

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, PATOGÊNICA, DE MATING-
TYPE E GENÉTICA DE ISOLADOS DE *Cylindrocladium* spp. E
Cylindrocladiella spp.**

CHRISTIANE CERIANI APARECIDO

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agronômicas da UNESP - Campus de Botucatu, para a obtenção do título de Doutor em Agronomia - Área de Concentração em Proteção de Plantas.

BOTUCATU – SP
Junho/2005

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, PATOGÊNICA, DE MATING-
TYPE E GENÉTICA DE ISOLADOS DE *Cylindrocladium* spp. E
Cylindrocladiella spp.**

Bióloga CHRISTIANE CERIANI APARECIDO

Orientador: Prof. Dr. Edson Luiz Furtado

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agronômicas da UNESP - Campus de Botucatu, para a obtenção do título de Doutor em Agronomia - Área de Concentração em Proteção de Plantas.

BOTUCATU - SP
Junho/2005

À minha mãe, ZULMIRA
Às minhas tias, NATALINA e EUGÊNIA
Aos meus tios, JOÃO (*in memorian*) e
MIGUEL (*in memorian*)

DEDICO

SUMÁRIO

	Página
Resumo	1
Summary.....	2
1. INTRODUÇÃO.....	4
2. REVISÃO DE BIBLIOGRÁFICA.....	6
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	12
1. Caracterização morfológica dos isolados de <i>Cylindrocladium</i> spp.....	13
2. Caracterização fisiológica dos diferentes isolados.....	14
2.1 Patogenicidade dos isolados a diferentes hospedeiros.....	14
2.2. Coloração das colônias – crescimento em meio Czapeck.....	16
2.3. Crescimento de <i>Cylindrocladium</i> spp. a diferentes temperaturas.....	16
2.4. Pareamento dos isolados em meio de cultura feijão azuki-ágar.....	16
3. Extração do DNA dos isolados para caracterização molecular.....	17
3.1. Isolados desenvolvidos em dois diferentes meios de cultura, efetuando-se trituração do micélio com nitrogênio líquido e utilizando-se kit de extração Wizard Plus Minipreps DNA Purification System (Promega).....	17

3.2. Extração do DNA dos isolados fúngicos, desenvolvidos em diferentes meios de cultura e utilizando-se somente resina de sílica gel Wizard (Promega).....	19
3.3. Extração do DNA dos isolados fúngicos desenvolvidos em meio extrato de malte líquido, utilizando o produto DNAzol.....	20
4. Caracterização molecular dos isolados de <i>Cylindrocladium</i> spp.....	21
4a. PCR.....	21
4b. Sequenciamento.....	22
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	23
1. Caracterização morfológica dos isolados de <i>Cylindrocladium</i> spp.....	23
2. Caracterização fisiológica dos diferentes isolados.....	29
2.1 Patogenicidade dos isolados a diferentes hospedeiros.....	29
2.2. Coloração das colônias – crescimento em meio Czapeck.....	34
2.3. Crescimento de <i>Cylindrocladium</i> spp. a diferentes temperaturas.....	38
2.4. Pareamento dos isolados em meio feijão azuki-ágar.....	41
3. Extração do DNA dos isolados para caracterização molecular.....	43

4. Caracterização molecular dos isolados de <i>Cylindrocladium</i> spp.....	45
4a. PCR.....	45
4b. Sequenciamento.....	46
6. CONCLUSÕES.....	56
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57
8. APÊNDICE.....	64

Apêndice

1 – Sequências de bases obtidas para os diferentes isolados de <i>Cylindrocladium</i> , utilizando-se para a PCR o par de primers ITS1 e ITS4.....	65
--	----

LISTA DE QUADROS

Quadro	Página
01. Culturas do gênero <i>Cylindrocladium</i> utilizadas no estudo.....	13
02. Composição da reação de PCR, utilizando os <i>primers</i> ITS1 e ITS4.....	21
03. Morfologia da vesícula terminal observada em cada isolado estudado.....	25
04. Dimensão de conídios de <i>Cylindrocladium</i> spp. em diferentes meios de cultura.....	26
05. Prováveis espécies identificadas com base na dimensão dos conídios e/ou forma da vesícula terminal.....	28
06. Inoculação de <i>Cylindrocladium</i> spp. sobre diferentes hospedeiros.....	33
07. Agrupamento dos isolados de acordo com a velocidade de crescimento e a coloração das colônias em meio Czapeck.....	38
08. Crescimento dos isolados sobre meio Czapeck a diferentes temperaturas.....	40
09. Pareamento dos isolados em meio feijão azuki-ágar.....	42
10. Quantidade e qualidade do DNA extraído com a utilização de DNAzol (Protocolo 3.3)...	44
11. Comparação entre os caracteres morfológicos e moleculares para identificação de <i>Cylindrocladium</i> spp.....	55

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
01. Formas das vesículas terminais observadas em <i>Cylindrocladium</i> spp.....	24
02. Resultados obtidos após as inoculações dos isolados estudados sobre diferentes órgãos de <i>Eucalyptus urophylla</i>	30
03. Inoculação de isolados do gênero <i>Cylindrocladium</i> sobre lírio-da-paz.....	31
04. Resultados obtidos pela inoculação de <i>Cylindrocladium</i> spp. em sementes de amendoim variedade Tatu.....	32
05. Agrupamento de isolados de <i>Cylindrocladium</i> spp. de acordo com o tipo e a coloração do micélio e, a velocidade de crescimento em meio Czapeck.....	35
06. Crescimento dos isolados estudados a diferentes temperaturas.....	39
07. Pareamento de diferentes culturas do gênero <i>Cylindrocladium</i> . A → IB17/89 e IB01/01. B → IB17/89 e IB239. Peritécios alaranjados (seta).....	41
08. Eletroforese em gel de agarose 0,8% realizada após a extração de DNA realizada com a utilização dos Protocolos 3.2 (A) e 3.3 (B).....	43
09. Fragmentos obtidos após a realização da reação de PCR com os <i>primers</i> ITS1 e ITS4 para os diferentes isolados do gênero <i>Cylindrocladium</i>	45

10. Fenograma resultante do sequenciamento da região ITS, utilizando os <i>primers</i> ITS1 e ITS4.....	52
---	----

RESUMO

Com o objetivo de caracterizar o “complexo” gênero anamórfico *Cylindrocladium*, dezoito isolados foram cultivados em meios de cultura distintos, mantidos sob diferentes temperaturas, além de ter conídios e vesículas terminais analisados morfológicamente para identificação correta das culturas. Inoculações em diferentes hospedeiros foram realizadas para avaliação do comportamento patogênico dos isolados estudados. Também, o DNA destes isolados foi extraído e analisado, na tentativa de se encontrar diferenças relevantes. Com relação aos caracteres morfológicos estudados, pôde-se observar que ocorrem alterações nas dimensões de conídios e morfologia da vesícula terminal devido, provavelmente, à mudança do substrato de cultivo. Porém, a variabilidade natural nas características dessas estruturas é tão elevada que dificulta a identificação correta dos isolados. Em uma mesma cultura, por exemplo, puderam ser observadas vesículas terminais de diferentes morfologias. Também foi estudada a compatibilidade genética através do pareamento, dois a dois, dos diferentes isolados em meio de cultura feijão azuki-ágar. Observou-se que, somente em alguns pareamentos, desenvolveram-se peritécios contendo esporos sexuais do gênero teleomórfico *Calonectria*, correspondente ao anamorfo *Cylindrocladium* spp., diferente compatibilidade gênica, ou seja, distintos “mating-types”. Pôde-se constatar que existem diferenças patogênicas e fisiológicas entre os isolados, uma vez que houve a formação de grupos distintos quando tais características foram consideradas. Estas diferenças, provavelmente, sejam devidas à constituição genética distinta existente entre os isolados. Porém, isto não pôde ser constatado devido às dificuldades encontradas nos experimentos relativos à caracterização molecular. Para estes estudos teria sido necessária a obtenção de DNA íntegro e de extrema pureza, o que não foi conseguido, embora inúmeros protocolos para extração tenham sido utilizados. A única região seqüenciada (ITS) mostrou-se, conforme descrito na literatura especializada, inadequada para a caracterização e identificação das espécies dentro do gênero *Cylindrocladium*.

Palavras-chave: *Calonectria*, *Cylindrocladium*, eucalipto, caracteres morfológicos, fisiologia.

MORPHOLOGIC, PATHOGENIC, MATING-TYPE AND GENETIC CHARACTERIZATION OF *Cylindrocladium* spp. AND *Cylindrocladiella* spp. Botucatu, 2005. 68 p. Tese (Doutorado em Agronomia/Proteção de Plantas) – Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista.

Author: CHRISTIANE CERIANI APARECIDO

Advisor: EDSON LUIZ FURTADO

SUMMARY

In order to characterize the anamorphic genus *Cylindrocladium* eighteen isolates had been cultivated in distinct media of culture, kept under different temperatures, besides having spores and terminal vesicles morphologically analyzed for correct identification of cultures. Inoculations on different hosts had been carried out through for evaluation of pathogenic behavior of the isolated studied. The genetic compatibility was studied by the cultures pareament on azuki-bean medium. Only in some plates were observed perithecia containing sexual spores (ascospores) of the teleomorphic genus *Calonectria*. This result indicates the existence of different mating types. Also, the DNA of these isolates were extracted and studied in the attempt to find important differences. Concerning the morphologic characters studied could be observed that alterations occur in the conidial dimensions and morphology of the terminal vesicle, but those alterations were meaningless and happen probably due the substratum changes. However, the natural variability in the general characteristics of these structures raised that it makes difficult the correct identification of the isolates. In the same culture, for example, can be observed terminal vesicles with different morphologies. It could be evidenced that pathogenic and physiological differences among the isolates exist. This

brings the idea of the distinct populational groups formation when such characteristics were considered. These differences, probably, must to the existence of distinct genetic constitution among the isolates. However, this could not be evidenced due the difficulties that occur in the molecular characterization experiments. For these studies were necessary a good quality of DNA samples. Even though many different protocols for DNA extraction were used this quality was not obtained. The only sequenced region (ITS) revealed inadequate for the characterization and identification of species belong to the *Cylindrocladium* genus, as described in specialized literature.

Keywords: *Calonectria*, *Cylindrocladium*, *Eucalyptus*, morphologic characters, physiology.

INTRODUÇÃO

A utilização de espécies florestais para produção de madeira, papel e celulose tem se tornado bastante importante no Brasil. Dentre os gêneros utilizados destacam-se *Pinus* e *Eucalyptus*. Porém, com a intensificação dos cultivos, inúmeros patógenos têm passado a parasitar as plantas principalmente, durante os estágios iniciais de desenvolvimento. Fungos do gênero *Cylindrocladium* têm se destacado como parasitos de *Pinus* e *Eucalyptus*, levando a problemas consideráveis em regiões tropicais e subtropicais, devido às condições ambientais favorecerem o desenvolvimento do patógeno, que pode causar morte das plantas mais jovens e, no caso de *Eucalyptus*, manchas foliares.

Diversas espécies de *Cylindrocladium* já foram detectadas no Brasil. O citado gênero foi descrito por Morgan em 1892 (BOEDIJN & REITSMA, 1950 in CROUS, 2002) e abrange cerca de 20 espécies, a maioria patogênica a espécies florestais e culturas agrônomicas de relevante importância econômica (ALFENAS & FERREIRA, 1979; ALMEIDA & BOLKAN, 1981; COELHO et al., 1986; AUER & GRINGOLETI Jr, 1995; AUER & SOTTA, 1995). A classificação taxonômica das espécies deste gênero está baseada em certos caracteres morfológicos que, de acordo com estudos, nem sempre se mostram

confiáveis, uma vez que podem variar em função do substrato e de condições ambientais (CROUS & WINGFIELD, 1994).

Atualmente, além das espécies de importância florestal, também, diversas espécies de plantas ornamentais têm sido infectadas. Por este motivo, a importância de *Cylindrocladium* spp. tem aumentado ainda mais.

Portanto, devido à crescente importância do gênero *Cylindrocladium* são propósitos deste trabalho:

1)- Caracterizar morfológicamente isolados do gênero *Cylindrocladium* avaliando, em diferentes meios de cultura, a constância dos caracteres morfológicos utilizados na taxonomia;

2)- Caracterizar molecularmente diferentes isolados do gênero *Cylindrocladium* pertencentes as Micotecas do Instituto Biológico e da Faculdade de Ciências Agrônomicas – UNESP – Campus de Botucatu.

3)- Avaliar, através de inoculações cruzadas, o comportamento fisiológico dos isolados ainda patogênicos mantidos em laboratório, frente a variado círculo de hospedeiros.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Inúmeros são os microrganismos que afetam espécies florestais, como por exemplo, os gêneros *Pinus* e *Eucalyptus*. Este último, em particular, muito importante no que se refere à produção de madeira para utilização na indústria de papel e celulose. Dentre os patógenos que infectam as citadas culturas, encontram-se várias espécies de *Cylindrocladium*. Estas podem causar: tombamento de plântulas, podridão de estacas, estrangulamento do caule, podridão de raízes, manchas foliares e, em se tratando do gênero *Pinus*, ainda pode ocorrer seca dos ponteiros e queima das acículas (REIS & CHAVES, 1967; ALFENAS, 1986).

No Brasil, a ocorrência de *Cylindrocladium* foi primeiramente constatada na década de 30 por ARRUDA (1940) sobre plantas de eucalipto provenientes do Horto Florestal da Cantareira. Posteriormente, o patógeno foi, também, detectado no Vale do Rio Doce, MG, Costa do Espírito Santo, Bahia e demais estados nordestinos, região Amazônica, Santa Catarina, Paraná e São Paulo. Durante cerca de 20 anos, desde sua primeira constatação, o gênero *Cylindrocladium* afetava de forma mais expressiva, em particular, espécies florestais. Porém, já em 1967, FIGUEIREDO & NAMEKATA, detectaram *Calonectria quinquesepata*, forma teleomórfica de *Cylindrocladium quinquesepatum*, sobre a

espécie frutífera *Annona squamosa* (fruta do conde). Recentemente, também plantas ornamentais têm sido infectadas (COUTINHO et al., 2001). Também em outros países como Estados Unidos, Itália, França, Bélgica e Holanda, algumas espécies já foram constatadas tanto em plantas ornamentais como em outras culturas de importância econômica, pertencentes às mais variadas famílias botânicas (CROUS & WINGFIELD, 1994; WATANABE et al., 1995; EL-GHOLL et al., 1997).

Nas regiões tropicais e subtropicais o gênero *Cylindrocladium* apresenta maior importância devido às condições de elevadas umidade e temperatura que encontra. Segundo dados de literatura, temperaturas variando entre 12^o a 33^oC são propícias ao desenvolvimento das espécies do patógeno, sendo que 27^oC é a temperatura mais apropriada (CRUZ & FIGUEIREDO, 1960; FIGUEIREDO & CRUZ, 1963; FERREIRA, 1989). Com relação à dispersão, quando se trata da fase teleomórfica representada pelo gênero *Calonectria*, os insetos são muito eficientes porque, pela abertura dos peritécios, exsudam substâncias mucilaginosas juntamente com as estruturas infectivas. Já, as estruturas anamórficas, representadas pelos conídios de *Cylindrocladium*, são eficientemente dispersas pela água e/ou vento (FERREIRA, 1989).

Com relação às espécies, o gênero *Cylindrocladium* agrupa parasitas facultativos que, devido à capacidade de produzir microescleródios, tanto em meio de cultura artificial, como no solo e sobre os hospedeiros, sobrevivem às mais adversas condições ambientais. As estruturas infectivas germinam e, penetram diretamente no tecido do hospedeiro, não necessitando da existência de ferimentos (ALFENAS & FERREIRA, 1979; COELHO et al., 1986). Segundo dados de literatura, o gênero *Cylindrocladium* agrupa, em média, 33 espécies (ALFENAS, 1986; CROUS & WINGFIELD, 1994; PEERALLY, 1991). No Brasil, de acordo com ALFENAS (1986) e AUER & SOTTA (1995), já foram constatadas as seguintes espécies: *Cylindrocladium clavatum*, *C. pteris*, *C. theae*, *C. quinquesseptatum*, *C. floridanum*, *C. crotalariae*, *C. scoparium* (ampla distribuição mundial), *C. ilicicola* e *C. candelabrum*. Mais recentemente, COUTINHO et al. (2001), relataram, pela primeira vez, *C. spathiphyllii* sobre *Spathiphyllum*, planta ornamental originária da América Central e conhecida vulgarmente como lírio da paz. A identificação das espécies, geralmente, é realizada com base nos caracteres morfológicos dos conídios (tamanho e número de septos) e no formato das vesículas terminais (ORREGO FUENTE et al., 1996). Porém, alguns autores,

já identificaram variação na forma das vesículas dentro de um mesmo isolado, resultado este de variação no substrato e/ou idade da cultura. Sendo assim, alguns autores acreditam que este não seja um caracter muito confiável a ser considerado em estudos taxonômicos (HUNTER & ZUMPETA, 1975; HUNTER & BARNETT, 1978; ORREGO FUENTE et al., 1996). Quando cultivado em meio artificial, *Cylindrocladium* spp. apresenta colônias de coloração marrom-castanha e de crescimento rápido, sob temperaturas elevadas (FIGUEIREDO & CRUZ, 1963).

Anteriormente foi mencionado que o patógeno infecta plantas florestais como eucalipto e *Pinus*. Quando se trata do gênero *Eucalyptus*, em que ocorre o tombamento de mudas, as principais espécies patogênicas envolvidas são: *C. scoparium* e *C. clavatum*. Durante a década de 60, a doença causava sérios prejuízos, principalmente devido ao manejo das sementeiras (REIS & CHAVES, 1967). A partir de 1971, com as mudanças no manejo aliadas às medidas de controle estabelecidas desde 1967, houve certa diminuição na incidência da doença. Além do tombamento de mudas, *C. clavatum*, *C. crotalariae* e *C. scoparium* foram detectados causando podridão de estacas de eucalipto. Com relação aos sintomas, no hospedeiro infectado, são observadas lesões escuras que, na maioria das vezes progridem da base para o ápice da estaca (FERREIRA, 1989). Algumas vezes pode-se observar, também, frutificações do patógeno. Quando se trata de *C. crotalariae*, também se verifica a presença de estruturas pertencentes à fase teleomórfica, o ascomiceto *Calonectria crotalariae*, tanto sobre folhas de eucalipto como sobre folhas de outros vegetais já em decomposição.

Outra doença causada em eucalipto por espécies de *Cylindrocladium* é a mancha das folhas. No Brasil, esta é uma doença bastante comum no campo, observada em plantas de qualquer idade. Porém, torna-se mais importante ao infectar plantas que se encontram no estágio fenológico B, caracterizado pela não ocorrência da desrama natural das plantas (FERREIRA, 1989). De acordo com ALFENAS & FERREIRA (1979), as principais espécies hospedeiras de *Cylindrocladium* sp são: *E. acmenioides*, *E. alba*, *E. camaldulensis*, *E. citriodora* (atualmente *Corimbea citriodora*), *E. dunnii*, *E. paniculata*, *E. pellita*, *E. saligna*, *E. cloeziana*, *E. grandis* e *E. urophylla*. É importante salientar que as três últimas são as mais suscetíveis (FERREIRA, 1989). Para controle da mancha das folhas, recomenda-se apenas a utilização de variedades resistentes.

Com relação a outras espécies florestais, em 1969 nos estados do Paraná e São Paulo, foi constatado *Cylindrocladium clavatum* causando podridão de raízes em árvores de *Araucaria angustifolia*, com mais de dez anos de idade. Em *Pinus* a doença ocorre desde o Paraná até a Bahia, incluindo também o estado de Goiás e atinge árvores a partir de um ano de idade (ALMEIDA & BOLKAN, 1981). A podridão de raízes em *Pinus*, assim como em *A. angustifolia* foi descrita em 1972 por HODGES & MAY, sendo a patogenicidade confirmada também por HOMECHIN em 1979. As plantas infectadas apresentam amarelecimento de toda a copa, sendo que neste estágio grande parte das raízes já está comprometida. Posteriormente, ocorre a morte do hospedeiro (HODGES et al., 1973). Até o momento, não há recomendações de controle para esta doença.

Com relação a novos hospedeiros, pesquisas antigas relatam a ocorrência de *Cylindrocladium* sobre plantas diferentes de espécies florestais como por exemplo, a planta frutífera *Annona squamosa* (FIGUEIREDO & NAMEKATA, 1967). SOBERS & LITTRELL (1974), inocularam cevada, aveia, centeio, trigo, duas cultivares de soja e outras duas de amendoim com *C. crotalariae*, *C. scoparium* e *C. floridanum* e verificaram que todos os hospedeiros foram suscetíveis a todos os isolados, havendo diferenças apenas no grau de suscetibilidade. *Cassia fasciculata* (Leguminosae) e amendoim (*Arachis hypogea* - Leguminosae) ao serem inoculados com *C. scoparium* também apresentaram suscetibilidade.

Outra planta recentemente infectada por *Cylindrocladium* é *Acacia mearnsii* (acácia-negra). Esta é uma espécie florestal proveniente da Austrália, cuja madeira é utilizada no Rio Grande do Sul para obtenção de energia, celulose, papel e chapa de fibra. Porém, segundo SCHENEIDER (citado por AUER & SOTTA, 1995), sua maior relevância econômica está na casca, matéria-prima a partir da qual é obtido tanino. AUER & SOTTA (1995), realizaram inúmeros isolamentos de lesões de *Acacia mearnsii* apresentando gomose e, após terem realizado testes de patogenicidade, identificaram *Cylindrocladium candelabrum*. De acordo com estes autores, existe um grupo de fungos associados à doença conhecida por gomose sendo que, anteriormente, nenhuma espécie de *Cylindrocladium* havia sido detectada.

