



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA FLORESTAL**

**IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DE *Cladosporium* E A
REAÇÃO DE CULTIVARES DE NOGUEIRA-PECÃ**

TESE DE DOUTORADO

Clair Walker

Santa Maria, RS, Brasil

2016

**IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DE *Cladosporium* E A
REAÇÃO DE CULTIVARES DE NOGUEIRA-PECÃ**

Clair Walker

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação
em Engenharia Florestal, Área de Concentração em Silvicultura,
da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS),
como requisito parcial para obtenção do grau de
Doutora em Engenharia Florestal.

Orientadora: Marlove Fátima Brião Muniz

Santa Maria, RS, Brasil.

2016

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Walker, Clair
Identificação de espécies de Cladosporium e a reação de cultivares de Nogueira-pecã. / Clair Walker.-2016.
57 f.; 30cm

Orientadora: Marlove Fátima Brião Muniz
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, RS, 2016

1. *Carya illinoensis* 2. Mancha foliar 3. Sarna 4. TEF-1α I. Muniz, Marlove Fátima Brião II. Título.

© 2016

Todos os direitos autorais reservados a Clair Walker. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.

E-mail: clairwalker@gmail.com

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Curso de Pós-Graduação em Engenharia Florestal**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Tese de Doutorado.

**IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DE *Cladosporium* E A REAÇÃO DE
CULTIVARES DE NOGUEIRA-PECÃ**

elaborada por
Clair Walker

como requisito parcial para obtenção do grau de
Doutora em Engenharia Florestal

COMISSÃO EXAMINADORA:

Marlove Fátima Brião Muniz, Dr^a. (UFSM)
(Presidente/Orientador)

Marília Lazarotto, Dr^a. (UFRGS)

Lia Rejane Silveira Reiniger, Dr^a. (UFSM)

Cândida Elisa Fanfio, Dr^a. (UNICRUZ)

Gerusa Pauli Kist Steffen, Dr^a. (FEPAGRO FLORESTAS)

Santa Maria, 23 de fevereiro de 2016.

*À minha mãe, Evandina, pelo amor e carinho,
compreensão e incentivo durante toda a minha vida.*

Dedico este trabalho

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Santa Maria, por proporcionar a oportunidade de me qualificar profissionalmente e, ao órgão financiador Capes, pela bolsa concedida, que viabilizou a execução deste trabalho.

À professora Dr^a Marlove Fátima Brião Muniz, pela orientação, disponibilidade e auxílio durante o desenvolvimento desta pesquisa.

À professora Dr^a Lia Reiniger e pesquisador da Embrapa Florestas, Dr. Álvaro Figueiredo dos Santos, agradeço pela coorientação deste trabalho, pela amizade, conhecimentos compartilhados e apoio.

À professora Dr^a Marília Lazarotto pelas ideias e sugestões desta pesquisa.

Às professoras, Dr^a Marília Lazarotto, Dr^a Cândida Elisa Manfio, Dr^a Gerusa Pauli Kist Steffen e Dr^a Lia Rejane Reiniger por aceitarem o convite para compor a banca examinadora desta tese.

À minha mãe Evandina, pela educação, apoio e confiança depositada em todos esses anos de estudos, pelo exemplo de honestidade, trabalho, força e fé.

Aos meus irmãos, Altair, Neuza, Jandir e Edson, pelo incentivo nos estudos e pelo exemplo de irmãos que são para mim.

Aos meus amigos e amigas, em especial Aline Ritter Curti, pela amizade, pelo companheirismo diante das nossas vitórias e dificuldades.

Ao meu namorado Ricardo Martins pelo apoio e participação na realização deste trabalho, pelo carinho, amor, amizade e compreensão. Agradeço também a família Bender pelo apoio e momentos alegres compartilhados.

Aos funcionários do Departamento de Defesa Fitossanitária, em especial a Maria Neves Weber, pela orientação nos trabalhos, amizade e tantos momentos de alegria.

Aos produtores de noqueira-pecã que me receberam em suas propriedades para a realização das coletas, ao Eng. Florestal Eloi Paulus e à Fepagro – Centro de Pesquisas em Florestas por disponibilizar a área experimental para a coleta de material.

Aos queridos colegas de laboratório, em especial, Caciara Gonzatto, Ricardo Mezzomo, Jéssica Rolim, Victória Rosenthal, Jéssica Rabuske, que nunca mediram esforços para me ajudar nos trabalhos, pelo conhecimento compartilhado e pela amizade.

MUITO OBRIGADA!

RESUMO

Tese de Doutorado
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal
Universidade Federal de Santa Maria

IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DE *Cladosporium* E A REAÇÃO DE CULTIVARES DE NOGUEIRA-PECÃ

AUTORA: CLAIR WALKER
ORIENTADORA: MARLOVE FÁTIMA BRIÃO MUNIZ
Local da defesa e data: Santa Maria, 23 de fevereiro de 2016.

A cultura da noqueira-pecã [*Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch] tem apresentado maior importância econômica no sul do Brasil nas últimas décadas, aumentando assim a área plantada, principalmente nos estados do Rio Grande do Sul (RS), Santa Catarina (SC) e Paraná (PR). No entanto, apesar do aumento crescente das áreas plantadas, poucas pesquisas relacionadas a doenças na cultura e ao melhoramento genético visando a obtenção de cultivares resistentes a doenças, têm sido realizadas no país. A ocorrência de sintomas de mancha foliar causada por *Cladosporium* spp. foi observada a campo nos três estados do sul do Brasil. Diante dessa observação, o objetivo geral do presente trabalho foi verificar a variabilidade morfológica e molecular de isolados de *Cladosporium* spp. associados à mancha foliar em noqueira-pecã, verificando sua distribuição na região sul do Brasil, bem como selecionar cultivares resistentes como forma de controle para a doença. Como objetivos específicos foram estabelecidos os seguintes: a) identificar as espécies de *Cladosporium* causadoras de mancha foliar em pomares de noqueira-pecã procedentes de regiões produtoras dos três estados do sul do Brasil; b) verificar a diversidade e a variabilidade morfológica e genética, através do sequenciamento da região do fator de alongação (TEF – 1 α), de isolados de *Cladosporium* spp. provenientes de plantas de noqueira-pecã com sintomas de mancha foliar; c) selecionar caracteres morfológicos eficientes para a separação dos isolados em grupos, de acordo com a espécie a que pertencem; d) confirmar a patogenicidade de isolados de *Cladosporium* spp., bem como quantificar a incidência e severidade da mancha foliar nas cultivares ‘Barton’ e ‘Shawnee’. Para isso, foram realizadas coletas de folhas sintomáticas em 16 pomares de noqueira-pecã para o isolamento do patógeno, nos estados do PR, SC e RS. Os isolados foram caracterizados morfológicamente através do crescimento micelial, esporulação, pigmentação das colônias, dimensões de conídios e ramoconídios. Essas variáveis foram utilizadas na análise UPGMA em que os isolados foram agrupados em um dendrograma de acordo com a similaridade genética e, estabelecidos os caracteres que mais contribuíram para a divergência. A análise dos 40 isolados através das características morfológicas e da análise genética, a partir do sequenciamento dos genes do fator de alongação TEF-1 α , confirmaram as espécies *C. cladosporioides* (21 isolados), *C. pseudocladosporioides* (18 isolados) e *C. subuliforme* (apenas um isolado) associadas à mancha foliar. A região do fator de alongação (TEF-1 α) é eficiente para identificar e agrupar as espécies associadas à noqueira-pecã incluídas no complexo *C. cladosporioides* e a esporulação é uma importante característica morfológica para diferenciar as espécies de *Cladosporium* spp. Todos os 40 isolados foram patogênicos às cultivares ‘Barton’ e ‘Shawnee’. As duas cultivares foram consideradas suscetíveis à mancha foliar para as três espécies de *Cladosporium* spp. testadas e existe diferença de suscetibilidade para *C. pseudocladosporioides*, onde a ‘Shawnee’ apresentou maior severidade da doença em relação a ‘Barton’.

Palavras-chave: *Carya illinoensis*. Mancha foliar. Sarna. TEF-1 α .

ABSTRACT

Doctorate Thesis
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal
Universidade Federal de Santa Maria

IDENTIFICATION OF *Cladosporium* spp. SPECIES AND REACTION OF PECAN CULTIVARS

AUTHOR: CLAIR WALKER

ADVISOR: MARLOVE FÁTIMA BRIÃO MUNIZ

Date and place of the defense: February, 23th, 2016, Santa Maria.

The culture of pecan [*Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch] has presented greater economic importance in southern Brazil in recent decades, thus increasing the planted area, mainly in the states of Rio Grande do Sul (RS), Santa Catarina (SC) and Paraná (PR). However, despite the increasing growth of planted area, little research related to diseases in culture and breeding aimed at obtaining cultivars resistant to diseases, have been held in the country. The occurrence of leaf spot symptoms caused by *Cladosporium* spp. was observed in field in three southern states of Brazil. Given this observation, the general objective of this study was to evaluate the morphological and molecular variability of *Cladosporium* spp. isolates associated with leaf spot in pecan, checking its distribution in southern Brazil, as well as selecting resistant cultivars as a way to control the disease. The specific objectives were established as follows: a) To identify the species of *Cladosporium* spp. causing leaf spot in pecan orchards coming from producing areas of the three southern states of Brazil; b) To verify the diversity and morphological and genetic variability, by sequencing elongation factor (TEF - 1 α) region, isolates of *Cladosporium* spp. from pecan plants with symptoms of leaf spot; c) To select efficient morphological characters for separation of isolated groups according to the species to which they belong; d) To confirm the pathogenicity of *Cladosporium* spp., as well as quantify the incidence and severity of leaf spot in 'Shawnee' and 'Barton' cultivars. For this, leaf samples were taken in 16 symptomatic pecan orchards to the isolation of the pathogen in the states of Paraná, Santa Catarina and Rio Grande do Sul. The isolates were characterized morphologically using mycelial growth, sporulation, colonies pigmentation, conidia and ramoconidia dimensions. These variables were used in the UPGMA analysis in which the isolates were grouped in a dendrogram according to genetic similarity and established characters that contributed most to the divergence. The analysis of 40 isolates by means of morphological and genetic analysis, sequencing of genes from the elongation factor TEF-1 α confirmed that the species *C. cladosporioides* (21 isolates), *C. pseudocladosporioides* (18 isolates) and *C. subuliforme* (only one isolate) associated with leaf spot. The region of the elongation factor (TEF-1 α) is efficient to identify and group the species associated with pecan included in the *C. cladosporioides* complex and sporulation is an important morphological characteristic to differentiate the species of *Cladosporium* spp. All 40 isolates were pathogenic to cultivars 'Barton' and 'Shawnee'. The two cultivars were considered susceptible to leaf spot for the three species of *Cladosporium* spp. tested and there is susceptibility difference for *C. pseudocladosporioides*, where 'Shawnee' showed greater severity of disease in relation to 'Barton'.

Keywords: *Carya illinoensis*. Leaf spot. Scab. TEF-1 α .

