

CLEBERLY EVANGELISTA DOS SANTOS

CÍRCULO DE HOSPEDEIROS E IDENTIFICAÇÃO
***Cylindrocladium brasiliensis* (*Calonectria brasiliensis*) ORIUNDO**
DE MORANGO INDIANO (*Duchesnea indica*)

URUTAÍ – GOIÁS
2021

CLEBERLY EVANGELISTA DOS SANTOS

CÍRCULO DE HOSPEDEIROS E IDENTIFICAÇÃO
***Cylindrocladium brasiliensis* (*Calonectria brasiliensis*) ORIUNDO**
DE MORANGO INDIANO (*Duchesnea indica*)

Monografia apresentada ao IF
Goiano Campus Urutaí como parte
das exigências do Curso de
Graduação em Agronomia para
obtenção do título de Bacharel em
Agronomia.

Orientador: prof. Dr. Milton Luiz
da Paz Lima.

URUTAÍ - GOIÁS
2021

CLEBERLY EVANGELISTA DOS SANTOS

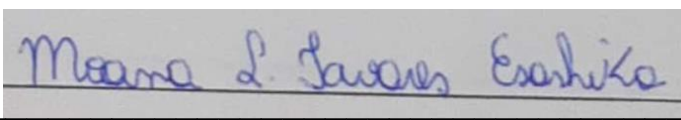
CÍRCULO DE HOSPEDEIROS E IDENTIFICAÇÃO
***Cylindrocladium brasiliensis (Calonectria brasiliensis)* ORIUNDO**
DE MORANGO INDIANO (*Duchesnea indica*)

Monografia apresentada ao IF Goiano-Campus Urutaí, como parte das exigências do Curso de Graduação em Agronomia para obtenção do título de Bacharel em Agronomia.

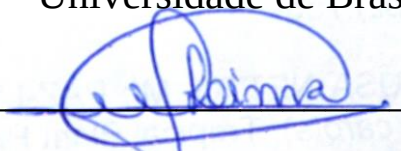
Aprovado em 11 de fevereiro de 2021.



M.Sc. Roberto Pereira Castro Junior
Embrapa Hortaliças



M.Sc. Moana Lima Tavares Esashika
Universidade de Brasília



Orientador Prof. Dr. Milton Luiz da Paz-Lima
Instituto Federal Goiano – Campus Urutaí

URUTAÍ – GOIÁS
2021

Sistema desenvolvido pelo ICMC/USP
 Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas - Instituto Federal Goiano

SC623c Santos, Cleberly Evangelista dos
 Círculo de hospedeiros e identificação de
Cylindrocladium brasiliensis (*Calonectria*
brasiliensis) oriundo de morango-indiano (*Duchesnea*
indica) / Cleberly Evangelista dos Santos;
 orientador Milton Luiz da Paz-Lima; co-orientador
 Leonardo da Silva Boiteux. -- Urutaí, 2021.
 50 p.

Monografia (Graduação em Curso de Agronomia) --
 Instituto Federal Goiano, Campus Urutaí, 2021.

1. identificação. 2. patogenicidade. 3. taxonomia.
 4. registro. I. Paz-Lima, Milton Luiz da, orient.
 II. Boiteux, Leonardo da Silva, co-orient. III.
 Título.

Responsável: Johnathan Pereira Alves Diniz - Bibliotecário-Documentalista CRB-1 nº2376



INSTITUTO FEDERAL
Goiano

Repositório Institucional do IF Goiano - RIIF Goiano
Sistema Integrado de Bibliotecas

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR PRODUÇÕES TÉCNICO-CIENTÍFICAS NO REPOSITÓRIO INSTITUCIONAL DO IF GOIANO

Com base no disposto na Lei Federal nº 9.610/98, AUTORIZO o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano, a disponibilizar gratuitamente o documento no Repositório Institucional do IF Goiano (RIIF Goiano), sem ressarcimento de direitos autorais, conforme permissão assinada abaixo, em formato digital para fins de leitura, download e impressão, a título de divulgação da produção técnico-científica no IF Goiano.

Identificação da Produção Técnico-Científica

- | | |
|--|---|
| ☐ Tese | ☐ Artigo Científico |
| ☐ Dissertação | ☐ Capítulo de Livro |
| ☐ Monografia – Especialização | ☐ Livro |
| ☒ TCC - Graduação | ☐ Trabalho Apresentado em Evento |
| ☐ Produto Técnico e Educacional - Tipo: _____ | |

Nome Completo do Autor: Cleberly Evangelista dos Santos

Matrícula: 2016101200240274

Título do Trabalho: CÍRCULO DE HOSPEDEIROS E IDENTIFICAÇÃO *Cylindrocladium brasiliensis* (*Calonectria brasiliensis*) ORIUNDO DE MORANGO INDIANO (*Duchesnea indica*)

Restrições de Acesso ao Documento

Documento confidencial: ☐ Não ☒ Sim, justifique: Será publicado como artigo

Informe a data que poderá ser disponibilizado no RIIF Goiano: 12/02/2021

O documento está sujeito a registro de patente? ☐ Sim ☒ Não
O documento pode vir a ser publicado como livro? ☐ Sim ☒ Não

DECLARAÇÃO DE DISTRIBUIÇÃO NÃO-EXCLUSIVA

O/A referido/a autor/a declara que:

1. o documento é seu trabalho original, detém os direitos autorais da produção técnico-científica e não infringe os direitos de qualquer outra pessoa ou entidade;
2. obteve autorização de quaisquer materiais inclusos no documento do qual não detém os direitos de autor/a, para conceder ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano os direitos requeridos e que este material cujos direitos autorais são de terceiros, estão claramente identificados e reconhecidos no texto ou conteúdo do documento entregue;
3. cumpriu quaisquer obrigações exigidas por contrato ou acordo, caso o documento entregue seja baseado em trabalho financiado ou apoiado por outra instituição que não o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano.

URTAÍ
Local

12/02/2021
Data

Cleberly E. dos Santos

Assinatura do Autor e/ou Detentor dos Direitos Autorais

Ciente e de acordo:

[Assinatura]

Assinatura do(a) orientador(a)



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SECRETARIA DE EDUCAÇÃO PROFISSIONAL E TECNOLÓGICA
INSTITUTO FEDERAL GOIANO - CAMPUS URUTAI
CURSO DE AGRONOMIA

ATA DE APRESENTAÇÃO DE TRABALHO DE CURSO

Após 11 dias do mês de fevereiro de dois mil e vinte e um reuniram-se: Prof. Dr. MILTON LUIZ DA PAZ LIMA, MSc. MOANA LIMA TAVARES ESASHIKA, e Eng. Agr. ROBERTO PEREIRA CASTRO JUNIOR nas dependências do Instituto Federal Goiano - Campus Urutai (GO), para avaliar o Trabalho de Curso do(a) acadêmico(a) CLEBERLY EVANGELISTA DOS SANTOS, como requisito necessário para conclusão do Curso Superior de Bacharelado em Agronomia. O presente TC tem como título: CÍRCULO DE HOSPEDEIROS E IDENTIFICAÇÃO DE *Cylindrocylindrium brasiliensis* (Calonectra brasiliensis) ORIUNDO DE MORANGO INDIANO (*Duchesnea indica*).

Após análise, foram dadas as seguintes notas:

Avaliadores	Notas
1. Prof. Dr. MILTON LUIZ DA PAZ LIMA	9,7
2. MSc. MOANA LIMA TAVARES ESASHIKA	9,1
3. Eng. Agr. ROBERTO PEREIRA CASTRO JUNIOR	9,0
Média final:	

OBSERVAÇÕES

Por ser verdade firmamos a presente:

Nome e Assinatura

1. Milton Luiz da Paz Lima

2. Moana Lima Tavares Esashika

3. Roberto Castro

Dedico...

Em especial a minha mãe Luciana,
ao meu pai Joaquim, e ao meu
orientador Milton, familiares e
amigos, pelo apoio oferecido ao
longo desses anos.

AGRADECIMENTOS

Gratidão pela oportunidade dada pelo Grande Arquiteto do Universo, que me proporciona a dádiva de viver e evoluir a cada dia, levando alegria, aprendizado, amor e benevolência.

Ao IF Goiano Campus Urutaí pelo apoio em ceder a moradia e infraestrutura ao longo da graduação.

Ao Laboratório de Melhoramento Molecular da Embrapa Hortaliças pelo sequenciamento do isolado.

A Moana Lima Tavarez pelas análises filogenéticas da sequencia com sequencias depositadas no GeneBank.

Gratidão pelos meus amigos Paulo Victor Bueno Flores, Igor Meireles de Souza, Ana Paula Neres Kramer, Elivelto Santana de Moura, Helliann Otávio Carvalho, Letícia Betânia Xavier Dias, Milton Luiz da Paz Lima, pela paciência e sabedoria, não me deixando desanimar e nem desistir dessa jornada tornando as coisas mais simples, sendo exemplos de coragem, determinação e companheirismo.

Gratidão aos meus pais pelo amor e apoio dedicação na minha formação de caráter, por todo amor e cuidado, amo vocês sendo minha motivação diária durante essa jornada.

Ao meu querido e excelentíssimo orientador Dr Milton Luiz da Paz Lima, pelas orientações e oportunidades, no laboratório de Fitopatologia que me fizeram crescer como profissional, no tempo de convivência, a qual não me esquecerei.

Gratidão a todos os outros professores do campo que me ajudaram direto ou indiretamente, através dos ensinamentos ofertados.

E aos meus colegas de moradia e graduação, por sempre estarem por perto dando apoio, e risadas nas horas tristes e alegres, e aos membros do laboratório de Fitopatologia que auxiliaram de alguma forma na construção do conhecimento e aprendizado de vida.

"A Gentileza é uma linguagem que o surdo pode ouvir e o cego pode ver."
(Mark Twain)

RESUMO

CÍRCULO DE HOSPEDEIROS E IDENTIFICAÇÃO *Cylindrocladium brasiliensis* (*Calonectria brasiliensis*) ORIUNDO DE MORANGO-INDIANO (*Duchesnea indica*)

Resumo – O morango-indiano (*Duchesnea indica* - Rosaceae), possui centro de origem o sul e leste da Ásia, a planta apresenta características muito semelhante ao morango silvestre, porém as flores são amarelas, frutos mais redondos e insípidos do que um morango. O objetivo deste trabalho foi avaliar círculo de hospedeiro e identificação molecular de *Cylindrocladium brasiliensis* oriundos de morango-indiano (*Duchesnea indica*). As folhas foram coletadas em julho de 2019 (Urutaí, GO) e analisadas em microscópio estereoscópico para preparo de lâminas e isolamento em meio ágar água (AA). Culturas axênicas foram preparadas em meio batata-dextrose-ágar (BDA). Em lâminas microscópicas fez-se descrição morfológica e morfométricas do isolado identificando-o como *Cylindrocladium* sp. e caracterizando-o segundo aspectos morfológicos e morfométricos. Para comprovar a patogenicidade e círculo de hospedeiros pelo método de folhas destacadas, foram inoculados discos de micélio em folhas sadias de 14 espécies de hospedeiras, nos tratamentos com e sem ferimento. Avaliou-se pelo período de sete dias permitindo o cálculo da patogenicidade, período de incubação e latência, AACPD e TIA. A partir de culturas axênicas e puras extraiu-se o DNA, amplificou-se para três loci gênicos e realizou-se o sequenciamento. O fungo apresentou conidióforos curtos, dispostos em pares ou apresentando três ramificações, cada um produzindo um esporo simples, cilíndrico voltado ao ápice, apresenta um septo, hialino obtuso, e com dimensões de 5,878 x 149,23 µm, vesícula terminal elipsoidal de dimensões 9,297 x 24,043 µm, conídio com dimensões 3,614 x 43,202 µm. Após 48 horas de (período de latência) foi observado que o isolado foi patogênico em todas as plantas testadas. Os valores de área abaixo da curva de progresso da lesão permitira reconhecer os hospedeiros mandioca, cabaça, pimenta Trindade Scorpion e morango como mais suscetíveis, e roseira rugosa e pêssego como mais resistente ao isolado oriundo de morango indiano. A análise morfológica e molecular identificou como *Cylindrocladium brasiliensis* (= *C. scoparum* var. *brasiliensis*), e este é o primeiro registro de ocorrência em morango indiano (*Duchesnea indica*), além sendo artificialmente patogênico em mandioca, goiaba, pêssego, morango, cabaça, pimenta Trindade Scorpion, *Eucalyptus globulus*, *Rosa chinensis*, *Rosa x grandiflora*, *R. banksiae*, *R. rugosa*, *R. wichuraiana* e *R. roletti*.

Palavras-chave – Identificação, Taxonomia, Patogenicidade, Registro.