WATANABE et al. (1995) e AUER & GRINGOLETTI Jr. (1995), identificaram como hospedeiros de *Cylindrocladium colhounii*: *Eucalyptus robusta*,

Callistemon citrinus (mirtácea ornamental), *Ilex paraguayensis* (erva-mate), *Arachis hypogea*, *Annona squamosa* e *Phellodendron amurense* (ornamental).

No Havaí e Flórida, nos Estados Unidos, foi constatado *C. spathiphylii* sobre *Heliconia*, *Spathiphyllum*, *Strelitzia nicolai* e *Ludwigia palustris*, todas plantas ornamentais. O gênero *Heliconia* apresenta considerável importância econômica, rendendo ao Havaí, durante 1991, cerca de \$1 milhão de dólares. Porém, durante as épocas quentes e úmidas, a planta é severamente infectada por *C. spathiphylii*, o que passa a ser um fator limitante à expansão da cultura. Mais recentemente no Brasil, este patógeno também foi constatado sobre *Spathiphyllum* (COUTINHO et al., 2001). POLTRONIERI et al. (2000) constataram, no Pará, a ocorrência de *C. parasiticum* sobre mogno africano (*Khaya ivorensis*) e ipê-marelo (*Tabebuia serratifolia*), ambas espécies florestais bastante utilizadas para reflorestamento na Amazônia. Esta foi a primeira constatação de *C. parasiticum* sobre mogno africano e ipê-amarelo no País.

As condições climáticas e a diversidade de espécies hospedeiras no Brasil favorecem o desenvolvimento do patógeno, tornando necessário o desenvolvimento de pesquisas com vistas à obtenção de conhecimento mais apurado sobre o gênero *Cylindrocladium*.

Anteriormente, foi mencionada a problemática no uso somente dos caracteres morfológicos para a identificação de espécies de *Cylindrocladium* taxonomicamente próximas. Entretanto, com o desenvolvimento e aprimoramento das técnicas moleculares, a caracterização de organismos tornou-se bastante facilitada. As análises de DNA podem auxiliar na diferenciação de espécies com morfologia muito próxima, porém com características patogênicas distintas. Inúmeras são as técnicas existentes, como por exemplo: RAPD (Random Amplified Polymorfism DNA), RFLP (Restriction Fragment Length Polymorfism), PCR (Polymerase Chain Reaction), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorfism). A escolha de qual será utilizada irá depender do objetivo que se desejar atingir. Quando se analisa o DNA total de um microrganismo, são utilizados marcadores moleculares, os quais permitem avaliar a diversidade genética, as relações filogenéticas intra e interespecíficas, além de possibilitar que novas raças e patótipos sejam identificados (LEAL-BERTOLI, 1998). Por meio desta ferramenta, inúmeros gêneros e espécies de fungos fitopatogênicos têm sido caracterizados e corretamente reclassificados (JACOBSON &

GORDON, 1990; GUTHRIE et al., 1992; GRAJAL-MARTIN et al., 1993; MORTON et al., 1995; POUPARD et al., 1995; SMITH et al.; 1996; SILVA et al., 2000).

Observa-se que as técnicas relativas à biologia molecular poderiam servir como importante instrumento auxiliar na especificação e caracterização de *Cylindrocladium* spp. Além disso, tais técnicas poderiam possibilitar o desenvolvimento de marcadores moleculares para as espécies que apresentam maior incidência no Brasil, permitindo a detecção do patógeno no solo, antes mesmo do estabelecimento da cultura com potencialidade hospedeira. Este procedimento já foi realizado com sucesso para detecção de espécies de *Verticillium* e mostrou-se mais rápido e preciso, quando comparado com a técnica tradicional de plaqueamento de solo (MAHUKU et al., 1999; PLATT & MAHUKU, 2000).

MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados nos laboratórios do Departamento de defesa Fitossanitária da Faculdade de Ciências Agrônômicas, UNESP, Botucatu, SP; de Fitopatologia Molecular do CEPEC / CEPLAC, Itabuna, BA e de Micologia Fitopatológica do Instituto Biológico, São Paulo, SP.

Foram utilizados os dezoito isolados relacionados no Quadro 1, provenientes das micotecas do Laboratório de Micologia Fitopatológica do Instituto Biológico de São Paulo, SP e do Departamento de Produção Vegetal da Faculdade de Ciências Agrônômicas (FCA)-UNESP, Botucatu, SP.

Quadro 1 – Culturas do gênero *Cylindrocladium* utilizadas no estudo.

Cultura	Espécie	Hospedeiro
IB223	<i>C. scoparium</i> var. <i>brasiliensis</i>	<i>E. Alba</i>
IB238	<i>C. scoparium</i>	<i>Eucalyptus</i> sp.
IB239	<i>C. citri</i>	Procedência: CBS*
IB268	<i>C. ilicicola</i>	<i>Eucalyptus</i> sp. (estrangulamento da haste)
IB328	<i>C. scoparium</i> var. <i>brasiliensis</i>	<i>Eucalyptus</i> sp.
IB421	<i>C. scoparium</i>	<i>Eucalyptus</i> sp.
IB515	<i>C. scoparium</i>	<i>Eucalyptus</i> sp.
IB728	<i>C. scoparium</i>	<i>Hevea brasiliensis</i> (seringueira)
IB11/75	<i>C. scoparium</i>	<i>Eucalyptus</i> sp.
IB6/78	<i>C. scoparium</i>	<i>E. urophylla</i> (eucalipto)
IB12/79	<i>C. clavatum</i>	<i>E. grandis</i> (eucalipto)
IB17/89	<i>C. scoparium</i>	<i>Eucalyptus</i> sp. (sementeira)
IB01/01	<i>C. spathiphyllii</i>	<i>Spathiphyllum walisii</i> (lírio da paz)
FCA06	<i>Cylindrocladium</i> sp.	<i>E. citriodora</i> (eucalipto)
FCA07	<i>Cylindrocladium</i> sp.	<i>Eucalyptus</i> sp. (clones)
FCA09	<i>Cylindrocladium</i> sp.	<i>Eucalyptus</i> sp. (folhas)
FCA10	<i>Cylindrocladium</i> sp.	<i>Eucalyptus</i> sp.
CKa	<i>Cylindrocladium</i> sp.	<i>Kalanchoe</i>

*Centraal Bureau Voor Schimmelcultures, Baarn - Holanda

Conforme mencionado anteriormente foram realizados os ensaios descritos à seguir:

1)- Caracterização morfológica dos isolados de *Cylindrocladium*

Para a realização deste experimento foram utilizados três diferentes meios de culturas: batata-dextrose-ágar comercial (BDA – batata, 200g; dextrose, 20g; ágar, 17g; água destilada, 1 L)- Czapeck (meio sintético – NaNO₃, 3g; K₂HPO₄.7H₂O, 0,5g; KCl, 0,5g; FeSO₄.7H₂O, 0,01g; sacarose, 30g; peptona, 1g; agar, 17g; água destilada, 1 L)- GAA (Glucose-asparagina-ágar – glucose, 10g; asparagina, 2g; K₂HPO₄, 1g; MgSO₄.7H₂O, 500 mg; KCl, 500mg; ágar, 17g, água destilada, 1 L), meio de cultura este que, de acordo com SINGLETON et al., 1992, mostra-se excelente para o crescimento e esporulação de *Cylindrocladium*, além de outros fungos de solo.

As culturas foram transferidas, separadamente, para placas de Petri contendo um dos meios e, assim que todo o diâmetro da placa foi tomado, quando estavam com sete dias de idade, foram preparadas lâminas para verificação da forma da vesícula terminal de cada isolado, medição do comprimento, largura e contagem do número de septos de vinte conídios, escolhidos ao acaso. Para a coloração das lâminas foi utilizado o corante azul de algodão. Posteriormente, foi calculada a média das dimensões, tanto para comprimento como para largura dos conídios. Todas as observações foram realizadas sob microscópio scanner confocal MRC-1024, com laser Kr/Ar e documentadas através de digitalização das imagens. O citado microscópio possibilita que as medições sejam mais precisas, pois todos os cálculos são realizados através do sistema computadorizado acoplado ao equipamento. Além disso, as imagens obtidas apresentam excelente qualidade. Os resultados obtidos foram comparados para constatar se diferentes substratos poderiam interferir nas características morfológicas de um mesmo isolado.

2)- Caracterização Fisiológica dos diferentes isolados

2.1)- Patogenicidade dos isolados de *Cylindrocladium* a diferentes hospedeiros

Cada um dos isolados do Quadro 1 foi, separadamente, inoculado sobre plântulas de *E. urophylla* e *E. grandis*. As plântulas estavam com trinta dias de idade e as inoculações foram realizadas sobre folhas e, também, em solo previamente esterilizado onde se desenvolviam as mudas do hospedeiro. Em ambos os casos, as culturas utilizadas estavam com dez dias de idade. Para as inoculações em solo, uma placa de cada isolado foi, separadamente, homogeneizada em liquidificador, com 200mL de água destilada. A seguir, 30mL da suspensão obtida foi incorporado ao solo de cada vaso contendo uma planta. Ao tratamento controle foi incorporado 30mL de uma suspensão resultante da homogeneização de meio BDA com água destilada. Para cada tratamento havia seis repetições. Todas as plântulas avaliadas foram mantidas em casa de vegetação à temperatura ambiente ($\pm 27^{\circ}\text{C}$). A avaliação foi realizada pela observação dos sintomas característicos da doença, anotando-se, também, o número de dias decorrentes desde as inoculações até o aparecimento dos sintomas.

Com relação às inoculações sobre folhas, a uma placa de cada isolado foram adicionados 100mL de água destilada e o micélio friccionado com alça de Drigalsky. A suspensão preparada foi aspergida sobre ambas as faces das folhas de plântulas de *Eucalyptus urophylla* com trinta dias de idade. Sobre as folhas das mudas do tratamento controle foi aspergida apenas água destilada. As plântulas foram cobertas com sacos plásticos umedecidos durante 24 h. Após esse período, os sacos plásticos foram removidos, sendo as câmaras úmidas desfeitas, permanecendo todos os tratamentos em casa de vegetação, à temperatura ambiente (27°C). Para a avaliação dos resultados, foram contadas todas as lesões dos três primeiros pares de folhas. Havendo o coalescimento de várias lesões, a mancha era considerada como uma única lesão. Após a contagem, o número total foi dividido pelo número de repetições, ou seja, seis plantas por tratamento. Todos os resultados foram documentados com a máquina fotográfica digital Sony Cyber-shot DSC-P31.

Também, foram inoculadas sementes de amendoim variedade Tatú. Para tanto, foi realizada, inicialmente, a desinfestação superficial das sementes em solução de hipoclorito de sódio a 10%, durante 2 minutos. Posteriormente, as sementes sofreram duas lavagens consecutivas com água destilada estéril para a remoção de resíduos de hipoclorito. Após este procedimento as sementes permaneceram no interior de uma câmara de fluxo laminar, a temperatura ambiente para secagem. Em seguida 12 sementes foram colocadas em contato, durante 24 horas, com esporos e micélio do isolado a ser inoculado. Cada isolado foi considerado como um tratamento. Passadas 24 horas seis sementes foram plaqueadas em ágar-água (AA) e outras seis semeadas em vasos contendo mistura esterilizada de solo, areia e esterco. Para a avaliação do experimento foi verificada a porcentagem de germinação das sementes em cada tratamento.

Outro hospedeiro utilizado foi a planta ornamental denominada lírio-da-paz (*Spathiphyllum wallisi* Regel). Uma placa de cada isolado foi, separadamente, homogeneizada em liquidificador com 200 mL de água destilada, sendo 30 mL da suspensão obtida incorporado ao solo de cada vaso contendo uma planta. Ao tratamento controle foi incorporado 30mL de uma suspensão resultante da homogeneização de meio BDA com água destilada. Para cada tratamento foram utilizadas quatro plantas. Todos os tratamentos foram mantidos em casa de vegetação à temperatura ambiente ($\pm 27^{\circ}\text{C}$). A avaliação foi realizada

pela observação dos sintomas característicos da doença aos sete, dez, quinze e vinte e cinco dias após as inoculações. Observando-se resultado positivo, foi realizada a documentação fotográfica e a planta foi levada ao laboratório para reisolamento do patógeno para confirmar se os sintomas estavam sendo causados, de fato, pelo microrganismo inoculado.

2.2)- Coloração das colônias - crescimento em Meio Czapeck

Cada isolado foi, separadamente, repicado para o centro de uma placa de Petri contendo o meio sintético Czapeck (TUIITE, 1969). A seguir, as placas foram mantidas em câmara do tipo BOD, a 25°C e no escuro. As avaliações foram realizadas após 10 dias de incubação anotando-se o tipo e coloração do micélio e, realizando-se a medição do diâmetro de cada colônia em dois sentidos diametralmente opostos. Para cada isolado havia seis repetições. Os os isolados semelhantes quanto ao tipo do micélio e coloração e velocidade de crescimento das colônias foram agrupados, conforme. A documentação e ilustração dos resultados foi realizada através da máquina fotográfica digital Sony Cyber-shot DSC-P31.

2.3)- Crescimento dos isolados de *Cylindrocladium* a diferentes temperaturas

Cada isolado foi, separadamente, repicado para o centro de uma placa de Petri contendo o meio sintético Czapeck (TUIITE, 1969). A seguir, as placas foram mantidas em câmaras com temperatura controlada a 15°, 20°, 25°, 30° e 35°C e, no escuro. Foram realizadas duas avaliações (aos 7 e aos 10 dias de incubação), medindo-se o diâmetro de cada colônia em dois sentidos diametralmente opostos. Para cada isolado, a cada uma das diferentes temperaturas, haviam três repetições. A documentação dos resultados foi realizada através da máquina fotográfica digital Sony Cyber-shot DSC-P31.

2.4)- Pareamento dos isolados em meio feijão azuki - ágar

As culturas foram pareadas duas a duas em placa de Petri contendo 30 mL de meio BDA-feijão azuki (20 g de feijão azuki; 40 g de meio batata-dextrose-ágar pronto;

1 L de água destilada). Para o preparo do meio de cultura, o feijão azuki foi colocado no interior de um Erlenmeyer contendo 200 mL de água destilada e mantido durante 24 horas à temperatura ambiente para absorção do líquido pelas sementes. Depois, o Erlenmeyer foi levado ao microondas durante 2 minutos para o cozimento do feijão que, em seguida, foi homogeneizado em liquidificador. O homogeneizado foi misturado ao meio BDA já fundido em 800 mL de água destilada e esterilizado em autoclave durante 30 minutos a 1 atm. Após a solidificação do meio, as culturas foram pareadas e mantidas em BOD à 25°C durante sete dias para crescimento e, passado este período, a tampa de cada placa foi, assepticamente, substituída por plástico Magipack. As placas foram colocadas sob luz negra durante dez dias.

Para cada pareamento havia três repetições. As avaliações foram realizadas observando-se a presença ou não de peritécios na área de encontro das hifas.

3)- Extração do DNA dos isolados para posterior caracterização molecular

Para o estudo molecular dos isolados, cerca de dez diferentes protocolos foram utilizados, alguns dos quais estão descritos a seguir:

3.1)- Extração do DNA dos isolados fúngicos, desenvolvidos em dois diferentes meios de cultura, pelo método de trituração do micélio em nitrogênio líquido e utilizando-se kit de extração Wizard Plus Minipreps DNA Purification System (Promega)

Cada um dos isolados relacionados no Quadro 1 foi transferido, separadamente, para Erlenmeyer contendo 50mL de meio líquido batata-dextrose (BD), onde permaneceram durante três dias, a 25°C.

Após esse período, o micélio foi recolhido, lavado com água destilada para remoção do excesso de meio de cultura e seco, através da prensagem deste material entre discos de papel de filtro. Em seguida, foi realizada a trituração dos micélios com nitrogênio líquido. Pequena porção do micélio triturado de cada um dos isolados foi, separadamente, transferida para microtubos com capacidade para 1,5 mL.

A cada microtubo foram adicionados os componentes do kit de extração Wizard Plus Minipreps DNA Purification System (Promega), segundo as seguintes recomendações do fabricante: 200µL da solução de ressuspensão; centrifugar a 14.000 rpm durante 2 minutos; 200µL da solução de lise e inversão dos microtubos 4 vezes para que a solução entre em contato com as partículas de micélio; 200µL da solução de neutralização e inversão dos microtubos 4 vezes; centrifugar o lisado durante 5 minutos a 14.000 rpm. Após a centrifugação, 350µL dos sobrenadantes foram transferidos, separadamente, para novos microtubos, cada um contendo 350µL da resina de sílica gel Wizard (Promega).

Os microtubos foram invertidos durante 1 minuto para que a resina entrasse em contato com o material fúngico. Em seguida, todo o conteúdo de cada microtubo foi transferido, separadamente, para seringas de 2mL acopladas a microcolunas.

Foi realizada pressão sobre os êmbolos das seringas para que os materiais que ficassem ligados à resina permanecessem presos aos filtros existentes nas microcolunas. Em seguida à filtragem, foi adicionado 2mL da solução de lavagem, contendo etanol, a cada seringa para que, estando os DNAs ali retidos, estes fossem lavados.

As colunas foram, então, centrifugadas a 14.000 rpm durante 2 minutos para retirada do excesso da solução de lavagem. Após a centrifugação, as microcolunas foram transferidas para novos microtubos e a cada uma foi adicionado 50 µL de água milique aquecida a 65°C, com o propósito de eluir os DNAs, caso presentes.

Os conjuntos foram centrifugados a 14.000 rpm durante 2 minutos. Protocolo idêntico foi utilizado, porém com o cultivo dos isolados sendo realizado em meio líquido extrato de malte – ME – (TUIITE, 1969). Após o procedimento de extração, foi realizada eletroforese em gel de agarose a 2%, com tampão TE, com o objetivo de verificar e eficiência dos métodos.

3.2)- Extração do DNA dos isolados fúngicos, desenvolvidos em diferentes meios de cultura e utilizando-se somente resina de sílica gel Wizard (Promega)

Cada um dos isolados relacionados no Quadro 1 foram transferidos, separadamente, para Erlenmeyers contendo 50mL de meio líquido batata-dextrose (BD), onde permaneceram durante três dias, a 25°C. Após esse período, o micélio foi recolhido e lavado com água destilada para remoção do excesso de meio de cultura.

Após esse procedimento, uma pequena porção micelial de cada isolado foi coletada com o auxílio de uma ponteira de micropipeta automática e depositado, em microtubos de 1,5 mL, contendo 350 µL do tampão de extração STE (1% SDS, 10 mM de TRIS/HCL e 25 mM de EDTA). Os microtubos foram mantidos, durante 15 minutos, sob agitação, à 65°C. Passado esse período, foram centrifugados a 14.000 rpm durante 15 minutos. Os sobrenadantes foram transferidos para novos microtubos contendo 350 µL da resina de sílica gel Wizard (Promega), misturados por inversão, permanecendo em contato com a resina durante 1 minuto. Em seguida, todo o conteúdo de cada microtubo foi transferido, separadamente, para seringas de 2mL acopladas a microcolunas. Os componentes solúveis foram removidos por pressão, com o auxílio dos êmbolos das seringas. O tampão de extração e o calor fazem com que as paredes das hifas se rompam, liberando o DNA que se liga à resina, ficando retido no filtro existente na microcoluna, após a realização da pressão.

Em seguida à filtragem, foi adicionado 2mL de isopropanol 80% a cada seringa para que, estando os DNAs ali retidos, estes fossem lavados. As colunas foram, então, centrifugadas a 14.000 rpm durante 2 minutos para retirada do excesso de isopropanol. Após a centrifugação, as microcolunas foram transferidas para novos microtubos e a cada uma foi adicionado 50 µL de água milique aquecida a 65°C, com o propósito de eluir os DNAs, caso presentes.

Os conjuntos foram centrifugados a 14.000 rpm durante 2 minutos. Protocolo idêntico foi utilizado, porém com o cultivo dos isolados sendo realizado em meio líquido extrato de malte – ME – (TUIITE, 1969).

Após o procedimento de extração, foi realizada eletroforese em gel de agarose a 2%, com tampão TE, com o objetivo de verificar a eficiência do protocolo.

3.3)- Extração do DNA dos isolados fúngicos desenvolvidos em meio extrato de malte líquido, utilizando o produto DNAzol

Os isolados relacionados no Quadro 1 foram transferidos, separadamente, para Erlenmeyers contendo 50mL de meio líquido extrato de malte (EM), onde permaneceram durante três dias, a 25°C. Após esse período, o micélio foi recolhido e lavado com água destilada para remoção do excesso de meio de cultura.

Posteriormente, parte do micélio foi depositado em tubos do tipo eppendorff com capacidade para 1,5 mL e macerado com nitrogênio líquido até a obtenção de um pó bastante fino. Em seguida, a cada eppendorff foi acrescentado 1mL de DNAzol, permanecendo o produto em contato com o micélio macerado durante 1 hora, à temperatura ambiente. Passado este período, os tubos foram centrifugados a 4°C, durante 10 minutos e a 10.000g.

Após este procedimento, 650 µL do sobrenadante foram transferidos para um novo eppendorff, sendo acrescentado igual volume de isopropanol absoluto. Foi realizada incubação à temperatura ambiente por três minutos, seguido de centrifugação a 4°C, durante 2 minutos a 12.000g. Os sobrenadantes foram descartados, acrescentando-se em seguida 1 mL de etanol 95%, realizando-se inversão dos eppendorffs durante cerca de 1 minuto.