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

ARTIGO 2

MORPHOLOGICAL AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF *Cladosporium cladosporioides* SPECIES COMPLEX CAUSING LEAF SPOT IN PECAN TREE

- Figure 1** - Leaf spot symptoms caused by *Cladosporium* spp. in pecan (*Carya illinoensis*). A and B: appearance of lesions visualized in stereoscopic microscope; C: necrotic lesions that coalesce and break the leaf blade in the ribs direction; D: stereoscopic microscope view of necrotic lesions with presence of reproductive fungal structures. Fonte: Walker (2014).....22
- Figure 2** - Dendrogram of the estimations and its percentages of dissimilarity among 40 isolates of *Cladosporium* spp. isolated from pecan (*Carya illinoensis*). The dendrogram was obtained by the UPGMA technique based on the analysis of the distance on a Euclidean matrix, comprising six morphological characters (mycelial growth, sporulation, width and length of conidia and ramoconidia). .28
- Figure 3** - Phylogenetic dendrogram based on Neighbor-joining method from the DNA sequences of the TEF-1 α region, based on 1000 bootstrap replicates. The numbers on the branches represent the number of bootstraps. * *Cladosporium* spp. isolates obtained in this study.30

ARTIGO 3

REAÇÃO DE DUAS CULTIVARES DE NOGUEIRA-PECÃ A ESPÉCIES DO COMPLEXO *Cladosporium cladosporioides*

- Figura 1** - Sintomas típicos de mancha foliar induzidos por meio de inoculação artificial de isolados de *Cladosporium* sp. em cultivares de noqueira-pecã. (A, B e F) Observações por meio do microscópio estereoscópico mostrando lesões escuras de coloração marrom a preta com presença de sinais do patógeno; (C, D e E) Sintomas observados visualmente; (A) Isolado 16/13RS (*C. pseudocladosporioides*) na cultivar ‘Shawnee’; (B) Isolado 12/8PR (*C. cladosporioides*) na cultivar ‘Barton’; (C) Isolado 16/2RS (*C. subuliforme*) na cultivar ‘Shawnee’; (D) Isolado 16/13RS (*C. pseudocladosporioides*) na cultivar ‘Shawnee’; (E) Isolado 12/7PR (*C. cladosporioides*) na cultivar ‘Barton’; (F) Isolado 16/2RS (*C. subuliforme*) na cultivar ‘Shawnee’. Fonte: Walker (2015)..42

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 2

MORPHOLOGICAL AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF *Cladosporium cladosporioides* SPECIES COMPLEX CAUSING LEAF SPOT IN PECAN TREE

- Table 1.** Collection areas of *Cladosporium* spp. isolates from pecan tree (*Carya illinoensis*) orchards in Rio Grande do Sul (RS), Santa Catarina (SC) and Paraná (PR).21
- Table 2.** Morphological characteristics of *Cladosporium* spp. isolates colonies from leaves of pecan (*Carya illinoensis*) after 19 days on incubation at 24°C and photoperiod of 12 h, in Potato Dextrose Agar (PDA).26

ARTIGO 3

REAÇÃO DE DUAS CULTIVARES DE NOGUEIRA-PECÃ A ESPÉCIES DO COMPLEXO *Cladosporium cladosporioides*

- Tabela 1.** Isolados de *Cladosporium* obtidos de manchas foliares de noqueira-pecã selecionados para o teste de patogenicidade, no sul do Brasil.40
- Tabela 2.** Valores médios de notas de severidade de mancha foliar induzida por inoculação artificial de espécies de *Cladosporium* spp. em folhas destacadas de noqueira-pecã nas cultivares ‘Barton’ e ‘Shawnee’43

LISTA DE APÊNDICES

- Apêndice A** - Mancha foliar em noqueira-pecã causada por *Cladosporium* spp. A e B: aspecto da mancha foliar nos folíolos; C e D: aspecto da mancha foliar com a presença de sinais do patógeno visualizada em microscópio estereoscópico. Fonte: Walker (2014).....56
- Apêndice B** - Características morfológicas de *Cladosporium cladosporioides*: micélio em meio de cultura BDA (A), conídio (B) e ramoconídio (C); *C. pseudocladosporioides*: micélio em meio de cultura BDA (D), conídio (E) e ramoconídio (F); *C. subuliforme*: micélio em meio de cultura BDA (G), conídio (H) e ramoconídio (I). Fonte: Walker (2014).....57

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	12
ARTIGO 1 FIRST REPORT OF SPECIES IN THE <i>Cladosporium cladosporioides</i> COMPLEX CAUSING PECAN LEAF SPOT IN BRAZIL.....	16
FIRST REPORT	16
REFERENCES	17
ARTIGO 2 MORPHOLOGICAL AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF <i>Cladosporium cladosporioides</i> SPECIES COMPLEX CAUSING LEAF SPOT IN PECAN TREE	18
ABSTRACT.	18
INTRODUCTION	18
MATERIAL AND METHODS	20
RESULTS	24
DISCUSSION.....	31
ACKNOWLEDGMENTS.....	33
REFERENCES	33
ARTIGO 3 REAÇÃO DE DUAS CULTIVARES DE NOGUEIRA-PECÃ A ESPÉCIES DO COMPLEXO <i>Cladosporium cladosporioides</i>	36
Resumo	36
Introdução	37
Material e métodos	39
Resultados e Discussão	42
Agradecimentos	45
Referências	45
DISCUSSÃO	48
CONCLUSÃO.....	53
REFERÊNCIAS	54
APÊNDICES	56

INTRODUÇÃO

A cultura da noqueira-pecã [*Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch] possui grande importância na atividade econômica de muitos agricultores na região sul do Brasil, principalmente no estado do Rio Grande do Sul (RS), seguido do Paraná (PR) e de Santa Catarina (SC). A noqueira-pecã foi introduzida no Brasil e passou a ser explorada economicamente a partir dos anos 1970, quando vários pomares foram implantados, principalmente nos três estados do sul do Brasil (ORTIZ e CAMARGO, 2005). No RS, a partir da década de 1990, empresas produtoras e fornecedoras de mudas de noqueira-pecã desenvolveram cultivares mais resistentes a doenças. A partir de cultivares norte-americanas, os melhores materiais foram selecionados em solos e climas brasileiros, avaliando o comportamento fitossanitário, a dinâmica floral e produção.

Nos últimos anos, diversos produtores investiram nessa atividade com a implantação de pomares, pois a cultura tem se mostrado promissora devido à valorização do preço pago pela noz. Além disso, o mercado vem se expandindo e o aumento no consumo da noz deve-se à crescente preocupação com a ingestão de alimentos saudáveis e nutritivos. De acordo com o IBGE (2014), somando-se os três estados do sul, a área colhida e a produção total de noz (fruto seco), foram de 2.223 hectares e 3.669 toneladas, respectivamente.

A noqueira-pecã possibilita a diversificação da produção nas propriedades rurais, além disso, alguns produtores utilizam sistemas agroflorestais e silvipastoris. Nos sistemas agroflorestais, em algumas áreas, a noqueira-pecã é consorciada com culturas agrícolas (milho, mandioca, feijão), enquanto nos sistemas silvipastoris, a cultura fornece sombra e propicia o cultivo de forrageiras que servem para a alimentação dos animais (bovinos e ovinos). Assim, esses sistemas de produção permitem a otimização da área de cultivo, aumentando os rendimentos do produtor.

Além da produção da noz, muito utilizada em confeitaria, a madeira da noqueira-pecã é muito valiosa e empregada em pisos e mobiliário (MARCHIORI, 1997). O aproveitamento da madeira ainda não tem sido muito explorado, mas pode ser obtido dos desbastes quando os plantios se encontram muito adensados ou em plantios antigos provenientes de mudas de pé-franco.

Muitos produtores são cautelosos em investir na cultura devido ao tempo de retorno do capital investido, pois as cultivares iniciam a produção após o quarto ano e, o retorno

econômico ocorre a partir do oitavo ano. Além disso, existem poucas pesquisas relacionadas a viabilidade econômica do cultivo da noqueira-pecã e, atualmente, essas informações são obtidas por meio da troca de experiências entre os produtores. Para a maioria, o cultivo da noqueira-pecã é apenas um complemento de renda na propriedade.

Esta atividade se concentra no RS, onde se localiza grande parte dos viveiros de produção de mudas e de indústrias beneficiadoras. Além do fornecimento de mudas, as empresas oferecem assistência técnica e a garantia de compra da produção. O incentivo para a implantação de pomares é dado pelas empresas particulares e a Associação Riograndense de Empreendimentos de Assistência Técnica e Extensão Rural (EMATER/RS), que prestam serviços de assistência técnica, palestras, além de cursos e estímulo voltado à diversificação e complementação de renda dos pequenos produtores. Ainda, o Colégio Politécnico da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) localizado em Santa Maria – RS oferece cursos de treinamento para o cultivo da noqueira-pecã para a comunidade em geral.

Atualmente, percebe-se uma demanda muito grande de informações em relação à implantação do pomar, necessidades nutricionais, condução e, principalmente ao manejo de doenças, necessário para uma produção de qualidade. Esse fato é observado a campo em relatos de produtores, os quais têm demanda de maior acompanhamento técnico.

A sarna da noqueira-pecã causada por *Fusicladium effusum* G. Winter (syn. *Cladosporium carygenum*) é considerada a doença mais importante da noqueira-pecã no sudeste dos Estados Unidos e outras regiões úmidas localizadas no leste da África do Sul, sul do Brasil e nordeste do México onde a espécie é cultivada (Beck et al., 2005).

No Brasil, estudos relacionados a doenças que acometem a cultura são escassos, apenas alguns trabalhos têm sido publicados recentemente, relatando a ocorrência de doenças com comprovação científica das espécies, como é o caso dos estudos de Lazarotto et al. (2014a) e Lazarotto et al. (2014b). Anteriormente, Ortiz e Camargo (2005) relataram que a sarna da noqueira-pecã, causada por *Cladosporium caryigenum*, é a principal doença que ocorre na cultura em regiões úmidas no Sudeste dos Estados Unidos, na África do Sul, bem como no Brasil. No entanto, até o momento, não foi relatada na literatura comprovação sobre a espécie de *Cladosporium* sp. associada à noqueira-pecã, nas condições climáticas e edáficas brasileiras, utilizando-se caracterização molecular e análise filogenética.

A identificação correta dos patógenos envolvidos em doenças e descrições minuciosas são imprescindíveis para a adoção de estratégias de controle. Leslie e Summerell (2006) relataram que a utilização de sequências de DNA é, atualmente, a técnica mais comumente utilizada para identificação e delineamento filogenético de espécies. No entanto, na prática,

qualquer marcador que seja suficientemente informativo, incluindo características morfológicas, pode ser utilizado na análise filogenética.

Diante disso, a identificação do patógeno associado à mancha foliar (Apêndice A) causada por *Cladosporium* sp. em noqueira-pecã e o conhecimento da diversidade genética da população do patógeno envolvido no patossistema é de fundamental importância, pois resulta em informações essenciais aos programas de melhoramento genético de plantas que visem à resistência à doença.