ABSTRACT

CIRCLE OF HOST AND IDENTIFICATION OF *Calonectria brasiliensis* ORIUNDO DE INDIAN STRAWBERRY (*Duchesnea indica*)

The Indian strawberry (*Duchesnea indica* - Rosaceae), has its center of origin in south and east Asia, the plant has characteristics very similar to wild strawberry, but the flowers are yellow, fruits rounder and more tasteless than a strawberry. The aim of this work was to evaluate the host circle and molecular identification of *Cylindrocladium* sp. from Indian strawberry (*D. indica*). The leaves were collected in July 2019 (Urutaí, GO) and analyzed using a stereoscopic microscope to prepare slides and isolate on water agar (AA). Axenic cultures were prepared on potato-dextrose-agar (BDA). In microscopic slides, a morphological and morphometric description of the isolate was made, identifying it as *Cylindrocladium* sp. and characterizing it according to morphological and morphometric aspects. To prove the pathogenicity and circle of hosts by the detached leaf method, mycelium discs were inoculated into healthy leaves of 14 host species, in treatments with and without injury. They were evaluated for a period of seven days allowing the calculation of pathogenicity, incubation and latency period, AACPD and TIA. DNA was extracted from axenic and pure cultures, amplified to three gene loci and sequencing was carried out. The fungus presented. short conidiophores, arranged in pairs or showing three branches, each producing a simple, cylindrical spore facing the apex, presenting a septum, obtuse hyaline, and with dimensions of 5,878 x 149,23 µm, ellipsoidal terminal vesicle of dimensions 9,297 x 24,043 µm, conidium with dimensions 3,614 x 43,202 µm. After 48 hours of (latency period) it was observed that the isolate was pathogenic in all tested plants. The AUDCL values had made it possible to recognize the hosts cassava, gourd, Trindade Scorpion pepper and strawberry as more susceptible, and rough rose and peach as more resistant to the isolate from Indian strawberry. Morphological and molecular analysis identified *Cylindrocladium brasiliensis* (= *C. scoparum* var. *brasiliensis*), and this is the first record of occurrence in Indian strawberries (*Duchesnea indica*), in addition to being artificially pathogenic in cassava, guava, peach, strawberry, gourd, pepper Trindade Scorpion, *Eucalyptus globulus*, *Rosa chinensis*, *Rosa x grandiflora*, *R. banksiae*, *R. rugosa*, *R. wichuraiana* and *R. rouletti*.

Keywords – Identify, Taxonomy, Pathogenicity, Registry.

SUMÁRIO

RESUMO.....	10
ABSTRACT.....	11
INTRODUÇÃO	13
REVISÃO DE LITERATURA.....	16
MATERIAL E MÉTODOS.....	22
RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
CONCLUSÕES	45
REFERÊNCIAS.....	46

INTRODUÇÃO

O morango indiano (*Duchesnea indica* Andr. - Rosaceae), também conhecido como falso-morango, possui como centro de origem o Sul e Leste da Ásia, e é empregado mediante suas propriedades medicinais, incluindo atividades citotóxicas, antibióticas, antioxidantes e anti-inflamatórias, sendo amplamente utilizada na medicina tradicional chinesa (Lee e Kim, 1986; Kim et al., 2002; Kim et al., 2007). A família Rosaceae é representada por cerca de 100 gêneros e 3.000 espécies divididos em quatro subfamílias, que está distribuído por várias partes do mundo (Romoleroux, 1992).

O morango indiano possui características muito semelhantes ao morango silvestre no qual possui frutos avermelhados (Debes, 2011), porém as flores são amarelas e frutos mais redondos e insípidos do que um morango (Kim et al., 2007). O gênero *Duchesnea* é representado por apenas duas espécies originárias da Índia como *D. indica* (Andrews) Focke (2 n = 84) e *D. chrysantha* (Zoll. & Moritzi) Miq (2 n = 14). Sendo que a espécie *D. indica* possui uma ocorrência cosmopolita e cresce em diferentes regiões do mundo (Arias, 2007).

Vinculado ao gênero *Duchesnea* sp. existem 93 registros de fungos associados as espécies, não havendo nenhum registro de ocorrência de *Calonectria* sp., nem tão pouco *Cylindrocladium* sp. (Farr e Rossman, 2021). O fungo fitopatogênico *Calonectria* spp. De Not. (teleomorfo) vem sido relacionado as doenças que tem como anamorfo *Cylindrocladium* sp. Morgan, desencadeando sintomas de acordo com a planta hospedeira e o órgão afetado, variáveis quanto sua forma, pulverulência, tipo de órgãos afetado e agressividade, sendo representados pelo tombamento de mudas, mancha de folhas, podridão de estacas, troncos, raízes e do colo (Coutinho et al., 2001). As podridões de colo e podridões de estacas são lesões características, na fase inicial surge lesões escuras e pequenas que com o tempo progride da base para o ápice das plantas infectadas. As lesões avançam sobre os tecidos sadios, provocando

escurecimento, necrose e consequentemente a morte das gemas, estacas e sistema radicular. Em condições adequadas de desenvolvimento do patógeno, é possível observar, a formação de corpos de frutificação sobre o tecido afetado (Aparecio e Finatti, 2012). Quando se trata de *C. crotalariae*, pode-se observar a presença de estruturas pertencentes à fase teleomórfica, em condições desfavoráveis o ascomiceto *Calonectria crotalariae*, consegue sobreviver de forma saprofítica sobre folhas mortas de eucalipto como em outros vegetais já em condições de decomposição (Crous e Wingfield, 1994).

Existem uma grande variedade de espécies sendo 92 táxons associados a *Cylindrocladium* spp. e 413 táxons de *Calonectria* spp. (para ambos representados por variedades, formae speciales e espécies), descritos no mundo (Index Fungorum, 2021), parasitando diversas culturas de interesse econômico (Alfenas et al., 2015).

O anamorfo *Cylindrocladium brasiliense* (Bat. & Cif.) Peerally foi descrito em 1974 [Bull. Fan. Nen. Inst. Biol. Bot 43:427], tem como sinonímia *C. scoparium* var. *brasiliense* Bat. & Cif., Bol. Secr. Agric. (Pernambuco) 18(3-4): 188 (1952) e *C. brasiliense* (Bat. & Cif.) Peerally, Bull. Fan Mem. Inst. Biol., Bot. 43: 427 (1974), sendo considerado como táxon atual associado ao seu teleomorfo *Calonectria brasiliensis* (Bat. & Cif.) L. Lombard, M.J. Wingf. & Crous. O teleomorfo *C. brasiliensis* (Bat. % Cif.) L. Lombard, M.J. Wingf. & Crous, foi descrito em 2010 [Stud. Mycology, 66:19], que tem como basionímio *Cylindrocladium scoparium* var. *brasiliense* Bar. & Cif. (1952) (= *C. brasiliensis* (Bat. & Cif.) 1951).

Existem registrados no mundo nove relatos de ocorrência de *Cylindrocladium brasiliense* (= *Calonectria brasiliensis*) infectando *Arenga engleri* em Hong Kong (Lu et al. 2000; Zhuang, 2001), *Eucalyptus alba* no Brasil (Crous et al., 1989), *E. citriodora* no Brasil (Crous et al., 1989), *E. grandis* no Brasil (Crous et al., 1989), *E. maculata* no Brasil (Crous et al., 1989), *E.*

saligna no Brasil (Crous et al., 1989), *Phoenix hanceana* em Hong Kong (Crous et al., 1989, Zhuang, 2001), e nenhum registro em membros da família Rosaceae (Farr & Rossman, 2021)

A taxonomia clássica baseando-se em aspectos morfológicos e morfométricos foi a sustentabilidade da descoberta de espécies e associações patógeno-hospedeiro. As dúvidas quanto as designações foram endossadas por informações de moleculares. Existem atualmente cerca de 150 espécies de *Calonectria* que foram descritas com base em comparações de sequências de DNA, por meio das inferências filogenéticas (Lombard et al., 2016; Marin Felix et al., 2017). A família Nectriaceae é representada por cerca de 55 gêneros, sendo subdividida em 900 espécies, incluindo os fungos da espécie *Calonectria* spp. (Mycobank Database, 2020).

Além dos métodos clássicos de taxonomia, os genes (regiões conservadas) mais importantes para identificação molecular de espécies de *Cylindrocladium* são histona (His3), fator de elongação TEF 1- α (TEF 1- α), calmodulina (cmdA), actina (AC) e beta tubulina (TUB) (Jayawardena et al., 2019).

O objetivo deste trabalho foi avaliar círculo de hospedeiro e identificação molecular de *Cylindrocladium* sp. oriundo de morango-indiano (*Duchesnea indica*).

REVISÃO DE LITERATURA

O morango indiano (*Duchesnea indica* Andr. - Rosaceae), também conhecido como falso-morango possui características medicinais, incluindo atividades citotóxicas, antibióticas, antioxidantes e anti-inflamatórias, sendo amplamente utilizada na medicina tradicional chinesa (Lee e Kim, 1986; Kim et al., 2002; Kim et al., 2007). Seu centro de origem está localizado no Sul e Leste da Ásia, com características muito semelhante ao morango-silvestre no qual possui frutos avermelhados (Debes, 2011), porém as flores são amarelas, frutos e insípidos e redondos do que um morango (Kim et al., 2007). O gênero *Duchesnea* é representado por apenas duas espécies originárias da Índia como *D. indica* (Andrews) Focke (2 n = 84) e *D. chrysantha* (Zoll. & Moritz) Miq. (2 n = 14). Sendo que a espécie *D. indica* que possui uma ocorrência cosmopolita e cresce em diferentes regiões do mundo (Arias, 2007). A família Rosaceae é representada por cerca de 100 gêneros e 3.000 espécies divididas em quatro sub-famílias, que está distribuído por várias partes do mundo (Romoleroux, 1992).

Vinculado ao gênero *Duchesnea* sp. existem 93 registros de fungos associados as espécies, não havendo nenhum registro de ocorrência de *Calonectria* sp., nem tão pouco *Cylindrocladium* sp. (Farr e Rossman, 2021). O fungo fitopatogênico *Calonectria* spp. De Not. (teleomorfo) vem sido relacionado as doenças que tem como anamorfo *Cylindrocladium* sp. Morgan, desencadeando sintomas de acordo com a planta hospedeira e o órgão afetado, variáveis quanto sua forma, pulverulência, tipo de órgãos afetado e agressividade, sendo representados pelo tombamento de mudas, mancha de folhas, podridão de estacas, troncos, raízes e do colo (Coutinho et al., 2001). As podridões de colo e podridões de estacas são lesões características, na fase inicial surge lesões escuras e pequenas que com o tempo progride da base para o ápice das plantas infectadas. As lesões avançam sobre os tecidos sadios, provocando

escurecimento, necrose e consequentemente a morte das gemas, estacas e sistema radicular. Em condições adequadas de desenvolvimento do patógeno, é possível observar, a formação de corpos de frutificação sobre o tecido afetado (Aparecio e Finatti, 2012). Quando se trata de *C. crotalariae*, pode-se observar a presença de estruturas pertencentes à fase teleomórfica, em condições desfavoráveis o ascomiceto *Calonectria crotalariae*, consegue sobreviver de forma saprofítica sobre folhas mortas de eucalipto como em outros vegetais já em condições de decomposição (Crous e Wingfield, 1994).

Existem uma grande variedade de espécies sendo 92 táxons associados a *Cylindrocladium* spp. e 413 táxons de *Calonectria* spp. (para ambos representados por variedades, formae speciales e espécies), descritos no mundo (Index Fungorum, 2021), parasitando diversas culturas de interesse econômico (Alfenas et al., 2015).

O anamorfo *Cylindrocladium brasiliense* (Bat. & Cif.) Peerally foi descrito em 1974 [Bull. Fan. Nen. Inst. Biol. Bot 43:427], tem como sinonímia *C. scoparium* var. *brasiliense* Bat. & Cif., Bol. Secr. Agric. (Pernambuco) 18(3-4): 188 (1952) e *C. brasiliense* (Bat. & Cif.) Peerally, Bull. Fan Mem. Inst. Biol., Bot. 43: 427 (1974), sendo considerado como táxon atual associado ao seu teleomorfo *Calonectria brasiliensis* (Bat. & Cif.) L. Lombard, M.J. Wingf. & Crous. O teleomorfo *C. brasiliensis* (Bat. & Cif.) L. Lombard, M.J. Wingf. & Crous, foi descrito em 2010 [Stud. Mycology, 66:19], que tem como basionímio *Cylindrocladium scoparium* var. *brasiliense* Bar. & Cif. (1952) (= *C. brasiliensis* (Bat. & Cif.), 1951).

Existem registrados no mundo nove relatos de ocorrência de *Cylindrocladium brasiliense* (= *Calonectria brasiliensis*) infectando *Arenga engleri* em Hong Kong (Lu et al. 2000; Zhuang, 2001), *Eucalyptus alba* no Brasil (Crous et al., 1989), *E. citriodora* no Brasil (Crous et al., 1989), *E. grandis* no Brasil (Crous et al., 1989), *E. maculata* no Brasil (Crous et al., 1989), *E.*

saligna no Brasil (Crous et al., 1989), *Phoenix hanceana* em Hong Kong (Crous et al., 1989, Zhuang, 2001), e nenhum registro em membros da família Rosaceae (Farr & Rossman, 2021)

Além dos métodos clássicos de taxonomia, os genes (regiões conservadas) mais importantes para identificação molecular de espécies de *Cylindrocladium* sp. e *Calonectria* sp. são histona (His3), fator de alongação TEF (TEF 1- α), calmodulina (CmdA), actina (AC) e beta tubulina TUB (Jayawardena et al., 2019).