Posteriormente, os tubos foram centrifugados a 4°C, durante 3 minutos a 12.000g, sendo o sobrenadante de cada um descartado. O pellet de DNA existente em cada eppendorff foi seco a temperatura ambiente e, posteriormente, foi acrescentado a cada eppendorff 100µL de TE+RNase. Após este procedimento, os eppendorffs foram colocados em banho-maria a 37°C, durante 1 hora.

Passado este período, após o procedimento de extração, foi realizada eletroforese em gel de agarose a 1%, com tampão TAE, com o objetivo de verificar a eficiência do protocolo. Para cada um dos isolados foi utilizada uma alíquota de 10µL. Também foi realizada a quantificação do DNA extraído de cada isolado em espectrofotômetro para verificação da qualidade. Para a realização da quantificação, uma alíquota de 10µL de cada eppendorff foi retirada e transferida, separadamente, para um novo tubo.

Em seguida, a cada tubo, foi acrescentado 90µL de água milique autoclavada. Cinquenta microlitros de cada amostra foram submetidos ao espectrofotômetro para verificação da quantidade de DNA existente assim como sua pureza e qualidade. Estes dois últimos parâmetros são dados pela relação entre as absorbâncias a 260 e 280nm (A260/A280). Quanto mais próximo de 1,8 o valor desta relação mais eficiente o protocolo de extração e, conseqüentemente, melhor a qualidade do DNA obtido.

4)- Caracterização molecular dos isolados de *Cylindrocladium*

4a)- PCR

Para as reações de amplificação da região *ITS1=5.8S=ITS2* rDNA, foi utilizado o termociclador *Programmable Thermal Controller - PTC100* (MJ Research), programado para uma desnaturação inicial a 95°C por 3 minutos, seguida de 40 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 56°C e 1 min a 72°C, com uma extensão final de 10 min a 72°C e, 4°C até o desligamento do aparelho. Os “*primers*” utilizados foram os denominados ITS1 (5' - TCCGAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5' -TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'), desenhados para anelar na região ITS. A composição de cada reação, contendo um total de 40µL encontra-se no Quadro 2.

Quadro 2 – Composição da reação de PCR utilizando-se os *primers* ITS1 e ITS4

Reagentes	Volume (µl)
DNA amostra	2,0
ITS1	1,0
ITS4	1,0
Tampão 10x	4,0
MgCl ₂	2,0
DNTPs (10mM)	1,0
<i>Taq</i> polimerase	0,4
Água milique esterilizada	28,6
Total de cada reação	40 µL

Os fragmentos de DNA amplificados foram visualizados por eletroforese em gel de agarose a 2 % em tampão TAE, corado com brometo de etídeo e fotografados sob luz UV.

4b)- Seqüenciamento

Os produtos amplificados via PCR foram seqüenciados pela técnica de reação de terminação em cadeia. Foi utilizado o seqüenciador automático *ABI 377* e o *kit ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit - Ampli Taq DNA Polymerase, FS* (Perkin Elmer) para o seqüenciamento automático de fragmentos de DNA amplificados via PCR, seguindo as recomendações do fabricante.

O seqüenciamento foi realizado nos dois sentidos de leitura, ou seja, utilizando-se os dois *primers* e repetido três vezes, a fim de evitar possíveis erros de leitura das bases.

O alinhamento das seqüências obtidas nos dois sentidos foi feito com o auxílio do programa *Sequencer 3.1* (Gene Codes Corporation) e as comparações, com as seqüências existentes no banco de dados GenBank, foram feitas através do programa do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), disponível na internet no endereço <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

Posteriormente, as seqüências obtidas foram utilizadas para a construção de uma árvore de similaridade, utilizando-se o programa BIOEDIT.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1)- Caracterização morfológica dos isolados

As observações em microscópio scanner confocal MRC-1024, com laser Kr/Ar possibilitaram constatar a existência de vesículas com diferentes formas, conforme ilustrado na Figura 1. No Quadro 3 são apresentados os dados obtidos, empregando-se os meios de cultura BDA, Czapeck e GAA.

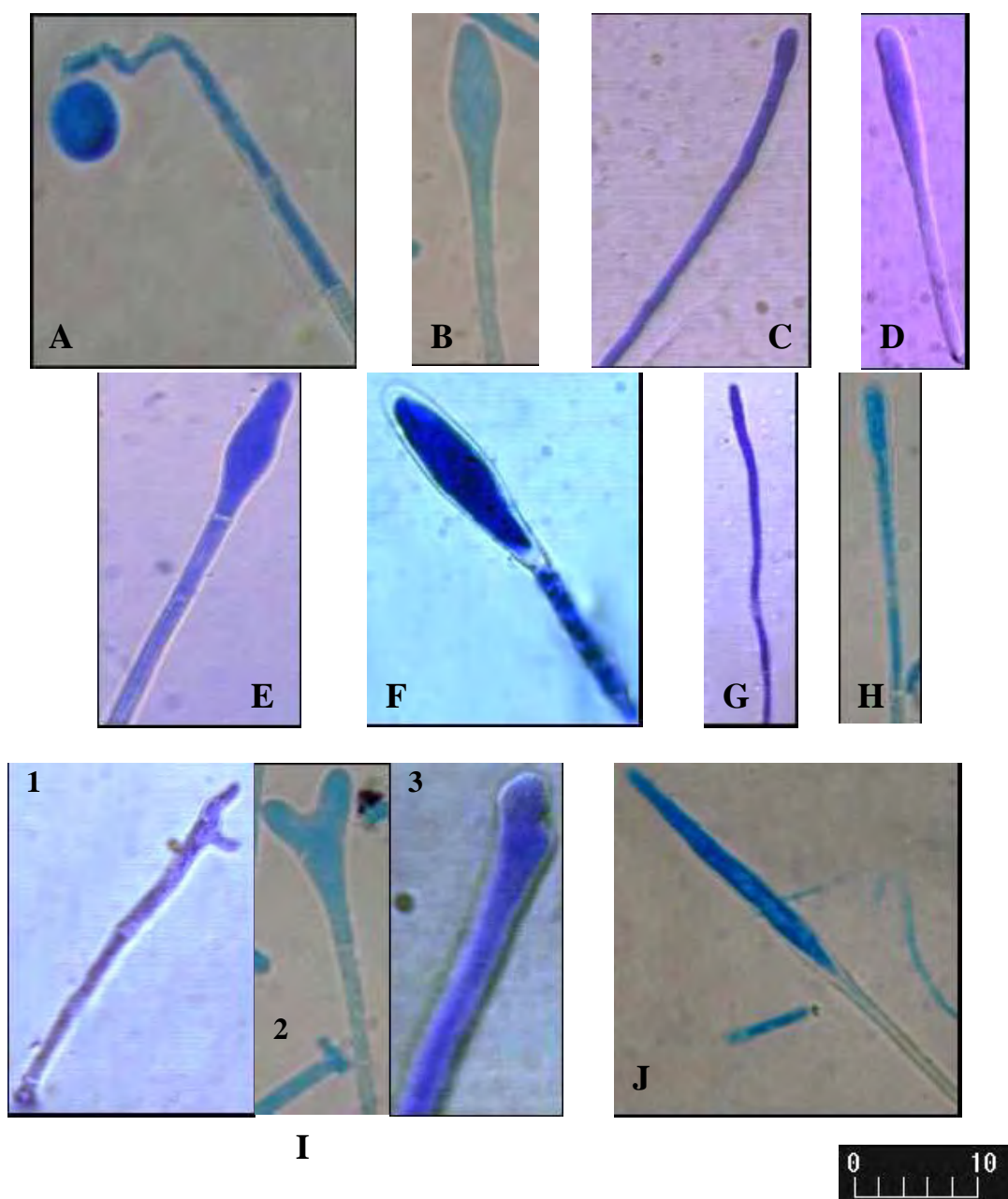


Figura 1 – Formas das vesículas terminais observadas em *Cyllindrocladium* spp. A → Globosa; B → Elipsoidal; C → Esferopedunculada; D → Clavada; E → Obpiriforme ou espatulada; F → Naviculada; G → Aciculada; H → Estreitamente clavada; I (1, 2 e 3) → Disforme; J → Lanceolada. Aumento 100x (escala de barras=10 μ m).

Analisando-se o Quadro 3, pode-se observar que, em um mesmo isolado, ocorrem vesículas com morfologia variada, o que dificulta a correta identificação das

espécies. Resultados semelhantes foram observados em inúmeros estudos relativos ao gênero *Cylindrocladium* (HUNTER & BARNETT, 1978; CROUS et al., 1992; ORREGO FUENTE et al., 1996). Segundo PEERALLY (1991) e CROUS et al. (1992), a morfologia da vesícula terminal é influenciada pela idade da cultura e pelo potencial osmótico do meio de cultura, o que pode resultar na variabilidade morfológica dessa estrutura observada em um mesmo isolado.

Quadro 3 – Morfologia da vesícula terminal observada em cada isolado do gênero *Cylindrocladium* estudado.

Isolados	Forma da Vesícula		
	Meio BDA	Meio Czapeck	Meio GAA
IB223	Obpiriforme ou espatulada	Obpiriforme ou espatulada	Obpiriforme ou espatulada
IB238	Elipsoidal	Elipsoidal	Elipsoidal
IB239	Não houve formação de vesícula	Não houve formação de vesícula	Não houve formação de vesícula
IB268	Naviculada, Esferopedunculada e Disforme 3	Naviculada	Naviculada
IB328	Clavada	Clavada	Clavada
IB421	Esferopedunculada	Esferopedunculada	Esferopedunculada
IB515	Esferopedunculada	Esferopedunculada	Esferopedunculada
IB728	Esferopedunculada	Esferopedunculada	Esferopedunculada
IB11/75	Obpiriforme ou espatulada	Obpiriforme ou espatulada	Obpiriforme ou espatulada
IB6/78	Obpiriforme ou espatulada	Obpiriforme ou espatulada	Obpiriforme ou espatulada
IB12/79	Clavada	Esferopedunculada	Esferopedunculada
IB17/89	Elipsoidal e Disforme 2	Elipsoidal	Elipsoidal
IB01/01	Globosa	Globosa	Globosa
FCA06	Clavada e Disforme 1	Clavada	Clavada
FCA07	Obpiriforme ou Espatulada	Elipsoidal a espatulada ou obpiriforme	Elipsoidal a espatulada ou obpiriforme
FCA09	Obpiriforme ou Espatulada	Obpiriforme ou Espatulada	Obpiriforme ou Espatulada
FCA10	Elipsoidal	Elipsoidal	Elipsoidal
Cka	Lanceolada	Lanceolada	Lanceolada

Com relação à dimensão dos conídios, no quadro abaixo estão registrados os resultados obtidos, sendo utilizados os mesmos substratos.

Quadro 4 – Dimensão de conídios* de *Cylindrocladium* spp em diferentes meios.

Isolados	Meio BDA		Meio Czapeck		Meio GAA	
	Comprimento (µm)**	Largura (µm)**	Comprimento (µm)**	Largura (µm)**	Comprimento (µm)**	Largura (µm)**
IB223	(32,9–) 35,7 (– 38,5)	(2,2–) 3,1 (– 3,9)	(35,9–) 41,8 (– 47,2)	(2,7–) 3,4 (–3,9)	—	—
IB238	(37,2–) 40,4 (– 43,6)	(2,5–) 3,1 (– 3,6)	(43, 1–) 46,8 (– 49,8)	(3,1–) 3,3 (–3,8)	(42,3–) 45,7 (– 48,6)	—
IB239	(25,4–) 29,3 (– 36,3)	(1,9–) 2,4 (– 3,1)	—	—	—	—
IB 268	—	—	—	—	—	—
IB328	(16,0–) 17,6 (– 19,3)	(2,0–) 2,5 (– 3,0)	(15,1–) 16,6 (– 19,3)	(1,5–) 1,6 (–1,8)	(15,3–) 16,9 (– 19,7)	—
IB421	—	—	—	—	—	—
IB515	—	—	—	—	—	—
IB728	—	—	—	—	—	—
IB11/75	(40,1–) 43,5 (– 46,9)	(3,0–) 3,4 (– 3,7)	—	—	—	—
IB6/78	(37,0–) 40,6 (– 44,2)	(3,1–) 3,4 (– 3,8)	(33,1–) 36,4 (– 41,6)	(3,0–) 3,2 (–3,5)	(30,1–) 36,3 (– 40,4)	(2,6–) 3,1 (–3,5)
IB12/79	(28,5–) 33,6 (– 38,7)	(3,5–) 3,8 (– 4,2)	(28,5–) 33,6 (– 38,7)	(3,6–) 3,8 (–4,2)	—	—
IB17/89	(41,8–) 44,7 (– 47,7)	(4,1–) 4,3 (– 5,2)	(41,8–) 44,1 (– 47,7)	(4,1–) 4,3 (–5,4)	(36,6–) 42,7 (– 48,8)	(3,2–) 3,7 (–4,2)
IB01/01	(65,0–) 69,8 (– 74,7)	(4,2–) 4,9 (– 5,6)	(58,3–) 66,7 (– 72,5)	(4,2–) 4,9 (–5,6)	(58,4–) 65,3 (– 73,6)	(4,4–) 5,6 (–6,8)
Cka	(12,5–) 13,9 (– 15,4)	(1,6–) 1,8 (– 2,0)	(12,4–) 13,6 (– 14,8)	(2,1–) 2,3 (–2,6)	(11,9–) 13,5 (– 15,1)	(1,9–) 2,1 (–2,6)
FCA06	(37,1–) 39,9 (– 42,7)	(3,4–) 3,8 (– 4,2)	(37,1–) 39,6 (– 42,2)	(2,5–) 3,1 (–3,8)	(40,2–) 44,3 (– 48,8)	(3,2–) 3,7 (–4,1)
FCA07	(37,4–) 40,9 (– 44,4)	(3,0–) 3,6 (– 4,2)	(37,6–) 43,9 (– 49,0)	(2,5–) 3,3 (–3,4)	(40,5–) 43,7 (– 47,3)	(2,7–) 3,4 (–3,8)
FCA09	(42,4–) 46,2 (– 50,0)	(3,2–) 3,5 (– 3,8)	(36,2–) 38,9 (– 41,7)	(3,1–) 3,3 (–3,6)	(36,8–) 39,6 (– 41,9)	(3,0–) 3,4 (–3,8)
FCA10	(38,9–) 41,0 (– 43,1)	(3,6–) 3,9 (– 4,3)	(37,2–) 38,2 (– 43,6)	(3,5–) 3,7 (–4,0)	(33,8–) 38,9 (– 40,9)	(2,6–) 3,3 (3,8–)

*Média de 20 conídios / ** (Extremo máximo) Média (Extremo mínimo)

– Não ocorreu esporulação

Com relação à forma, todos os conídios observados apresentavam-se cilíndricos, com ambas as extremidades arredondadas e variação de 1 a 3 septos. Conforme pode ser observado alguns dos isolados não esporularam em Czapeck e/ou GAA. O isolado IB239 esporulou em BDA somente após cerca de um mês, sem ser observada a formação de vesículas terminais. É possível que as características morfológicas desta cultura tenham sido alteradas devido a ter sido isolada há muito tempo ou, ainda, o isolado não tenha sido capaz de metabolizar um ou mais nutrientes necessários à esporulação. Com relação às culturas que esporularam, pode-se observar que as dimensões dos conídios mostraram-se ligeiramente diferentes em cada substrato. Porém, é importante ressaltar que variações no comprimento e largura dos conídios podem ser observadas entre isolados e, também, no mesmo isolado. Isto pode ocorrer tanto quando se utiliza o mesmo substrato como quando são utilizados diferentes meios para o crescimento das colônias devido a diferenças na constituição genética de cada isolado. Porém, tais variações quando pequenas são consideradas irrelevantes, caso estejam dentro da faixa de variação aceita para as espécies de *Cylindrocladium* (CROUS, 2002).

Comparando-se a morfologia da vesícula terminal e as dimensões dos conídios dos isolados em estudo nos meios BDA, Czapeck e GAA, pôde-se observar que houve pequena variação nas dimensões dos conídios, porém sem alteração na morfologia das vesículas terminais. Deve-se ressaltar que as alterações ocorridas não modificaram o resultado da identificação preliminar dos isolados estudados. Porém, diferentemente do que se observa em outros gêneros, como por exemplo, *Colletotrichum* (FAGAN, 1980), existe certa complexidade e confusão na correta identificação de isolados do gênero *Cylindrocladium* através da utilização dos caracteres morfológicos.

Analisando-se conjuntamente os Quadros 3 e 4 e, comparando-se os resultados registrados com os dados de literatura, é provável que as espécies estudadas sejam as seguintes, conforme o Quadro 5.

Quadro 5 – Prováveis espécies do gênero *Cylindrocladium*, identificadas com base na dimensão dos conídios e/ou forma da vesícula terminal.

Isolado	Identificação Original	Identificação Morfológica	Conídios	Vesícula Terminal
IB12/79	<i>C. clavatum</i> (<i>C. gracile</i>)	<i>C. gracile</i>	28,5-38,7 x 3,5 x 4,2	Clavada
FCA06	<i>Cylindrocladium</i> sp.	<i>C. gracile</i>	37,1-42,7 x 3,4 x 4,2	Clavada
IB239	<i>C. citri</i>	<i>C. leucothoes</i> (sin. <i>C. perseae</i>)	25,4-36,3 x 1,9 x 3,1	—
IB268	<i>C. iliticola</i>	<i>C. naviculatum</i>	—	Naviculada
IB238	<i>C. scoparium</i>	<i>C. scoparium</i>	37,2-43,6 x 2,5 x 3,6	Elipsoidal
IB11/75	<i>C. scoparium</i>	<i>C. spathulatum</i>	40,1-46,9 x 3,0-3,7	Obpiriforme ou Espatulada
IB17/89	<i>C. scoparium</i>	<i>C. scoparium</i>	41,8-47,7 x 4,1-5,2	Elipsoidal
IB223	<i>C. scoparium</i> var. <i>brasiliensis</i>	<i>C. scoparium</i>	32,9-38,5 x 2,2 x 3,9	Obpiriforme ou Espatulada
FCA07	<i>Cylindrocladium</i> sp.	<i>C. scoparium</i>	37,4-44,4 x 3,0-4,2	Elipsoidal a Espatulada ou Obpiriforme
FCA10	<i>Cylindrocladium</i> sp.	<i>C. scoparium</i>	38,9-43,1 x 3,6-4,3	Elipsoidal
IB6/78	<i>C. scoparium</i>	<i>C. spathulatum</i>	37,0-44,2 x 3,1-4,2	Obpiriforme ou Espatulada
FCA09	<i>Cylindrocladium</i> sp.	<i>C. spathulatum</i>	42,4-50,0 x 3,2-3,8	Obpiriforme ou Espatulada
IB01/01	<i>C. spathiphylli</i>	<i>C. spathiphylli</i>	65,0-74,7 x 4,2-5,6	Globosa
IB421	<i>C. scoparium</i>	Diversas	—	Esferopedunculada
IB515	<i>C. scoparium</i>	Diversas	—	Esferopedunculada
IB728	<i>C. scoparium</i>	Diversas	—	Esferopedunculada
IB328	<i>C. scoparium</i> var. <i>brasiliensis</i>	<i>Cylindrocladiella</i> sp.	16,0-19,3 x 2,0-3,0	Clavada
CKa	<i>Cylindrocladium</i> sp.	<i>Cylindrocladiella</i> sp.	12,0-15,4 x 1,6-2,0	Lanceolada

DIVERSAS: *C. scoparium* / *C. parasiticum* / *C. quinquesepatum* / *C. variabile*

Observando-se o Quadro 5, verifica-se que, para alguns isolados, existe mais de uma possibilidade de identificação, devido a grande variação nos caracteres morfológicos, conforme foi encontrado na literatura especializada. Por exemplo, em uma mesma espécie pode ser observada variação no formato da vesícula terminal, assim como nas dimensões dos conídios (CROUS & WINGFIELD, 1994). Ainda com referência ao Quadro 4, deve-se ressaltar que as culturas Cka, isolada da planta ornamental *Kalanchoe*, e a cultura IB328, isolada de eucalipto, foram identificadas como pertencentes ao gênero *Cylindrocladiella* devido às dimensões reduzidas dos conídios. De acordo com BOESEWINKEL (1982) e CROUS & WINGFIELD (1993), o citado gênero agrupa espécies de *Cylindrocladium* que possuem conídios pequenos.

2)- Caracterização Fisiológica dos Diferentes Isolados

2.1)- Patogenicidade dos isolados de *Cylindrocladium* a diferentes hospedeiros

Após cinco dias verificou-se que, com exceção dos isolados IB515, IB728 e FCA01, os demais foram patogênicos às folhas de *E. urophylla*, sendo que IB239, IB328, IB6/78, IB12/79, IB17/89, IB01/01 e Cka induziram reação de hipersensibilidade, com alguns isolados produzindo grande número de minúsculas lesões. Os demais isolados resultaram em necrose agressiva do tecido foliar, destacando-se FCA06 e FCA07.

A inoculação em solo com os isolados FCA06, FCA07, IB223, IB6/78 e IB12/79 resultou, após seis dias, em lesões no coleto, com posterior murcha e morte das plântulas, que secaram sem tombar, conforme ilustrado na Figura 2.

As culturas que produziram algum tipo de lesão puderam ser reisoladas em meio BDA.