A contribuição do presente estudo consiste no fornecimento de informações acerca das características morfológicas e da variabilidade genética de isolados de *Cladosporium* sp., identificados e obtidos nas diferentes áreas e regiões do sul do Brasil abrangidas no estudo. As informações geradas servem como base para estudos futuros do patógeno. Ainda, a avaliação da agressividade dos isolados pode fornecer subsídios para programas de melhoramento genético de noqueira-pecã.

Para os produtores de noqueira-pecã, a disponibilidade de materiais genéticos resistentes é de suma importância, pois no momento do planejamento dos pomares, o produtor poderá optar por cultivares menos suscetíveis à mancha foliar. Assim, a utilização de materiais genéticos resistentes representa redução de gastos com fungicidas para o controle da doença e ganhos de produtividade, além da qualidade da noz produzida.

No presente estudo, pretendeu-se identificar cultivares que apresentem maior resistência aos patógenos identificados, possibilitando, dessa maneira, indicar aos produtores materiais genéticos mais resistentes à mancha foliar. Além disso, as informações fornecidas para a comunidade científica poderão subsidiar novas pesquisas com os patógenos envolvidos na doença, gerando, assim, outras informações, que poderão ser úteis para os produtores.

Diante do exposto, o objetivo geral do presente trabalho foi verificar a variabilidade morfológica e molecular de isolados de *Cladosporium* spp. associados à mancha foliar em noqueira-pecã (*Carya illinoensis*), verificando sua distribuição na região sul do Brasil, bem como selecionar cultivares resistentes como forma de controle para a doença.

Os seguintes objetivos específicos foram propostos: a) identificar as espécies de *Cladosporium* causadoras de mancha foliar, em pomares de noqueira-pecã procedentes de regiões produtoras do Paraná, de Santa Catarina e do Rio Grande do Sul; b) verificar a diversidade e a variabilidade morfológica e genética, através do sequenciamento da região do fator de alongação (TEF – 1 α), de isolados de *Cladosporium* spp., provenientes de plantas de noqueira-pecã com sintomas de mancha foliar; c) selecionar caracteres morfológicos eficientes para a separação dos isolados em grupos, de acordo com a espécie a que pertencem;

d) confirmar a patogenicidade de isolados de *Cladosporium* spp., bem como quantificar a incidência e severidade da mancha foliar em duas cultivares de noqueira-pecã.

ARTIGO 1

FIRST REPORT OF SPECIES IN THE *Cladosporium cladosporioides* COMPLEX CAUSING PECAN LEAF SPOT IN BRAZIL

Journal of plant Pathology: Submetido

FIRST REPORT

From January to April 2014, sixteen pecan (*Carya illinoensis*) orchards in southern Brazil were surveyed to determine the causal agent of a small black circular leaf spot disease. Isolates were obtained by using potato dextrose agar (PDA) as an isolation medium. Forty isolates were identified on the basis of morphological features and sequence analysis of the translation elongation factor 1- α gene (Bensch et al., 2012). Morphological features and sequence homology confirmed the isolates to be either *Cladosporium cladosporioides*, *C. pseudocladosporioides* or *C. subuliforme*, all species included in the *C. cladosporioides* complex. On PDA, *C. cladosporioides* (2/1PR - GenBank accession No. KT991541) and *C. pseudocladosporioides* (11RS - KT991560) both produced colonies of greenish-gray pigmentation with velvety and floccose aerial mycelium, whereas *C. subuliforme* (16/2RS - KT995114) produced colonies with similar pigmentation but more abundant aerial mycelium. Isolates 2/1PR, 11RS and 16/2RS produced on average colonies that were 72.2, 68.1 and 74.6 mm in diameter, respectively; conidia were $5.1 \times 2.6 \mu\text{m}$, $5.7 \times 2.5 \mu\text{m}$ and $5.3 \times 2.9 \mu\text{m}$ in length; ramoconidia were $23.7 \times 4.2 \mu\text{m}$, $22.5 \times 2.8 \mu\text{m}$ and $16.0 \times 4.3 \mu\text{m}$ in length. To confirm pathogenicity, young detached leaflets were inoculated with twenty-six isolates. One-tenth ml of conidial suspension (1×10^6 conidia ml^{-1}) divided into six individual drops on each leaflet surface was applied with eight replicates. Leaflets receiving only sterile distilled water served as a non-inoculated control. Black leaf spots were observed after 22 days on all leaflets inoculated. The originally inoculated *Cladosporium* sp. species was re-isolated from inoculated leaflets. To our knowledge, this is the first report of *C. cladosporioides*, *C. pseudocladosporioides* and *C. subuliforme* causing pecan leaf spot in Brazil as well as in the world.

REFERENCES

Bensch K., Braun U, Groenewald J. Z., Crous P. W., 2012. The genus *Cladosporium*. *Studies in Mycology* 72:1-401.

ARTIGO 2

MORPHOLOGICAL AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF *Cladosporium cladosporioides* SPECIES COMPLEX CAUSING LEAF SPOT IN PECAN TREE

Genetics and Molecular Research: em preparação

ABSTRACT. The objective of this study was to characterize, through morphological and molecular characteristics, species of the *Cladosporium cladosporioides* complex isolated from pecan trees (*Carya illinoensis*) with symptoms of leaf spot. Morphological characterization was performed in monosporic cultures on Potato Dextrose Agar (PDA) medium which were assessed on mycelial growth, sporulation, culture colour, spore size and ramoconidia. The molecular characterization was carried out after isolation of DNA and amplification of the elongation factor region (TEF-1 α). Three species of the *Cladosporium cladosporioides* complex were identified: *C. cladosporioides*, *C. pseudocladosporioides* and *C. subuliforme*. Sporulation was the most important characteristic to differentiate species of the genus. However, morphological characteristics must be confronted with the molecular analysis because some characters are indistinguishable between species. The elongation factor region (TEF-1 α) is effective for identifying and grouping the isolates belonging to *C. cladosporioides* complex.

Key words: *Carya illinoensis*; TEF- 1 α ; phylogeny; scab; UPGMA.

INTRODUCTION

The pecan tree (*Carya illinoensis* [Wangenh.] K. Koch) belongs to the Juglandaceae family, considered the most important species of the genus *Carya*, which occurs naturally in North America. The fruits of the Pecan are harvested from native trees throughout its natural range, however, the culture have been extended considerably beyond that; from Ontario, Canada, to south Oaxaca, Mexico, and from the Atlantic coast of Virginia and western Carolina to California. In addition, the pecan is commercially produced in smaller areas in Israel, South Africa, Australia, Egypt, Peru, Argentina and Brazil (Thompson and Conner,

2012). In Brazil, almost all genetic material of *C. illinoensis* cultivars used in commercial orchards has originated from the US. According to MAPA (2015), 41 cultivars were registered by three companies located in Rio Grande do Sul state and within these, only two were developed in the country. An increasing number of areas with Pecan plantations has been observed, focusing mainly in the states of Rio Grande do Sul, Santa Catarina and Paraná (IBGE, 2015).

The Juglandaceae are monoecious plants, with androic flowers gathered in axillary and gynoecious flowers in erect terminal spikes; the drupaceous fruits have a husk that opens when it is ripe. The genera *Carya* and *Juglans* produce both edible nuts and valuable timber and are considered the best known genera in southern Brazil. *C. illinoensis* is considered a large tree (50m) with straight trunk (150 cm diameter), elliptical canopy and deciduous foliage, alternate odd pinnated leaves and with 9-17 leaflets each (Marchiori, 1997).

In Brazil, few studies have reported the occurrence of disease in pecan. However, pathogens in culture have recently been identified: *Fusarium* sp. species causing strangulation, and leaf necrosis associated with root rot (Lazarotto et al., 2014a) and *Pestalotiopsis* sp. species causing leaf spot (Lazarotto et al., 2014b).

The pecan scab caused by *Fusicladium effusum* G. Winter (syn. *Cladosporium caryigenum*) is considered the most important disease of pecan in southeastern United States and other humid regions located in eastern South Africa, southern Brazil and northeastern Mexico where the species is cultivated (Beck et al., 2005). Although some authors quote the occurrence of *F. effusum* causing scab in pecan in Brazil, in the literature there are no studies that genetically prove the existence of this pathogen in Brazilian environmental conditions. Regardless, in the **Article 1** the authors described the “First Report of species in the *Cladosporium cladosporioides* complex causing pecan leaf spot in Brazil”, namely *Cladosporium cladosporioides*, *C. pseudocladosporioides* and *C. subuliforme*.

Cladosporium sp. species have wide ecological distribution, occurring in all types of substrates and in a wide variety of hosts, surviving either biotrophically or necrotrophically, or even in senescence stages. Nevertheless, *C. herbarum*, *C. cladosporioides* and *C. oxysporum* do not seem to have major environmental preferences (Bensch et al., 2012).

Cladosporium cladosporioides is the most common saprophytic species of the genus, widely distributed around the world. It can survive on plant material in senescence, in fresh leaves as a secondary invader, and also can be isolated from air, soil, textiles and numerous other substrates (Ellis, 1971 cited by Bensch et al., 2012), considered as an endophytic fungus (Riesen e Sieber 1985 cited by Bensch et al., 2012). Despite being considered a saprophytic

fungus, however, there have been reported diseases such as leaf spot and scab caused by *C. cladosporioides*. Anilkumar and Seshadri (1975) observed in 1973 in Bangalore (India), the occurrence of the fungus causing leaf spot in sunflower (*Helianthus annuus* L.). Chen et al. (2009) first reported the occurrence of scab caused by *C. cladosporioides* in papaya (*Carica papaya*) in Taiwan.

Leaf spots caused by species of the genus *Cladosporium* have been observed in various cultures. Berner et al. (2007) reported the occurrence of *C. herbarum* in Greece in *Centaurea solstitialis* L. causing leaf spots of a light brown shade on the lower leaves and necrotic lesions along the stem. In *Syagrus oleracea*, Oliveira et al. (2014) verified the existence of leaf spots caused by *C. perangustum*. According to these authors, the first symptoms observed appeared as small, yellowish spots, soaked on young or mature leaves, which develop into brown necrotic streaks that run parallel to the leaf's ribs. In China, Zheng et al. (2014) observed leaf spots caused by *C. oxysporum* in *Solanum melongena* L. cultivated in a greenhouse.

Considering the information aforementioned, the objective of this study was to characterize, by both morphological and molecular characteristics, species from the *Cladosporium cladosporioides* complex responsible for causing leaf spot in pecan.

MATERIAL AND METHODS

The collections of plant material in pecan orchards, with symptoms of disease caused by *Cladosporium* spp., were held during the period of January-April 2014 in southern Brazil, in the states of Rio Grande do Sul (RS), Santa Catarina (SC) and Paraná (PR). The collection points were georeferenced with Global Positioning System (GPS), the information for which is presented in Table 1.