As podridões de colo e podridões de estacas são lesões características, na fase inicial surge lesões escuras e pequenas que com o tempo progride da base para o ápice das plantas infectadas. As lesões avançam sobre os tecidos sadios, provocando escurecimento, necrose e consequentemente a morte das gemas, estacas e sistema radicular. Em condições adequadas de desenvolvimento do patógeno, é possível observar, a formação de corpos de frutificação sobre o tecido afetado (Aparecio e Finatti, 2012). Quando se trata de *C. crotalariae*, pode-se observar a presença de estruturas pertencentes à fase teleomórfica, em condições desfavoráveis o ascomiceto *Calonectria crotalariae*, consegue sobreviver de forma saprofítica sobre folhas mortas de eucalipto como em outros vegetais já em condições de decomposição (Crous e Wingfield, 1994).

Até o presente a taxonomia clássica baseada em morfologia e morfometria sustentaram a identificação de espécies de *Cylindrocladium* sp. A espécie *C. scoparium* que atualmente foi designada como sinonímia de *C. brasiliensis* apresenta como características descritivas essenciais os seguintes aspectos: *Cylindrocladium* sp. - apresenta uma hifa estéril rastejante e ramificada, a hifa fértil é ereta, bifurcada ou tricomatosamente ramificada, os conidióforos são em pares ou grupos de três ramificados e arranjados cimosamente, os esporos são solitários, cilíndricos, unisseptados e hialinos; *C. scoparium* – apresenta colônias efusas, finas, flocosas, brancas, com hifas estéreis rastejantes e ramificadas, delgada, indistinta, hifa fértil e fina, ereta,

hialina, ramificada, septada, cimosamente septada acima, os conidióforos são curtos, dispostos em pares ou grupos de três, as extremidades ramificadas e no seu topo produzindo conídios cilíndricos, afinando ligeiramente para baixo, unisseptados, hialinos, obtusos, suas dimensões de 40-50 x 3-4 μm . A hifa estéril é abundante delgada e se afinam. Na descrição original da espécie não se faz menção a respeito do tamanho e forma da clava e vesícula e sua forma que é uma característica decisiva para identificação morfológica (Crous et al., 1991).

Os patógenos do gênero *Calonectria* (forma perfeita) podem provocar tombamento afetando plantas nas fases de germinação (pré-emergência) ou de plântulas (pós-emergência), o fungo coloniza os tecidos tenros da radícula e do caulículo da plântula. Os principais sintomas se caracterizam através do surgimento inicial de lesão na região do colo de aspecto encharcado, progredindo para lesões necróticas de coloração escura no caulículo da plântula, provocando a lise celular e conseqüentemente a morte da plântula (Ferreira, 1989).

O gênero possui uma alta virulência, infectando uma diversidade de hospedeiros em todo o mundo, sendo considerado patógenos de solo de importância econômica em diversos países, o gênero foi descrito pela primeira vez em 1867 (Lombard et al., 2010a). A ocorrência dos fungos do gênero *Cylindrocladium* spp. em lavouras e pomares comerciais no cerrado brasileiro é relatada por muito tempo através da identificação realizada por observação de caracteres morfológico (Dianese et al., 1986; Ferreira e Dianese, 1999).

O primeiro relato da ocorrência de *Cylindrocladium* no Brasil foi descrito em 1930, ocorrendo em plantas de eucalipto infectadas no Horto Florestal da Cantareira. Posteriormente foram detectados a ocorrência do patógeno em outros estados brasileiros. Cerca de 20 anos após a sua constatação da ocorrência do gênero *Cylindrocladium* afetava em sua maioria espécies florestais (Alfenas, 1986). Em 1967 foi constatado a ocorrência de *Cylindrocladium quinqueseptatum*, forma anamórfica *Calonectria quinqueseptata*, provocando doença em

espécie frutífera de fruta-do-conde (*Annona squamosa*). Á registro também em plantas ornamentais sendo infectadas em diversos países como Holanda, Itália, EUA, Bélgica e França, algumas espécies já foram constatadas a ocorrência em diversas culturas de importância econômica, pertencentes à variadas famílias botânicas em diversos países (Aparecio e Finatti, 2012). No Brasil já foram descritas as seguintes espécies do gênero *Cylindrocladium*: *C. theae*, *C. pteris*, *C. clavatum*, *C. quinquesseptatum*, *C. scoparium*, *C. crotalariae*, *C. floridanum*, *C. candelabrum*, *C. ilicicola* agrupando uma média de 33 espécies descritas no mundo. Por último, foi relatado pela primeira vez na América Central *C. spathiphyllii* parasitando lírio da paz (*Spathiphyllum wallisii*) (Aparecio e Finatti, 2012). Neste contexto, a adoção de ferramentas moleculares voltadas ao estudo e identificação de espécies de fungos promoveu diversas modificações no nível taxonômico de *Cylindrocladium* spp., obtendo maior precisão na diferenciação filogenética dentro da espécie, quando comparado com a identificação através de critérios morfológicos (Crous et al., 2006; Lombard et al., 2010b).

Existem atualmente cerca de 150 espécies de *Calonectria* que foram descritas com base em comparações de dados da sequência de DNA, por meio das inferências filogenéticas (Lombard et al., 2016; Marin Felix et al., 2017). A família Nectriaceae é representada por cerca de 55 gêneros, sendo subdividida em 900 espécies, incluindo os fungos da espécie *Calonectria* spp. (Mycobank Database, 2020).

Estudos filogenéticos descreveram novos gêneros de Botryosphaeriaceae utilizando o nome mais antigo do fungo, independentemente de ser a forma sexual ou assexual (Crous et al., 2006). Estes estudos taxonômicos permitiram a utilização de nomes genéricos antigos, tal como, espécies de *Cylindrocladium* usando o nome genérico mais antigo *Calonectria* (Lombard e Crous, 2012). A taxonomia molecular possibilitou o reconhecimento e diferenças de espécies

de forma mais refinada, permitindo a classificação de novas espécies. Porém não excluiu a utilização dos estudos de identificação com base em características morfológicas, ecológicas e epidemiológicas, pois são ferramentas complementares (Lombard et al., 2010a). Os fungos pertencentes a este gênero *Calonectria* são compostos em sua maioria por patógenos de solo, com cerca de 335 espécies de plantas pertencentes a 100 famílias de plantas hospedeiras, as principais famílias de plantas associadas são famílias Myrtaceae (*Eucalyptus* spp.), Fabaceae (*Acacia* spp.) (Lombard et al., 2015). O patógeno também está associado a plantas herbáceas de grande importância econômica como soja, amendoim, plantas ornamentais, batata e ervilha (Crous, 2002).

MATERIAL E MÉTODOS

As amostras de folhas de morango-indiano contendo fungo causador do crestamento e mancha-foliar foram coletadas em julho de 2019 no município de Urutaí, GO, (latitude 17°29'8" Sul e longitude 48°12'48", altura 660 m) cultivada em uma horta caseira. A hospedeira sintomática foi analisada primeiramente e microscópio estereoscópio. Em seguida permaneceu sob as condições de câmara úmida previamente esterilizada, permanecendo por um período de 24 horas, para então serem observadas a emergência de frutificações.

Microscopia e preparo de lâminas

A partir desse momento preparou-se lâminas permanentes utilizando microscópio estereoscópico. As estruturas fúngicas foram retiradas com auxílio de estilete de ponta fina esterilizado e colocadas em lâminas de vidro contendo fixador lactofenol (200 mL L⁻¹ fenol fundido, 200 mL L⁻¹ ácido láctico; 400 mL L⁻¹ glicerina branca; 0,5 h L⁻¹ azul de algodão; 200 mL L⁻¹ água purificada) em seguida depositou-se uma lamínula de vidro (18 x 18 mm) foram sobrepostas e vedadas com esmalte. A partir da observação das estruturas morfológicas e comparação com informações em Crous (2002) identificou-se o gênero como sendo *Cylindrocladium* sp. associado as lesões.

Sobre as amostras efloradas isolou-se através do método de pescagem direta fragmentos de hifas em meio de cultivo ágar-água [tetraciclina (50 µg mL⁻¹)]. Após a observação de micélio repicou-se fragmentos de micélio para meio de cultivo batata-dextrose-ágar (BDA) para produção de cultura axênica. Após cinco dias adicionou-se sobre a superfície do meio de cultivo gotas de água destilada estéril e riscou-se utilizando alça de platina em meio de cultivo BDA, e realizou-se a riscagem (método quadrado), para após 24 horas coleta das culturas monospóricas (método do recorte de disco de micélio) e repicagem para uma nova cultura de meio BDA. As

culturas foram mantidas em temperatura de 23 °C em estufa de crescimento BOD modelo EL202/4 até a obtenção da cultura pura.

Análise morfológica e morfométrica:

As lâminas semipermanentes foram examinadas e fotografadas em microscópio de luz Nikon® Eclipse NI-U, acoplada a câmera Feldmann Wild Leitz® FWL Digi-Pro ligado ao computador no qual é feita a captura e medições através do programa ToupTek 3.7 para largura e comprimento da vesícula terminal, dimensões dos conídios contagem do número de septos, na objetiva de 60x. As medidas referentes foram realizadas com 100 repetições e foram consideradas as dimensões médias. Os sintomas foram fotografados com câmera profissional Canon Eos T6i.

Teste de patogenicidade e círculo de hospedeiros

A partir das matrizes axênicas e monospóricas do isolado de *Cylindrocladium* sp. oriundo de morango-indiano (*Duchesnea indica*), foram recortados com um contador de colônia estéril discos de micélio de 10 mm de diâmetro (voltados para baixo) que foram transferidos e inoculados nas folhas de morango indiano (teste de patogenicidade) e outras plantas teste (círculo de hospedeiros). As outras plantas testadas foram 1. morango-indiano (*Duchesnea indica*, Rosaceae), 2. morango (*Fragaria × ananassa* Duch, Rosaceae), 3. pêssigo (*Prunus persica* Lineu, Rosaceae), 4. roseira-miniatura (*Rosa chinensis* Jacq, Rosaceae), 5. rosa-arbustiva (*Rosa x grandiflora* Hort, Rosaceae), 6. roseira-miúda (*Rosa banksiae* Hort., Rosaceae), 7. roseira-rugosa (*Rosa rugosa* Thunb., Rosaceae), 8. roseira-trepadeira (*Rosa wichuraiana* Crép., Rosaceae), 9. mini-rosa (*Rosa rouletti* Hort., Rosaceae), 10. Goiaba (*Psidium guajava* Lineu, Myrtaceae), 11. Eucalipto (*Eucalyptus globulus* Labill, Myrtaceae), 12. Pimenta Trindade Scorpion (*Capsicum chinense* Jacquin, Solanaceae), 13. Cabaça (*Lagenaria siceraria* Molina, Cucurbitaceae) e 14. Mandioca (*Manihot esculenta* Crantz,

Euphorbiaceae). O número de repetições foi de 10 folhas, em delineamento inteiramente casualizado, totalizando 140 unidades experimentais (14 * 10).

Utilizou-se o método da folha destacada, onde as folhas foram previamente lavadas (pulverização) com hipoclorito de sódio (HClO, 0,3%), seguido de álcool (50 %) e tríplice lavagem com água destilada. Após a secagem dentro de embalagens também lavadas com pulverização com hipoclorito de sódio (HClO, 0,3%), seguido de álcool (50 %) e tríplice lavagem com água destilada, embalagens com tampas foram forradas com papel mata-borrão estéril e umedecidos com água destilada. As folhas foram depositadas sobre um suporte, afim de evitar o contato direto da folha com o papel úmido. Após folhas depositadas, foi realizado num lado perfurações com agulhas e no outro permanecendo intactas. Adicionou-se os discos com micélio voltado para as folhas e os potes foram pulverizados com água, vedados e permaneceram para incubação a temperatura ambiente.

Avaliação do teste de patogenicidade e círculo de hospedeiros

Avaliou-se diariamente por um período de sete dias, o diâmetro da colônia (mm), permitindo o cálculo da área abaixo da curva de progresso da lesão (AACPL) (Shanner e Finney, 1977) e taxa de infecção (TI) nas diferentes plantas hospedeiras (correspondente ao coeficiente angular bx da regressão linear). A partir de sete medidas temporais do diâmetro da lesão (mm) calculou-se a AACPL, integralizando a curva de progresso da lesão para cada hospedeira (diâmetro x sete dias de avaliação), por meio da fórmula:

$$AACPL = \sum_i \frac{(X_i + X_{i+1})(t_{i+1} - t_i)}{2}$$

Onde: X_i corresponde ao diâmetro da lesão no primeiro dia de avaliação, X_{i+1} corresponde ao diâmetro da lesão no próximo dia de avaliação, t_{i+1} corresponde ao segundo tempo em dias após o primeiro dia, t_i corresponde ao tempo no primeiro de avaliação. Assim sucessivamente X e t pulam um dia durante a avaliação para cálculo e estabelecimento do somatório.

A taxa de infecção (TI) foi calculada através da regressão linear sendo os dias o valor de X e Y os valores de diâmetro da lesão foliar calculando o coeficiente angular obtido no Excel®, (procedimento = inclinação(y;x)) correspondente a taxa de crescimento dada em % cm dia⁻¹.