Figura 2 – Resultados obtidos após as inoculações dos isolados de *Cylindrocladium* sobre diferentes órgãos de *E. urophylla*. A → Controle; B → Morte causada pela inoculação no solo; C → Mancha e necrose do tecido foliar; D → Reação de Hipersensibilidade (HR) – seta.

Com relação a *E. grandis*, somente os isolados IB6/78 e IB12/79 provocaram lesões no coleto e morte das plântulas após 4 dias das inoculações em solo. Sobre as folhas do mesmo hospedeiro, somente IB239, IB6/78 e IB12/79 provocaram algumas poucas lesões após 15 dias das inoculações.

Quando o hospedeiro inoculado foi lírio-da-paz, somente os isolados IB01/01 e IB238 provocaram sintomas e puderam ser reisolados. Porém, o primeiro mostrou-se mais agressivo, isto por ter provocado sintomas iniciais em curto período de tempo, além de ter provocado a morte das plantas inoculadas, como é ilustrado pela Figura 3.

É importante ressaltar que IB01/01 foi, originalmente, isolado de lírio-da-paz, enquanto que IB238 foi isolado de eucalipto. Comportamento patogênico distinto já foi relatado em inúmeros gêneros. Pode ser citado como exemplo o gênero *Colletotrichum* (GOES & KIMATI, 1997).

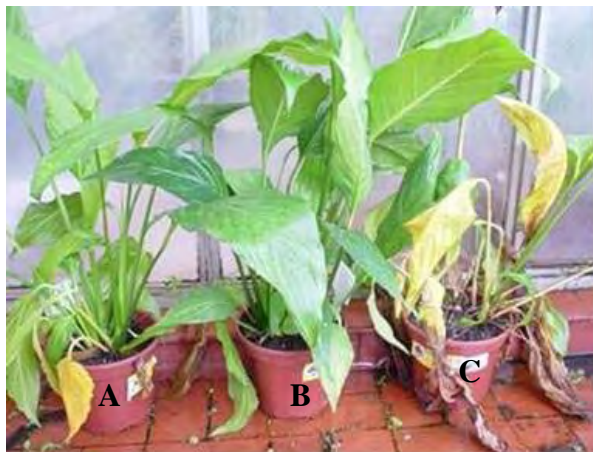


Figura 3 – Inoculação de isolados do gênero *Cylindrocladium* sobre lírio-da-paz. A → IB238; B → Controle; C → IB01/01.

Com relação às inoculações realizadas em sementes de amendoim variedade Tatu, pôde-se observar que ocorreu a infecção, uma vez que houve crescimento micelial sobre as sementes. Porém, a germinação e a fisiologia não foram prejudicadas, uma vez que a partir das sementes inoculadas, desenvolveram-se plantas saudáveis. A Figura 4 ilustra os resultados descritos.



C=controle; 1=IB223, 2=IB238, 3=IB239, 4=IB268, 5=IB328, 6=IB421, 7=IB515, 8=IB728, 9=IB6/78, 10=IB01/01 e 11=FCA06.

Figura 4-Resultados obtidos pela inoculação de *Cylindrocladium* spp. em sementes de amendoim var. Tatú.

Os dados referentes ao efeito das inoculações de *Cylindrocladium* spp. em *Eucalyptus urophylla*, *E. grandis*, *Spathiphyllum walisii* (lírio da paz) e sementes de amendoim, encontram-se apresentados no Quadro 6.

Quadro 6 – Inoculação de *Cylindrocladium* spp. sobre diferentes hospedeiros.

Isolado	<i>E. urophylla</i>		<i>E. grandis</i>		Amendoim var. Tatu	Lírio da paz
	Solo	Folhas	Solo	Folhas		
IB223	+	+ (21 lesões)	—	—	—	—
IB238	—	+ (16 lesões)	—	—	+	+ (25 dias após inoculação)
IB239	—	+ (HR ^{**})	—	+ (01 lesão)	+	—
IB268	—	+ (31 lesões)	—	—	+	—
IB328	—	+ (HR ^{**})	—	—	+	—
IB421	—	+ (01 lesão)	—	—	—	—
IB515	—	—	—	—	+	—
IB728	—	—	—	—	—	—
IB11/75	—	+ (33 lesões)	—	—	—	—
IB6/78	+	+ (HR ^{**})	+	+ (02 lesões)	+	—
IB12/79	+	+ (HR ^{**})	+	+ (02 lesões)	—	—
IB17/89	—	+ (HR ^{**})	—	—	—	—
IB01/01	—	+ (HR ^{**})	—	—	+	+ (10 dias após inoculação)
Cka	—	+ (HR ^{**})	—	—	—	—
FCA06	+	+ (85 lesões)	—	—	+	—
FCA07	+	+ (90 lesões)	—	—	—	—
FCA09	—	+ (10 lesões)	—	—	—	—
FCA10	—	+ (28 lesões)	—	—	—	—

* Média de seis repetições/isolado. / ** HR = Reação de Hipersensibilidade.

(—) negativo = ausência de sintomas

(+) positivo = ocorrência de sintomas

A partir dos resultados obtidos, pode-se observar que os isolados IB238, IB239, IB268, IB328, IB421, IB6/78, IB01/01 e FCA06 colonizaram as sementes de amendoim, porém sem interferir sobre a germinação (Figura 4), enquanto que sobre eucalipto, com exceção de IB6/78 e FCA06, tais isolados não provocaram qualquer sintoma ou, apenas

provocaram manchas em folhas, quando o hospedeiro foi *E. urophylla*. Pode-se supor, portanto, que exista resposta diferente de cada hospedeiro frente a um mesmo isolado ou, ainda, que exista certo grau de especialização de cada isolado para certos hospedeiros, o que certamente é controlado por mecanismo gênico.

Verifica-se, portanto, que existe comportamento patogênico diferenciado dos isolados frente aos diferentes hospedeiros e, também, frente a diferentes órgãos do mesmo hospedeiro. Observa-se que *E. grandis* foi mais resistente às infecções no coleto e nas folhas. Somente os isolados IB6/78 e IB12/79 foram capazes de infectar o coleto das plântulas, reforçando a existência de comportamento patogênico diferencial. Esta característica pode ser resultante do próprio patógeno, das características genéticas do hospedeiro ou, mais provavelmente, devido à interação patógeno x hospedeiro x ambiente.

É possível observar, também, certa especificidade patógeno x hospedeiro dentro do gênero *Cylindrocladium*, isto devido aos resultados obtidos quando o hospedeiro utilizado foi a planta ornamental lírio-da-paz.

Resultados semelhantes foram relatados por SOBERS & LITTRELL (1974) que, inoculando *C. crotalariae*, *C. scoparium* e *C. floridanum* sobre folhas de amendoim, soja, cevada, aveia e centeio verificaram que, em todos os tratamentos, infecção e sintomas iniciais foram observados 24-48 h após as inoculações, porém, com maior ou menor grau de severidade.

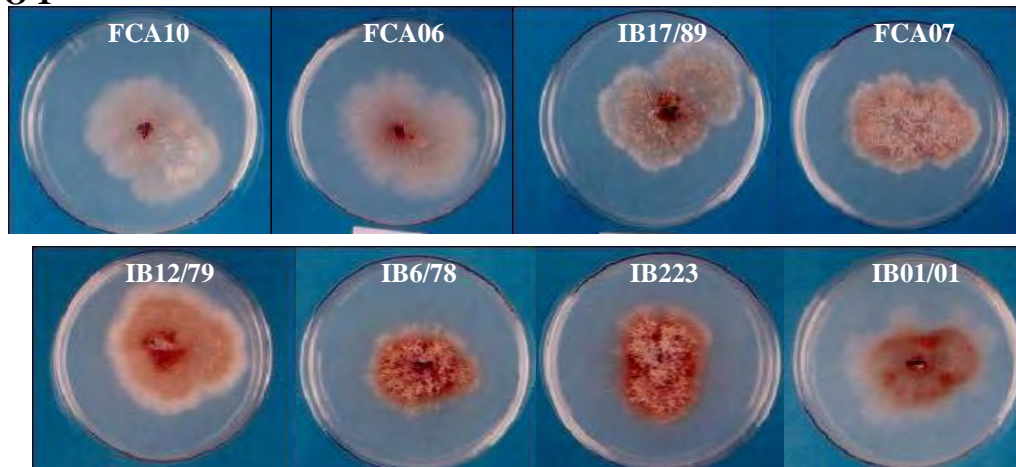
Os autores concluíram que, embora não tendo sido referidos sobre alguns destes hospedeiros inoculados, estes microrganismos poderiam ser patógenos em potencial (SOBERS & LITTRELL, 1974).

2.2)- Coloração das colônias - crescimento em Meio Czapeck

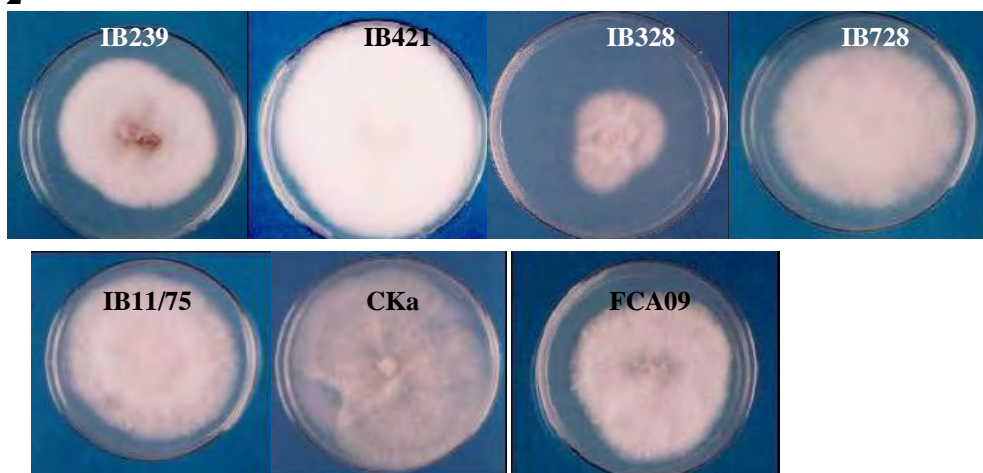
Os resultados obtidos permitiram a formação de três grupos: Grupo 1- Micélio rasteiro (plano) com coloração variando de castanho-rosado pálido a castanho avermelhado intenso; Grupo 2- Micélio aéreo, com aspecto cotonoso e totalmente branco; Grupo 3- Micélio aéreo, com aspecto semi-cotonoso e periferia branca e centro castanho claro. Deve-se ressaltar que isolados pertencentes ao Grupo 1 foram patogênicos às folhas e ao colo

de plântulas de *E. urophylla*, destacando-se como mais agressivos FCA06, FCA7 e IB223. A Figura 5 ilustra o aspecto das culturas em meio sintético Czapeck.

GRUPO 1



GRUPO 2



GRUPO 3



Figura 5 – Agrupamento de isolados de *Cylindrocladium* spp., de acordo com as características de tipo e coloração do micélio e, velocidade de crescimento em meio Czapeck.

Segundo ROSA & MENEZES (2001), a pigmentação e o aspecto da colônia (micélio aéreo ou rasteiro) podem diferir, dependendo do meio de cultura utilizado, de seu pH e da capacidade do isolado em metabolizar componentes do substrato. Os mesmos autores, estudando alguns isolados de *Pseudocercopora musae*, observaram crescimento plano do micélio nos meios BDA e V8, com pH 4,5. Nestes mesmos meios em outros pHs o crescimento do micélio foi aéreo.

Com relação à pigmentação, para um mesmo isolado, houve variação em função do meio de cultura utilizado (ROSA & MENEZES, 2001). GRIFFIN (1994) afirma que esses pigmentos são, em parte, determinados por fatores genéticos e expressos em função do meio ambiente.

JOHNSTON & JONES (1997) também conseguiram separar isolados do gênero *Colletotrichum* em 16 grupos distintos com base nas características culturais (cor e aspecto da cultura) desses isolados. Além desses caracteres, a taxa de crescimento da cultura é relatada como possível parâmetro para o agrupamento de isolados (SERRA & SILVA, 2004).

O meio Czapeck possibilitou a diferenciação dos isolados e, conseqüentemente, o agrupamento daqueles com características próximas. ORREGO FUENTE et al. (1996) obtiveram resultados semelhantes também com isolados de *Cylindrocladium*, porém não só em meio Czapeck, mas também nos meios de coco, soja e cenoura, os quais induziram à variação nas características culturais dos isolados estudados. Em meio BDA isto não é possível, uma vez que todos os isolados apresentam o mesmo tipo de micélio (cotonoso), coloração da cultura (marrom-avermelhada intensa) e tamanho da colônia semelhantes. Para *Colletotricum gloeosporioides* resultado semelhante em meio BDA foi relatado (SERRA & SILVA, 2004). Devido a não ser um meio de cultura sintético, seus constituintes podem apresentar variações, o que pode resultar, para muitos fungos, em uniformidade nas características culturais de diferentes isolados. Ao contrário, os meios sintéticos, como Czapeck, não apresentam variação nas características de seus componentes.

Provavelmente, os constituintes do meio Czapeck, ao serem utilizados pelos isolados para seu desenvolvimento, modificaram a fisiologia dos microrganismos, o que foi refletido nas características morfológicas das culturas. Segundo COCHRANE (1958), fatores nutricionais como microelementos essenciais, fontes de carbono e de nitrogênio podem fazer com que os fungos produzam pigmentos e os liberem no meio de cultura. CASTRO &

COELHO (2000), observaram significativa variação no comportamento de *Cercopora cruenta* no que se refere ao tamanho das colônias, quando cultivado em diferentes meios de cultura.

De acordo com a composição do meio, por exemplo, adição de sais (KCl, NaCl, NaNO₃), a morfologia da colônia pode sofrer alteração. Os sais podem induzir ao clareamento da colônia uma vez que são nutrientes capazes de interferir na atividade enzimática, metabolismo dos carboidratos, balanço iônico, formação de aminoácidos, nucleotídeos e vitaminas (GRIFFIN, 1993).

Porém, não se deve menosprezar a capacidade intrínseca do microrganismo em captar e utilizar os nutrientes do substrato suprindo, assim, suas exigências nutricionais (EKPO & ESURUOSO, 1977; QUEIROZ & MENEZES, 1993; OLIVEIRA et al., 1997). Tal capacidade pode ser devida aos isolados pertencerem a raças fisiológicas distintas, conforme sugerido por AZEVEDO (1997), e serem diferenciados não pela morfologia, mas somente através de estudos fisiológicos e moleculares. VECHIATO (2002) também conseguiu agrupar cinquenta e cinco isolados de *Diaporthe phaseolorum* var. *meridionalis* observando crescimento e coloração das colônias nos meios Czapeck e BDA e, FAGAN (1980), LIYANAGE et al. (1992), GOES & KIMATI (1997) e SERRA & SILVA (2004) conseguiram distinguir “strains” em *Colletotrichum acutatum* e *C. gloeosporioides*.

Com relação ao crescimento dos isolados, no Quadro 7 encontram-se registrados os dados referentes ao tamanho das colônias de cada isolado. Estes resultados estão de acordo com aqueles obtidos por COCHRANE (1958), ou seja, o tamanho das colônias varia entre diferentes espécies e, também, entre clones de uma mesma espécie.

Quadro 7 – Agrupamento dos isolados de *Cylindrocladium* de acordo com o tamanho e coloração das colônias em meio Czapeck.

Isolados	Coloração da Cultura	Tamanho da Colônia (cm)
GRUPO 1 – Micélio rasteiro (plano)		
FCA10	Castanho rosado pálido	5,6 x 4,2
FCA06	Castanho rosado claro	5,6 x 4,7
IB17/89	Castanho rosado claro	5,1 x 4,0
FCA07	Castanho rosado alaranjado claro	5,5 x 4,5
IB12/79	Castanho alaranjado intenso	5,7 x 4,5
IB223	Castanho alaranjado avermelhado intenso	3,6 x 2,9
IB6/78	Castanho alaranjado avermelhado intenso	4,0 x 3,1
IB01/01	Castanho avermelhado intenso	5,7 x 4,6
Grupo 2 – Micélio aéreo cotonoso		
IB239	Branca	5,6 x 4,9
IB328	Branca	3,9 x 3,1
IB421	Branca	7,7 x 7,1
IB728	Branca	6,9 x 6,5
IB11/75	Branca	7,2 x 6,5
Cka	Branca	7,5 x 7,1
FCA09	Branca	6,5 x 6,3
GRUPO 3 – Micélio aéreo semi-cotonoso		
IB238	Periferia branca com o centro castanho claro	7,7 x 7,7
IB268	Periferia branca com o centro castanho claro	6,7 x 6,5
IB515	Periferia branca com o centro castanho claro	5,1 x 4,2

* Avaliação aos 7 dias de idade e temperatura de incubação = 25°C

Observa-se, portanto, que a maioria dos isolados com comportamento patogênico (Quadro 7), coloração da colônia e velocidade de crescimento semelhantes encontram-se no mesmo grupo.

2.3)- Crescimento dos isolados de *Cylindrocladium* a diferentes temperaturas

Observou-se um comportamento diferencial dos isolados incubados sob diferentes temperaturas, podendo-se verificar que todos os isolados, com exceção de IB728, IB 12/79 e IB01/01, cresceram bem a 15°C. À temperatura de 30°C, IB239, IB268,

IB421 e IB17/89 pouco se desenvolveram. Ao contrário, a 30°C, os isolados IB238, IB328, IB728, IB11/75, IB12/79, CKa, FCA06, FCA09 e FCA10, cresceram bem.

Com relação aos isolados mais agressivos a *Eucalyptus urophylla* (FCA06 e FCA07), estes apresentaram crescimento razoável a 30°C. Pôde-se observar, também, que 25°C foi a melhor temperatura para o crescimento de todos os isolados (Quadro 8), enquanto que a 35°C, nenhum deles se desenvolveu, sendo esta temperatura considerada letal para todos os isolados estudados. Embora 25°C tenha sido uma temperatura bastante adequada para o crescimento de todos os isolados, pôde-se constatar nítida diferença na velocidade de crescimento: o isolado que mais rapidamente se desenvolveu foi IB238, enquanto o mais lento foi IB6/78. Dados de literatura confirmam que 25°C é a temperatura ideal para o crescimento da grande maioria das espécies de *Cylindrocladium* (CROUS et al., 1992; CROUS & WINGFIELD, 1994; CROUS, 2002). A Figura 6 ilustra alguns dos resultados obtidos.

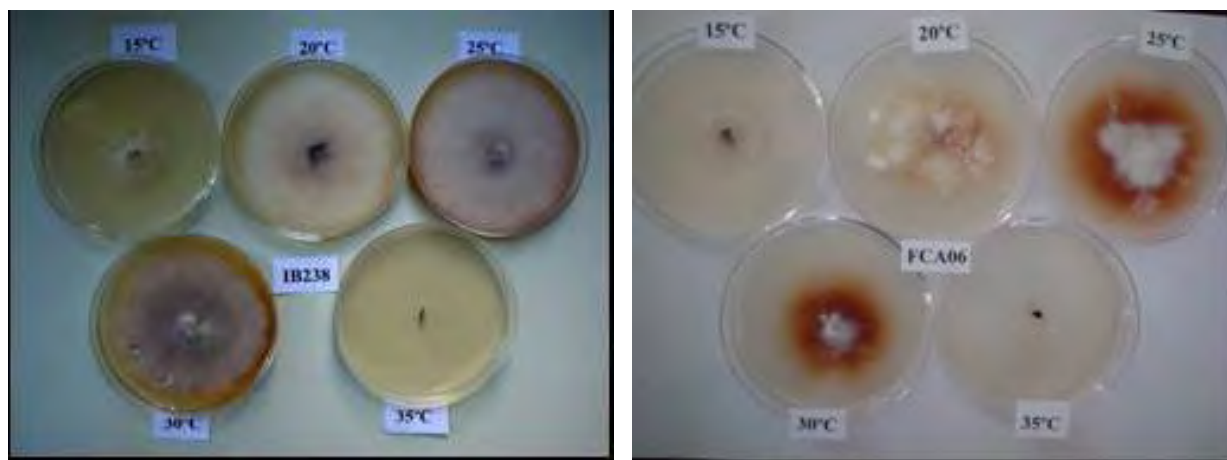


Figura 6 - Crescimento de isolados de *Cylindrocladium* sob diferentes temperaturas.

Quadro 8 - Crescimento de isolados do gênero *Cylindrocladium* em meio Czapeck a diferentes temperaturas.

ISOLADO	MÉDIA DE CRESCIMENTO*			
	15°C	20°C	25°C	30°C
IB223	2,09 abB	5,73 abA	6,26 abcA	3,85 bcdAB
IB238	2,68 abB	7,06 aA	8,50 aA	7,46 aA
IB239	2,26 abB	4,59 abA	6,09 abcA	1,19 eB
IB268	3,39 aB	6,29 abA	7,73 abA	1,55 deC
IB328	1,53 abB	3,33 bA	4,83 abcA	4,69 abcA
IB421	2,89 abB	6,03 abA	7,79 abA	1,52 deB
IB515	1,86 abB	3,89 abA	4,86 abcA	2,99 cdeAB
IB728	1,36 abC	4,83 abB	7,93 abA	5,56 abcAB
IB11/75	3,39 aB	5,53 abAB	7,36 abcA	4,26 abcB
IB6/78	2,02 abB	3,69 abAB	4,08 cA	2,76 cdeAB
IB12/79	1,39 abB	3,85 abA	5,75 abcA	4,96 abcA
IB17/89	2,10 abBC	3,89 abAB	4,66 bcA	1,39 eC
IB01/01	1,09 bB	3,49 bA	5,09 abcA	4,06 abcA
FCA06	2,66 abB	5,19 abA	6,69 abcA	5,43 abcA
FCA07	2,19 abB	4,20 abA	5,32 abcA	3,86 bcdAB
FCA09	2,89 abB	5,09 abA	7,19 abcA	7,16 abA
FCA10	3,13 abB	5,09 abAB	6,76 abcA	5,59 abcA
CKa	2,06 abB	4,83 abA	6,19 abcA	4,93 abcA

*Média de três repetições. Para análise estatística os dados foram transformados em \sqrt{x} . Médias seguidas da mesma letra minúscula na vertical e maiúscula na horizontal não diferem entre si pelo teste de TUKEY, ao nível de 5% de probabilidade. Coeficiente de variação = 12,76%.