Table 1. Collection areas of *Cladosporium* spp. isolates from pecan tree (*Carya illinoensis*) orchards in Rio Grande do Sul (RS), Santa Catarina (SC) and Paraná (PR).

Area code	Number of isolates	Collection date	County/State	Coordinates (GMS)
1PR	1	Jan./14	Missal/PR	-25°04'50" S, -54°16'03" W
2PR	2	Jan./14	Toledo/PR	24°75'24" S, 53°66'45" W
3PR	1	Jan./14	Assis Chateaubriand/PR	-24°41'00" S, -53°52'13" W
4PR	1	Jan./14	Pato Branco/PR	-26°27'37" S, -52°60'34" W
12PR	8	Mar./14	Porto Amazonas/PR	-25°32'22" S, -49°54'29" W
6SC	1	Jan./14	Palmitos/SC	-27°12'00" S, -53°22'10" W
7SC	1	Jan./14	São João do Oeste/SC	-27°05'01" S, -53°58'37" W
8RS	1	Feb./14	Alegrete/RS	29°48'53" S, 55°49'15" W
9RS	1	Feb./14	Uruguaiana/RS	29°26'11" S, 56°41'05" W
10RS	1	Feb./14	Itaqui/RS	29°12'07" S, 56°29'34" W
11RS	1	Feb./14	São Borja/RS	-28°63'39" S, -55°84'83" W
13RS	4	Mar./14	Santa Maria (Pains)/RS	-29°45'25" S, -53°40'00" W
14RS	8	Mar./14	Santa Maria (Fepagro)/RS	-29°40'19" S, -53°54'35" W
15RS	3	Apr./14	Dilermando de Aguiar/RS	-29°47'52" S, -54°05'45" W
16RS	4	Apr./14	Cachoeira do Sul/RS	-30°00'20" S, -52°53'00" W
17RS	2	Apr./14	Cachoeira do Sul/RS	-30°00'16" S, -52°53'25" W

The collection of compound leaves of pecan, with typical symptoms of leaf spot caused by *Cladosporium* spp., was held from the east to the west in every orchard, removing two leaves in the lower and upper thirds of the crown, totalling eight leaves from each tree. In each area, 12 trees were sampled by the traversal walking method. The plant material collected in field was properly identified, packed in aluminium foil and plastic bags, and then packed in styrofoam boxes containing ice to maintain low temperature during transport to the laboratory. Subsequently, the material was transported to the Laboratório de Fitopatologia “Eloicy Minussi” of Departamento de Defesa Fitossanitária at the Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), for identification and isolation of pathogens. The isolation of *Cladosporium* spp. was conducted from necrotic lesions on pecan leaflets. Small spots of dark

brown to black colour were observed, verifying also other spots in whitish grey with a brown halo. Through the advancement of the disease, it was found that some lesions coalesce and the cracks formed by it will accompany the ribs (Figure 1).

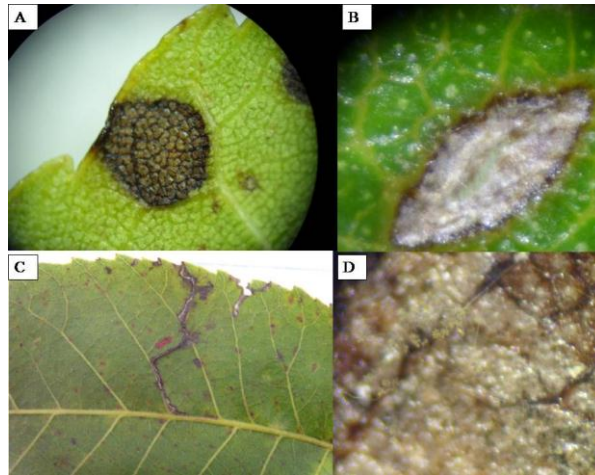


Figure 1 - Leaf spot symptoms caused by *Cladosporium* spp. in pecan (*Carya illinoensis*). A and B: appearance of lesions visualized in stereoscopic microscope; C: necrotic lesions that coalesce and break the leaf blade in the ribs direction; D: stereoscopic microscope view of necrotic lesions with presence of reproductive fungal structures. Fonte: Walker (2014).

To isolate the pathogens, first, the leaflets presenting disease symptoms were sterilized for 30 s with 70% ethanol, sodium hypochlorite (1%) and rinsed twice in distilled and autoclaved water. Afterwards, the material was placed on filter paper sheets for removal of excess moist and transferred to plastic gerbox boxes (previously sterilized) containing two sheets of pre-moistened filter paper. The boxes were kept in moist chamber and incubated at 25 °C on 12 h photoperiod for seven days. After this period, the lesions were observed in a stereoscopic microscope for the presence of pathogen signs and its isolation.

After the pathogen was isolated, the monosporic culture technique was performed, according to Fernandez (1993), for purification of the isolates, in which only one conidia was transferred to Potato Dextrose Agar (PDA) medium. Subsequently, the plates were transferred to incubation chamber at 24 °C in 12 h photoperiod for two weeks, then stored on the methods suggested by Castellani (Alfenas et al., 2007) and by spore suspension in silica gels kept in a freezer in the dark, as suggested by Clive H. Bock (personal communication, July 16, 2014).

For morphological characterization, all of the 40 isolates obtained were used. The experiment was performed using fungus mycelial disks of approximately 6 mm diameter, obtained from colonies after two weeks of growth on PDA medium. The disks were

transferred to Petri dishes containing PDA medium, which were maintained in an incubation chamber at 24 °C in 12 h photoperiod for a period of 20 days. Four replications were made for each isolate, each replicate consisting of a one plate. The mycelial growth of the isolates was evaluated daily through the average measurement of colony diameter in two diametrically opposite directions. To measure the concentration of the spore suspension 20 ml of distilled autoclaved water was added to each plate and the colonies were scraped with the aid of a Drigalski handle, subsequent filtering in a double layer of gauze. To estimate the spore concentration (conidia mL⁻¹) a Neubauer chamber was used. The evaluation of sporulation of the isolates was performed after 20 days. For the colour evaluation plates with 19 days of growth of the colonies were used, and the observation was made on both the top and reverse sides of the plate and set according to the colour scale on Munsell Soil Color Charts (2009). For assessing the size of conidia and ramoconidia slides were prepared and the measurement was performed by optic microscopy, coupled with a micrometer, at a magnitude of 40X. The width and length of 50 conidia and 15 ramoconidia were measured for each isolate.

The morphological characteristics were determined according to the methodology and classification key for the species *Cladosporium cladosporioides* complex proposed by Bensch et al. (2010). The isolates were transferred to Synthetischer Nährstoffarmer Agar (SNA) medium and incubated at 24 °C (12h photoperiod) for 7 to 9 days (Bensch et al., 2010) and afterwards the fungal structures were observed in optical microscope.

The 40 isolates were subjected to DNA isolation, according to the cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB) method described by Doyle and Doyle (1991) made from the mycelium produced in liquid medium (potato dextrose). The genomic DNA solutions obtained were submitted to Polymerase Chain Reaction (PCR) for amplification of the elongation factor region 1-alpha of rDNA using the primers EF-F (5'-GTYGTYATYGGYCACGTYGAYTC-3') (Souza et al., 2012) and Tef997R (5'-CAGTACCGGCRGCRATRATSAG-3') (Shoukouhi and Bissett, 2009).

The reaction included approximately 30 ng of DNA, 10X buffer, 2.5 µM of each dNTP, 20 nM of MgCl₂, 25 pmoles of each of the primers, 5 U of Taq polymerase and ultrapure water q.s.p. The reactions were performed on MJ Research thermocycler, INC. PTC - 100MT, under the following thermal conditions: 94 °C for 2 min, 30 cycles of 94 °C for 45 s, 55 °C for 30 s, 72 °C for 35 to 72 °C for 10 min. At the end of the reaction, the products were kept at 4 °C. A negative control without DNA was included in the PCR amplifications. The amplified fragments and the negative control were separated by agarose gel

electrophoresis to 1.2% in 1X TBE buffer containing ethidium bromide and visualized under ultraviolet light.

The PCR products were purified with 13% PEG 8000, and in sequencing reactions, oligonucleotides EF-F and Tef997R were used. The sequencing was performed at the Mega BACE 500 sequencer (Amersham). The sequenced fragments were analyzed using the BioEdit program (Hall, 1999). Afterwards, the obtained sequences were compared to the GenBank sequences of the species *Cladosporium cladosporioides* complex and the construction of the phylogenetic tree was performed. For construction of a phylogenetic tree, the nucleotide sequences obtained from different isolates underwent an alignment using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). The GenBank sequences showing the highest 'scores' were selected for phylogenetic analysis. The nucleotide sequences were aligned using the ClustalW algorithm and phylogenetic analysis was conducted using the "Neighbour-joining" method with 1000 replicates on the MEGA software version 4 (Tamura et al., 2007). The similarity of the nucleotide sequences of the isolates was calculated using the Basic Local Alignment Search Tool procedure - BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

Quantitative data of morphological characterization were subjected to multivariate analysis to cluster analysis using the GENES software (2009.7.0 version). A standardized Euclidean distance matrix (D2) was calculated as dissimilarity measure and used to cluster analysis by the "Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean" method - UPGMA (Cruz, 2008).

RESULTS

Morphological characteristics of *Cladosporium* spp. isolates were consistent with the published descriptions for the species of *Cladosporium cladosporioides* complex (Bensch et al., 2010). The mycelial growth had a fluctuation of 63.3 mm (observed on isolated 1PR) to 75.0 mm (16/16RS) after 19 days of incubation (Table 2). Within the same complex, the growth of *C. pseudocladosporioides* colonies reached 65 mm to 78 mm in diameter after 14 days in PDA medium, as described by the literature aforementioned. As for the characteristics of the aerial mycelium, only the isolate 16/2 RS presented abundant aerial mycelium, while the other ones showed sparse mycelium with flat growth. On the surface, the colonies showed greenish-grey to dark greenish-grey pigmentation, while the reverse of the plate was greenish-black (Table 2).

Sporulation ranged from 2.09×10^6 (6SC) to 68.63×10^6 spores per ml (14/ 9RS). The conidia varied in width from 2.4 to 2.9 μm and in length from 4.1 to 6.7 μm (Table 2); conidia vary in size and shape, ellipsoid or thin-walled limoniform shaped, formed in long, branched chains of pale colour olive-brown, most of them without a septum. Regarding ramoconidia, a width between 2.6 and 4.6 μm , and length from 12.5 to 23.6 μm was observed; ramoconidia with thin walls, similar coloring to the conidia, 0-1 septa (Table 2).

Table 2. Morphological characteristics of *Cladosporium* spp. isolates colonies from leaves of pecan (*Carya illinoensis*) after 19 days on incubation at 24 °C and photoperiod of 12 h, in Potato Dextrose Agar (PDA) medium.