O período de avaliação do diâmetro da lesão foi de sete dias (intervalo de 24 horas), totalizando sete avaliações. As medidas do diâmetro da lesão serviram para construção de curvas de progresso temporal permitindo identificar parâmetros epidemiológicos como período de incubação (PI) e período de latência (PL). O PI mensurado correspondeu ao número em dias desde o momento da inoculação até o aparecimento de sintomas, já o PL refere-se ao número em dias desde a inoculação até o aparecimento de sinais. Avaliou-se ainda a patogenicidade que de acordo com Andrivon (1993) o qual representa um critério de avaliação qualitativo que expressa a capacidade do patógeno de causar sintomas tanto em inoculações artificiais como naturais, sendo representada pelos sinais de + ou -.

Extração de DNA do isolado de *Cylindrocladium* sp.

Foi obtido a partir de micélio que foi cultivado sob agitação em meio batata-dextrose por um período de 15 dias. Após crescimento, em câmara de fluxo laminar e utilizando funil de Buchner e gaze autoclavada o micélio foi lavado com água destilada estéril em abundância para retirada do carboidrato presente no meio. Espremeu-se a gaze para retirada o excesso de água, adicionou-se o micélio em um frasco estéril de ampicilina e congelou-se a amostra.

Após a obtenção do micélio em caldo nutritivo o DNA genômico foi isolado do micélio fungico coletado utilizando o protocolo de (Lee e Taylor, 1990).

Quatro loci foram amplificados e sequenciados como CmdA, His3, Tub2 e Tef1. As condições para amplificação no termociclador estão descritas na tabela 1. Os fragmentos foram sequenciados no senso e anti-senso utilizando primers específicos para a reação de PCR (Tabela 1) e BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit v. 3.1 (Applied Biosystems Life Technologies, Carlsbad, CA, USA).

O sequenciamento do DNA foi purificado através das colunas superfinais Sephadex G-50 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) em placas MultiScreen HV (Millipore, Billerica, MA). As sequências purificadas foram analisadas pelo Applied Biosystems 3730xl DNA Analyzer (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). As sequências de DNA geradas foram analisadas e as sequências do consenso foram analisadas utilizando o programa SeqMan v. 7.0 (Lasergene, Madison, WI, USA).

Tabela 1. Listagem de oligonucleotídeos e temperaturas de anelamento utilizados para amplificação na reação de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase).

Região Genômica	Iniciador	Sequência no oligonucleotídeo	Temperatura C°
Beta-tubulina	BT2A	5' GGT AAC CAA ATC GGT GCT GCT TTC 3'	58
Beta-tubulina	BT2B	5' AAC CTC AGT GTA GTG ACC CTT GGC 3'	58
Fator de elongação	EF1-728F	5' CAT CGA GAA GTT CGA GAA GG 3'	55
Fator de elongação	EF1-986R	5' TAC TTG AAG GAA CCC TTA CC 3'	55
Histona 3	H3-1A	5' ACTAAGCAGACCGCCCGCAGG 3'	52
Histona 3	H3-1B	5' GCGGGCGAGCTGGATGTCCTT 3'	52
Calmodulina	CAL-228F	5'-GAGTTCAAGGAGGCCTTCTCCC-3'	58
Calmodulina	CAL-737R	5'-CATCTTTCTGGCCATCATGG-3'	58

Análise filogenética

As sequências adicionais foram realizadas “download” do NCBI’s Gen-Bank nucleotide database (Tabela 2). O “download” e as sequências genéricas de cada gene foram alinhados com a versão “on line” de MAFFT v. 7 (Katoh & Standley, 2013). O alinhamento foi realizado manualmente checando e melhorando a sequência quando necessário utilizando o programa MEGA v. 7 (Kumar et al., 2016) e estas foram concatenadas utilizando alguns softwares.

Os métodos filogenéticos utilizados neste estudo incluíram análise bayesiana utilizando o programa MrBayes v. 3.2.6 (Ronquist et al. 2012), e a análise da máxima parsimônia foi utilizado o programa PAUP v. 4.0b10 (Swofford, 2003). A ausência de sequencias quando presentes, foi tratada com ausência de dados para análise. O programa MrMo-deltest v. 2.2 (Nylander 2004) foi utilizado para determinar o melhor modelo de substituição do nucleotídeo para cada partição dos dados afim de ordenar a performance do modelo otimizado da reconstrução filogenética Bayesiana. A análise de Markov Chain Monte Carlo (MCMC) para as quatro cadeias foi considerada utilizando uma topologia randômica e aleatória da árvore. O parâmetro foi definido pelo coeficiente 0,25 e as árvores foram salvas a cada 10 gerações até que o desvio padrão médio das frequências de divisão atingisse 0,01 (valor de parada). O burn-in foi definido como 25%, quando os valores de probabilidade eram estacionários. As filogenias Neighbour-Joining (NJ) realizadas com PAUP executaram 1000 réplicas de bootstrap usando o modelo HKY85. Nas análises de Parsimônia Máxima, as lacunas de alinhamento foram tratadas como estado de quinto caractere e todos os caracteres foram desordenados e de peso desigual.

Uma opção de pesquisa heurística com 100 adições de táxons aleatórios e bissecção e reconexão de árvore (TBR) como o algoritmo de troca de ramos foi usado. Galhos de comprimento zero foram derrubados e todas as árvores múltiplas e igualmente parcimoniosas foram salvas. A robustez das árvores obtidas foi avaliada por 1 000 replicações bootstrap (Hillis & Bull 1993).

Todas as árvores resultantes foram impressas com Geneious v. 7.0.6 (<http://www.geneious.com>) (Kearse et al. 2012).

Tabela 2. Listagem de sequências e respectivos genes da β -tubulina, calmodulina (CmdA), gene que codifica a biossíntese da histidina (His3) e fator de elongação 1 alfa (Tef1) comparados com o isolados *Cylindrocladium* sp. isolado a partir de morango indiano (*Duchesnea indica*).

Ord.	Sequências depositadas no GeneBank utilizados para comparação	Gene (Nº Acesso NCBI)			
		CmdA	His3	Tub2	Tef1
1	<i>Calonectria maranhensis</i> CBS 134829	KM396039.1	-	-	-
2	<i>C. maranhensis</i> CBS 134828	KM396038.1	-	-	-
3	<i>C. foliicola</i> strain CBS 136641	KJ463031.1	-	-	-
4	<i>C. maranhensis</i> strain CBS 134811	<u>KM396035.1</u>	-	-	-
5	<i>C. hodgesii</i> strain CBS 133610	KC491223.1	-	-	-
6	<i>C. hodgesii</i> strain CBS 133608	KC491221.1	-	-	-
7	<i>C. pseudohodgesii</i> strain CBS 134813	KM395989.1	-	-	-
8	<i>C. variabilis</i> strain CBS 112691	GQ267458.1	-	-	-
9	<i>C. variabilis</i> strain CBS 114677	GQ267457.1	-	-	-
10	<i>C. maranhensis</i> CBS 134825	KM396037.1	KM396120.1	KM395950.1	KM395863.1
11	<i>c. pseudoecuadoriae</i> strain CBS 111412	KX784590.1	-	-	KX784724.1
12	<i>C. lageniformis</i> strain CBS 112685	KX784575.1	-	KX784633.1	KX784703.1
13	<i>Calonectria</i> sp. NQP-2018i strain CMW 47430	MH119258.1	MH119192.1	MH119291.1	MH119225.1
14	<i>C. propaginicola</i> strain CBS 134820	KM396043.1	KM396126.1	KM395956.1	KM395869.1
15	<i>C. cerciana</i> strain CMW 25309	GQ267369.1	-	-	-
16	<i>C. propaginicola</i> strain LPF218	KM396045.1	KM396128.1	KM395958.1	KM395871.1
17	<i>C. propaginicola</i> strain CBS 134816	KM396041.1	KM396124.1	KM395954.1	KM395867.1
18	<i>C. propaginicola</i> strain CBS 134815	KM396040.1	KM396123.1	KM395953.1	KM395866.1
19	<i>C. papillata</i> strain CBS 136251	KJ463080.1	KJ463196.1	KJ462965.1	KJ462850.1
20	<i>C. papillata</i> strain CBS 136097	KJ463079.1	KJ463195.1	KJ462964.1	KJ462849.1
21	<i>C. sulawesiensis</i> strain CMW 14878	GQ267432.1	GQ267269.1	GQ267220.1	GQ267340.1
22	<i>C. hawksworthii</i> strain CBS 111870	GQ267386.1	DQ190649.1	-	FJ918558.1
23	<i>C. pseudonaviculata</i> strain CPC 3570	AY725769.1	AY725694.1	-	AY725731.1
24	<i>C. pseudohodgesii</i> strain CBS 134819	KM395992.1	KM396080.1	KM395906.1	KM395818.1
25	<i>C. brasiliensis</i> strain CBS 116078	-	GQ421780.1	GQ421772.1	GQ421788.1
26	<i>Cylindrocladium insulare</i> strain CBS 114558	-	FJ918526.1	-	FJ918556.1
27	<i>C. insulare</i> strain CBS 114559	-	FJ918525.1	-	FJ918555.1
28	<i>Calonectria pseudohodgesii</i> strain CBS 134818	KM395991.1	KM396079.1	KM395905.1	KM395817.1
29	<i>C. morganii</i> strain CPC 1722	-	GQ421787.1	-	GQ421795.1
30	<i>C. cylindrospora</i> strain CBS 110666	GQ267423.1	FJ918527.1	FJ918509.1	FJ918557.1
31	<i>C. morganii</i> strain CBS 119669	-	DQ521601.1	DQ521599.1	GQ421796.1
32	<i>Calonectria</i> sp. NQP-2018c strain CMW 47179	MH119255.1	MH119189.1	MH119288.1	MH119222.1
33	<i>C. papillata</i> strain CBS 136084	KJ463077.1	KJ463193.1	KJ462962.1	KJ462847.1
34	<i>C. terrestris</i> strain CBS 136651	KJ463126.1	KJ463242.1	KJ463009.1	KJ462896.1
35	<i>C. humicola</i> strain CMW 31186	GQ267446.1	GQ267283.1	GQ267234.1	GQ267354.1
36	<i>C. humicola</i> strain CMW 31183	GQ267445.1	GQ267282.1	GQ267233.1	GQ267353.1
37	<i>C. humicola</i> strain CMW 31187	GQ267447.1	GQ267284.1	GQ267235.1	GQ267355.1

38	<i>C. densa</i> strain CMW 31184	GQ267442.1	GQ267279.1	GQ267230.1	GQ267350.1
39	<i>Cylindrocladium pseudospathiphylli</i> strain 1624	-	AF348229.1	AF348213.1	-
40	<i>Calonectria densa</i> strain CMW 31185	GQ267443.1	GQ267280.1	GQ267231.1	Q267351.1
41	<i>C. brachiatica</i> strain CBS 134665	KM396020.1	KM396103.1	KM395933.1	KM395846.1
42	<i>C. brachiatica</i> strain CBS 134665	KM396020.1	KM396103.1	KM395933.1	KM395846.1
43	<i>C. telluricola</i> strain CBS 134663	KM396016.1	KM396099.1	KM395929.1	KM395842.1
44	<i>Calonectria</i> sp. CBS 134657	KM396005.1	KM396088.1	KM395918.1	KM395831.1
45	<i>C. paraensis</i> strain LPF306	KM396012.1	KM396095.1	KM395925.1	KM395838.1
46	<i>C. paraensis</i> strain LPF309	KM396014.1	KM396097.1	KM395927.1	KM395840.1
47	<i>C. pseudobrassicae</i> strain CBS 134661	KM396022.1	KM396105.1	KM395935.1	KM395848.1
48	<i>C. duoramosa</i> strain CBS 134656	KM396027.1	KM396110.1	KM395940.1	KM395853.1
49	<i>C. pini</i> strain CMW 31209	GQ267436.1	GQ267273.1	GQ267224.1	GQ267344.1
50	<i>C. matogrossensis</i> strain GFP018	MH837657.1	MH837652.1	MH837668.1	MH837663.1
51	<i>C. matogrossensis</i> strain GFP016	MH837656.1	MH837651.1	MH837667.1	MH837662.1
52	<i>C. matogrossensis</i> strain GFP007	MH837654.1	MH837649.1	MH837665.1	MH837660.1
53	<i>C. brassiana</i> strain CBS 134857	KM396058.1	KM396141.1	KM395971.1	KM395884.1
54	<i>C. robigophila</i> strain LPF190	KM396026.1	KM396109.1	KM395939.1	KM395852.1
55	<i>C. brasiliensis</i> strain CBS 230.51	GQ267421.1	GQ267259.1	GQ267241.1	GQ267328.1
56	<i>C. leucothoes</i> strain CBS 109166	GQ267392.1	FJ918523.1	FJ918508.1	-
57	<i>C. brasiliensis</i> strain CBS 114257	GQ267422.1	GQ267260.1	GQ267242.1	-
58	<i>C. glaeibicola</i> strain CBS 134853	KM396054.1	KM396137.1	KM395967.1	-
59	<i>C. glaeibicola</i> strain CBS 134852	KM396053.1	KM396136.1	KM395966.1	-
60	<i>C. hodgesii</i> strain CBS 133609	KC491222.1	-	KC491228.1	-
61	<i>C. ilicicola</i> strain CBS 115897	GQ267403.1	GQ267256.1	-	-
62	<i>C. ilicicola</i> strain CBS 190.50	AY725764.1	AY725676.1	AF333412.1	-
63	<i>C. brassiana</i> strain CBS 134855	KM396056.1	KM396139.1	KM395969.1	-
64	<i>C. candelabra</i> strain CPC 1679	GQ267368.1	GQ267246.1		-
65	<i>C. colombiensis</i> strain CBS 112220	AY725748.1	AY725662.1	GQ267207.1	-
66	<i>C. colombiensis</i> strain CBS 112221	AY725749.1	AY725663.1	AY725620.1	-
67	<i>C. eucalypticola</i> strain CBS 134846	KM396050.1	KM396133.1	KM395963.1	-
68	<i>C. eucalypticola</i> strain CBS 134847	KM396051.1	KM396134.1	KM395964.1	-
69	<i>C. metrosideri</i> strain CBS 133604	KC294305.1	KC294308.1	KC294314.1	-
70	<i>C. metrosideri</i> strain CBS 133605	KC294306.1	KC294309.1	KC294315.1	-
71	<i>C. nemuricola</i> strain CBS 134837	KM396066.1	KM396149.1	KM395979.1	-
72	<i>C. nemuricola</i> strain CBS 134838	KM396067.1	KM396150.1	KM395980.1	-
73	<i>C. pseudocerciana</i> strain CBS 134824	KM396049.1	KM396131.1	KM395962.1	-
74	<i>C. pseudometrosideri</i> strain CBS 134843	KM395993.1	KM396081.1	KM395907.1	-
75	<i>C. pseudometrosideri</i> strain CBS 134845	KM395995.1	KM396083.1	KM395909.1	-
76	<i>C. pseudospathulata</i> strain CBS 134841	KM396070.1	KM396153.1	KM395983.1	-
77	<i>C. silvicola</i> strain CBS 134836	KM396062.1	KM396145.1	KM395975.1	-
78	<i>C. chinensis</i> CBS 112744 (Outugroup)	AY725746	AY725660	-	-

