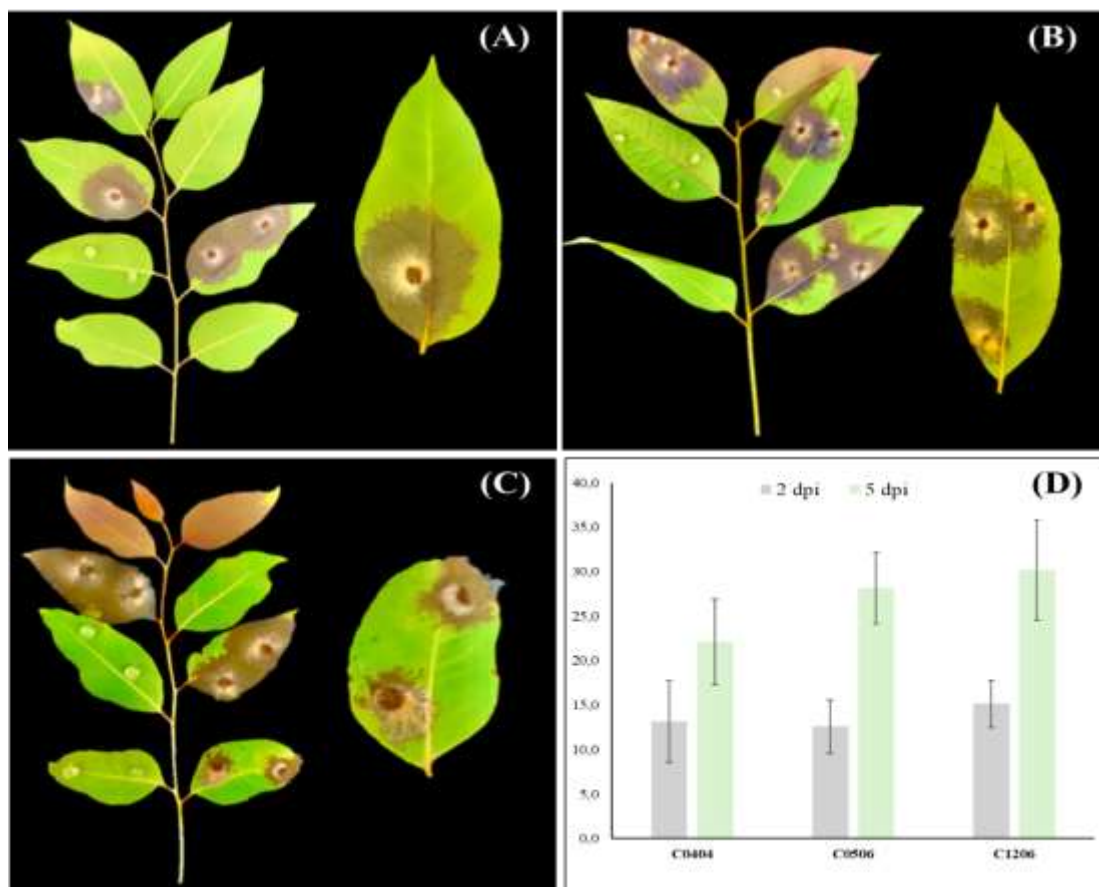


4.4 Testes de patogenicidade

As folhas de eucalipto dos ramos de todos os três clones inoculados com discos de micélio de *C. variabilis* apresentaram sintomas necróticos (Figura 8a–c), o que não foi observado nas folhas que continham apenas discos de BDA. A esporulação ocorreu nas folhas inoculadas aos cinco dias após a inoculação (dpi). Das folhas inoculadas, os fungos foram reisolados e identificados pelas mesmas características morfológicas dos isolados originalmente inoculados, completando os postulados de Koch.

Aos 2 dpi, o diâmetro da lesão do isolado nos clones C0404, C0506 e C1206 atingiu médias de, 13,2 mm, 12,5 mm e 15,1 mm, respectivamente. Aos 5 dpi, o diâmetro médio da lesão do isolado nos clones foram: C0404 - 22,1 mm, C0506 - 29,2 mm e C1206 30,2 mm (Figura 8d).

Figura 8. Testes de patogenicidade, evidenciando sintomas necróticos em folhas de três diferentes genótipos de eucalipto, inoculadas com discos miceliais de *Calonectria variabilis* (isolado RAT012P9C2) aos 2 dias após a inoculação. (A) Folhas do clone C1206; (B) Folhas do clone C0506; (C) Folhas do clone C0404; (D) Gráfico evidenciando os diâmetros das lesões aos 2 e 5 dpi (dias após a inoculação).