(continua)

Isolates	Diameter (mm)	Sporulation (x10 ⁶ spores mL ⁻¹)	Conidia		Ramoconidia		Colony pigmentation on PDA (Munsell Soil Color Charts, 2009)	
			Width (µm)	Length (µm)	Width (µm)	Length (µm)	reverse	surface
1PR	63,30	41,47	2,75	5,50	3,17	13,50	greenish-black	greenish-gray
2/1PR	72,24	3,36	2,60	5,15	4,17	23,67	greenish-black	greenish-gray
2/2PR	69,52	26,27	2,50	5,30	3,00	13,67	greenish-black	greenish-gray
3PR	66,74	30,80	2,55	4,50	3,83	16,00	greenish-black	greenish-gray
4PR	72,87	13,93	2,65	5,85	3,83	15,17	greenish-black	greenish-gray
12/1PR	69,34	28,73	2,70	5,00	3,50	14,70	greenish-black	greenish-gray
12/8PR	71,60	58,93	2,65	4,95	4,17	15,33	greenish-black	dark greenish-gray
12/7PR	64,87	49,93	2,65	5,40	3,50	17,83	greenish-black	greenish-gray
12/18PR	67,47	25,43	2,60	4,90	3,17	16,33	greenish-black	greenish-gray
12/9PR	71,54	28,03	2,55	5,25	2,67	15,67	greenish-black	greenish-gray
12/14PR	70,04	41,07	2,80	5,20	4,17	16,33	greenish-black	greenish-gray
12/3PR	70,02	46,83	2,62	5,35	3,83	16,17	greenish-black	dark greenish-gray
12/6PR	67,82	56,50	2,77	5,30	4,17	17,33	greenish-black	greenish-gray
6SC	74,21	2,09	2,50	6,40	4,17	15,83	greenish-black	greenish-gray
7SC	73,00	6,84	2,70	6,05	3,00	15,67	greenish-black	greenish-gray
8RS	68,67	25,77	2,60	5,85	3,33	14,50	greenish-black	greenish-gray
9RS	68,70	39,63	2,60	4,85	3,17	13,50	greenish-black	dark greenish-gray
10RS	66,75	10,18	2,55	6,45	3,00	16,00	greenish-black	greenish-gray
11RS	68,17	38,67	2,55	5,75	2,83	22,50	greenish-black	greenish-gray
13/10RS	68,13	32,00	2,62	4,90	3,17	16,67	greenish-black	greenish-gray
13/1RS	68,39	2,97	2,47	6,70	3,33	14,17	greenish-black	greenish-gray
13/12RS	69,37	24,33	2,57	5,40	4,50	13,83	greenish-black	dark greenish-gray
13/34RS	73,70	51,10	2,52	5,50	4,00	16,17	greenish-black	greenish-gray

Isolates	Diameter (mm)	Sporulation ($\times 10^6$ spores mL^{-1})	Conidia		Ramoconidia		Colony pigmentation on PDA (Munsell Soil Color Charts, 2009)	
			Width (μm)	Length (μm)	Width (μm)	Length (μm)	reverse	surface
14/25RS	70,26	39,07	2,57	5,60	3,17	16,17	greenish-black	dark greenish-gray
14/5RS	72,40	41,80	2,55	5,00	3,33	14,50	greenish-black	dark greenish-gray
14/17RS	64,81	45,57	2,72	5,30	3,83	14,00	greenish-black	greenish-gray
14/8RS	71,28	66,50	2,75	5,75	4,00	15,00	greenish-black	greenish-gray
14/26RS	73,62	48,23	2,57	5,60	3,33	16,00	greenish-black	greenish-gray
14/10RS	69,15	41,63	2,57	6,00	2,83	12,50	greenish-black	greenish-gray
14/9RS	71,84	68,63	2,72	4,70	4,00	14,17	greenish-black	greenish-gray
14/21RS	74,38	30,50	2,67	4,10	3,17	16,50	greenish-black	greenish-gray
15/7RS	71,06	52,57	2,77	5,30	2,67	14,83	greenish-black	greenish-gray
15/23RS	67,39	63,33	2,60	4,45	4,17	13,33	greenish-black	greenish-gray
15/5RS	71,97	37,33	2,52	5,50	3,17	14,17	greenish-black	greenish-gray
16/16RS	75,06	7,28	2,62	5,20	3,33	14,83	greenish-black	greenish-gray
16/13RS	74,71	19,33	2,57	6,00	3,83	18,50	greenish-black	dark greenish-gray
16/2RS	74,69	2,22	2,90	5,35	4,33	16,00	greenish-black	greenish-gray
16/17RS	73,36	42,77	2,52	5,45	3,17	14,17	greenish-black	greenish-gray
17/2RS	73,58	60,93	2,52	5,20	3,83	13,33	greenish-black	greenish-gray
17/18RS	73,14	60,00	2,67	4,15	4,67	19,33	greenish-black	greenish-gray

The morphological features (mycelial growth, sporulation, width and length of conidia and ramoconidia) of *Cladosporium* spp. isolates were grouped according to similar characteristics and established characters that contributed more to the divergence. Through multivariate analysis, the relative contribution of characters for divergence was obtained, and sporulation was responsible for the most significant contribution, with 96.13%, while the mycelial growth was only 2.37%. About the remaining characters, the length and width of conidia contributed only 0.0024% and 0.0849%, respectively; and the width and length of ramoconidia 0.0741% and 1.3348%, respectively (Figure 2).

Through the analysis of the dendrogram formed by the Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA) method it can be observed that the isolates of *Cladosporium* spp. have formed five groups, when observed in the value 30% of dissimilarity. The group formed by isolates 6SC, 16/2RS, 7SC, 16/16RS, 13/1RS, 2/1PR and 10RS, presented 100% dissimilarity in relation to the other groups. This result shows that these isolates are genetically distinct in relation to the other groups formed. Moreover, the isolates genetically closer to each other were 6SC and 16/2RS, having only 3.42% dissimilarity. Among the isolates 14/5RS and 16/17RS, and also 2/2PR and 8RS, reduced dissimilarity was observed (3.95%) (Figure 2).

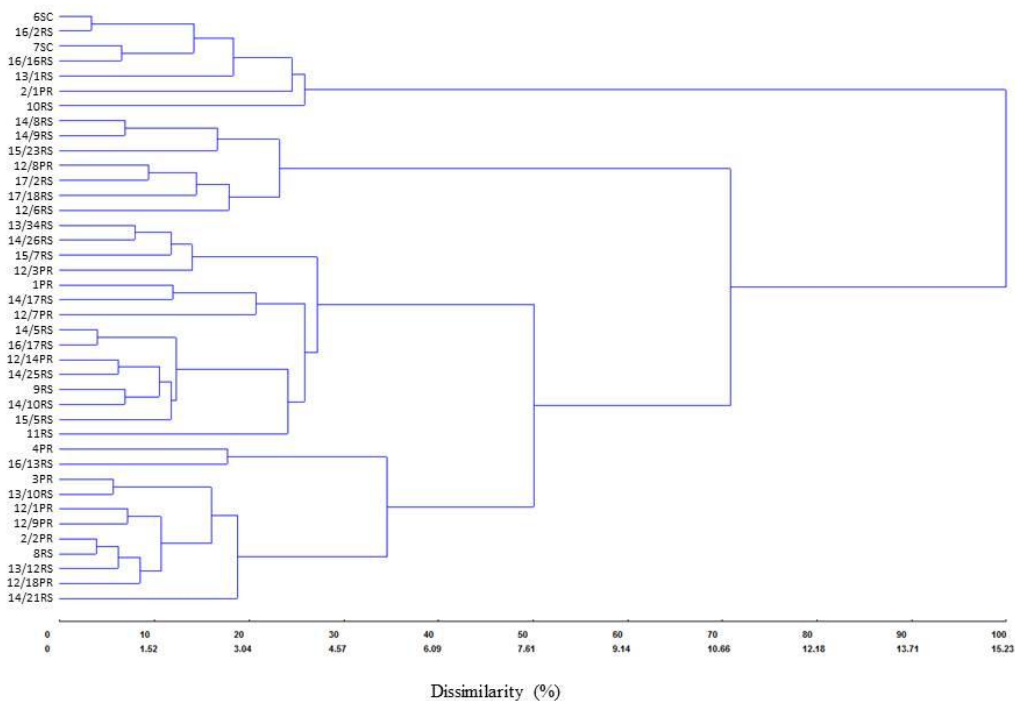


Figure 2 - Dendrogram of the estimations and its percentages of dissimilarity among 40 isolates of *Cladosporium* spp. isolated from pecan (*Carya illinoensis*). The dendrogram was obtained by the UPGMA technique based on the analysis of the distance on a Euclidean matrix, comprising six morphological characters (mycelial growth, sporulation, width and length of conidia and ramoconidia).

The phylogenetic dendrogram of the elongation factor region (TEF-1 α) was generated for the isolates obtained in this study, through the aligning of *Cladosporium* spp. isolates sequences with the same gene accesses in GenBank (Figure 3). The phylogenetic tree resulted from grouping genetically similar isolates, corroborating some results of the dendrogram generated from the morphological (Figure 2). Isolates 16/16RS, 7SC, 15/5RS, 14/5RS, 13/1RS, 11RS, 17/2RS, 16/17RS, 16/13RS, 14/25RS, 14/17RS, 13/34RS, 13/10RS, 10RS, 2/2PR and 6SC clustered in the same clade with other GenBank access for *Cladosporium pseudocladosporioides*, indicating high genetic similarity between these isolates. In addition, 8RS and 13/12RS also showed to be very similar to each other, grouping up on another clade that includes other access for *C. pseudocladosporioides* in GenBank.