2.4)- Pareamento de isolados em meio feijão azuki

Somente entre alguns dos isolados pareados foi observada a formação de peritécios, estruturas teleomórficas que contêm os ascos dentro dos quais estão os ascosporos, esporos sexuais característicos do gênero *Calonectria*. Os pareamentos que apresentaram resultado positivo foram oito: IB223-IB238; IB223-IB421; IB223-IB17/89; IB238-IB268; IB238-IB17/89; IB238-FCA10; IB239-IB17/89 e IB17/89-IB01/01. Os peritécios observados apresentavam coloração laranja-avermelhada e, como já referido anteriormente, foram observados nos pontos de encontro das hifas das culturas pareadas (Figura 7).



Figura 7 – Pareamento de diferentes culturas do gênero *Cylindrocladium*. A → IB17/89 e IB01/01. B → IB17/89 e IB239. Peritécios alaranjados (seta).

Os resultados do item 2.2 (Coloração das colônias - crescimento em Meio Czapeck) permitiram a formação de três grupos distintos e, analisando-se estes resultados aos deste item, pode-se verificar que os isolados pertencentes ao GRUPO 1 (IB223, IB17/89, IB01/01 e FCA10), apresentaram maior variabilidade genética, uma vez que foram capazes de produzir estruturas sexuais quando em contato com isolados dos GRUPOS 2 (IB239 e IB421) e 3 (IB238 e IB268). A variabilidade genética resulta na variação dos demais caracteres estudados. Entre os isolados pertencentes ao Grupo 1, o isolado IB17/89 foi considerado, provavelmente, o único homotático. No Quadro 9 encontram-se apresentados os dados referentes ao pareamentos das culturas de *Cylindrocladium* spp.

Quadro 9 - Resultados obtidos pelo pareamento de isolados de *Cylindrocladium* em meio Azuki.

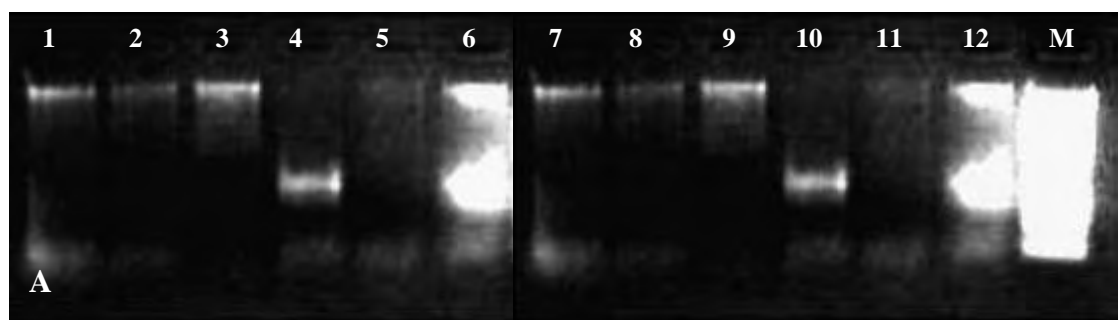
Isolado	IB223	IB238	IB239	IB268	IB328	IB421	IB515	IB728	IB11/75	IB6/78	IB12/79	IB17/89	IB01/01	CKa	FCA06	FCA07	FCA09	FCA10
IB223	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
IB238	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
IB239	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
IB268	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IB328	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IB421	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IB515	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IB728	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IB11/75	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IB6/78	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IB12/79	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IB17/89	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
IB01/01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
CKa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FCA06	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FCA07	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FCA09	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FCA10	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+ → Formação de peritécios na linha de encontro das hifas dos isolados pareados

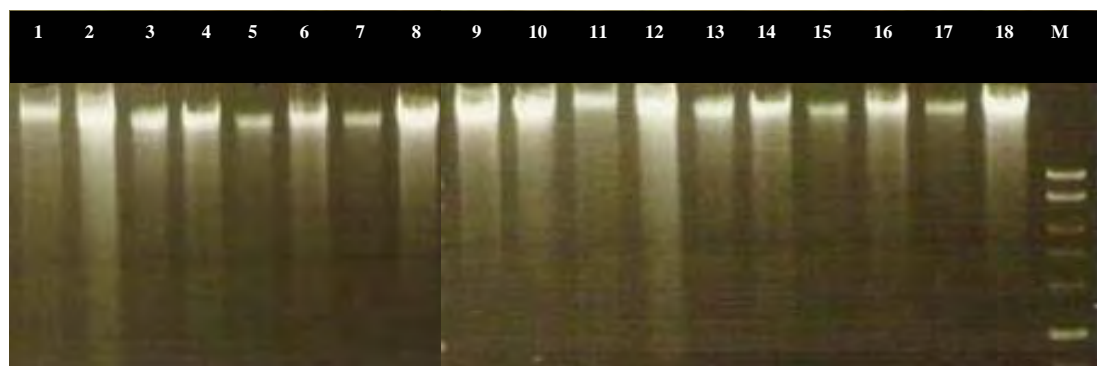
- → Ausência de peritécios na linha de encontro das hifas dos isolados pareados

3)- Extração de DNA para caracterização molecular

Dos diferentes protocolos utilizados o 3.2, com os isolados sendo cultivados em meio extrato de malte (ME), e o 3.3 possibilitaram a obtenção de resultados positivos, conforme ilustra a Figura 8.



1=IB223, 2=IB 238, 3=IB328, 4=IB515, 5=IB11/75, 6=IB12/79, 7=IB17/89, 8=CKa, 9=FCA06, 10=FCA07, 11=FCA09, 12=FCA10, M = Marcador



1=IB223, 2=IB 238, 3=IB239, 4=IB268, 5=IB328, 6=IB421, 7=IB515, 8=IB728, 9=IB11/75, 10=IB6/78, 11=IB12/79, 12=IB17/89, 13=IB01/01, 14=CKa, 15=FCA06, 16=FCA07, 17=FCA09, 18=FCA10, M = Marcador

Figura 8 – Eletroforese em gel de agarose realizada após a extração de DNA realizada com a utilização do Protocolo 3.2 (A) e Protocolo 3.3 (B). M = marcador.

Porém, ao se comparar as ilustrações, pode-se verificar que o protocolo no qual foi utilizado o produto DNazol (Protocolo 3.3), possibilitou a obtenção de DNA pouco ou nada degradado, portanto de melhor qualidade, o que foi comprovado através da

quantificação em espectrofotômetro Ultrospec 2000 – Amersham Pharmacia Biotech. Os resultados estão registrados no Quadro 10.

Quadro 10 – Quantidade e qualidade do DNA dos isolados de *Cylindrocladium* extraído com a utilização de DNAzol (Protocolo 3.3).

Isolado	Quantidade de DNA ($\mu\text{g/mL}$)	Relação A260/A280
IB223	72	1,53
IB238	63	1,73
IB239	52	1,64
IB268	58	1,53
IB328	67	1,83
IB421	48	1,76
IB515	54	1,84
IB728	38	1,78
IB11/75	50	1,61
IB12/79	70	1,51
IB17/89	45	1,62
IB01/01	30	1,63
FCA06	76	1,71
FCA07	54	1,67
FCA09	37	1,83
FCA10	56	1,69
CKa	75	1,73

Quanto melhor a qualidade do DNA obtido, técnicas mais sensíveis poderão ser utilizadas, o que torna a caracterização molecular mais precisa. O espectrofotômetro realiza duas leituras para cada amostra: uma a absorbância de 260 nm e outra a 280 nm. A qualidade do DNA é dada pela relação A260/A280. Quanto mais próximo o valor obtido estiver entre 1,7 a 1,8, maior será a pureza do DNA, o que significa que o protocolo de extração está bastante adequado. É importante ressaltar que antes da realização

dessas leituras uma alíquota de 10 μ L do DNA de cada isolado foi, separadamente, diluída em 90 μ L de água ultrapura, devido a ser um procedimento necessário realizado antes da utilização do espectofotômetro.

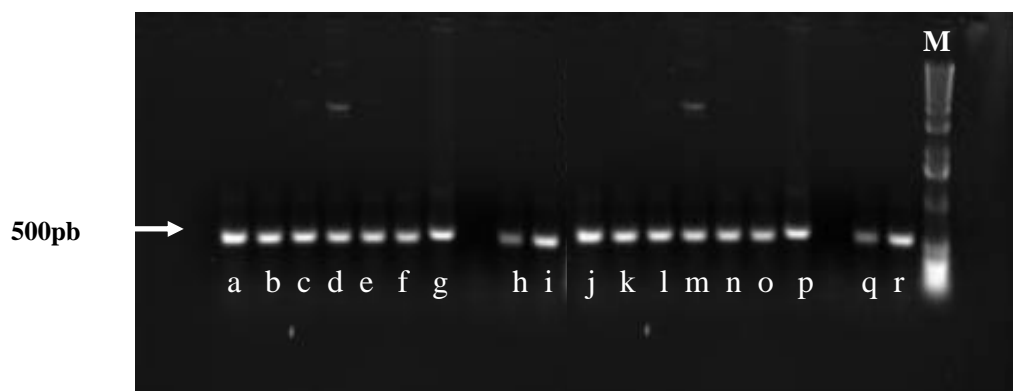
Devido aos resultados obtidos e, também, por possibilitar a extração do DNA das amostras em curto período de tempo, o Protocolo 3.3 passou a ser utilizado.

4)- Caracterização molecular dos isolados de *Cylindrocladium*

4a)- PCR

A PCR realizada com os primers ITS1 e ITS4 resultou, para todos os isolados, na obtenção de um fragmento com cerca de 500 pb, conforma ilustra a Figura 8.

A partir do produto de PCR restante de cada isolado, foi realizada nova reação de PCR específica para sequenciamento.



a=IB223, b=IB238, c=IB239, d=IB268, e=IB328, f=IB421, g=IB515, h=IB728, i=IB11/75, j=IB6/78, k=IB12/79, l=IB17/89, m=01/01, n=FCA06, o=FCA07, p=FCA09, q=FCA10, r=CKa

4b)- Seqüenciamento

Após a reação de PCR para sequenciamento, foram obtidas, para cada isolado, duas seqüências (senso e anti-senso). Ambas foram submetidas ao programa BLASTN (ALTSCHUL et al., 1997) para a identificação de cada isolado. No ANEXO 1 constam as seqüências senso obtidas para cada um dos isolados.

As seqüências foram comparadas com aquelas já depositadas no banco de dados GenBank para possível identificação taxonômica de cada isolado. Após a realização do BLASTN com ambas as fitas (senso e anti-senso), os isolados estudados apresentaram seqüência de bases muito semelhante a: *Calonectria kyotensis* (IB328 e IB11/75), *Cylindrocladium pseudogracile* ou *C. quinquesseptatum* (IB728), *C. pseudogracile* ou *C. gracile* – sin. *C. clavatum* - (IB12/79), *C. spathiphylli* (IB01/01), *C. perseae* (IB239) e *C. sphaullatum* ou *C. quinquesseptatum* (IB421 e IB515) e *C. spathulatum* (IB223, IB238, IB268, IB6/78, IB17/89, FCA06, FCA07, FCA09, FCA10 e Cka). Destes, somente FCA07, FCA09 e Cka apresentaram diferenças relevantes dos demais em vários trechos da seqüência, sendo, porém, bastante semelhantes entre si. IB328 e IB11/75 apresentaram diferença em algumas poucas bases da seqüência.

Este resultado pode ser conferido no alinhamento citado a seguir, obtido após a utilização do programa CLUSTAL-W. É importante ressaltar que foram incluídos dois isolados de gêneros diferentes (*Alternaria* e *Cylindrocarpon*) e um outro de *Cylindrocladium*. As seqüências destes foram extraídas do Gene Bank e o objetivo foi verificar se iria ocorrer a formação de grupos externos e se as dezoito seqüências obtidas iriam se assemelhar com aquelas já depositadas no Gene Bank.

Deve-se ressaltar que, em ambos os sentidos de leitura (senso e anti-senso), os resultados foram os mesmos, apenas com alguns valores de *score* ligeiramente diferentes, o que pode ser considerado não significativo.

Abaixo seguem os alinhamentos obtidos, sendo que os traços observados correspondem aos “gaps”.

	5	15	25	35	45	55
IB223	-----TT	TGNTTAGNTA	GCGGGTAGTC	CTACCTGATT	CGAGGTCAAC	CA--GAAAAA
IB238	-----TT	TGNTTAGNTA	GCGGGTAGTC	CTACCTGATT	CGAGGTCAAC	CA--GAAAAA
IB239	-----	--TTCGTTCA	GCGGGTAGTC	CTACCTGATT	CGAGGTCAAC	CA--GAAAAA
IB268	-----TT	TGCTNANNTA	GCGNGTAGTC	CTACCTGATT	CGAGGTCAAC	CA--GAAAAA
IB328	-----TT	TGATNCCTTA	GCGNGTAGTC	CTACCTGATT	CGAGGTCAAC	CA--GAAAAA
IB421	-----TT	TGATTACNTN	GCGGGTAGTC	CTACCTGATT	CGAGGTCAAC	CA--GAAAAA
IB515	-----TN	TNATACCTTA	GCGGGTAGNC	CTACCTGATT	CGAGGTCAAC	CA--GAAAAA
IB728	-----T	TATTNCTTCA	GCGGGTAGTC	CTACCTGATT	CGAGGTCAAC	CA--GAAAAA
IB6/78	-----	-TTAC-TTCA	GCGGGTAGTC	CTACCTGATT	CGAGGTCAAC	CA--GAAAAA
IB17/89	-----	-TTACGTTCA	GCGGGTAGTC	CTACCTGATT	CGAGGTCAAC	CA--GAAAAA
IB01/01	-----	-TTACNTTCA	GCGGGTAGTC	CTACCTGATT	CGAGGTCAAC	CA--GAAAAA
FCA06	-----	-TTACGTTCA	GCGGGTAGTC	CTACCTGATT	CGAGGTCAAC	CA--GAAAAA
IB12/79	-----TT	TGATTCCCTTA	GCGN-TAGNC	CTACCTGATT	CGAGGTCAAC	CA--GAAAAA
FCA10	-----	-TTAC-TTCA	GCGGGTAGTC	CTACCTGATT	CGAGGTCAAC	CA--GAAAAA
CKa	-----	-----	-----	-----T	CCGAGTCGCC	AACTCCCATA
Altern	AGGGATCATT	ACACAAATAT	GAAGGCGGGC	TGGCACCTCC	CGGGGTGGCC	AGCCTTGCTG
Cycarp	-----	-----	-----	-----ATTA	CCGAGTTTAC	AACTCCCCAA
Cyclad	-----	-----	-----	-----CATT	CCGAGTTTAC	AACTCCCCAA
IB11/75	-----TT	TGATNCCTTA	GCGGGTAGTC	CTACCTGATT	CGAGGTCAAC	CA--GAAAAA
FCA07	-----	-----	-----	-----T	CCGAGTTTAC	AACTCC-ANA
FCA09	-----	-----	-----	-----T	CCGAGTCGCC	AACTCCCATA

	65	75	85	95	105	115
IB223	GTTGGGGGTT	TTACGGCGTG	GTCGCACCGA	GACT---CCA	GAGCG-AGGT	GTATTACTAC
IB238	GTTGGGGGTT	TTACGGCGTG	GTCGCACCGA	GACT---CCA	GAGCG-AGGT	GTATTACTAC
IB239	GTTGGGGGTT	TTACGGCGTG	GCCGCACCGA	GACT---CCA	GAGCG-AGGT	GTATTACTAC
IB268	GTTGGGGGTT	TTACGGCGTG	GCCGCACCGA	GACT---CCA	GAGCG-AGGT	GTATTACTAC
IB328	GTTGGGGGTT	TTACGGCGTG	GTCGCACCGA	GACT---CCA	GAGCG-AGGT	GTATTACTAC
IB421	GTTGGGGGTT	TTACGGCGTG	GCCGCACCGA	GACT---CCA	GAGCG-AGGT	GTATTACTAC
IB515	GTTGGGGGTT	TTACGGCGTG	GTCGCACCGA	GACT---CCA	GAGCG-AGGT	GTATTACTAC
IB728	GTTGGGGGTT	TTACGGCGTG	GTCGCACCGA	GACT---CCA	GAGCG-AGGT	GTATTACTAC
IB6/78	GTTGGGGGTT	TTACGGCGTG	GTCGCACCGA	GACT---CCA	GAGCG-AGGT	GTATTACTAC
IB17/89	GTTGGGGGTT	TTACGGCGTG	GCCGCACCGA	GACT---CCA	GAGCG-AGGT	GTATTACTAC
IB01/01	GTTGGGGGTT	TTACGGCGTG	GTCGCACCGA	GACT---CCA	GAGCG-AGGT	GTATTACTAC
FCA06	GTTGGGGGTT	TTACGGCGTG	GTCGCACCGA	GACT---CCA	GAGCG-AGGT	GTATTACTAC
IB12/79	GTTGGGGGTT	TTACGGCGTG	GTCGCACCGA	GACT---CCA	GAGCG-AGGT	GTATTACTAC
FCA10	GTTGGGGGTT	TTACGGCGTG	GTCGCACCGA	GACT---CCA	GAGCG-AGGT	GTATTACTAC
CKa	CCCCA-----	TGTGAACATA	CCTGTTTCGT	TCCCTCGGCG	GTGTCCGG--	CAACGGCCCCG
Altern	AATTA----T	TCCACCCGTG	TCTTTTTCGT	ACTTCTTGTT	-TCCTTGGTG	GGCTCGCCCCA
Cycarp	CCCC-----	TGTGAACATA	CCTAT--CGT	TGCCTCGGCG	GTGCCCGCTC	CGGCGGCCCCG
Cyclad	CCCCA-----	TGTGAACATA	CCTGTTTCGT	TCCCTCGGCG	GTGTCCGG--	CAACGGCCCCG
IB11/75	GTTGGGGGTT	TTACGGCGTG	GTCGCACCGA	GACT---CCA	GAGCG-AGGT	GTATTACTAC
FCA07	CCCCA-----	TGTGAACATA	CCTGTTTCGT	TCCCTCGGCG	GTGTCCGG--	CAACGGCCCCG
FCA09	CCCCA-----	TGTGAACATA	CCTGTTTCGT	TCCCTCGGCG	GTGTCCGG--	CAACGGCCCCG

	125	135	145	155	165	175
IB223	GCAGAGGAAG	CTACAGCGAG	ACCGCCACTA	TATTTGGGGG	ACGGCGCGAC	CCGGAGGCCG
IB238	GCAGAGGAAG	CTACAGCGAG	ACCGCCACTA	TATTTGGGGG	ACGGCGCGAC	CCGGAGGCCG
IB239	GCAGAGGAAG	CTACAGCGAG	ACCGCCACTA	AATTTGGGGG	ACGGCGCGAC	CCGGAGGACG
IB268	GCAGAGGAAG	CTACAGCGAG	ACCGCCACTA	AATTTGGGGG	ACGGCGCGAC	CCGGAGGACG
IB328	GCAGAGGAAG	CTACAGCGAG	ACCGCCACTA	AATTTGGGGG	ACGGCGCGAC	CCGGAGGACG
IB421	GCAGAGGAAG	CTACAGCGAG	ACCGCCACTA	AATTTGGGGG	ACGGCGCGAC	CCGGAGGACG
IB515	GCAGAGGAAG	CTACAGCGAG	ACCGCCACTA	TATTTGGGGG	ACGGCGCGAC	CCGGAGGCCG
IB728	GCAGAGGAAG	CTACAGCGAG	ACCGCCACTA	AATTTGGGGG	ACGGCGCGAC	CCGGAGGACG
IB6/78	GCAGAGGAAG	CTACAGCGAG	ACCGCCACTA	TATTTGGGGG	ACGGCGCGAC	CCGGAGGCCG
IB17/89	GCAGAGGAAG	CTACAGCGAG	ACCGCCACTA	AATTTGGGGG	ACGGCGCGAC	CCGGAGGACG
IB01/01	GCAGAGGAAG	CTACAGCGAG	ACCGCCACTA	TATTTGGGGG	ACGGCGCGAC	CCGGAGGACG
FCA06	GCAGAGGAAG	CTACAGCGAG	ACCGCCACTA	TATTTGGGGG	ACGGCGCGAC	CCGGAGGCCG
IB12/79	GCAGAGGAAG	CTACAGCGAG	ACCGCCACTA	AATTTGGGGG	ACGGCGCGAC	CCGGAGGACG
FCA10	GCAGAGGAAG	CTACAGCGAG	ACCGCCACTA	TATTTGGGGG	ACGGCGCGAC	CCGGAGGCCG
CKa	CCAGAGGACC	CAA----CAA	ACTCTTTTGA	ATTTTTTCAGT	ATCTTCTGAG	TAAAA-AACA
Altern	CCACAAGGAC	CAACCCATAA	ACCTTTTTGC	AATGGCAATC	AGCGTC--AG	TAACA--ATG
Cycarp	CCAGAGGACC	CC-----CAA	ACTCTTGTT-	-TTATACAGT	ATCTTCTGAG	TAACACGATT
Cyclad	CCAGAGGACC	CAA----CAA	ACTCTTTTGA	ATTTTTTCAGT	ATCTTCTGAG	TGAGA-AAAA
IB11/75	GCAGAGGAAG	CTACAGCGAG	ACCGCCACTA	AATTTGGGGG	ACGGCGCGAC	CCGGAGGACG
FCA07	CCAGAGGACC	CAA----CAA	ACTCTTTTGA	ATTTTTTCAGT	ATCTTCTGAG	TAAAA-AACA
FCA09	CCAGAGGACC	CAA----CAA	ACTCTTTTGA	ATTTTTTCAGT	ATCTTCTGAG	TAAAA-AACA