5. DISCUSSÃO

Neste estudo, confirmamos a ocorrência de *Calonectria variabilis* em três plantios clonais de eucalipto situados no Agreste do estado da Bahia, Brasil. A identificação foi realizada por meio de análises filogenéticas baseadas em quatro regiões genômicas (*cmdA*, *his3*, *tef1* e *tub2*), complementadas por avaliações morfológicas. A caracterização molecular demonstrou que os onze isolados analisados formaram um clado bem suportado (bootstrap = 100 e probabilidade posterior = 1), com um subclado contendo cinco isolados. A validação do uso dessas regiões genômicas para a delimitação de espécies dentro do gênero *Calonectria* é amplamente documentada na literatura (Liu et al., 2020; 2021; Lombard et al., 2010; 2016; Pham et al., 2019; Sanchez-Gonzalez et al., 2022; 2023).

O complexo *Calonectria cylindrospora* agrupa espécies patogênicas de relevância florestal, incluindo *C. variabilis* e *C. cylindrospora*. Tais espécies têm sido frequentemente relatadas em plantios de eucalipto em diferentes regiões do mundo, causando sintomas como manchas foliares, desfolha e necrose de ramos, impactando negativamente o crescimento das árvores e a produtividade florestal (Liu et al., 2020; Lombard et al., 2010; Wingfield et al., 2015).

Dentre as espécies de *Calonectria*, *C. variabilis* tem sido relatada como um importante agente etiológico de doenças foliares em regiões tropicais e subtropicais. A espécie foi descrita por Crous et al., (1993) e foi registrada na Amazônia, nas espécies nativas *Didymopanax morototoni* e *Theobroma grandiflorum*, provocando manchas foliares e podridão radicular. Posteriormente identificada em plantios comerciais de eucalipto nos estados do Espírito Santo, Pará, Maranhão e Bahia (Crous, 2002; Sanchez-Gonzalez et al., 2023), além de ter sido relatada causando queima de folhas em *Anacardium occidentale* (cajuzeiro) no Panamá (Ramírez-Camejo et al., 2024).

Os resultados deste estudo ampliam o conhecimento sobre a distribuição de *C. variabilis* e sua ocorrência em plantios de eucalipto, confirmando sua presença na região Agreste da Bahia.

Os testes de patogenicidade demonstraram que o isolado RAT012P9C2 é capaz de induzir sintomas necróticos nas folhas de três diferentes clones de eucalipto. Estudos anteriores indicam que a resistência a *Calonectria* spp. podem estar associada a fatores genéticos do hospedeiro, além de condições ambientais que favorecem a infecção e o desenvolvimento da doença (Graça et al., 2021).

Dessa forma, os dados apresentados contribuem para o entendimento da diversidade e da distribuição de *Calonectria* spp. no Brasil, fornecendo informações valiosas para programas de melhoramento genético, como a utilização dos isolados obtidos nesse estudo em testes com diferentes clones de eucalipto, visando a seleção de genótipos resistentes, a fim de se mitigar os danos causados por *Calonectria* spp. (Graça *et al.*, 2021; Soares *et al.*, 2018; Wingfield *et al.*, 2015).

AGRADECIMENTOS: As instituições de fomento, não só pelo pagamento da minha bolsa que proporcionou o desenvolvimento do trabalho, mas também a aprovação de projetos no laboratório de Patologia Florestal, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