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Identificação e caracterização do isolado de *Cylindrocladium* sp.

Sintomas: No campo os sintomas naturais da mancha-foliar-de-cilindrocladium-do-morango indiano ou crestamento-foliar-de-cilindrocladium-do-morango-indiano foram representados por lesões esféricas de halos páleo no mesófilo foliar e queima de bordos das folhas. Durante os processos incubação em câmara úmida além do *Cylindrocladium* sp. também foram detectados outros fitopatógenos, como *Cercospora* sp. Artificialmente os sintomas foram representados por lesões necróticas de tamanhos variáveis, de forma esférica, sem a presença de halos, e dentro do período de sete dias de avaliação observou-se em alguns hospedeiros a presença de sinais devido a presença de flocos ou aglomerações no micélio. Mas folhas inoculadas observou-se micélio de aspecto cotonoso na face adaxial e abaxial (mais frequente) da folha (Fig. 1AB) que em contato com o tecido sadio da folha provoca lesões de coloração marro-clara, as lesões avançam sobre os tecidos sadios provocando escurecimento (Fig. 1AB), sendo observado em algumas interações agressividades maiores e menores (AACPL da Tab. 3). Os sintomas nas hospedeiras inoculadas apresentaram-se reações de resistência onde o hospedeiro de origem (morango-indiano), não apresentou a maior agressividade (AACPL = 100,0), não sendo considerado o hospedeiro mais suscetível (Tab. 3). Os sintomas de lesões escuras em diferentes culturas infectadas por *Cylindrocladium* ocorrem em maior frequência na região do colo da planta que progride da base para o ápice da planta. (Aparecido et al., 2012).

Sinais: A olho em condições de câmara úmida a emissão de micélio foi verificada pelo aspecto cotonoso do micélio branco desenvolvido em ambas as faces foliares, já o início da formação de sinais foi detectado pela presença de flocos e aglomerados representados por massas de conídios em ambas as faces foliares, permitindo assim a detecção dos períodos incubação e períodos de latência. Após 48 horas foi observado início da esporulação flocosa e

esbranquiçada nas plantas hospedeira, ou seja, inicialmente foram detectados a presença de sintomas e depois a presença de sinais (Amorim e Pascholati, 2018). As características morfológicas do isolado analisado foram – *micélio* apresenta colônias efusas, finas, flocosas, brancas, com hifas estéreis rastejantes e ramificadas, delgada, indistinta, hifa fértil e fina, ereta, hialina, ramificada, septada, cimosamente septada acima; *conidióforos* curtos, penicilados, dispostos em pares ou apresentando três ramificações (Fig. 1C), cada um produzindo um conídio, de dimensões 5,878 x 149,23 µm; *conídios* bicelulares, simples, obtusos, cilíndrico voltado ao ápice (Fig. 1E), uniseptado, hialino, obtuso (Fig. 1D), de dimensões 43,202 x 3,614 µm; *vesícula terminal* elipsoidal (Fig. 1D) de dimensões 9,297 x 24,043 µm.

O isolado de *Cylindrocladium* sp. oriundo de morango indiano apresentou características morfoculturais, morfometria conídios e da vesícula terminal se ajustaram com a caracterização de isolados de *Cylindrocladium* spp. ajustando-se na espécie *C. scoparium* (Aparecido et al., 2008; Crous et al., 1991). De acordo com Index Fungorum (2021) a espécie *Cylindrocladium scoparium* atualmente seu táxon é designado como *Calonectria morganii* sensu Crous, Alfenas & M.J. Wingf (1993). Ainda no mesmo banco de dados o táxon *C. scoparium* var *brasiliense* bat & Cif. (1952) é designado atualmente como *Calonectria brasiliense*. Assim o nome válido do anamorfo baseando em aspectos de taxonomia clássica agente causal do cretamento-foliar-do-morango-indiano é *Cylindrocladium brasiliense* (Bat. & Cif) Peerally (1974) e o seu teleomorfo *Calonectria brasiliensis*. É importante ressaltar que a literatura considera como táxon e agente causal da doença o teleomorfo, assim designando o agente causal como sendo *Calonectria brasiliensis*. Na descrição original da espécie não se faz menção a respeito do tamanho e forma da clava e vesícula e sua forma que é uma característica decisiva para identificação morfológica (Crous et al., 1991).

De acordo Crous e Wingfield (1994) as *Calonectria* spp. em sua fase anamórfica representada por *Cylindrocladium* spp., caracteriza-se por apresentar esporulação esbranquiçada, apresentando conidióforos penicilados de onde se originam uma estrutura denominada estipe terminando em uma vesícula de formato variado e conídios cilíndricos.

No mundo existem apenas nove relatos de ocorrência de *Cylindrocladium brasiliense* (teleomorfo *Calonectria brasiliensis*) infectando *Arenga engleri* em Hong Kong (Lu et al. 2000; Zhuang, 2001), *Eucalyptus alba* no Brasil (Crous et al., 1989), *E. citriodora* no Brasil (Crous et al., 1989), *E. grandis* no Brasil (Crous et al., 1989), *E. maculata* no Brasil (Crous et al., 1989), *E. saligna* no Brasil (Crous et al., 1989), *Phoenix hanceana* em Hong Kong (Crous et al., 1989, Zhuang, 2001). Este é o primeiro registro de ocorrência em 1. Mandioca (*Manihot esculenta* - Euphorbiaceae), 2. Goiaba (*Psidium guajava* - Myrtaceae), 3. Cabaça (*Lagenaria siceraria* Cucurbitaceae), 4. Pimenta Trindade Scorpion (*Capsicum chinense* Solanaceae), 5. Eucalipto (*Eucalyptus globulus* Myrtaceae), 6. Pêssego (*Prunus persica* Rosaceae), 7. Morango indiano (*Duchesnea indica* Rosaceae), 8. Morango (*Fragaria × ananassa* Rosaceae), 9. Roseira-miniatura (*Rosa chinensis* Rosaceae), 10. Rosa-arbustiva (*Rosa × grandiflora* Rosaceae), 11. Roseira-miúda (*Rosa banksiae* Rosaceae), 12. Roseira-rugosa (*Rosa rugosa* Rosaceae), 13. Roseira-trepadeira (*Rosa wichuraiana* Rosaceae) e 14. Mini-rosa (*Rosa roletti* Rosaceae)(Tabela 3).

Teste de patogenicidade e circulo de hospedeiros de *Calonectria* sp. oriundo de morango indiano.

Os valores de AACPD permitira reconhecer os hospedeiros mandioca, cabaça, pimenta Trindade Scorpion e morango como mais suscetíveis, e roseira rugosa e pêssego como mais resistente ao isolado oriundo de morango indiano.

Não foi identificado a fase teleomórfica nas amostras naturais e inoculadas com o isolado de *Cylindrocladium* sp. oriundo de morango indiano.

O isolado *Cylindrocladium* sp. oriundo de morango-indiano foi patogênico a todos os 14 hospedeiros inoculados (Tabela 3).

Após 24 horas após a inoculação nenhum hospedeiro expressou sintomas, sendo observado a partir do segundo dia a presença de lesões em cabaça (19 mm de diâmetro de lesão) e morango (11 mm de diâmetro de lesão). Somente após 48 horas o hospedeiro de origem comprovou a patogenicidade do isolado. Após três dias de incubação o isolado continuou sendo avirulento (sensu Andrivon, 1993) em goiaba, eucalipto e pêsego, sendo os hospedeiros mais suscetíveis cabaça (39 mm de diâmetro de lesão) e morango (28 mm de diâmetro de lesão). Após quatro dias de incubação nenhum isolado foi avirulento sendo todos hospedeiros do fitopatógeno, sendo os hospedeiros mais suscetíveis mandioca (51 mm de diâmetro de lesão), cabaça (44 mm de diâmetro de lesão), pimenta trindade Scorpion (44 mm de diâmetro de lesão) e morango (39 mm de diâmetro de lesão). Após cinco dias de incubação os hospedeiros mais suscetíveis mandioca (54 mm de diâmetro de lesão), cabaça (47 mm de diâmetro de lesão), pimenta trindade Scorpion (49 mm de diâmetro de lesão), eucalipto (48 mm de diâmetro de lesão) e morango (49 mm de diâmetro de lesão). Após seis dias de incubação os hospedeiros mais suscetíveis repetiram os padrões do quinto dia. E por fim ao sétimo dia os hospedeiros mais suscetíveis foram os mesmos do quinto e sextos dias, sendo adicionado a goiaba (52 mm de diâmetro de lesão). O progresso do crescimento da lesão nos sete dias de avaliação pouco alterou-se em pêsego e roseira rugosa (Tab. 3 e Figura 2AB).

A área abaixo da curva de progresso da lesão (AACPL) representa um resumo da epidemiologia da doença no período de avaliação, permitindo designar o tipo de reação do isolado nos agora identificados também hospedeiros de *Cylindrocladium* sp. Os hospedeiros de reação suscetível foram 1. Mandioca (*Manihot esculenta* - Euphorbiaceae), 3. Cabaça

(*Lagenaria siceraria* Cucurbitaceae) e 4. Pimenta Trindade Scorpion (*Capsicum chinense* Solanaceae); os hospedeiros de reação intermediária foram 2. Goiaba (*Psidium guajava* - Myrtaceae), 5. Eucalipto (*Eucalyptus globulus* Myrtaceae), 7. Morango indiano (*Duchesnea indica* Rosaceae), 8. Morango (*Fragaria* × *ananassa* Rosaceae), 9. Roseira-miniatura (*Rosa chinensis* Rosaceae), 10. Rosa-arbustiva (*Rosa* × *grandiflora* Rosaceae), 11. Roseira-miúda (*Rosa banksiae* Rosaceae), 13. Roseira-trepadeira (*Rosa wichuraiana* Rosaceae), 14. Mini-rosa (*Rosa roletti* Rosaceae); os hospedeiros de reação resistentes foram 6. Pêssego (*Prunus persica* Rosaceae) 12. Roseira-rugosa (*Rosa rugosa* Rosaceae) (Tabela 3 e Figura 3A).

A agressividade pode ser definida como a quantidade de doença produzida pelo fitopatógeno (*sensu* Andrivon, 1993), desta forma a maior agressividade foi observada nos hospedeiros designados como suscetíveis (Tabela 3 e Figura 3A).