	185	195	205	215	225	235
IB223	CCTTGCCGAT	CCCCAACACC	AAGCT-----	--GAGCTTGA	GGGTTGAAAT	GACGCTCGAA
IB238	CCTTGCCGAT	CCCCAACACC	AAGCT-----	--GAGCTTGA	GGGTTGAAAT	GACGCTCGAA
IB239	CCTTGCCGAT	CCCCAACACC	AAGCT-----	--GAGCTTGA	GGGTTGAAAT	GACGCTCGAA
IB268	CCTTGCCGAT	CCCCAACACC	AAGCT-----	--GAGCTTGA	GGGTTGAAAT	GACGCTCGAA
IB328	CCTTGCCGAT	CCCCAACACC	AAGCTCCCGA	AGGTGCTTGA	GGGTTGAAAT	GACGCTCGAA
IB421	CCTTGCCGAT	CCCCAACACC	AAGCT-----	--GAGCTTGA	GGGTTGAAAT	GACGCTCGAA
IB515	CCTTGCCGAT	CCCCAACACC	AAGCT-----	--GAGCTTGA	GGGTTGAAAT	GACGCTCGAA
IB728	CCCTGCCGAT	CCCCAACACC	AAGCT-----	--GAGCTTGA	GGGTTGAAAT	GACGCTCGAA
IB6/78	CCTTGCCGAT	CCCCAACACC	AAGCT-----	--GAGCTTGA	GGGTTGAAAT	GACGCTCGAA
IB17/89	CCTTGCCGAT	CCCCAACACC	AAGCT-----	--GAGCTTGA	GGGTTGAAAT	GACGCTCGAA
IB01/01	CCTTGCCGAT	CCCCAACACC	AAGCA-----	--GAGCTTGA	GGGTTGAAAT	GACGCTCGAA
FCA06	CCTTGCCGAT	CCCCAACACC	AAGCT-----	--GAGCTTGA	GGGTTGAAAT	GACGCTCGAA
IB12/79	CCCTGCCGAT	CCCCAACACC	AAGCT-----	--GAGCTTGA	GGGTTGAAAT	GACGCTCGAA
FCA10	CCTTGCCGAT	CCCCAACACC	AAGCT-----	--GAGCTTGA	GGGTTGAAAT	GACGCTCGAA
CKa	-AAT---AAA	TCAAAACTTT	CAACA-----	ACGGATCTCT	TGGTTC---T	GGCA-TCGAT
Altern	TAAT---AAT	TTACAACCTT	CAACA-----	ACGGATCTCT	TGGTTC---T	GGCA-TCGAT
Cycarp	AAAT---AAA	TCAAAACTTT	CAACA-----	ACGGATCTCT	TGGTTC---T	GGCA-TCGAT
Cyclad	CAAT---AAA	TCAAAACTTT	CAACA-----	ACGGATCTCT	TGGTTC---T	GGCA-TCGAT
IB11/75	CCTTGCCGAT	CCCCAACACC	AAGCTCCCGA	AGGTGCTTGA	GGGTTGAAAT	GACGCTCGAA
FCA07	-AAT---AAA	TCAAAACTTT	CAACA-----	ACGGATCTCT	TGGTTC---T	GGCA-TCGAT
FCA09	-AAT---AAA	TCAAAACTTT	CAACA-----	ACGGATCTCT	TGGTTC---T	GGCA-TCGAT

	245	255	265	275	285	295
IB223	CAGGCATGCC	CGCCAGAATA	CTGGCGGGCG	CAATGTGCGT	TCAAAGATTC	GATGATTCAC
IB238	CAGGCATGCC	CGCCAGAATA	CTGGCGGGCG	CAATGTGCGT	TCAAAGATTC	GATGATTCAC
IB239	CAGGCATGCC	CGCCAGAATA	CTGGCGGGCG	CAATGTGCGT	TCAAAGATTC	GATGATTCAC
IB268	CAGGCATGCC	CGCCAGAATA	CTGGCGGGCG	CAATGTGCGT	TCAAAGATTC	GATGATTCAC
IB328	CAGGCATGCC	CGCCAGAATA	CTGGCGGGCG	CAATGTGCGT	TCAAAGATTC	GATGATTCAC
IB421	CAGGCATGCC	CGCCAGAATA	CTGGCGGGCG	CAATGTGCGT	TCAAAGATTC	GATGATTCAC
IB515	CAGGCATGCC	CGCCAGAATA	CTGGCGGGCG	CAATGTGCGT	TCAAAGATTC	GATGATTCAC
IB728	CAGGCATGCC	CGCCAGAATA	CTGGCGGGCG	CAATGTGCGT	TCAAAGATTC	GATGATTCAC
IB6/78	CAGGCATGCC	CGCCAGAATA	CTGGCGGGCG	CAATGTGCGT	TCAAAGATTC	GATGATTCAC
IB17/89	CAGGCATGCC	CGCCAGAATA	CTGGCGGGCG	CAATGTGCGT	TCAAAGATTC	GATGATTCAC
IB01/01	CAGGCATGCC	CGCCAGAATA	CTGGCGGGCG	CAATGTGCGT	TCAAAGATTC	GATGATTCAC
FCA06	CAGGCATGCC	CGCCAGAATA	CTGGCGGGCG	CAATGTGCGT	TCAAAGATTC	GATGATTCAC
IB12/79	CAGGCATGCC	CGCCAGAATA	CTGGCGGGCG	CAATGTGCGT	TCAAAGATTC	GATGATTCAC
FCA10	CAGGCATGCC	CGCCAGAATA	CTGGCGGGCG	CAATGTGCGT	TCAAAGATTC	GATGATTCAC
CKa	GAAGAACG--	CAGCGAAATG	CGATAAG---	TAATGTGAAT	TGCAGAATTC	AGTGAATCAT
Altern	GAAGAACG--	CAGCGAAATG	CGATAAG---	TAGTGTGAAT	TGCAGAATTC	AGTGAATCAT
Cycarp	GAAGAACG--	CAGCGAAATG	CGATAAG---	TAATGTGAAT	TGCAGAATTC	AGTGAATCAT
Cyclad	GAAGAACG--	CAGCGAAATG	CGATAAG---	TAATGTGAAT	TGCAGAATTC	AGTGAATCAT
IB11/75	CAGGCATGCC	CGCCAGAATA	CTGGCGGGCG	CAATGTGCGT	TCAAAGATTC	GATGATTCAC
FCA07	GAAGAACG--	CAGCGAAATG	CGATAAG---	TAATGTGAAT	TGCAGAATTC	AGTGAATCAT
FCA09	GAAGAACG--	CAGCGAAATG	CGATAAG---	TAATGTGAAT	TGCAGAATTC	AGTGAATCAT

	305	315	325	335	345	355
IB223	TGAATTCTGC	AATTCACATT	ACTTATC---	GCATTTTCGCT	G--CGTTCTT	CATCGA-TGC
IB238	TGAATTCTGC	AATTCACATT	ACTTATC---	GCATTTTCGCT	G--CGTTCTT	CATCGA-TGC
IB239	TGAATTCTGC	AATTCACATT	ACTTATC---	GCATTTTCGCT	G--CGTTCTT	CATCGA-TGC
IB268	TGAATTCTGC	AATTCACATT	ACTTATC---	GCATTTTCGCT	G--CGTTCTT	CATCGA-TGC
IB328	TGAATTCTGC	AATTCACATT	ACTTATC---	GCATTTTCGCT	G--CGTTCTT	CATCGA-TGC
IB421	TGAATTCTGC	AATTCACATT	ACTTATC---	GCATTTTCGCT	G--CGTTCTT	CATCGA-TGC
IB515	TGAATTCTGC	AATTCACATT	ACTTATC---	GCATTTTCGCT	G--CGTTCTT	CATCGA-TGC
IB728	TGAATTCTGC	AATTCACATT	ACTTATC---	GCATTTTCGCT	G--CGTTCTT	CATCGA-TGC
IB6/7	TGAATTCTGC	AATTCACATT	ACTTATC---	GCATTTTCGCT	G--CGTTCTT	CATCGA-TGC
IB17/89	TGAATTCTGC	AATTCACATT	ACTTATC---	GCATTTTCGCT	G--CGTTCTT	CATCGA-TGC
IB01/01	TGAATTCTGC	AATTCACATT	ACTTATC---	GCATTTTCGCT	G--CGTTCTT	CATCGA-TGC
FCA06	TGAATTCTGC	AATTCACATT	ACTTATC---	GCATTTTCGCT	G--CGTTCTT	CATCGA-TGC
IB12/79	TGAATTCTGC	AATTCACATT	ACTTATC---	GCATTTTCGCT	G--CGTTCTT	CATCGA-TGC
FCA10	TGAATTCTGC	AATTCACATT	ACTTATC---	GCATTTTCGCT	G--CGTTCTT	CATCGA-TGC
CKa	CGAATCTTTG	AACGCACATT	GCGCCCGCCA	GTATTCTGGC	GGGCATGCCT	GTTTCGAGCGT
Altern	CGAATCTTTG	AACGCACATT	GCGCCCTTTG	GTATTCCAAA	GGGCATGCCT	GTTTCGAGCGT
Cycarp	CGAATCTTTG	AACGCACATT	GCGCCCGCCA	GTATTCTGGC	GGGCATGCCT	GTTTCGAGCGT
Cyclad	CGAATCTTTG	AACGCACATT	GCGCCCGCCA	GTATTCTGGC	GGGCATGCCT	GTTTCGAGCGT
IB11/75	TGAATTCTGC	AATTCACATT	ACTTATC---	GCATTTTCGCT	G--CGTTCTT	CATCGA-TGC
FCA07	CGAATCTTTG	AACGCACATT	GCGCCCGCCA	GTATTCTGGC	GGGCATGCCT	GTTTCGAGCGT
FCA09	CGAATCTTTG	AACGCACATT	GCGCCCGCCA	GTATTCTGGC	GGGCATGCCT	GTTTCGAGCGT

	365	375	385	395	405	415
IB223	CA----GAAC	CAAGAGATC-	-----CGTT	GTTGAAAGTT	TTG-----A	TTTATT---T
IB238	CA----GAAC	CAAGAGATC-	-----CGTT	GTTGAAAGTT	TTG-----A	TTTATT---T
IB239	CA----GAAC	CAAGAGATC-	-----CGTT	GTTGAAAGTT	TTA-----A	TTTATTG--T
IB268	CA----GAAC	CAAGAGATC-	-----CGTT	GTTGAAAGTT	TTG-----A	TTTATT---T
IB328	CA----GAAC	CAAGAGATC-	-----CGTT	GTTGAAAGTT	TTG-----A	TTTATTG--T
IB421	CA----GAAC	CAAGAGATC-	-----CGTT	GTTGAAAGTT	TTG-----A	TTTATT---T
IB515	CA----GAAC	CAAGAGATC-	-----CGTT	GTTGAAAGTT	TTG-----A	TTTATT---T
IB728	CA----GAAC	CAAGAGATC-	-----CGTT	GTTGAAAGTT	TTG-----A	TTTATTG--T
IB6/78	CA----GAAC	CAAGAGATC-	-----CGTT	GTTGAAAGTT	TTG-----A	TTTATT---T
IB17/89	CA----GAAC	CAAGAGATC-	-----CGTT	GTTGAAAGTT	TTG-----A	TTTATT---T
IB01/01	CA----GAAC	CAAGAGATC-	-----CGTT	GTTGAAAGTT	TTG-----A	TTTATTG--T
FCA06	CA----GAAC	CAAGAGATC-	-----CGTT	GTTGAAAGTT	TTG-----A	TTTATT---T
IB12/79	CA----GAAC	CAAGAGATC-	-----CGTT	GTTGAAAGTT	TTG-----A	TTTATTGG-T
FCA10	CA----GAAC	CAAGAGATC-	-----CGTT	GTTGAAAGTT	TTG-----A	TTTATT---T
CKa	CATTTCAACC	CTCAAGCTC-	--AGCTTGGT	GTTGGGGATC	GGCAAGGCGG	CCTCCGGGTC
Altern	CATTTGTACC	CTCAAGCTT-	--TGCTTGGT	GTTGGGCGTC	TTTTTTGTCTC	CCCTTGCGG-
Cycarp	CATTTCAACC	CTCAAGCCCC	CGGGCTTGGT	GTTGGGGATC	GGCGTG----	CCCTCGCGGC
Cyclad	CATTTCAACC	CTCAAGCTC-	--AGCTTGGT	GTTGGGGATC	GGCAGGGCGT	CCTCCGGGTC
IB11/75	CA----GAAC	CAAGAGATC-	-----CGTT	GTTGAAAGTT	TTG-----A	TTTATTG--T
FCA07	CATTTCAACC	CTCAAGCTC-	--AGCTTGGT	GTTGGGGATC	GGCAAGGCGG	C-TCCGGGTC
FCA09	CATTTCAACC	CTCAAGCTC-	--AGCTTGGT	GTTGGGGATC	GGCAAGGCGG	CCTCCGGGTC

	425	435	445	455	465	475
IB223	GNTTTTTTACT	CAGAAGATAC	TGANAAATTC	ANAAGAAGTT	TGTT-GGGTC	CTCTGGCGGG
IB238	GNTTTTTTACT	CAGAAGATAC	TGAAAAATTC	AAAAGA-GTT	TGTT-GGGTC	CTCTGGCGGG
IB239	TTTTTTTACT	CAGAAGATAC	TGAAAAATTC	AAAAGA-GTT	TGTT-GGGTC	CTCTGGCGGG
IB268	GTTTTTTTACT	CAGAAGATAC	TGAAAAATTC	AAAAGA-GTT	TGTTTGGGTC	CTCTNGCGGG
IB328	TTTTTTTACT	CAGAAGATAC	T-ATNAATTC	AAAAGA-GTT	TGTT-GGGTC	CTCTTGCGGG
IB421	GTTTTTTTACT	CAGAAGATAC	TGAAAAATTC	AAAAGA-AGT	TGTT-GGGTN	CTCTGGCGGG
IB515	GTTTTTTTACT	CAGAAGATAC	TGAAAAATTC	AAAAGA-AGT	TGTT-GGGTC	CTCTGGCGGG
IB728	TTTTTTTACT	CAGAAGATAC	TGAAAAATTC	AAAAGA-GTT	TGTT-GGGTC	CTCTGGCGGG
IB6/78	GTTTTTTTACT	CAGAAGATAC	TGAAAAATTC	AAAAGA-GTT	TGTT-GGGTC	CTCTGGCGGG
IB17/89	GTTTTTTTACT	CAGAAGATAC	TGAAAAATTC	AAAAGA-GTT	TGTT-GGGTC	CTCTGGCGGG
IB01/01	TTTTTTTACT	CAGAAGATAC	TGAAGAATTC	AAAAGA-GTT	TGTT-GGGTC	CTCTGGCGGG
FCA06	GTTTTTTTACT	CAGAAGATAC	TGAAAAATTC	AAAAGA-GTT	TGTT-GGGTC	CTCTGGCGGG
IB12/79	TTTTTTTACT	CAGAAGATAC	TGAAAAATTC	AAAAGA-GTT	TGTT-GGGTC	CTCTTNCGGG
FCA10	GTTTTTTTACT	CAGAAGATAC	TGAAAAATTC	AAAAGA-GTT	TGTT-GGGTC	CTCTGGCGGG
CKa	GCGCCGTCCC	CCAAATATAG	TGGCGGTCTC	GCTGTAGCTT	CCTCTGCGTA	GTAATACACC
Altern	GAGACTCGCC	TTAAAGTCAT	TGGCAGCCGG	CCTACTGGTT	TCGGAGCGCA	GCA-CAAGTC
Cycarp	GCGCCGTCCC	CTAAATCTAG	TGGCGGTCTC	GCTGTAGCTT	CCTCTGCGTA	GTAGCAACAC
Cyclad	GCGCCGTCCC	CCAAATTTAG	TGGCGGTCTC	GCTGTAGCTT	CCTCTGCGTA	GTAATACACC
IB11/75	TTTTTTTACT	CAGAAGATAC	TGATAAATTC	AAAAGA-GTT	TGTT-GGGTC	CTCTGGCGGG
FCA07	GCGCCGTCCC	CCAAATATAG	TGGCGGTCTC	GCTGTAGCTT	CCTCTGCGTA	GTAATACACC
FCA09	GCGCCGTCCC	CCAAATATAG	TGGCGGTCTC	GCTGTAGCTT	CCTCTGCGTA	GTAATACACC

	485	495	505	515	525	535
IB223	NCG-----	GTGCC-CGAC	ACC-CC-GAA	GGAACNAAAC	ANGTNT----	--TT-CACAT
IB238	CCG---T---	-TGCC-GGAC	ACCGCC-GAG	GGAACGAAAC	AGGTATG---	--TT-CACAT
IB239	CCG---T---	-TTCC-GGAC	ACCGCC-GAG	GGAACGAAAC	AGGTATG---	--TT-CACAT
IB268	CCG---T---	-TGCC-GG-C	ACCGCC-GAG	GGAACCAAAC	ANGTNTG---	--TT-CACAT
IB328	CCG---N---	-TGCCCGGAC	ACCGCCNAG	GGAACNAAAC	AGGTNTT---	--TT-CACAT
IB421	CCG---T---	-TGCC-GGAC	ACCGCC-GAA	GGAACCAAAC	ANGTNTG---	--TT-CACAT
IB515	CCG---T---	-TGCC-GGAC	ACCGCC-GAA	GGAACNAAAC	ANGTNTN---	--TT-CACAT
IB728	CCG---T---	-TGCC-GGAC	ACCGCC-GAG	GGAACGAAAC	AGGTATG---	--TT-CACAT
IB6/78	CCG---T---	-TGCC-GGAC	ACCGCC-GAG	GGAACGAAAC	AGGTATG---	--TT-CACAT
IB17/89	CCG---T---	-TGCC-GGAC	ACCGCC-GAG	GGAACGAAAC	AGGTATG---	--TT-CACAT
IB01/01	CCG---T---	-TGCC-GGAC	ACCGCC-GAG	GGAACGAAAC	AGGTATG---	--TT-CACAT
FCA06	CCG---T---	-TGCC-GGAC	ACCGCC-GAG	GGAACGAAAC	AGGTATG---	--TT-CACAT
IB12/79	CCG---N---	-TGCCCGGAC	ACCCCNAG	GGAACNAAAC	ATGTNTN---	--TT-CACAT
FCA10	CCG---T---	-TGCC-GGAC	ACCGCC-GAG	GGAACGAAAC	AGGTATG---	--TT-CACAT
CKa	TCGCTCTGGA	GTCTCGGTGC	GACCACGCCG	TAAAACCCCC	AACTTTTTTCT	GGTT-GACCT
Altern	GCGCTCTC--	-TTCCAGCCC	--CAAGGTCT	AGCATCCACC	AAGC-----	-----
Cycarp	TCGCACTGGA	-TCGCAGCGC	GGCCACGCCG	TAAAACCCCC	CACTTCTGAA	AGTTTGACCT
Cyclad	TCGCTCTGGA	GTCTCGGTGC	GACCACGCCG	TAAAACCCCC	AACTTTTTTCT	GGTT-NACCT
IB11/75	CCG---T---	-TGCC-GGAC	ACCGCC-GAG	GGAACGAAAC	AGGTATG---	--TT-CACAT
FCA07	TCGCTCTGGA	GTCTCGGTGC	GACCACGCCG	TAAAACCCCC	AACTTTTTTCT	GGTT-GACCT
FCA09	TCGCTCTGGA	GTCTCGGTGC	GACCACGCCG	TAAAACCCCC	AACTTTTTTCT	GGTT-GACCT

	545	555	565	575
IB223	GGGGTTNGGG	AGT-----	-----	-----
IB238	GGGGTTTGGG	AG-----	-----	-----
IB239	GGGGTTTGGG	AGTTG----	-----	-----
IB268	GGGGTTTGGG	AG-----	-----	-----
IB328	GGG-----	-----	-----	-----
IB421	GGGGTT-GGG	AGT-----	-----	-----
IB515	GGGGTTTGGG	AG-----	-----	-----
IB728	GGGGTTTGGG	AG-----	-----	-----
IB6/78	GGGGTTTGGG	AGTTGT----	-----	-----
IB17/89	GGGGTTTGGG	AGTTG----	-----	-----
IB01/01	GGGGTTTGGG	AGTT-----	-----	-----
FCA06	GGGGTTTGGG	AGTTG----	-----	-----
IB12/79	GGGGTTTGGG-	-----	-----	-----
FCA10	GGGGTTTGGG	AGTTGT----	-----	-----
CKa	CGAATCAGGT	AGGACTACCC	G-----	-----
Altern	-----	-----	-----	-----
Cycarp	CGGATCAGGT	AGGAATACCC	G-----	-----
Cyclad	CGAATCAGGT	AGGACT----	-----	-----
IB11/75	GGGG-----	-----	-----	-----
FCA07	CGAATNAGGT	AGGACTACCC	GCT-----	-----
FCA09	CGAATCAGGT	AGGACTACCC	G-----	-----

Após a análise das seqüências obtidas, foi construído o fenograma ilustrado pela Figura 10. Visualmente, podem ser detectados três grupos. Analisando-se conjuntamente o fenograma e os resultados do item 2.2 (crescimento das culturas em meio Czapeck), pode-se verificar que a maioria dos isolados do Grupo 1, obtidos no citado experimento, encontra-se no agrupamento C. Isto faz supor que, de fato, estes isolados apresentem-se bastante semelhantes no que se refere à região estudada (ITS).