REFERÊNCIAS

- ALFENAS, A. C.; ZAUZA, E. A. V.; MAFIA, R. G.; DE ASSIS, T. F. **Clonagem e doenças do eucalipto**. 2. ed. Viçosa, MG: Editora UFV, 2009. 500 p.
- ALFENAS, R. F.; LOMBARD, L.; PEREIRA, O. L.; ALFENAS, A. C.; CROUS, P. W. Diversity and potential impact of *Calonectria* species in *Eucalyptus* plantations in Brazil. **Studies in Mycology**, v. 80, n. 1, p. 89–130, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2014.11.002>.
- 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 Árvore**, v. 3, p. 47–56, 1979.
- ALFENAS, A. C. Fungos do gênero *Cylindrocladium* como patógenos florestais no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 11, p. 275-277, 1986.
- ALFENAS, R. F. **Production of inoculum of *Cylindrocladium pteridis* under controlled conditions**. 2009. Dissertação (Mestrado em Etiologia; Epidemiologia; Controle) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2009. Disponível em: <http://locus.ufv.br/handle/123456789/4375>. Acesso em: 21 jan. 2025.
- ALFENAS, R. F.; LOMBARD, L.; PEREIRA, O. L.; ALFENAS, A. C.; CROUS, P. W. Diversity and potential impact of *Calonectria* species in *Eucalyptus* plantations in Brazil. **Studies in Mycology**, v. 80, n. 1, p. 89-130, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2014.11.002>.
- ALMEIDA, O. C.; BOLKAN, H. A. Ocorrência e distribuição do gênero *Cylindrocladium* no Distrito Federal. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 6, p. 223-228, 1981.
- ARRUDA, S. C. Estiolamento das mudinhas (*Cylindrocladium*) do *Eucalyptus*. **O Biológico**, São Paulo, v. 6, p. 161-162, 1940.
- BOSE, R.; BANERJEE, S.; PANDEY, A.; BHANDARI, M. S.; BARTHWAL, S.; PANDEY, S. *Calonectria* leaf blight of *Eucalyptus*: A global review. **Annals of Applied Biology**, v. 182, n. 1, p. 6–28, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1111/aab.12800>.
- BOSE, R.; BANERJEE, S.; PANDEY, A.; BHANDARI, M. S.; BARTHWAL, S.; PANDEY, S. *Calonectria* leaf blight of *Eucalyptus*: a global review. **Annals of Applied Biology**, v. 182, n. 1, p. 6-28, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1111/aab.12800>.
- CARBONE, I.; KOHN, L. M. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. **Mycologia**, v. 91, n. 3, p. 553–556, 1999. DOI: <https://doi.org/10.1080/00275514.1999.12061051>.
- CROUS, P. W. et al. New and Interesting Fungi 4. **Fungal Systematics and Evolution**, v. 7, n. 1, p. 255–343, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3114/fuse.2021.07.13>.

DE NOTARIS, G. Nuove reclute per la pirenomicetologia italiana. Commentario della **Società Crittogamologica Italiana**, v. 2, p. 477–492, 1867

CASTELLANI, A. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. **The Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 42, p. 225–226, 1939.

CROUS, P. W.; PHILLIPS, A. J. L.; WINGFIELD, M. J. The genera *Cylindrocladium* and *Cylindrocladiella* in South Africa, with special reference to forest nurseries. **South African Forestry Journal**, v. 157, n. 1, p. 69–85, 1991.

CROUS, P. W.; JANSE, B. J. H.; VICTOR, D.; MARAIS, G. F.; ALFENAS, A. C. Characterization of some *Cylindrocladium* species with three-septate conidia using morphology, isozyme banding patterns and DNA polymorphisms. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 16, p. 266–273, 1993.

CROUS, P. W. Taxonomy and pathology of *Cylindrocladium* (*Calonectria*) and allied genera. **St. Paul: APS Press**, 2002. 278 p.

CROUS, P. W.; GROENEWALD, J. Z.; RISÈDE, J. M.; SIMONEAU, P.; HYWEL-JONES, N. L. *Calonectria* species and their *Cylindrocladium* anamorphs: Species with sphaeropedunculate vesicles. **Studies in Mycology**, v. 50, p. 415–430, 2004. DOI: <https://doi.org/10.3114/sim.55.1.213>.

CROUS, P. W.; LOMBARD, L.; WINGFIELD, M. J. Species concepts in *Calonectria* (*Cylindrocladium*): Nomenclature and taxonomic challenges. **Studies in Mycology**, v. 80, p. 1–18, 2014.

CROUS, P. W. et al. Fungal Planet description sheets: 868–950. **Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi**, v. 42, p. 291–473, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3767/persoonia.2019.42.11>.

CROUS, P. W. et al. New and Interesting Fungi 4. **Fungal Systematics and Evolution**, v. 7, n. 1, p. 255–343, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3114/fuse.2021.07.13>.

CROUS, Pedro Willem et al. Fungal Planet description sheets: 785–867. **Persoonia-Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi**, v. 41, n. 1, p. 238–417, 2018.

DOYLE, JEFF J.; DOYLE, JANE L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical bulletin**, 1987.

FARRIS JS, KALLERSJO M, KLUGE AG, BULT C, Testing significance of incongruence. *Cladistics* 10:315–319. 1995. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1096-0031.1994.tb00181.x>

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. 4, p. 743–752, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1111/ppa.13008>.

GRATTAPAGLIA, D.; PIMENTA, D.; CAMPINHOS, E. N.; REZENDE, G. D. S.; ASSIS, T. F. Marcadores moleculares na proteção varietal de *Eucalyptus*. In: **Proc 8th Brazilian Forestry Congress**. Published in CD, SBS, Brazilian Soc Silviculture, p. 1–13, 2003.