O tamanho da lesão nos sete dias de avaliação apresentou uma taxa aparente de progresso de 11, 12 e 10 mm dia⁻¹, em mandioca, pimenta Trindade Scorpion e eucalipto, explicando a reação de suscetibilidade observada anteriormente (Tabela 3 e Figura 3B). A taxa aparente de infecção caracteriza que o crestamento foliar do morango indiano é uma doença policíclica, de juro compostos e provavelmente ajusta-se ao modelo logístico (Bergamin Filho et al., 2018). As análises epidemiológicas baseadas na taxa de infecção aparente e na quantidade de inóculo inicial pode ser expressa por $y = y_0 e^{rt}$ onde y representa a proporção da doença, t tempo, y_0 o inóculo inicial e r a taxa média e aparente de infecção durante o qual o hospedeiro esteve exposto ao patógeno, o conhecimento de r ou TAI permite a indicação de medidas de controle mais adequadas, e se essas medidas forem elevadas deve-se utilizar medidas de controle que reduzam TAI como proteção pelo uso fungicidas, imunização e resistência horizontal, serão mais satisfatórias para o desenvolvimento de epidemias. Se os valores de TAI forem baixos como observados para os demais hospedeiros uma pequena redução do inóculo inicial será suficiente e medidas como exclusão, erradicação, evasão, imunização e resistência horizontal

podem ser suficientes para controle do crestamento-foliar-de-cilindrocladium (Bergamin Filho e Amorim, 2018).

Ao analisar as curvas de progresso ao terceiro dia houve uma grande expansão da lesão em cabaça e roseira miúda, os demais hospedeiros apresentaram um diâmetro médio de lesão na amplitude de 10-32 mm (Figura 2A). No segundo experimento o pico de expansão do tecido lesionado foi observado a partir do terceiro dia, ficando o hospedeiro de origem do isolado (morango-indiano) a menor curva e área de tecido lesional (Figura 2B). Não se pode aferir a respeito da estabilização do progresso de expansão da lesão devido a finalização de tecido sadio em alguns hospedeiros (área de tecido vegetal variável).

Os hospedeiros de reação suscetível de acordo com a AACPL (Tabela 3) foram 1. Mandioca (*Manihot esculenta* - Euphorbiaceae), 3. Cabaça (*Lagenaria siceraria* Cucurbitaceae) e 4. Pimenta Trindade Scorpion (*Capsicum chinense* Solanaceae); de acordo com Bergamin Filho e Amorim (1996) plantas que apresentam períodos de latência e incubação em dias baixos são características epidemiológicas de plantas suscetíveis. O menor PI foi observado em mandioca, cabaça (confirmando os dados de AACPL), no entanto, além destes morango, morango-indiano, roseira-miúda, roseira-trepadeira e roseira-arbustiva também apresentaram os menores PI (Figura 4A). A esporulação que representa também a capacidade de reprodução do fitopatógeno representado pelo parâmetro epidemiológico período de latência, não foi observada nos hospedeiros pêssego, goiaba e roseira rugosa (Figura 4B), que de acordo com AACPL foram considerados resistentes, desta forma o patógeno dentro do período de avaliação, não conseguiu fechar o ciclo das relações patógeno-hospedeiro e desenvolver partir para ciclos secundários da doença (Amorim e Pascholati, 2018).

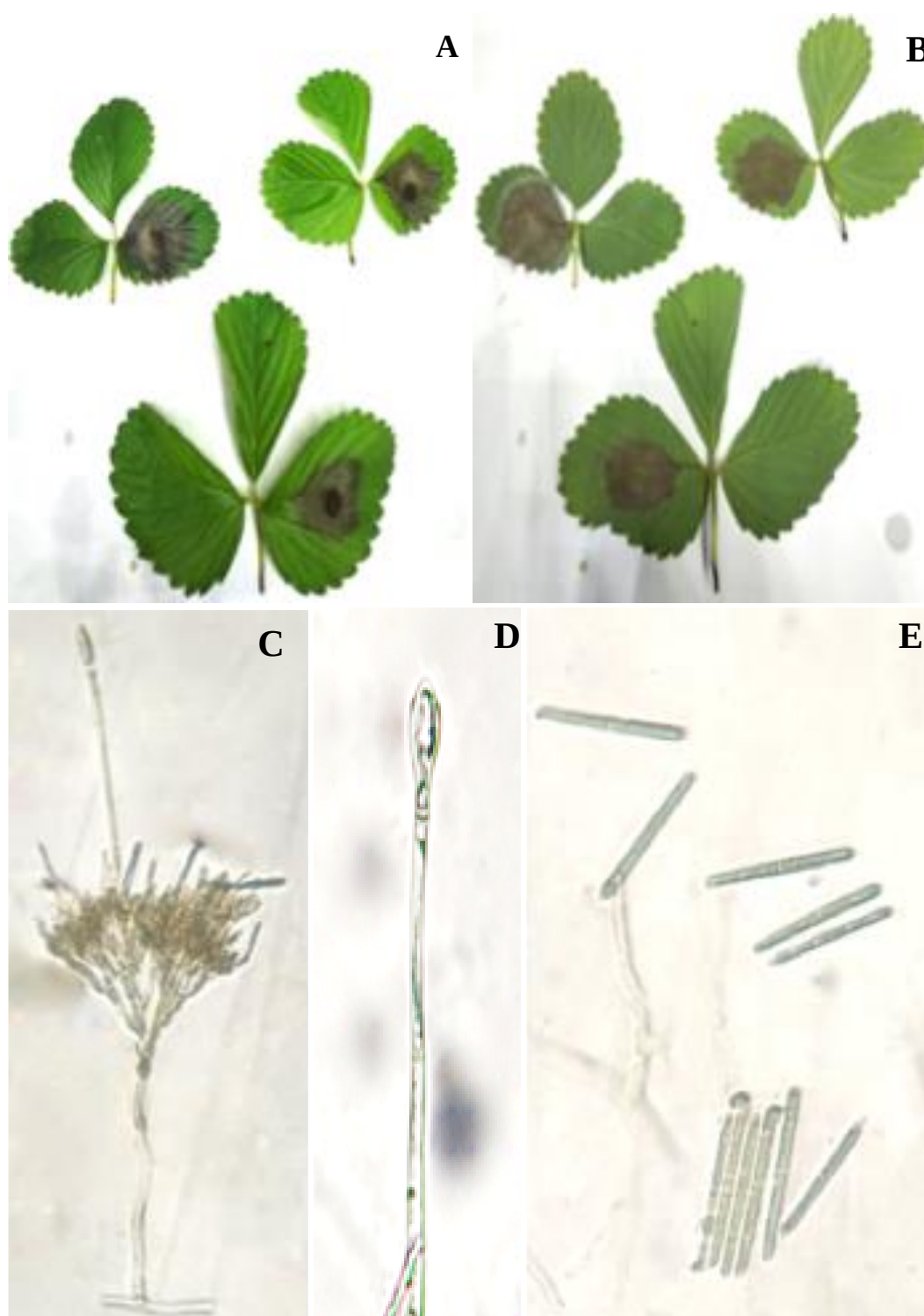


Figura 1. Sintomatologia da podridão de *Cylindrocladium* sp. em folhas de morango indiano (*Duchesnea indica*) **A.** sintomas artificiais na face adaxial, **B.** sintomas artificiais na face abaxial, **C.** Conidióforos penicilados de onde se originam uma estrutura denominada estipe, **D.** Estipe com vesícula terminal elipsoidal, **E.** Conídios cilíndricos, hialinos e bicelulares.

Tabela 3. Patogenicidade (P), diâmetro da lesão em diferentes dias após a inoculação (DAI), área abaixo da curva de progresso da lesão (AACPL) e taxa de infecção aparente (TIA)*.

Hospedeiras Testadas	Diâmetro da lesão (mm) em dias após a inoculação (DAI)								AACPL	TIA
	P	1	2	3	4	5	6	7		
1. Mandioca (<i>Manihot esculenta</i> - Euphorbiaceae)	+	0 a	0 d	25 b	51 a	54 a	55 a	56 a	214,0 a	11 a
2. Goiaba (<i>Psidium guajava</i> - Myrtaceae)	+	0 a	0 d	0 d	14 c	24 b	31 b	52 a	95 d	9 b
3. Cabaça (<i>Lagenaria siceraria</i> Cucurbitaceae)	+	0 a	19 a	39 a	44 a	47 a	48 a	49 a	221 a	7 b
4. Pimenta Trindade Scorpion (<i>Capsicum chinense</i> Solanaceae)	+	0 a	0 d	7 c	44 a	49 a	61 a	61 a	192 a	12 a
5. Eucalipto (<i>Eucalyptus globulus</i> Myrtaceae)	+	0 a	0 d	0 d	30 b	48 a	48 a	48 a	150 b	10 a
6. Pêssego (<i>Prunus persica</i> Rosaceae)	+	0 a	0 d	0 d	0 d	11 c	12 c	13 d	30 e	2 e
7. Morango indiano (<i>Duchesnea indica</i> Rosaceae)	+	0 a	6 c	12 c	20 c	23 b	26 b	26 c	100 d	4 d
8. Morango (<i>Fragaria</i> × <i>ananassa</i> Rosaceae)	+	0 a	11 b	28 b	39 a	46 a	54 a	56 a	206 a	9 b
9. Roseira-miniatura (<i>Rosa chinensis</i> Rosaceae)	+	0 a	2 c	5 c	13 c	20 b	26 b	27 c	81 d	5 d
10. Rosa-arbustiva (<i>Rosa</i> x <i>grandiflora</i> Rosaceae)	+	0 a	2 c	5 c	12 c	18 b	35 b	38 b	92 d	7 c
11. Roseira-miúda (<i>Rosa banksiae</i> Rosaceae)	+	0 a	4 c	7 c	12 c	23 b	24 b	25 c	83 d	5 d
12. Roseira-rugosa (<i>Rosa rugosa</i> Rosaceae)	+	0 a	1 d	3 d	4 d	6 c	8 c	12 d	29 e	2 e
13. Roseira-trepadeira (<i>Rosa wichuraiana</i> Rosaceae)	+	0 a	3 c	9 c	17 c	29 b	34 b	34 b	109 c	6 c
14. Mini-rosa (<i>Rosa roletti</i> Rosaceae)	+	0 a	1 d	10 c	13 c	14 c	22 b	23 c	72 d	4 d
Valor de F (Pr>F)		0,0000 ^{ns}	0,0000**	0,0000**	0,0000**	0,0000**	0,0000**	0,0000**	0,0000**	0,0000**
Coeficiente de variação (CV)		0%	50%	35%	32%	22%	18%	16%	18%	17%

*Médias seguidas de mesma letra na vertical não diferem entre si no teste Skott-Knott P~0,05.

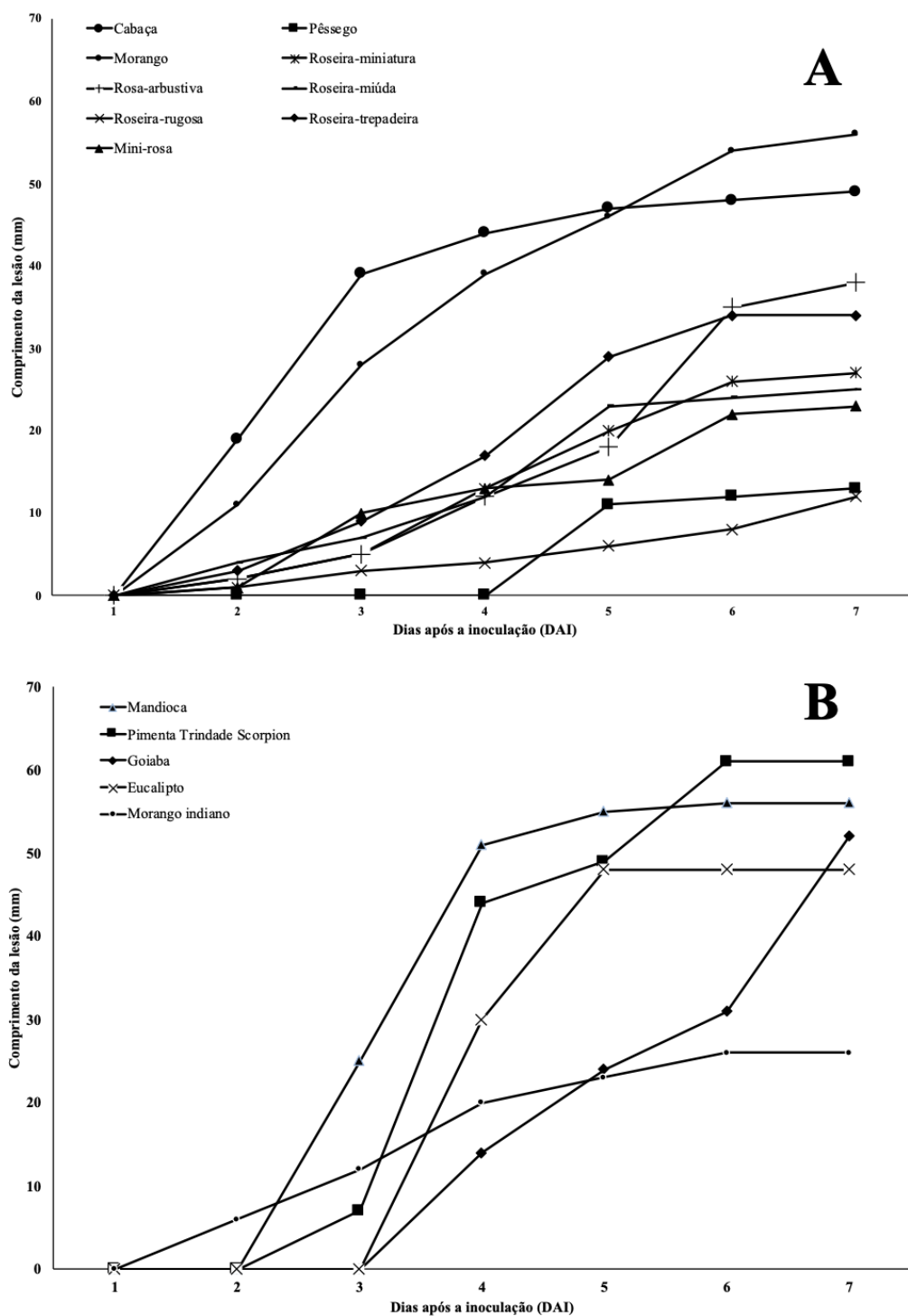


Figura 2. Curva de progresso do crescimento da lesão de diferentes hospedeiros inoculados com *Cylindrocladium* sp. isolado de morango indiano. **A.** primeiro experimento, **B.** segundo experimento.