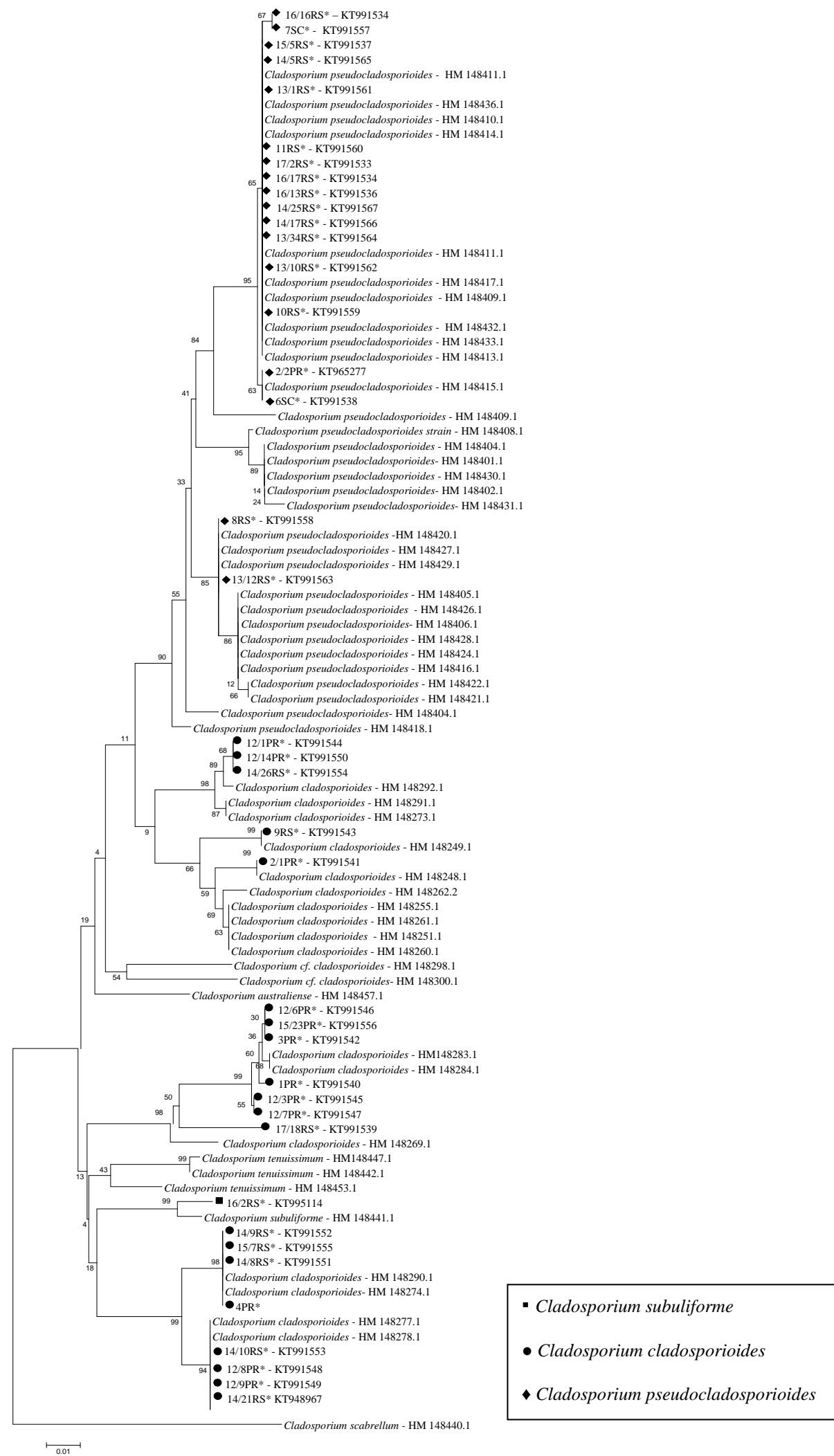


Figure 3 - Phylogenetic dendrogram based on Neighbor-joining method from the DNA sequences of the TEF-1 α region, based on 1000 bootstrap replicates. The numbers on the branches represent the number of bootstraps. * *Cladosporium* spp. isolates obtained in this study.

Other isolates (12/1PR, 12/14PR and 14/26 RS) presented genetic similarity to access of *Cladosporium cladosporioides* species deposited in GenBank (HM148292.1); the isolate 9RS with access HM148249.1; isolate 2/1PR with access HM148248.1; other isolates (12/6PR, 15/23RS, 3PR, 1PR, 12/3PR, 12/7PR and 17/18RS) were enrolled in a larger group and subdivided, being deeply genetically similar to each other; and also isolates 14/9RS, 15/7RS, 14/8RS, 4PR, 14/10RS, 12/8PR, 12/9PR and 14/21RS were framed in a larger group, subdividing into smaller groups, confirming a genetic similarity between these isolates of this study and GenBank accessions of the species *C. cladosporioides*. In the present study, only the isolated 16/2RS has been allocated in the phylogenetic dendrogram with *C. subuliforme* access in GenBank (HM148441.1).

Phylogenetic analysis allowed the distinction between isolates and confirmed that 21 isolates presented high genetic similarity with accesses on GenBank for species of *Cladosporium cladosporioides*, while 18 isolates have high genetic similarity with *C. pseudocladosporioides*. Only one isolate showed high genetic similarity with the species *C. subuliforme*.

DISCUSSION

In the present study the morphological characteristics of the *Cladosporium* spp. species, under similar conditions (culture medium, temperature), were similar to those reported in other studies. The observations corroborate those described for *C. cladosporioides*, *C. pseudocladosporioides* and *C. subuliforme*, in which colonies pigmentation on the surface had a grey-olivaceous and the reverse of the plate was olivaceous-black, and olivaceous-grey for the last specie. The morphological characteristics of these species are very similar to each other, making it difficult to distinguish them using only morphological characters. For example, *Cladosporium cladosporioides* has secondary ramoconidia more width and length to *C. pseudocladosporioides*, however both are phylogenetically aligned (Bensch et al., 2010).

Lazarotto et al. (2014b) found that the diameter of the colony was the character that most contributed to group genetically similar *Pestalotiopsis* spp. isolates occurring in pecan. The obtained result indicates that sporulation was responsible for the characteristic grouping of isolates in the dendrogram. However, morphological analysis has to be confronted with molecular analysis, as some characters are indistinguishable between species.

The key used to identify the species listed in *C. cladosporioides* complex (Bensch et al., 2010) did not allow the differentiation of *Cladosporium* spp. isolates only by morphological characteristics, being necessary to compare this data with the results of molecular phylogeny. Currently, studies for identification of fungal isolates seek to match morphological and molecular characteristics, thereby increasing the reliability of results. Lazarotto et al. (2014b), in a study about identification and characterization of pathogenic isolates of *Pestalotiopsis* in pecan, used morphological characters (mycelial growth, sporulation, colony pigmentation, and length and width of conidia) and identification by sequencing the Internal Transcribed Spacer (ITS) regions and β -tubulin.

To establish the identity and explain the taxonomy of species deposited in databases as *Cladosporium cladosporioides*, Bensch et al. (2010) re-examined these isolates from various substrates and geographic regions. For that, three regions of DNA were sequenced (ITS, actin, elongation factor 1- α) and supplemented with analysis of morphological characteristics, in order to clarify the diversity of species included in the *C. cladosporioides* complex. This complex includes species which are morphologically close to *C. cladosporioides*, but distinguishable due to a subtle combination of features, as well as some breeds and strains of *C. cladosporioides* which are morphologically indistinguishable but phylogenetically distinct as *C. pseudocladosporioides*.

The results indicated that the TEF-1 α region was effective for identifying and grouping the isolates. It should be noted that in a previous analysis with three isolates of *Cladosporium* spp., ITS region did not allow the identification of species. Braun et al. (2003) indicate that solely the ITS region is insufficient for molecular delimitation of *Cladosporium* species. Schubert et al. (2007) carried out molecular and morphological analysis of the *Cladosporium herbarum* complex and demonstrated that a multilocus DNA approach, based on five genes, rDNA ITS, actin, calmodulin, translation elongation factor 1- α and histone H3, resulted in a much better resolution, appropriate for species analysis.

The understanding of the genetic diversity of a pathogen population is critical for the planning of strategies in breeding programs for the production of resistant hosts, as reported by Bock et al. (2014) in the selection of germplasm resistant to scab. The apple scab, caused by *Venturia inaequalis*, was best characterized via knowledge of diversity in population levels among species of the Venturiaceae family. Thus, molecular studies have provided new insights into the epidemiology and possible treatment of the disease (Xu et al., 2013). In pecan, *Fusicladium effusum* has been shown to be genetically diverse across the southeastern US with little evidence for differentiation in population (Chen et al., 2014). Similarly, in the

present study, phylogenetic analysis was fundamental to verify similarity among isolates of *Cladosporium* spp. causing leaf spots in pecan, which will facilitate future studies related to pathogenicity.

Given these results, it should be noted that this is the first study of leaf spot disease in pecan in Brazil, and worldwide, caused by species of the *Cladosporium* genus included in the *C. cladosporioides* complex, and it was not found to *Fusicladium effusum* species (syn. *C. caryigenum*).

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES for granting the doctoral scholarship to the first author, and the CNPq for the PQ scholarship to MUNIZ, M.

REFERENCES

- Alfenas AC and Ferreira FA (2007). Inoculação de fungos fitopatogênicos. In: Métodos em fitopatologia (Alfenas AC and Mafia RG, eds.). Editora: UFV, Viçosa, 117-138.
- Anilkumar TB and Seshadri VS (1975). *Cladosporium* leaf spot of sunflower. *Current Science*. 44:722.
- Beck A, Ritschel A, Schubert K, Braun U, et al. (2005). Phylogenetic relationship of the anamorphic genus *Fusicladium* s. lat. as inferred by ITS data. *Mycol. Progress*. 4:111-116.
- Bensch K, Braun U, Groenewald JZ, Crous PW (2012). The genus *Cladosporium*. *Stud. Mycol.* 72:1-401.
- Bensch K, Groenewald JZ, Dijksterhuis J, Starink-Willemse M, et al. (2010). Species and ecological diversity within the *Cladosporium cladosporioides* complex (Davidiellaceae, Capnodiales). *Stud. Mycol.* 67:1-94.
- Berner DK, Smallwood EL, McMahon MB, Luster DG, et al. (2007). First report of leaf spot caused by *Cladosporium herbarum* on *Centaurea solstitialis* in Greece. *Plant Dis.* 91:463.
- Bock CH, Wood BW, Stevenson KL, Arias RS (2014). Genetic diversity and population structure of *Fusicladium effusum* on pecan in the United States. *Plant Dis.* 98:916-923.
- Braun U, Crous PW, Dugan F, Groenewald JZ et al. (2003) Phylogeny and taxonomy of *Cladosporium*-like hyphomycetes, including *Davidiella* gen. nov., the teleomorph of *Cladosporium* s. str. *Mycol. Prog.* 2:3-18.

- Chen C, Bock CH, Brannen PM, Adaskaveg JE, et al. (2014). Genetic variability among populations of *Fusicladium species* from different host trees and geographic locations in the USA. *Mycol. Prog.* 13:1179-1190.
- Chen RS, Wang WL, Li JC, Wang YY, et al. (2009). First report of papaya scab caused by *Cladosporium cladosporioides* in Taiwan. *Plant Dis.* 93: 426.
- Cruz CD (2008). Programa Genes: Diversidade Genética. Viçosa: Ed. UFV.
- Doyle JJ, Doyle JL (1991). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus.* 1:13-15.
- Fernandez MR (1993). Manual para laboratório de fitopatologia. Passo Fundo: Embrapa-CNPT.
- Hall TA (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium.*41:95- 98.
- IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Available at [<http://www.ibge.gov.br/estadosat/temas.php?sigla=rs&tema=lavourapermanente2013>]. Accessed August 22, 2015.
- Lazarotto M, Milanesi PM, Muniz MFB, Reiniger LRS, et al. (2014). Morphological and molecular characterization of *Fusarium* spp. pathogenic to pecan tree in Brazil. *Genet. Mol. Res.* 13:9390-9402.
- Lazarotto M, Bovolini MP, Muniz MFB, Harakawa R, et al. (2014). Identification and characterization of pathogenic *Pestalotiopsis* species to pecan tree in Brazil. *Pesq. Agropec. Bras.* 49:440-448.
- MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Available at [http://extranet.agricultura.gov.br/php/proton/cultivarweb/cultivares_registradas.php]. Accessed August 22, 2015.
- Marchiori JNC (1997). Dendrologia das Angiospermas: das Magnoliáceas às Flacourtiáceas. Editora da Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.
- Munsell Soil Color Charts (2009). Macbeth Division of Kollinorgen Instruments Corporation.
- Oliveira RR, Aguiar RL, Tessmann DJ, Nunes WMC, et al. (2014). First report of leaf spot caused by *Cladosporium perangustum* on *Syagrus oleracea* in Brazil. *Plant Dis.*98: 280.
- Schubert K, Groenewald JZ, Braun U, Dijksterhuis J, et al. (2007). Biodiversity in the *Cladosporium herbarum* complex (Davidiellaceae, Capnodiales), with standardisation of methods for *Cladosporium* taxonomy and diagnostics. *Stud.Mycol.* 58:105-156.
- Shoukouhi P, Bissett J. (2009). Preferred primers for sequencing the 5' end of the translation elongation factor 1-alpha gene (eEF1a1). ISTH . Available at [<http://www.isth.info/methods>].