GRAÇA, R. N.; ALFENAS, A. C.; MAFFIA, L. A.; TITON, M.; ALFENAS, R. F.; LAU, D.; ROCA BADO, J. M. A. Factors influencing infection of eucalypts by *Cylindrocladium pteridis*. **Plant Pathology**, v. 58, n. 5, p. 971–981, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2009.02094.x>.

HEPPERLE D. SeqAssem©. Win32–Version. A sequence analysis tool contig assembler and trace data visualization tool for molecular sequences. Win32-Version. **Distributed by the author** 2004. <http://www.sequentix.de>

KATOH K, ROZEWICKI J, YAMADA KD. MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. **Briefings in bioinformatics** 20(4):1160–1166. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1093/bib/bbx108>

LI JQ, BARNES I, LIU FF, WINGFIELD MJ, CHEN SF Global genetic diversity and mating type distribution of *Calonectria pauciramosa*: an important wide host-range plant pathogen. **Plant Disease** PDIS-05. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-20-1050-RE>

LIU, Q.; CHEN, S. Two novel species of *Calonectria* isolated from soil in a natural forest in China. **MycKeys**, v. 26, p. 25–60, 2017. DOI: <https://doi.org/10.3897/mycokeys.26.14688>.

LIU, Q. L.; LI, J. Q.; WINGFIELD, M. J.; DUONG, T. A.; WINGFIELD, B. D.; CROUS, P. W.; CHEN, S. F. Reconsideration of species boundaries and proposed DNA barcodes for *Calonectria*. **Studies in Mycology**, v. 97, p. 100106, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2020.08.001>.

LIU L, WU W, CHEN S. Species diversity and distribution characteristics of *Calonectria* in five soil layers in a *eucalyptus* plantation. **Journal of Fungi** 7(10):857. 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/jof7100857>

LIU, L., & CHEN, S. Pathogenicity of six *Calonectria* species isolated from five soil layers in a *Eucalyptus* plantation. **Journal of Phytopathology**, 170, 445–452. 2022. DOI: <https://doi.org/10.1111/jph.13096>

LOMBARD, L.; CROUS, P. W.; WINGFIELD, B. D.; WINGFIELD, M. J. Phylogeny and systematics of the genus *Calonectria*. **Studies in Mycology**, v. 66, n. 1, p. 31–69, 2010. DOI: <https://doi.org/10.3114/sim.2010.66.03>.

LOMBARD, L.; WINGFIELD, M. J.; ALFENAS, A. C.; CROUS, P. W. The forgotten *Calonectria* collection: Pouring old wine into new bags. **Studies in Mycology**, v. 85, n. 1, p. 159–198, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2016.11.004>.

MOHALI, S. R.; STEWART, J. E. *Calonectria vigiensis* sp. nov. (Hypocreales, Nectriaceae) associated with dieback and sudden-death symptoms of *Theobroma cacao*

from Mérida state, Venezuela. **Botany**, v. 99, n. 11, p. 683–693, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1139/cjb-2021-0050>.

MIRANDA, I. D. S.; AUER, C. G.; DOS SANTOS, Á. F.; FERREIRA, M. A.; TAMBARUSSI, E. V.; DA SILVA, R. A. F.; REZENDE, E. H. Occurrence of *Calonectria* leaf blight in *Eucalyptus benthamii* progenies and potential for disease resistance. **Tropical Plant Pathology**, v. 46, p. 254–264, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1007/s40858-021-00426-4>.

NI, M. et al. Sex in fungi. **Annual Review of Genetics**, v. 45, p. 405–430, 2011.

NYLANDER, J. A. A. MrModeltest v2. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University, 2004.

O'DONNELL K, CIGELNIK E. Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. **Molecular phylogenetics and evolution** 7(1):103–116. 1997. DOI: <https://doi.org/10.1006/mpev.1996.0376>

O'DONNELL K, KISTLER HC, CIGELNIK E, PLOETZ RC. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 95(5):2044–2049. 1998. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.95.5.2044>

PHAM, N. Q.; BARNES, I.; CHEN, S.; LIU, F.; DANG, Q. N.; PHAM, T. Q.; WINGFIELD, M. J. Ten new species of *Calonectria* from Indonesia and Vietnam. **Mycologia**, v. 111, n. 1, p. 78–102, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1080/00275514.2018.1522179>.