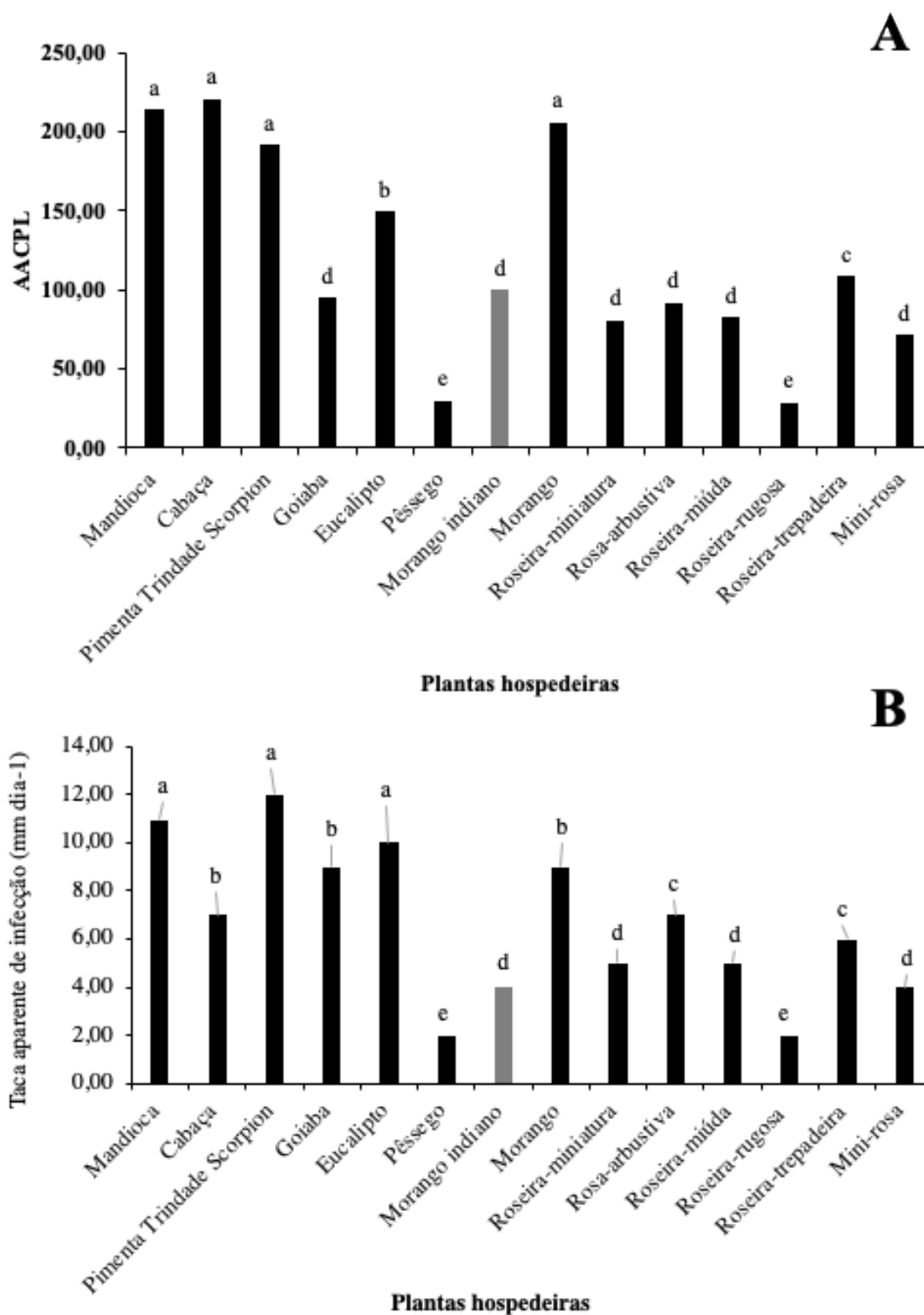


Figura 3. Parâmetros epidemiológicos de hospedeiros inoculados com *Cylindrocladium* sp. oriundo de morango-indiano. **A.** área abaixo da curva de progresso da lesão (AACPL), **B.** taxa de infecção aparente (TIA).

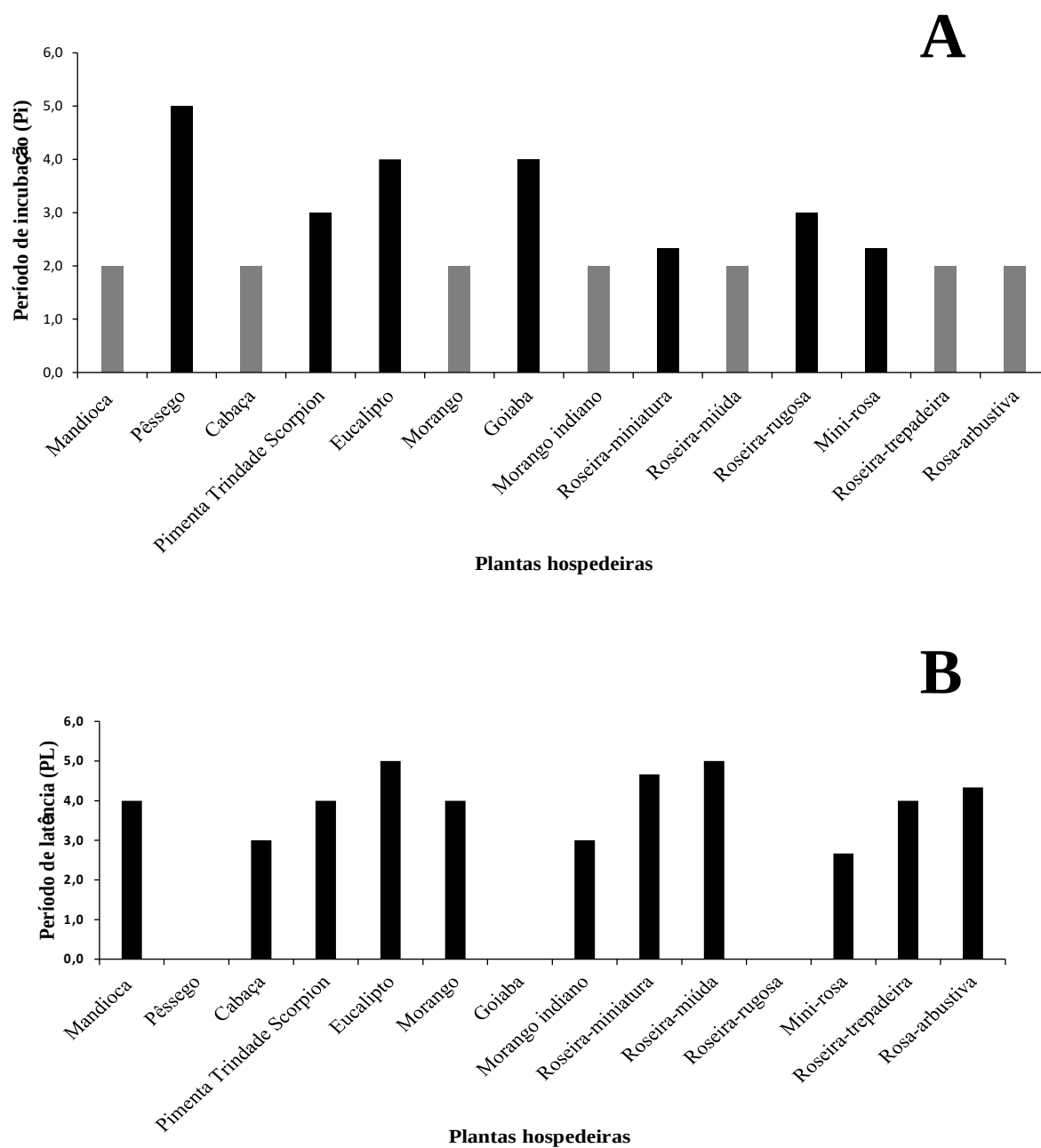


Figura 4. Período de incubação (A) e período de latência (B) em dias em diferentes espécies inoculadas com *Cylindrocladium* sp. oriundo de morango-indiano.

Sequenciamento de quatro genes de *Cylindrocladium*:

De acordo com a árvore filogenética e comparação com os quatro genes (calmodulina [CmdA], histona 3 [His3], β -tubulina [Tub2], fator de elongação [Tef1]) relatados já relatados em estudo de populações de *Cylindrocladium* por Lombard et al. (2010), Alfenas et al. (2014) e Kang et al., (2001).

Na análise filogenética com isolados de *Calonectria* e *Cylindrocladium* depositados no gene banco, comparando as sequencias o isolado apresentou similaridade de 89,7% para a espécie *Calonectria brasiliensis*.

Utilizando critérios de taxonomia clássica representados pela análise de um conjunto de aspectos morfológicos e morfométricos comparados com descrições e/ou chaves de identificação de espécies de *Cylindrocladium* o isolado fitopatogênico comprovado pelo teste de patogenicidade em folhas de morango indiano foi identificado como *Calonectria brasiliensis*. Procurando associar ampliar a precisão e acurácia do agente causal, o uso de 4 marcadores moleculares também convergiu na identificação do isolado como *Calonectria brasiliensis*.

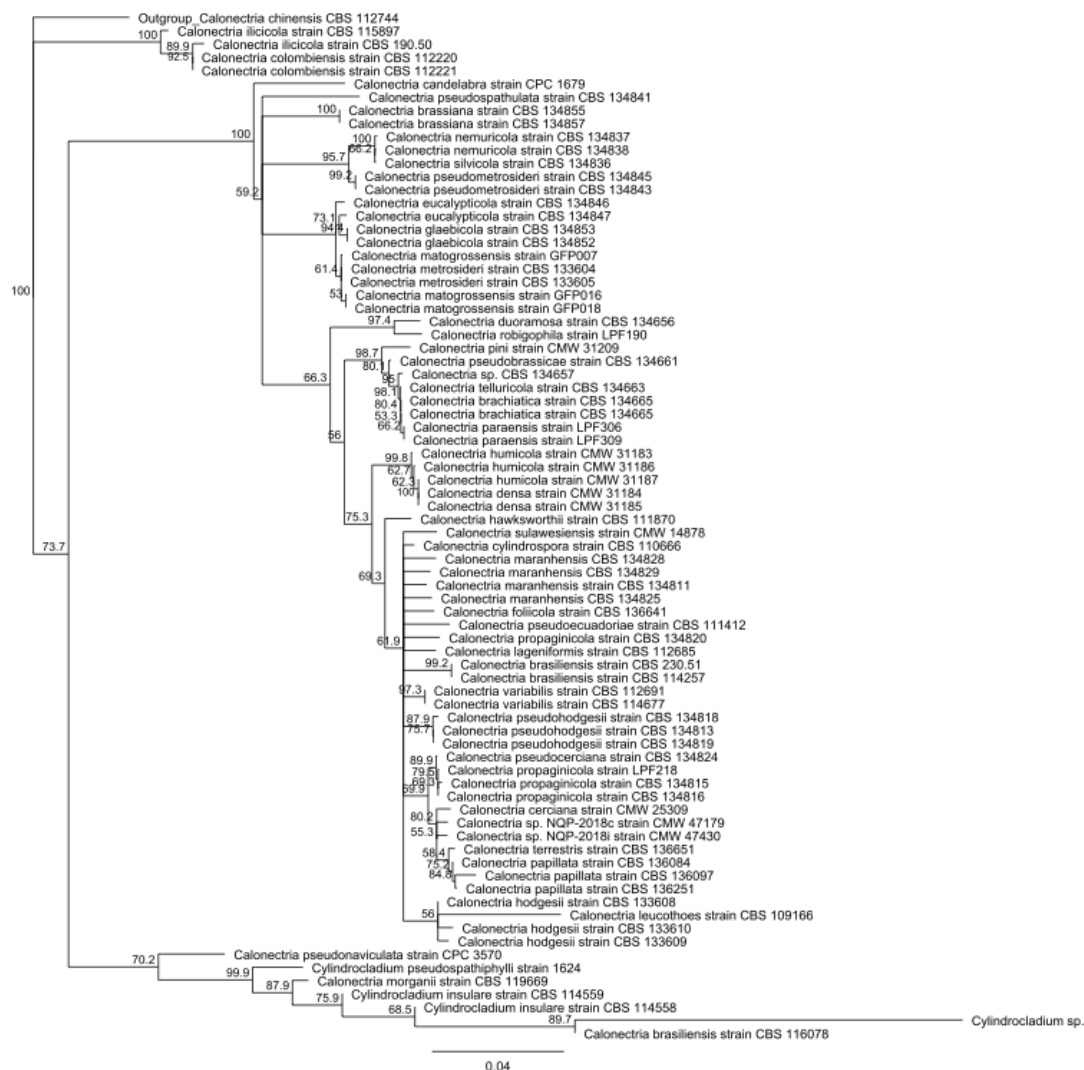


Figura 5. Máxima parcimônia de arvores obtidas de buscas heurísticas de cada uma das 78 sequências adicionadas mediante o alinhamento das sequências dos genes β -tubulina, calmodulina (CmdA), gene que codifica a biossíntese da histidina (His3) e fator de elongação 1 alfa (Tef1). A barra de escala mostra 10 trocas e os valores do suporte do Bootstrap para 1000 repetições para geração das clades. As linhas indicam as ramificações presentes no stricto consenso da árvore. A árvore foi rodada para um isolado de *Cylindrocladium* detectado em morango indiano.