Souza JI, Pires-Zottarelli CLA, Santos JF, Costa JP, et al. (2012). *Isomucor* (Mucoromycotina): a new genus from a Cerrado reserve in state of Sao Paulo, Brazil. *Mycologia*. 104:232-241.

Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007).MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24:1596-1599.

Thompson TE, Conner PJ. (2012). Pecan. In: Fruit Breeding, Handbook of Plant Breeding (Badenes ML, Byrne DH). 771-801.

Xu X, Harvey N, Roberts A, Barbara D (2013). Population variation of apple scab (*Venturia inaequalis*) within mixed orchards in the UK. *Eur. J. Plant Pathol.*135: 97-104.

Zheng C, Liu ZH, Tang SS, Lu D, et al. (2014). First report of leaf spot caused by *Cladosporium oxysporum* on greenhouse eggplant in China, *Plant Dis.* 98:566.

ARTIGO 3

REAÇÃO DE DUAS CULTIVARES DE NOGUEIRA-PECÃ A ESPÉCIES DO COMPLEXO *Cladosporium cladosporioides*

Pesquisa Agropecuária Brasileira: em preparação

Resumo - Estudos recentes observaram sintomas de mancha foliar em noqueira-pecã (*Carya illinoensis*) associados a espécies incluídas no complexo *Cladosporium cladosporioides* (*C. cladosporioides*, *C. pseudocladosporioides*, *C. subuliforme*). Por se tratar de espécies de *Cladosporium* sp. que ainda não haviam sido identificadas em noqueira-pecã, a nova doença passou a ser investigada. Portanto, este estudo teve o objetivo de testar a patogenicidade desses isolados de *Cladosporium* spp. em duas cultivares de noqueira-pecã. Foram utilizados 26 isolados para a inoculação com suspensão de esporos em folíolos das cultivares ‘Barton’ e ‘Shawnee’. A suspensão foi aplicada utilizando-se gotas na superfície dos folíolos, sendo o material mantido em caixas “gerbox” em sala de incubação. Aos 22 dias foram observadas manchas foliares com pequenas pontuações circulares de coloração marrom a preta, que se alongam com o avanço da doença. As três espécies de *Cladosporium* sp. foram patogênicas a noqueira-pecã e existe diferença de suscetibilidade entre as cultivares ‘Barton’ e ‘Shawnee’ para *C. pseudocladosporioides*, onde a ‘Shawnee’ apresenta maior severidade da doença. Além disso, a metodologia utilizada no ensaio apresenta padronização nas condições do ambiente testado e facilita os testes com um grande número de isolados e cultivares.

Termos para indexação: *Carya illinoensis*, suscetibilidade, inoculação, melhoramento genético. Sarna.

REACTION OF TWO PECAN CULTIVARS TO *Cladosporium cladosporioides* SPECIES COMPLEX

Abstract – Recent studies have observed symptoms of leaf spot in pecan (*Carya illinoensis*) associated with species included in the *Cladosporium cladosporioides* complex (*C. cladosporioides*, *C. pseudocladosporioides*, *C. subuliforme*). Because it is a species of *Cladosporium* sp. that had not yet been identified in pecan, the new disease began to be

investigated. Therefore, this study aimed to test the pathogenicity of these *Cladosporium* spp. isolated in two pecan cultivars. Twenty-six isolates were used for inoculation with a spore suspension of the leaflets cultivars 'Barton' and 'Shawnee'. The suspension was applied through drops on the surface of the leaflets, the material being kept in boxes "gerbox" in the incubation room. After 22 days there were observed leaf spots with small circular scores brown to black, which extend to the advancement of the disease. The three species of *Cladosporium* sp. were pathogenic to pecan and there is susceptibility difference between the 'Barton' and 'Shawnee' cultivars for *C. pseudocladosporioides* species, where 'Shawnee' has greater disease severity. Furthermore, the methodology used in the assay has standardization under the conditions of the test environment and facilitates, testing a large number of cultivars and isolated.

Index terms: *Carya illinoensis*, susceptibility, inoculation, breeding program, scab.

Introdução

A noqueira-pecã [*Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch], família Juglandaceae, é considerada, entre as 20 espécies do gênero *Carya*, a espécie nativa mais valorizada da América do Norte. A espécie, além de 13 espécies do gênero, é nativa dos Estados Unidos da América (EUA). Por outro lado, pomares formados por cultivares superiores, propagadas via clonagem, são mais produtivos e produzem nozes de qualidade superior em relação aos pomares nativos ou formados por propagação via sementes. Dessa maneira, os programas de melhoramento têm buscado materiais genéticos com maiores rendimentos e qualidade da noz, além de resistência a doenças e insetos (Thompson & Conner, 2012).

No Brasil, tem sido observado um aumento crescente de áreas com plantios de noqueira-pecã, concentrando-se principalmente, no estado do Rio Grande do Sul, em Santa Catarina e no Paraná (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2015). Apesar do aumento de área plantada, o melhoramento genético, visando à obtenção de cultivares resistentes a doenças e com características de fruto interessantes ao mercado, tem obtido pouca atenção, haja visto que, segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (2015), apenas duas cultivares de noqueira-pecã foram desenvolvidas no estado do Rio Grande do Sul, por uma empresa produtora de mudas e, no entanto, há 41 cultivares registradas por três empresas no mesmo estado. Praticamente todo o material genético das cultivares de *C. illinoensis* utilizadas nos pomares comerciais são provenientes dos EUA.

Segundo Payne (2011), dois programas de melhoramento da espécie estão em andamento, incluindo, na Universidade da Geórgia, o Colégio de Agricultura e Ciências Ambientais e no Departamento de Agricultura dos Estados Unidos, Serviços de Investigação Agrícola (USDA/ARS), localizado em Somerville e Brownwood (Texas). As progênies obtidas de cruzamentos são cultivadas e as características dos frutos avaliadas em relação à qualidade e resistência à sarna. Além disso, as árvores são selecionadas para características de vigor, resistência ao frio e maturação antecipada dos frutos. Assim, as progênies consideradas melhores em relação aos genitores podem ser lançadas como uma nova cultivar. No entanto, estas cultivares estão sendo testadas para o país de origem e não há muitas informações acerca da resistência destas nas condições climáticas e edáficas brasileiras.

Em relação às doenças que acometem a cultura, árvores de noqueira-pecã estão sujeitas ao ataque de várias espécies de fungos, bactérias e nematoides. A sarna causada pelo fungo *Fusicladium effusum* (sin. *Cladosporium caryigenum*) é a doença mais conhecida, no entanto, muitas outras doenças podem causar significantes perdas na produção (Johnson & Black, 2012). Recentemente, no Brasil, Lazarotto et al. (2014a) identificaram espécies de *Fusarium* sp. patogênicas à noqueira-pecã causando estrangulamento, apodrecimento radicular e necrose foliar associada à podridão radicular. A ocorrência de espécies de *Pestalotiopsis* sp. causando mancha foliar, também foi observada por Lazarotto et al. (2014b).

As manchas foliares ocasionadas por *Cladosporium* sp. em noqueira-pecã causam pequenas lesões em folhas, ramos e frutos, no entanto, as mesmas se expandem e coalescem causando sintomas que podem levar a desfolha, abortamento e perdas na qualidade dos frutos e, conseqüentemente, diminuição de produtividade.

Mesmo que cultivares resistentes à sarna estejam disponíveis e comumente plantadas, muitas delas necessitam de aplicações regulares de fungicidas (Turechek & Stevenson, 1998). No entanto, a utilização de cultivares resistentes constitui um dos mais importantes meios dentre as estratégias utilizadas para o controle de doenças, aplicável em largas áreas, além de possuir baixo impacto ambiental comparado aos agroquímicos (Camargo, 2011). Uma estratégia que pode ser utilizada é a incorporação de uma mistura de cultivares contendo diferentes genes de resistência dentro dos pomares. Assim, o desenvolvimento de novas cultivares com características silviculturais similares, porém com diferentes genes de resistência, podem facilitar a utilização dessa estratégia em pomares de noqueira-pecã (Conner & Stevenson, 2004).

A cultivar ‘Barton’ foi a primeira a ser lançada pelo USDA, resultado de um cruzamento entre ‘Moore’ e ‘Success’, realizado em 1937 por L. D. Romberg no pomar de

John Barton, em Uteley, Texas, enquanto que a cultivar ‘Shawnee’ foi selecionada a partir de um cruzamento entre ‘Schley’ x ‘Barton’ e lançada em 1968 pelo USDA (College of Agricultural and Environmental Sciences, 2015).

Em um trabalho realizado por Yates et al. (1996), os autores avaliaram 10 cultivares de noqueira-pecã quanto à suscetibilidade à sarna. As cultivares ‘Caddo’, ‘Choctaw’, ‘Desirable’ e ‘Farley’ foram mais suscetíveis na Louisiana, enquanto que ‘Curtis’ e ‘Stuart’ foram mais suscetíveis na Flórida. Dessa maneira, respostas variáveis entre as cultivares em regiões distintas podem ser devido a diferentes raças de *Cladosporium caryigenum*.

A desvantagem de métodos de avaliação a campo de germoplasmas resistentes à sarna da noqueira-pecã é a dependência de condições ambientais favoráveis para o desenvolvimento do patógeno (Conner, 2002). Para contornar as dificuldades em conduzir testes de resistência a campo, Yates et al. (1996) desenvolveram uma metodologia que emprega folhas destacadas para verificar cultivares resistentes à sarna da noqueira-pecã. Este método apresenta a vantagem de padronizar as condições do ambiente testado, em que a inoculação está sendo conduzida, facilitando a reprodutibilidade entre testes. Conner (2002) desenvolveu um protocolo modificado testando múltiplos isolados de *Cladosporium caryigenum* em folhas destacadas com avaliações do desenvolvimento do patógeno ao microscópio óptico. Essa metodologia foi eficiente para avaliar a resistência a raças específicas de sarna da noqueira-pecã. Em trabalho desenvolvido recentemente (**Artigo 1**), foram isoladas de manchas foliares de noqueira-pecã espécies do mesmo gênero (*C. cladosporioides*, *C. pseudocladosporioides*, *C. subuliforme*), porém, não comprovadas quanto a sua patogenicidade e resistência a cultivares. Assim, este estudo teve como objetivo testar a reação desses isolados de *Cladosporium* sp. em duas cultivares de noqueira-pecã.