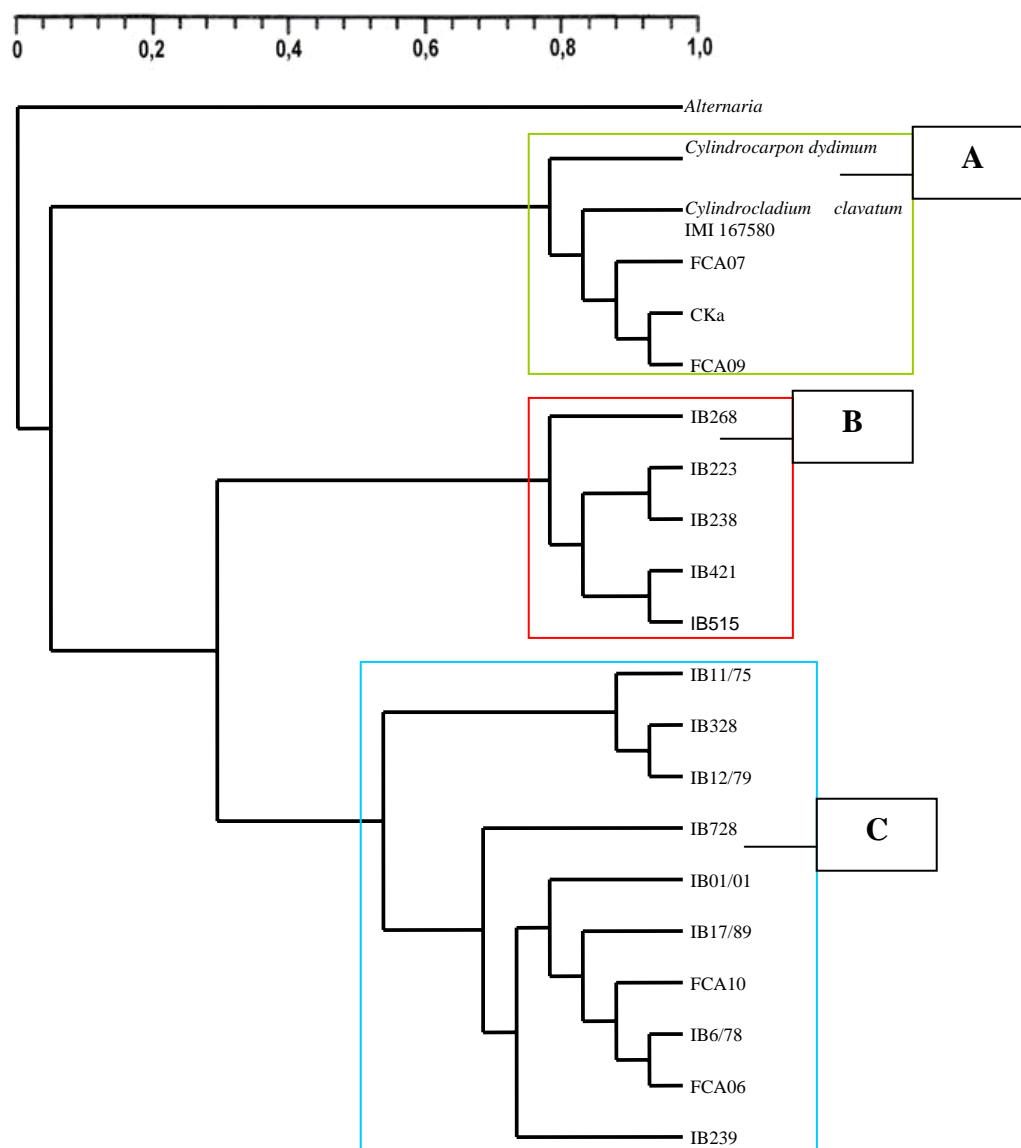


Figura 10 – Fenograma resultante do sequenciamento da região ITS, utilizando os *primers* ITS1 e ITS4, para isolados do gênero *Cylandrocladium*.

A partir dos resultados obtidos e, conforme dados já existentes (CROUS et al., 1999; KANG et al., 2001), pode-se confirmar que para a maioria das espécies pertencentes ao gênero *Cylindrocladium*, o sequenciamento da região ITS não se mostra muito elucidativo, tanto para a detecção de regiões polimórficas importantes, como para a identificação taxonômica, embora sutil variabilidade tenha sido detectada, a ponto de serem formados grupos, conforme pode ser observado no fenograma gerado (Figura 9). Além disso, somente para IB239, IB6/78, IB01/01 e FCA09, houve correspondência na identificação utilizando-se os caracteres morfológicos e a análise molecular da região ITS. Aparentemente, esta região é extremamente conservada inter-especificamente, o que resultou na mesma identificação para a grande maioria das seqüências submetidas ao BLASTN, ou seja, *C. spathulatum*. Segundo METHA et al. (2004) em *Alternaria macrospora* a região ITS também é bastante conservada, o que impossibilita a detecção de variabilidade genética.

Porém, JENG et al. (1997) conseguiram, através do sequenciamento da região ITS diferenciar isolados de *C. scoparium* de *C. floridanum*. HAMELIN et al. (1996) utilizaram esta mesma região e obtiveram sucesso no desenvolvimento de *primers* específicos para detectar *C. floridanum* em material doente.

Aparentemente, outras seqüências gênicas como beta-tubulina, histona, MAT2, parecem ser mais variáveis na composição das bases, fornecendo melhores resultados do que a região ITS para diferenciação inter-específica. CROUS et al. (1999) foram capazes de distinguir e separar melhor as espécies deste gênero utilizando parte do gene da beta-tubulina.

Inúmeras foram as tentativas para a realização da reação de PCR com *primers* de parte da seqüência do gene da beta-tubulina. Porém, em nenhuma das reações foi obtido qualquer fragmento. Embora o espectrofotômetro não detectasse qualquer impureza presente no DNA extraído, acreditamos que alguma substância tenha impedido a ocorrência da reação. Tal substância poderia ser algum componente presente nos reagentes utilizados, ou até mesmo, um metabólito do próprio isolado.

Acreditando na existência de inibidores nas amostras de DNA extraídas, foi realizada a diluição de uma alíquota de cada amostra em água milique esterilizada, mas o problema não foi resolvido. Talvez, algum dos componentes do reagente

DNAzol tenha sido o causador do problema, embora nada tenha sido encontrado na literatura que confirme tal suspeita.

No Quadro 11 encontram-se apresentados os dados referentes à comparação entre os dados morfológicos e moleculares para a identificação das espécies de *Cylindrocladium* estudadas.

Analisando todos os resultados obtidos, pode-se observar a grande variabilidade nas características de isolados de *Cylindrocladium*, o que pode tornar bastante confusa a identificação das espécies deste gênero.

Quadro 11 – Comparação entre os caracteres morfológicos e moleculares para a correta identificação de *Cylindrocladium* spp.

Isolado	Identificação preliminar – caracteres morfológicos	BLAST	Registro Original
IB223	<i>C. scoparium</i> (sin. <i>C. floridanum</i>)	<i>C. spathulatum</i>	<i>C. scoparium</i> var. <i>brasiliensis</i>
IB238	<i>C. scoparium</i> (sin. <i>C. floridanum</i>)	<i>C. spathulatum</i>	<i>C. scoparium</i>
IB239	_____	<i>C. leucothoes</i> (sin. <i>C. perseae</i>	<i>C. citri</i>
IB268	<i>C. naviculatum</i>	<i>C. spathulatum</i>	<i>C. ilicicola</i>
IB328	<i>Cylindrocladiella</i> sp.	<i>Calonectria kyotensis</i> (anamorfo= <i>C. scoparium</i>)	<i>C. scoparium</i> var. <i>brasiliensis</i>
IB421	<i>C. scoparium</i> (sin. <i>C. floridanum</i>) / <i>C. parasiticum</i> / <i>C. quinquesseptatum</i> / <i>C. variabile</i>	<i>C. spathulatum</i> ou <i>C. quinquesseptatum</i>	<i>C. scoparium</i>
IB515	<i>C. scoparium</i> (sin. <i>C. floridanum</i>) / <i>C. parasiticum</i> / <i>C. quinquesseptatum</i> / <i>C. variabile</i>	<i>C. spathulatum</i> ou <i>C. quinquesseptatum</i>	<i>C. scoparium</i>
IB728	<i>C. scoparium</i> (sin. <i>C. floridanum</i>) / <i>C. parasiticum</i> / <i>C. quinquesseptatum</i> / <i>C. variabile</i>	<i>C. pseudogracile</i> ou <i>C. quinquesseptatum</i>	<i>C. scoparium</i>
IB11/75	<i>C. scoparium</i> (sin. <i>C. floridanum</i>)	<i>Calonectria kyotensis</i>	<i>C. scoparium</i>
IB6/78	<i>C. scoparium</i> (sin. <i>C. floridanum</i>)	<i>C. spathulatum</i>	<i>C. scoparium</i>
IB12/79	<i>C. clavatum</i>	<i>C. psudogracile</i> ou <i>C. clavatum</i>	<i>C. clavatum</i>
IB17/89	<i>C. scoparium</i> (sin. <i>C. floridanum</i>)	<i>C. spathulatum</i>	<i>C. scoparium</i>
IB01/01	<i>C. spathiphylli</i>	<i>C. spathiphylli</i>	<i>C. spathiphylli</i>
Cka	<i>Cylindrocladiella</i> sp.	<i>C. spathulatum</i>	<i>Cylindrocadium</i> sp.
FCA06	<i>C. quinquesseptatum</i> / <i>C. clavatum</i>	<i>C. spathulatum</i>	<i>Cylindrocladium</i> sp.
FCA07	<i>C. scoparium</i> (sin. <i>C. floridanum</i>)	<i>C. spathulatum</i>	<i>Cylindrocladium</i> sp.
FCA09	<i>C. scoparium</i> (sin. <i>C. floridanum</i>)	<i>C. spathulatum</i>	<i>Cylindrocladium</i> sp.
FCA10	<i>C. scoparium</i> (sin. <i>C. floridanum</i>)	<i>C. spathulatum</i>	<i>Cylindrocladium</i> sp.

CONCLUSÕES

- 1) – Existe expressiva variação nos caracteres morfológicos, o que dificulta a identificação das espécies estudadas e pertencentes ao gênero *Cylindrocladium*;
- 2) - Foi observado comportamento patogênico variável dos isolados frente a diferentes hospedeiros e frente a diferentes órgãos do mesmo hospedeiro, o que torna espécies do fungo ainda não referidas como causadoras de doenças sobre plantas importantes patógenos potenciais, devido à provável ocorrência de *formae speciales*, biótipos ou patótipos;
- 3) – A extração de DNA dos vários isolados foi bastante complexa e, mesmo parecendo de boa qualidade, o material extraído não pôde ser amplificado. Talvez existam substâncias do próprio isolado e/ou presentes nos reagentes que não permitam a realização da reação de amplificação, essencial para a aplicação das demais técnicas. Os estudos devem ser continuados no sentido identificar o problema e obter-se algum protocolo de purificação específico que possibilite a caracterização molecular do gênero *Cylindrocladium*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFENAS, A.C. Fungos do gênero Cylindrocladium como patógenos florestais no Brasil. **Fitopaologia. Brasileira**, Brasília, v. 11, p. 275-277, 1986.
- ALFENAS, A.C., FERREIRA, F.A. A mancha da folha de eucalipto no Brasil causada por três espécies de Cylindrocladium – uma revisão da descrição da doença. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 3, p. 47-56, 1979.
- 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 eucalipto. **O Biológico**, São Paulo, v. 6, p. 161-162, 1940.
- AUER, C.G., GRINGOLETI JÚNIOR, A. Doenças da erva-mate. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 21, p. 195-198, 1995.

- AUER, C.G., SOTTA, E.D. Patogenicidade de Cylindrocladium candelabrum em acácia-negra. **Boletim de Pesquisa Florestal**, v. 30/31, p. 29-35, 1995.
- AZEVEDO, J.L. Variabilidade em fungos fitopatogênicos. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 2, p. 3-15, 1997.
- BOESEWINKEL, H.J. Cylindrocladiella, a new genus to accommodate Cylindrocladium parvum and other small-spored species of Cylindrocladium. **Canadian Journal of Botany**, Ontário, v. 60, p. 288-2294, 1982.
- CASTRO, N.R., COELHO, R.S.B. Caracterização fisiológica de isolados de Cercospora cruenta em diferentes meios de cultura. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 26, n. 4, p. 466-471, 2000.
- COELHO, L., ALFENAS, A.C., FERREIRA, F.A. Mancha de folha do eucalipto associada a Cylindrocladium spp e Coniella fragariae. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 11, p. 380, 1986.
- COCHRANE, V. W. **Physiology of fungi**. New York: J. Wiley, 1958. 542 p.
- 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**, Brasília, v. 26, p. 427, 2001. Suplemento.
- CROUS, P.W. **Taxonomy and pathology of Cylindrocladium (Calonectria) and allied genera**. St. Paul: The American Phytopathological Society, 2002. 278 p.
- CROUS, P.W., WINGFIELD, M.J. A re-evaluation of Cylindrocladiella, and a comparison with allied genera. **Mycological Research**, Cambridge, v. 97, p. 433-448, 1993.
- CROUS, P.W., WINGFIELD, M.J. A monograph of Cylindrocladium, including anamorphus of Calonectria. **Mycotaxon**, New York, v. 51, p. 341-435, 1994.

- CROUS, P.W., PHILLIPS, A.J.L., WINGFIELD, M.J. Effects of cultural conditions on vesicle and conidium morphology in species of Cylindrocladium and Cylindrocladiella. **Mycologia**, Albuquerque, v.84, p. 497-504, 1992.
- CROUS, P.W., KANG, J.C., SCHOCH, C.L., MCHAU, G.R.A. Phylogenetic relationships of Cylindrocladium pseudogracile and Cylindrocladium rumorhae with morphologically similar taxa, based on morphology and DNA sequences of internal transcribed spacers and β -tubulin. **Canadian Journal of Botany**, Ontário, v. 77, p. 1813-1820, 1999.
- CRUZ, B.P.B., FIGUEIREDO, M.B. Observações sobre a doença do eucalipto causada por Cylindrocladium. **Arquivos do Instituto. Biológico**, São Paulo, v. 27, p. 97-102, 1960.
- EKPO, E.J.A., ESURUOSO, O.F. Factors affecting spore germination in cowpea isolate of Cercospora cruenta Sacc. **Phytopathology**, St. Paul, v. 67, p. 249-255, 1977.
- EL-GHOLL, N.E., SCHUBERT, T.S., WALKER, S.E. Expanded range of Cylindrocladium colhounii in the United States. **Plant Disease**, v. 81, p. 1333, 1997.
- FAGAN, H.J. Strain of Colletotrichum gloeosporioides in citrus in Belize. **Transactions of the British Mycology Society**, London, v. 74, n. 3, p. 643-644, 1980.
- FERREIRA, F.A. *Patologia Florestal – Principais doenças florestais no Brasil*. Viçosa: Sociedade de Investigações Florestais, 1989. 570 p.
- FIGUEIREDO, M.B., CRUZ, B.P.B. Ocorrência de Cylindrocladium ilicicola (Hawley) Boedijn & Reitsma sobre Eucalyptus spp. no estado de São Paulo – Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 30, p. 29-32, 1963.
- FIGUEIREDO, M.B., NAMEKATA, T. Constatação de Calonectria quinqueseptata N. Sp., forma perfeita de Cylindrocladium quinqueseptatum Boedijn & Reitsma, sobre Annona squamosa L. e Eucalyptus sp. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 34, p. 91-96, 1967.

- GOES, A. de, KIMATI, H. Caracterização patogênica de isolados de Colletotrichum acutatum e C. gloeosporioides obtidos de plantas cítricas. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 23, n. 1, p. 10-14, 1997.
- GRAJAL-MARTIN, M.J., SIMON, C.J., MUEHLBAUER, F.J. Use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) to characterize race 2 of Fusarium oxysporum f. sp. pisi. **Phytopathology**, St. Paul, v. 83, p. 612-4, 1993.
- GRIFFIN, D.H. **Fungal Physiology**, New York: J. Wiley, 1993, v. 2. 458 p.
- GUTHRIE, P.A.I., MAGILL, C.W., FREDERIKSEN, R.A., ODVODY, G.N. Random amplified polymorphic DNA markers: a system for identifying and differentiating isolates of Colletotrichum graminicola. *Phytopathology*, v. 82, p. 832-5, 1992.
- HAMELIN, R.C., BERUBE, P., GIGNAC, M., BOURASSA, M. Identification of root rot fungi in nursery seedlings by nested multiplex PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, p. 4026-4031, 1996.
- HODGES, C.S., MAY, L.C. A root disease of pine, araucaria and eucalyptus in Brazil caused by a new species of Cylindrocladium. **Phytopathology**, St. Paul, v. 62, p. 898-901, 1972.
- HODGES, C.S., REIS, M.S., MAY, L.C. Duas enfermidades em plantações de essências florestais exóticas no Brasil. **Brasil Florestal**, v. 6, p. 5-12, 1973.
- HOMECHIN, M. **Avaliação da patogenicidade de três isolados de Cylindrocladium clavatum Hodges e May em árvores de Pinus caribaea Morelet var. hondurensis Barret e Golfari**. 1979. 43 p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luis de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- HUNTER, B.B., ZUMPETTA, G.M. Differentiating species of Cylindrocladium by acrilamide gel eletroforesis. **Proceeding Annual Phytopathology Society**, St. Paul, p. 26, 1975.

- HUNTER, B.B., BARNETT, H.L. Growth and sporulation of species and isolates of Cylindrocladium in culture. **Mycologia**, Albuquerque, v. 70, p. 614-635, 1978.
- JACOBSON, D.J., GORDON, T.R. Variability of mitochondrial DNA as an indicator of relationships between populations of Fusarium oxysporum f. sp. melonis. **Mycological Research**, Cambridge, v. 94, p. 734-44, 1990.
- JENG, R.S., DUMAS, M., LIU, F.H., WANG, C.L. HUBBES, M. DNA analysis of Cylindrocladium floridanum isolates from selected Forest nurseries. **Mycological Research**, Cambridge, v. 101, p. 71-74, 1997.
- JOHNSTON, P.R., JONES, D. Relationships among Colletotrichum isolates from fruit-rots assessed using rDNA sequences. **Mycologia**, Albuquerque, v. 89, p. 420-430, 1997.
- LEAL-BERTOLI, S.C.M. O enfoque molecular na sistemática de fungos. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 6, p. 197-230, 1998.
- LIYANAGE, H.D, McMILLIAN Jr., R.T., KISTLER, H.C. Two genetically distinct populations of Colletotrichum gloeosporioides fom citrus. **Phytopathology**, St. Paul, v. 82, n. 11, p. 1371-1376, 1992.
- LUCON, C.M.M., OKINO, L.K., SCHOENLEIN-CRUSIUS, I.H. Survival of fungi preserved by lyophilization after 49 years. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 24, p. 207-211, 1993.
- MAHUKU, G.S., PLATT, H.W., MAXWELL, P. Comparison of polymerase chain reaction based methods with plating on media to detect and identify verticillium wilt pathogens of potato. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 21, p. 125-131, 1999.
- METHA, Y.R., CASSETARI NETO, D., CIA, E., PIZZINATO, M.A., TEIXEIRA, E.A., CUNHA, H.C. Variabilidade genética entre isolados de Alternaria macrospora do algodoeiro. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 30, n.4, p. 481-487, 2004.

- MORTON, A., CARDER, J.H., BARBARA, D.J. Sequences of the internal transcribed spacers of the ribosomal RNA genes and relationships between isolates of Verticillium albo-atrum and V. dahliae. **Plant Pathology**, v. 44, p. 183-190, 1995.
- ORREGO FUENTE, A.L., MENEZES, M., OLIVEIRA, S.M.A., COELHO, R.S.B. Análise comparativa de caracteres patogênicos e físico-morfológicos para identificação de espécies de Cylindrocladium. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 22, p. 127-133, 1996.
- PEERALLY, A. The classification and phytopathology of Cylindrocladium species. **Mycotaxon**, New York, v. 40, p. 323-366, 1991.
- PIMENTEL, C.P.V., FIGUEIREDO, M.B. Métodos de preservação de fungos em meio de cultura. **O Biológico**, São Paulo, v. 55, p. 27-33, 1989.
- PLATT, H.W., MAHUKU, G. Detection methods for Verticillium species in naturally infested and inoculated soils. **American Journal of Potato Research**, v. 77, p. 271-274, 2000.
- POLTRONIERI, L.S., ALFENAS, A.C., DUARTE, M.L.R., ALBUQUERQUE, F.C., JESUS, C.C. Mogno africano e ipê-amarelo, hospedeiros de Cylindrocladium parasiticum no estado do Pará. **Fitopatologia Brasileira**, v. 25, supl. p. 411, 2000.
- POUPARD, P., FREI, U., CAVELIER, N., LIND, V. Genetic diversity in w- and r-type populations of Pseudocercospora herpotrichoides based on DNA restriction fragment length polymorphisms. **Journal of Phytopathology**, p. 99-104, 1995.
- QUEIROZ, F.M., MENEZES, M. Efeito de meios de cultura e de regimes de luz no crescimento micelial e esporulação de Cercospora cruenta, agente causal da mencha necrótica do caupi. **Revista Omega**, Recife, v. 10, p. 36-38, 1997.
- REIS, M.S., CHAVES, G. M. Estudo do tombamento de mudas de eucalipto incitado por Cylindrocladium scoparium Morgan – I – Etiologia. **Experientiae**, v. 7, p. 1-23, 1967.