CONCLUSÕES

Com base nos estudos realizado, foi observado que o isolado foi patogênico em todas as plantas testadas. As plantas que apresentaram maior AACPD foram Cabaça, Mandiocas e Morango respectivamente, as plantas que apresentaram menor AACPD foram Roseira-rugosa e Pêssego. O período de incubação foi menor nas espécies mandioca, cabaça, morango, morango indiano, roseira-miúda, roseira-trepadeira e rosa-arbustiva. As espécies de pêssego, goiaba e roseira-rugosa não apresentaram período de latência, os maiores períodos de latência foram nas espécies de eucalipto, roseira-miúda e roseira-miniatura. A análise morfológica e filogenética apontou que o isolado pertencente a espécie *Cylindrocladium. scoparium var. brasiliensis*. Este é o primeiro registro deste patógeno incidente em folhas de *Duchesnea indica* e de amplo círculo de hospedeiros.

Utilizando critérios de taxonomia clássica representados pela análise de um conjunto de aspectos morfológicos e morfométricos comparados com descrições e/ou chaves de identificação de espécies de *Cylindrocladium* o isolado fitopatogênico comprovado pelo teste de patogenicidade em folhas de morango indiano foi identificado como *Calonectria brasiliensis*. Procurando associar ampliar a precisão e acurácia do agente causal, o uso de 4 marcadores moleculares também convergiu na identificação do isolado como *Calonectria brasiliensis*.

REFERÊNCIAS

ALFENAS, A.C. Fungos do gênero *Cylindrocladium* como patógenos florestais no Brasil. *Fitopatologia Brasileira*, v. 11, p. 275-277, (1986).

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. *Stud. Mycol.*, v.80, p. 89–130, 2014.

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, p. 89–130, 2015.

AMORIM, L., PASCHOLATI, S. Ciclo das relações patógeno-hospedeiro. In: AMORIM, L. REZENDE, J.A.M., BERGAMIN FILHO, A. *Manual de fitopatologia, princípios e conceitos*, Ouro Fino, MG: Editora Agronômica Ceres, p. 46–68. 2018.

ANDRIVON, D. Nomenclature for pathogenicity and virulence: the need for precision. *Phytopathology*. v. 83, p. 889–890. 1993.

APARECIDO, C.C., FINATTI, D. Impacto do gênero *Cylindrocladium* para diferentes culturas. (2012). *Artigo em Hypertexto*. Disponível em: <http://www.infobibos.com/Artigos/2012_2/cylindrocladium/index.htm>. Acesso em: 11/11/2020.

APARECIDO, C.C., FURTADO, E.L., FIGUEIREDO, M. Caracterização morfofisiológica de isolados do gênero *Cylindrocladium*. *Summa Phytopathol.* V. 34, p. 38–47. 2008.

ARIAS, ME. *Frutillas silvestres e espécies relacionadas com a cultura*, 1ª ed. Universidad Nacional de Tucumán, Tucumán, Argentina, 2007.

BERGAMIN FILHO, A., AMORIM, L. Doenças de plantas tropicais: epidemiologia e controle econômico. 1a. Ed. São Paulo, SP: Editora Agronômica Ceres. 1996.

BERGAMIN FILHO, A., AMORIM, L. Princípios gerais de controle. In: AMORIM, L. REZENDE, J.A.M., BERGAMIN FILHO, A. *Manual de fitopatologia, princípios e conceitos*, Ouro Fino, MG: Editora Agronômica Ceres, p. 215–227. 2018.

BERGAMIN FILHO, A., AMORIM, L., WILLOCQUET, L., SAVARY, S. Epidemiologia de doenças de plantas. In: AMORIM, L. REZENDE, J.A.M., BERGAMIN FILHO, A. *Manual de fitopatologia, princípios e conceitos*, Ouro Fino, MG, p. 71–83. 2018.

BOITEUX, L.S., FONSECA, M.E.N., SIMON, P.W. Effects of plant tissue and DNA purification method on randomly amplified polymorphic DNA-based genetic fingerprinting analysis in carrot. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, v. 124, p. 32-38, 1999.

COUTINHO, L.N., APARECIDO, C.C., FIGUEIREDO, M.B. Podridão de colo de plantas de lírio da paz (*Spathiphyllum wallisii*) causada por fungo do gênero *Cylindrocladium*. *Fitopatologia Brasileira*, v. 26 (supl.), p. 427, 2001.

CROUS, P. W. Taxonomy and Pathology of *Cylindrocladium* (*Calonectria*) and allied genera. *American Phytopathological Society Press. Saint Paul - Minnesota*. 278p. 2002.

CROUS, P.W. Taxonomy and pathology of *Cylindrocladium* (*Calonectria*) and allied genera. 1a. Ed. St. Paul, Minnessota, USA: American Phytopathological Society. 2002.

CROUS, P.W., 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., KNOX-DAVIES, P.S., WINGFIELD, M.J. A list of Eucalyptus leaf fungi and their potential importance to South African Forestry. *S. African Forest. J.*, v. 149, p. 17-29. 1989.

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., WINGFIELD, M.J. A monograph of *Cylindrocladium*, including anamorphous of *Calonectria*. *Mycotaxon*, v. 51, p. 341-435, 1994.

DEBES, M.A., ARIAS, M.E., GRELLET-BOURNONVILLE, C.F., WULF, A.F., MARTINEZ-ZAMORA, M.G., CASTAGNARO, A.P., RICCI, J.C.D. White-fruited *Duchesnea indica* (Rosaceae) is impaired in ANS gene expression. *American Journal of Botany*, v. 98, n. 12, p. 2077-2083, 2011.

DIANESE, J.C., RIBEIRO, W.R.C., URBEN, A.F. Root rot of soybean caused by *Cylindrocladium clavatum* in Central Brazil. *Plant Disease*, v. 70, p. 977-980, 1986.

FARR, D.F., ROSSMAN, A.Y. Fungal Databases, U.S. National Fungus Collections, ARS, USDA. Disponível em <<https://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/>>, acessado em 07/02/2021.

FERREIRA, F.A. Patologia Florestal – Principais doenças florestais no Brasil. Viçosa: *Sociedade de Investigações Florestais*. 570 p, 1989.

FERREIRA, M.A.S.V., DIANESE J.C. Screening soybean germplasm for resistance to *Cylindrocladium clavatum*. *International Journal of Pest Management*, v. 45, p. 249-253, 1999.

HILLIS, D.M., BULL, J.J. An empirical test of bootstrapping as a method for assessing

confidence in phylogenetic analysis. *Systematic Biology*, v. 42, p. 182-192, 1993.

KANG, J. C., CROUS, P. W., SCHOCH, C. L. Species concepts in the *Cylindrocladium floridanum* and *C. spathiphylli* Complexes (Hypocreaceae) based on multi-allelic sequence data, sexual compatibility and morphology. *Syst. Appl. Microbiol.*, v. 24, p. 206–217. 2001.

KATOH, K., STANDLEY, D.M. MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in Performance and Usability. *Molecular Biology and Evolution*, v. 30, p.772–780. 2013.

KEARSE, M., MOIR, R., WILSON A, STONES-HAVAS, S., CHEUNG, M., STURROCK, S., BUXTON, S., COOPER, A., MARKOWITZ, S., DURAN, C., THIERER, T., ASHTON, B., MEINTJES, P., DRUMMOND, A. Genious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, v. 28, p. 1647–1649, 2012.

KIM, I.G, JUNG, I.L., OH, T.J., KIM, K.C., SHIM, H.W. The polysaccharide enriched fraction isolated from *Duchesnea chrysantha* protects against oxidative damage. *Biotechnol. Lett.*, v. 24, pp. 1299-1305, 2002.

KIM, K.C., KIM, J.S. , SON, J.K., KIM, I.G. Enhanced induction of mitochondrial damage and apoptosis in human leukemia cells HL-60 by extracts of *Ganoderma lucidum* and *Duchesnea chrysantha*. *Cancer Lett.*, 246 , p. 210-217, 2007.

KUMAR S, STECHER G, TAMURA K MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution*, v. 33: p. 1870–1874, 2016.

LEE, I.R., KIM, Y.H. Estudos sobre a atividade antitumoral de *Duchesnea indicae*. *Herba Arco. Pharm. Res.*, v. 9, pp. 1-4, 1986.

LEE, S. B., TAYLOR, J. W. Isolation of DNA from fungal mycelia and single spores. In PCR Protocols: A guide to methods and applications, org. White TJ Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ. San Diego, California: Academic Press, p. 282–287. 1990.

LOBARD, 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, p. 159–198, 2016

LOMBARD, L., CROUS, P. W., WINGFIELD, B. D., WINGFIELD, M. J. Phylogeny and systematics of the genus *Calonectria*. *Stud. Mycol.*, v. 66, p. 31–69. 2010.

LOMBARD, L., CROUS, P.W. Phylogeny and taxonomy of the genus *Gliocladiopsis*. *Persoonia* v.28, p.25–33, 2012.

LOMBARD, L., CROUS, P.W., WINGFIELD, B.D., WINGFIELD, M.J. Phylogeny and systematics of the genus *Calonectria*. *Studies in Mycology* v. 66, p. 31–69, 2010b.

LOMBARD, L., CROUS, P.W., WINGFIELD, B.D., WINGFIELD, M.J. Species concepts in *Calonectria* (*Cylindrocladium*). *Studies in Mycology*, v.66, p.1–14, 2010a.

LOMBARD, L., VAN DER MERWE, N.A., GROENEWALD, J.Z., CROUS, P.W. Generic concepts in Nectriaceae. *Studies in Mycology*, v. 80, p. 189–245, 2015.

LU, B., HYDE, K.D., HO, W.H., TSUI, K.M., TAYLOR, J.E., WONG, K.M., YANNA, AND ZHOU, D. Checklist of Hong Kong Fungi. Fungal Diversity Press, Hong Kong, 207 pp., 2000.

MARIN-FELIX, Y., GROENEWALD, J.Z., CAI, L., CHEN, Q., MARINCOWITZ, S., BARNES, I., BENSCH, K., BRAUN, U., CAMPORESI, E., DAMM, U., DE BEER, Z.W., DISSANAYAKE, A., EDWARDS, J., GIRALDO, A., HERNANDEZ-RESTREPO, M., HYDE, K.D., JAYAWARDENA, R.S., LOMBARD, L., LUANGSA-ARD, J., MCTAGGART, A.R., ROSSMAN, A.Y., SANDOVAL-DENIS, M., SHEN, M.; SHIVAS,

R.G., TAN, Y.P., VAN DERLINDER, E.J., WINGFIELD, M.J., WOOD, A.R., ZHANG, J.Q., ZHANG, Y., CROUS, P.W. Genera of phytopathogenic fungi: GOPHY 1. *Studies in Mycology*, v. 86, p.99216, 2017.

MYCOBANK DATABASE Fungal Databases, Nomenclature & Species Banks – *International Mycological Association*. Disponível em: <<http://www.mycobank.org/>>, (Acessado em 17 de novembro de 2020).

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

ROMOLEROUX, K. Rosaceae no Páramo do Equador. Em Balslev H. & JL Luteyn (eds.) *Páramo: An Andean Ecosystem under Human Influence*: p. 85-94, 1992.

RONQUIST, F., TESLENKO, M., VAN DER MARK, P., AYRES, D.L., DARLING, A., HÖHNA, S., LARGET, B., LIU, L., SUCHARD, M.A., HUELSENBECK, J.P. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice, across a large model space. *Systematic Biology*, v.61, p. 539–542. 2012.

SHANNER, G., FINNEY, R. 1977. The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in Knox wheat. *Phytopathology*. 67:1051–1056.

SWOFFORD, D.L. PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and other methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, MA, U.S.A. 2002.

SWOFFORD, D.L. PAUP*. Phylogenetic analysis using parsimony (*and their methods). Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts. Version 4. 2003

ZHUANG, W.Y. Higher Fungi of Tropical China. Mycotaxon, Ltd., Ithaca, NY, 485 pp., 2001.