PHAM, N. Q.; MARINCOWITZ, S.; CHEN, S.; YAPARUDIN, Y.; WINGFIELD, M. J. *Calonectria* species, including four novel taxa, associated with *Eucalyptus* in Malaysia. **Mycological Progress**, v. 21, n. 1, p. 181–197, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11557-021-01768-8>.

PHIPPS, P. M.; BEUTE, M. K.; BARKER, K. R. An elutriation method for quantitative isolation of *Cylindrocladium crotalariae* microsclerotia from peanut field soil. **Phytopathology**, v. 66, p. 1255–1259, 1976.

POSADA D, CRANDALL KA. Modeltest: testing the model of DNA substitution. **Bioinformatics** 14(9):817–818. 1998. DOI: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/14.9.817>

QUAEDVLIEG, W.; KEMA, G. H. J.; GROENEWALD, J. Z.; VERKLEY, G. J. M.; SEIFBARGHI, S.; RAZAVI, M.; GOHARI, A. M.; MEHRABI, R.; CROUS, P. W. *Zymoseptoria* gen. nov.: A new genus to accommodate *Septoria*-like species occurring on graminicolous hosts. **Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi**, v. 26, n. 1, p. 57–69, 2011. DOI: <https://doi.org/10.3767/003158511X571841>.

RAMÍREZ-CAMEJO, L. A. et al. Identification of *Calonectria variabilis* isolated from *Anacardium occidentale* trees exhibiting leaf blight symptoms. **Australasian Plant Pathology**, v. 53, p. 375–383, 2024.

RONQUIST F, TESLENKO M, VAN DER MARK P, AYRES DL, DARLING A, HÖHNA S, LARGET B, LIU L, SUCHARD MA, HUELSENBECK JP. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. **Systematic biology** 61(3):539–542. 2012. DOI: <https://doi.org/10.1093/sysbio/sys029>

SANCHEZ-GONZALEZ, E. I.; SOARES, T. D. P. F.; ZARPELON, T. G.; ZAUZA, E. A. V.; MAFIA, R. G.; FERREIRA, M. A. Two new species of *Calonectria* (Hypocreales, Nectriaceae) causing *Eucalyptus* leaf blight in Brazil. **MycoKeys**, v. 91, p. 169–197, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3897/mycokeys.91.84896>.

SILVA, G. A.; OLIVEIRA, M. E. S.; RÊGO, G. M. S.; WINGFIELD, B. D.; WINGFIELD, M. J.; FERREIRA, M. A. *Chrysosporthe brasiliensis* sp. nov. pathogenic to Melastomataceae in southeast Brazil. **Fungal Biology**, v. 128, n. 3, p. 1790–1799, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1111/efp.12803>.

SOARES, T. P. et al. Calcium and potassium imbalance favours leaf blight and defoliation caused by *Calonectria pteridis* in *Eucalyptus* plants. **Forests**, v. 9, n. 12, p. 782, 2018. DOI: <https://doi.org/10.3390/f9120782>

SOARES, T. P. F.; FERREIRA, M. A.; POZZA, A. A. A.; POZZA, E. A.; MAFIA, R. G. Distribution and content of calcium and potassium in eucalyptus leaves infected with *Calonectria pteridis*. **Journal of Phytopathology**, v. 171, n. 2, p. 81-90, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1111/jph.12933>

SWOFFORD, D. L. PAUP*. Phylogenetic analysis using parsimony (and other methods). v. 4.0b10. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, USA, 2003.

ULISSES, C.; WILLADINO, L.; DE ALBUQUERQUE, C. C.; CÂMARA, T. R. Clonagem vegetal. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica**, v. 7, p. 86-91, 2010

WANG, Q. C.; LIU, Q. L.; CHEN, S. F. Novel species of *Calonectria* isolated from soil near *Eucalyptus* plantations in southern China. **Mycologia**, v. 111, n. 6, p. 1028–1040, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1080/00275514.2019.1666597>.

WINGFIELD, M. J.; BROCKERHOFF, E. G.; WINGFIELD, B. D.; SLIPPERS, B. Planted forest health: the need for a global strategy. **Science**, v. 349, n. 6250, p. 832–833, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.aac6674>.

WILSON, A. M. et al. It's all in the genes: the regulatory pathways of sexual reproduction in filamentous ascomycetes. **Genes**, v. 10, p. 330, 2019

WU, W., & CHEN, S. Species Diversity, Mating Strategy and Pathogenicity of *Calonectria* Species from Diseased Leaves and Soils in the *Eucalyptus* Plantation in Southern China. **Journal of Fungi**, 7, 73. 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/jof7020073>.