- ROSA, R.T.C., MENEZES, M. Caracterização patogênica, fisiológica e morfológica de Peudocercospora musae. **Fitopatologia Brasileira**, v. 26, n. 2, p. 141-147, 2001.
- SERRA, I.M.R. de, SILVA. G.S. da. Caracterização morfofisiológica de isolados de Colletotrichum gloeosporioides agentes de antracnose em frutíferas no Maranhão. **Summa Phytopathologica.**, v. 30, n. 4, p. 475-480, 2004.
- SILVA, J.F.V., ABDELNOOR, R.V., COSTA, C.L., BAÍA, G.S. Análise de RAPD em isolados de Fusarium spp parasitas de ovos de Heterodera glycines ou de plantas de soja. **Fitopatologia Brasileira**, v. 25, p. 491-496, 2000.
- SINGLETON, L.L., MIHAIL, J.D., RUSH, C.M. **Methods for research on soilborne phytopathogenic fungi**. Minnesota: APS PRESS. 1992.
- SMITH, O.P., PETERSON, G.L., BECK, R.J., SCHAAD, N.W., BONDE, M.R. Development of a PCR-based method for identification of Tilletia indica, causal agent of karnal bunt of wheat. **Phytopathology**, St. Paul, v. 86, p. 115-22, 1996.
- SOBERS, E.K., LITTRELL, R.H. Pathogenicity of three species of Cylindrocladium to select hosts. **Plant Disease Reporter.**, v. 58, p. 1017-1019, 1974.
- TUITE, J. **Plant Pathological Methods: Fungi and Bacteria**. Minneapolis. Burgess. Publ., 1969, 239 p.
- VECHIATO, M.H. **Detecção e identificação de Diaporthe phaseolorum var. meridionalis em sementes de soja por PCR**. 2002. 115 p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
- WATANABE, T., HAGIWARA, S., NARITA, I. Decline of Phellodendron amurense in Tokyo: associated fungi and pathogenicity of associated Cylindrocladium spp. **Plant Disease**, v. 79, p. 1161-1164, 1995.

APÊNDICE

Apêndice 1 – Sequências de bases obtidas para os diferentes isolados de *Cylindrocladium*, utilizando-se para a PCR o par de primers ITS1 e ITS4.

>IB223

TNTNATACCTTAGCGGGTAGNCCTACCTGATTCGAGGTCAACCAGAAAAAGTT
 GGGGGTTTTACGGCGTGGTCGCACCGAGACTCCAGAGCGAGGTGTATTACTAC
 GCAGAGGAAGCTACAGCGAGACCGCCACTATATTTGGGGGACGGCGCGACCCG
 GAGGCCGCCTTGCCGATCCCCAACACCAAGCTGAGCTTGAGGGTTGAAATGAC
 GCTCGAACAGGCATGCCCCGCCAGAATACTGGCGGGCGCAATGTGCGTTCAAAG
 ATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTTCGCTGCGT
 TCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTGATTTATTTG
 TTTTTTACTCAGAAGATACTGAAAAATTCAAAGAAGTTGTTGGGTCCTCTGGC
 GGGCCGTTGCCGGACACCGCCGAAGGAACNAAACANGTNTNTTCACATGGGGT
 TTGGGAGGTGGAAACTCGGTAATGATCCCCNCAGTTCACCTTAGGGA

>IB238

TTTGNTTAGNTAGCGGGTAGTCCTACCTGATTCGAGGTCAACCAGAAAAAGTT
 GGGGGTTTTACGGCGTGGTCGCACCGAGACTCCAGAGCGAGGTGTATTACTAC
 GCAGAGGAAGCTACAGCGAGACCGCCACTATATTTGGGGGACGGCGCGACCCG
 GAGGCCGCCTTGCCGATCCCCAACACCAAGCTGAGCTTGAGGGTTGAAATGAC
 GCTCGAACAGGCATGCCCCGCCAGAATACTGGCGGGCGCAATGTGCGTTCAAAG
 ATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTTCGCTGCGT
 TCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTGATTTATTTG
 NTTTTTACTCAGAAGATACTGAAAAATTCAAAGAAGTTTGTGGGTCCTCTGGC
 GGGCCGTTGCCGGACACCGCCGAGGGAACGAAACAGGTATGTTACATGGGGT
 TTGGGAGTTGNAAACTCGTNATGTTCCCCCNCAAGTTACTTCGGAA

>IB239

TTTGCTNANNTAGCGGGTAGTCCTACCTGATTCGAGGTCAACCAGAAAAAGTT
 GGGGGTTTTACGGCGTGGCCGCACCGAGACTCCAGAGCGAGGTGTATTACTAC
 GCAGAGGAAGCTACAGCGAGACCGCCACTAAATTTGGGGGACGGCGCGACCC

GGAGGACGCCTTGCCGATCCCCAACACCAAGCTGAGCTTGAGGGTTGAAATGA
 CGCTCGAACAGGCATGCCC GCCAGAATACTGGCGGGCGCAATGTGCGTTCAA
 GATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTTCGCTGCG
 TTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTGATTTATTT
 GTTTTTTACTCAGAAGATACTGAAAAATTCAAAGAGTTTGTGGGTCCTCTGG
 CGGGCCGTTGCCGGACACCGCCGAGGGAACGAAACAGGTATGTTACATGGGG
 TTTGGGAGTTGNAAACTCGGTNATGATCCCCCNAAGTTCACTNCGGAA

>IB268

TTTGCTNANNTAGCGNGTAGTCCTACCTGATTCGAGGTCAACCAGAAAAAGTT
 GGGGGTTTTACGGCGTGGCCGCACCGAGACTCCAGAGCGAGGTGTATTACTAC
 GCAGAGGAAGCTACAGCGAGACCGCCACTAAATTTGGGGGACGGCGCGACCC
 GGAGGACGCCTTGCCGATCCCCAACACCAAGCTGAGCTTGAGGGTTGAAATGA
 CGCTCGAACAGGCATGCCC GCCAGAATACTGGCGGGCGCAATGTGCGTTCAA
 GATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTTCGCTGCG
 TTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTGATTTATTT
 GTTTTTTACTCAGAAGATACTGAAAAATTCAAAGAGTTTGTGGGTCCTCTN
 GCGGGCCGTTGCCGGCACCGCCGAGGGAACCAAACANGTNTGTTACATGGGG
 TTTGGGAGTTGNAAACTCGGTNATGATCCCCCNAAGTTCACTNCGGAA

>IB328

TTTGATNCCTTAGCGNGTAGTCCTACCTGATTCGAGGTCAACCAGAAAAAGTTG
 GGGGTTTTACGGCGTGGTCGCACCGAGACTCCAGAGCGAGGTGTATTACTACG
 CAGAGGAAGCTACAGCGAGACCGCCACTAAATTTGGGGGACGGCGCGACCCG
 GAGGACGCCTTGCCGATCCCCAACACCAAGCTCCCGAAGGTGCTTGAGGGTTG
 AAATGACGCTCGAACAGGCATGCCC GCCAGAATACTGGCGGGCGCAATGTGCG
 TTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTT
 GCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTGAT
 TTATTGTTTTTTTCACTCAGAAGATACTATNAATTCAAAGAGTTTGTGGGTC
 TCTTGCGGGCCGNTGCCGGACACCGCCCNAGGGAACNAAACAGGTNTTTTCA

CATGGGGTTTGGGAGTTGGAAACTCGGTAATGATNCCNCCCCCAGGTTACCTT
 NGGA

>IB421

TTTGATTACNTNGCGGGTAGTCCTACCTGATTCGAGGTCAACCAGAAAAAGTTG
 GGGGTTTTACGGCGTGGCCGCACCGAGACTCCAGAGCGAGGTGTATTACTACG
 CAGAGGAAGCTACAGCGAGACCGCCACTAAATTTGGGGGACGGCGCGACCCG
 GAGGACGCCTTGCCGATCCCCAACACCAAGCTGAGCTTGAGGGTTGAAATGAC
 GCTCGAACAGGCATGCCCCGCCAGAATACTGGCGGGCGCAATGTGCGTTCAAAG
 ATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTTCGCTGCGT
 TCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTGATTTATTTG
 TTTTTTACTCAGAAGATACTGAAAAATTCAAAGAAGTTGTTGGGTNCTCTGGC
 GGGCCGTTGCCGGACACCGCCGAAGGAACCAAACANGTNTGTTACATGGGGT
 TGGGAGTTGGAAACTCGGTAATGATCCCNCCNAGGTTACCTTCGGAA

>IB515

TTTGNTTAGNTAGCGGGTAGTCCTACCTGATTCGAGGTCAACCAGAAAAAGTT
 GGGGGTTTTACGGCGTGGTCGCACCGAGACTCCAGAGCGAGGTGTATTACTAC
 GCAGAGGAAGCTACAGCGAGACCGCCACTATATTTGGGGGACGGCGCGACCCG
 GAGGCCGCCTTGCCGATCCCCAACACCAAGCTGAGCTTGAGGGTTGAAATGAC
 GCTCGAACAGGCATGCCCCGCCAGAATACTGGCGGGCGCAATGTGCGTTCAAAG
 ATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTTCGCTGCGT
 TCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTGATTTATTTG
 NTTTTTACTCAGAAGATACTGANAAATTCANAAGAAGTTTGTTGGGTCCTCTGG
 CGGGNCGGTGCCCGACACCCCGAAGGAACNAAACANGTNTTTCACATGGGGTT
 NGGGAGTGNAAACTCGTNATGTTCCCCCNCAAGTTACTTCGGAA

>IB728

TTTGATTACNTAGCGGGTAGTCCTACCTGATTCGAGGTCAACCAGAAAAAGTTG
 GGGGTTTTACGGCGTGGCCGCACCGAGACTCCAGAGCGAGGTGTATTACTACG

CAGAGGAAGCTACAGCGAGACCGCCACTAAATTTGGGGGACGGCGCGACCCG
 GAGGACGCCTTGCCGATCCCCAACACCAAGCTGAGCTTGAGGGTTGAAATGAC
 GCTCGAACAGGCATGCCCCGCCAGAATACTGGCGGGCGCAATGTGCGTTCAAAG
 ATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTTCGCTGCGT
 TCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTGATTTATTTG
 TTTTTTACTCAGAAGATACTGAAAAATTCAAAGAGTTTGTGGGTCTCTGGC
 GGGCCGTTGCCGGACACCGCCGAGGGAACGAAACAGGTATGTTACATGGGGT
 TTGGGAGTTGGAAACTCGGTAATGATCCCNCCNAGGTTACCTTCGGAA

>IB11/75

TTTGATNCCTTAGCGGGTAGTCCTACCTGATTCGAGGTCAACCAGAAAAAGTTG
 GGGGTTTTACGGCGTGGTCGCACCGAGACTCCAGAGCGAGGTGTATTACTACG
 CAGAGGAAGCTACAGCGAGACCGCCACTAAATTTGGGGGACGGCGCGACCCG
 GAGGACGCCTTGCCGATCCCCAACACCAAGCTCCCGAAGGTGCTTGAGGGTTG
 AAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCCGCCAGAATACTGGCGGGCGCAATGTGCG
 TTCAAAGATTTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTT
 GCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTGAT
 TTATTGTTTTTTTCACTCAGAAGATACTGATAAATTCAAAGAGTTTGTGGGT
 CCTCTGGCGGGCCGTTGCCGGACACCGCCGAGGGAACGAAACAGGTATGTTCA
 CATGGGGTTTGGGAGTTGGAAACTCGGTAATGATNCCNCCCCCAGGTTACCTT
 NGGA

>IB6/78

TNTNATACCTTAGCGGGTAGTCCTACCTGATTCGAGGTCAACCAGAAAAAGTT
 GGGGGTTTTACGGCGTGGTCGCACCGAGACTCCAGAGCGAGGTGTATTACTAC
 GCAGAGGAAGCTACAGCGAGACCGCCACTATATTTGGGGGACGGCGCGACCCG
 GAGGCCGCCTTGCCGATCCCCAACACCAAGCTGAGCTTGAGGGTTGAAATGAC
 GCTCGAACAGGCATGCCCCGCCAGAATACTGGCGGGCGCAATGTGCGTTCAAAG
 ATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTTCGCTGCGT
 TCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTGATTTATTTG
 TTTTTTACTCAGAAGATACTGAAAAATTCAAAGAGTTTGTGGGTCTCTGGC

GGGCCGTTGCCGGACACCGCCGAGGGAACGAAACAGGTATGTTACATGGGGT
TTGGGAGTTGGAAACTCGGTAATGATCCCCNCAGTTCACCTTAGGGA

>IB12/79

TTTGATTCCTTAGCGNTAGNCCTACCTGATTCGAGGTCAACCAGAAAAAGTTGG
GGGTTTTACGGCGTGGTCGCACCGAGACTCCAGAGCGAGGTGTATTACTACGC
AGAGGAAGCTACAGCGAGACCGCCACTAAATTTGGGGGACGGCGCGACCCGG
AGGACGCCCTGCCGATCCCCAACACCAAGCTGAGCTTGAGGGTTGAAATGACG
CTCGAACAGGCATGCCCGCCAGAATACTGGCGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGA
TTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTCGCTGCGTT
CTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTGATTTATTGGT
TTTTTTCACTCAGAAGATACTGAAAAATTCAAAGAGTTTGTGGGTCCTCTTN
CGGGCCGNTGCCCGGACACCCCNAGGGAACNAAACATGTNTNTTCACATGG
GTTTGGGAGTTGNAACCGGTATGATTCCCCCCCCANGTTACCTCGGAA

>IB17/89

TTTGATTCCTTAGCGGGTAGTCCTACCTGATTCGAGGTCAACCAGAAAAAGTTG
GGGGTTTTACGGCGTGGTCGCACCGAGACTCCAGAGCGAGGTGTATTACTACG
CAGAGGAAGCTACAGCGAGACCGCCACTAAATTTGGGGGACGGCGCGACCCG
GAGGACGCCCTGCCGATCCCCAACACCAAGCTGAGCTTGAGGGTTGAAATGAC
GCTCGAACAGGCATGCCCGCCAGAATACTGGCGGGCGCAATGTGCGTTCAAAG
ATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTCGCTGCGT
TCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTGATTTATTGG
TTTTTTCACTCAGAAGATACTGAAAAATTCAAAGAGTTTGTGGGTCCTCTGG
CGGGCCGTTGCCCGGACACCGCCGAGGGAACGAAACAGGTATGTTACATGGGG
TTTGGGAGTTGNAAACTCGGTAATGATTCCCCCCCCANGTTACCTCGGAA

>IB01/01

TTACNTTCAGCGGGTAGTCCTACCTGATTCGAGGTCAACCAGAAAAAGTTGGG
 GGTTTTACGGCGTGGTCGCACCGAGACTCCAGAGCGAGGTGTATTACTACGCA
 GAGGAAGCTACAGCGAGACCGCCACTATATTTGGGGGACGGCGCGACCCGGA
 GGACGCCTTGCCGATCCCCAACACCAAGCAGAGCTTGAGGGTTGAAATGACGC
 TCGAACAGGCATGCCC GCCAGAATACTGGCGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGAT
 TCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTTCGCTGCGTTC
 TTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTGATTTATTGTTT
 TTTTCACTCAGAAGATACTGAAGAATTCAAAGAGTTTGTGGGGTCCTCTGGCG
 GGCCGTTGCCGGACACCGCCGAGGGAACGAAACAGGTATGTTACATGGGGTT
 TGGGAGTTGGAAACTCGGTAATGATCCCTCCGCAAGTTCACCCTNGGA

>FCA06

TTACGTTTCAGCGGGTAGTCCTACCTGATTCGAGGTCAACCAGAAAAAGTTGGG
 GGTTTTACGGCGTGGTCGCACCGAGACTCCAGAGCGAGGTGTATTACTACGCA
 GAGGAAGCTACAGCGAGACCGCCACTATATTTGGGGGACGGCGCGACCCGGA
 GGCCGCCTTGCCGATCCCCAACACCAAGCTGAGCTTGAGGGTTGAAATGACGC
 TCGAACAGGCATGCCC GCCAGAATACTGGCGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGAT
 TCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTTCGCTGCGTTC
 TTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTGATTTATTTGTT
 TTTTACTCAGAAGATACTGAAAAATTCAAAGAGTTTGTGGGGTCCTCTGGCGG
 GCCGTTGCCGGACACCGCCGAGGGAACGAAACAGGTATGTTACATGGGGTTT
 GGGAGTTGTAAACTCGGTAATGTTNCCNCCGNAGTTNCCCTCG

>FCA07

AGGGGGGCAATNACTATACGAATTCAAGTCGCCATCAGGATGGANTAAGCTC
 CAGTTGGTCTTTTTCAACCCCCAAAATGCCGCACCAGCGTGGCTCTGAGGTCTC
 GCTCCACATAATGATGCGTCTCCTTCGATGTCGCTCTGGCGGTGATATAAACCC
 CCTGCCGCGCTGGGCCTCGGCGGAACGGCTAGGGGTTGTGGTTCGACTCGAAC
 TCCCAACTTTACTGCGAGCTTGTCCGTACGGGCGGTCTTATGACCGCCCGCGTT
 ACACGCAAGTTTCTAAGCTACTAAGTGACTTAAGACGTTAAGTGTAATGAATA
 GCGTAAAGCGACGCAAGAAGTAGCTACGGTCTTGGTTCTCTAGGCAACAACCTT

TCAAAACTAAATAAACAAAAAATGAGTCTTCTATGACTTTTTAAGTTTTCTCAA
ACAACCCAGGAGACCGCCCGGCAACGGCCTGTGGCGGCTCCCTTGCTTTGTCC
ATACAAGTGTACCCCANACCTCAACATTTGAGCCT

>FCA09

AGGGGGGCGGATTAACTATACGAATTCAAGTCGCCCATCAGGATGGACTAAGC
TCCAGTTGGTCTTTTTCAACCCCAAAAATGCCGCACCAGCGTGGCTCTGAGGTC
TCGCTCCACATAATGATGCGTCTCCTTCGATGTCGCTCTGGCGGTGATATAAAC
CCCCTGCCGCGCTGGGCCTCCGGCGGAACGGCTAGGGGTTGTGGTTCGACTCG
AACTCCCAACTTTACTGCGAGCTTGTCCGTACGGGCGGTCTTATGACCGCCCGC
GTTACACGCAAGTTTCTAAGCTACTAAGTGACTTAAGACGTTAAGTGTAATGAA
TAGCGTAAAGCGACGCAAGAAGTAGCTACGGTCTTGGTTCTCTAGGCAACAAC
TTTCAAACTAAATAAACAAAAAATGAGTCTTCTATGACTTTTTAAGTTTTCTC
AAACAACCCAGGAGACCGCCCGGCAACGGCCTGTGGCGGCTCCCTTGCTTTGT
CCATACAAGTGTACCCCATACCTCAACCGCTGAGCCT

>FCA10

TTACTTCAGCGGGTAGTCCTACCTGATTCGAGGTCAACCAGAAAAAGTTGGGG
GTTTTACGGCGTGGTCGCACCGAGACTCCAGAGCGAGGTGTATTACTACGCAG
AGGAAGCTACAGCGAGACCGCCACTATATTTGGGGGACGGCGCGACCCGGAG
GCCGCCTTGCCGATCCCCAACACCAAGCTGAGCTTGAGGGTTGAAATGACGCT
CGAACAGGCATGCCCCGCCAGAATACTGGCGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATT
CGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTTCGCTGCGTTCT
TCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTGATTTATTTGTTT
TTTACTCAGAAGATACTGAAAAATTCAAAGAGTTTGTGGGTCCTCTGGCGGG
CCGTTGCCGACACCGCCGAGGGAACGAAACAGGTATGTTACATGGGGTTTG
GGAGTTGTAAACTCGGTAATGATNCCTCCGCANGTTCACCCTCGA

>CKa

TCCGAGTCGCCAACTCCCATACCCCATGTGAACATACCTGTTTCGTTCCCTCGG
CGGTGTCCGGCAACGGCCCGCCAGAGGACCCAACAAACTCTTTTGAATTTTTCA
GTATCTTCTGAGTAAAAAACAATAAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTG
GTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCA
GAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTG
GCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCTCAGCTTGGTGTGG
GGATCGGCAAGGCGGCCTCCGGGTTCGCGCCGTCCCCAAATATAGTGGCGGTC
TCGCTGTAGCTTCCTCTGCGTAGTAATACACCTCGCTCTGGAGTCTCGGTGCGA
CCACGCCGTAAAACCCCAACTTTTTCTGGTTGACCTCGAATCAGGTAGGACTA
CCCGCTGAACTTAAGCATATCAATTAGCCGGGGGA