Material e métodos

No período de janeiro a abril de 2014, realizou-se coleta de folhas com sintomas de mancha foliar causada por *Cladosporium* spp. em pomares de noqueira-pecã, nos estados do Rio Grande do Sul (RS), de Santa Catarina (SC) e do Paraná (PR). A seleção dos isolados para o teste de patogenicidade foi baseada na árvore filogenética construída com os 40 isolados de *Cladosporium*, identificados segundo sequenciamento do fator de alongação TEF-1 α (**Artigo 2, Figura 3**). Dentro de cada grupo formado nos clados, selecionou-se apenas um isolado, dentre eles: *Cladosporium pseudocladosporioides* (12 isolados), *C. cladosporioides* (13 isolados) e *C. subuliforme* (um isolado) (Tabela 1).

Tabela 1. Isolados de *Cladosporium* sp. obtidos de manchas foliares de nogueira-pecã, no sul do Brasil, selecionados para o teste de patogenicidade.

Isolado	Nº acesso GenBank ¹	Espécie	Data de coleta	Município/Estado
1PR	KT991540	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	jan/14	Missal - PR
2/1PR	KT991541	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	jan/14	Toledo - PR
2/2PR	KT965277	<i>Cladosporium pseudocladosporioides</i>	jan/14	Toledo - PR
3PR	KT991542	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	jan/14	Assis Chateaubriand - PR
4PR	KT991568	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	jan/14	Pato Branco - PR
12/7PR	KT991547	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	mar/14	Porto Amazonas - PR
12/14PR	KT991550	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	mar/14	Porto Amazonas - PR
12/8PR	KT991548	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	mar/14	Porto Amazonas - PR
6SC	KT991538	<i>Cladosporium pseudocladosporioides</i>	jan/14	Palmitos-SC
7SC	KT991557	<i>Cladosporium pseudocladosporioides</i>	jan/14	São João do Oeste - SC
8RS	KT991558	<i>Cladosporium pseudocladosporioides</i>	fev/14	Alegrete-RS
9RS	KT991543	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	fev/14	Uruguaiana -RS
10RS	KT991559	<i>Cladosporium pseudocladosporioides</i>	fev/14	Itaqui- RS
11RS	KT991560	<i>Cladosporium pseudocladosporioides</i>	fev/14	São Borja - RS
13/10RS	KT991562	<i>Cladosporium pseudocladosporioides</i>	mar/14	Santa Maria (Pains) - RS
13/12RS	KT991563	<i>Cladosporium pseudocladosporioides</i>	mar/14	Santa Maria (Pains) - RS
14/21RS	KT948967	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	mar/14	Santa Maria (Fepagro) - RS
14/25RS	KT991567	<i>Cladosporium pseudocladosporioides</i>	mar/14	Santa Maria (Fepagro) - RS
14/26RS	KT991554	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	mar/14	Santa Maria (Fepagro) - RS
15/5RS	KT991537	<i>Cladosporium pseudocladosporioides</i>	abr/14	Dilermando de Aguiar -RS
15/23RS	KT991556	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	abr/14	Dilermando de Aguiar -RS
15/7RS	KT991555	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	abr/14	Dilermando de Aguiar -RS
16/2RS	KT995114	<i>Cladosporium subuliforme</i>	abr/14	Cachoeira do Sul - RS
16/13RS	KT991536	<i>Cladosporium pseudocladosporioides</i>	abr/14	Cachoeira do Sul - RS
17/2RS	KT991533	<i>Cladosporium pseudocladosporioides</i>	abr/14	Cachoeira do Sul - RS
17/18RS	KT991539	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	abr/14	Cachoeira do Sul - RS

¹ Identificação das espécies de *Cladosporium* spp. através do sequenciamento da região do fator de alongação TEF-1 α .

Para confirmar a patogenicidade dos isolados, foi utilizado o método da folha destacada utilizado por Conner (2002), com modificações. Foram coletados folíolos da folha composta das cultivares ‘Barton’ e ‘Shawnee’, sem sintomas aparentes do ataque de fitopatógenos, obtidos de um pomar experimental com idade de três anos, localizado na Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária (FEPAGRO), coordenadas geográficas de 29° 40’ 19 S e 53° 54’ 35 W, município de Santa Maria, RS. Os folíolos foram desinfestados por 30 s com etanol a 70%, hipoclorito de sódio a 1% e, lavados por duas vezes em água destilada

e esterilizada. Posteriormente, o peciólolo foi envolvido com algodão umedecido e as folhas foram dispostas em caixas “gerbox” contendo duas folhas de papel filtro umedecidas. Sob cada folha destacada foram colocadas duas lâminas de vidro, a fim de evitar o contato direto com o papel filtro e conseqüentemente, o seu encharcamento e apodrecimento.

A suspensão de esporos para a inoculação foi obtida de colônias dos isolados de *Cladosporium* sp. que foram cultivadas em meio Batata Dextrose Agar (BDA) a 24 °C (fotoperíodo de 12 horas), após 10 dias de crescimento em câmara de incubação. Posteriormente, foi adicionada água destilada em cada placa e, com o auxílio da alça de Drigalski foi realizada a raspagem do micélio fúngico na superfície do meio, sendo a suspensão filtrada em uma dupla camada de gaze para um béquer. A contagem da concentração de esporos foi efetuada com o auxílio da câmara de Neubauer e a concentração de esporos ajustada para 1×10^6 esporos mL⁻¹. A suspensão foi aplicada utilizando 0,1 mL divididos em 6 gotas em cada superfície dos folíolos, mantidas em caixas “gerbox” em sala de incubação com temperatura de 25 °C ± 1 °C (fotoperíodo de 12 h). Aos 22 dias da instalação do teste, a incidência da doença foi avaliada para a presença e ausência de sintomas foliares e a severidade foi observada em cada folíolo, no local onde as gotas da suspensão de esporos foram aplicadas, anotando-se o número de lesões e transformando-as em porcentagem. Foi utilizada uma escala diagramática e atribuídas notas de 1 a 7, onde 1 = 0% (sem sintomas); 2 = 16,6% (uma gota com sintoma); 3 = 33,3% (duas gotas com sintoma); 4 = 50% (três gotas com sintoma); 5 = 66,6% (quatro gotas com sintoma); 6 = 83,3% (cinco gotas com sintoma); 7 = 100% (seis gotas com sintoma). Foi considerada resistente a cultivar que recebeu notas entre 1 e 4 e suscetíveis àquelas que obtiveram notas acima de 4. Após as avaliações, foi realizado o reisolamento dos patógenos para confirmar os Postulados de Koch.

Os testes de patogenicidade e reação de material genético, conduzidos simultaneamente, foram realizados em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial composto de dois fatores (3 espécies de *Cladosporium* spp. x 2 cultivares de noqueira-pecã). Utilizaram-se 8 repetições, sendo que cada folíolo representou uma unidade amostral. Os dados foram submetidos à análise de variância e a testes de comparação de médias pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro, através do programa estatístico Sisvar versão 5.3 (Ferreira, 2008).

Resultados e Discussão

Os sinais e o início dos sintomas de mancha foliar causada pela inoculação artificial de suspensão de esporos de isolados de *Cladosporium* sp. (*C. cladosporioides*, *C. pseudocladosporioides* e *C. subuliforme*) foram observados aos sete dias, aproximadamente. De acordo com estudos realizados por Conner (2002), o período adequado para a avaliação do desenvolvimento de lesões de *C. caryigenum* em folhas de noqueira-pecã foi de 21 dias. Diante desse resultado, no presente estudo, as avaliações foram realizadas aos 22 dias, quando foram observadas manchas foliares com pequenas pontuações circulares de coloração marrom a preta, que se alongam com o avanço da doença (Figura 1 – A, B e F).

Diferenças nos sintomas causados pelas três espécies inoculadas não foram verificadas. Cabe salientar que as espécies de *Cladosporium* spp. do presente estudo, patogênicas à noqueira-pecã, pertencem ao complexo *C. cladosporioides* e apresentam características morfológicas muito próximas, corroborando as descrições de Bensch et al. (2010). Até o presente estudo, essas espécies identificadas não haviam sido relatadas em noqueira-pecã no Brasil, nem em qualquer outro local do mundo onde a espécie é cultivada.

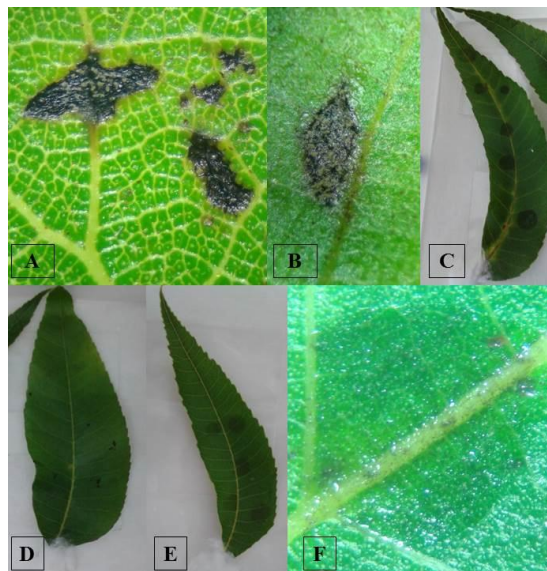


Figura 1 - Sintomas típicos de mancha foliar induzidos por meio de inoculação artificial de isolados de *Cladosporium* sp. em cultivares de noqueira-pecã. (A, B e F) Observações por meio do microscópio estereoscópico mostrando lesões escuras de coloração marrom a preta com presença de sinais do patógeno; (C, D e E) Sintomas observados visualmente; (A) Isolado 16/13RS (*C. pseudocladosporioides*) na cultivar ‘Shawnee’; (B) Isolado 12/8PR (*C. cladosporioides*) na cultivar ‘Barton’; (C) Isolado 16/2RS (*C. subuliforme*) na cultivar ‘Shawnee’; (D) Isolado 16/13RS (*C. pseudocladosporioides*) na cultivar ‘Shawnee’; (E) Isolado 12/7PR (*C. cladosporioides*) na cultivar ‘Barton’; (F) Isolado 16/2RS (*C. subuliforme*) na cultivar ‘Shawnee’. Fonte: Walker (2015).

Manchas foliares já foram reportadas na Índia em *Helianthus annuus* L. causadas por *C. cladosporioides* (Anilkumar & Seshadri, 1975), além de outras espécies do mesmo gênero relatadas causando manchas foliares em outros hospedeiros, dentre elas: *C. herbarum* em *Centaurea solstitialis* L., na Grécia (Berner et al., 2007); *C. perangustum* em *Syagrus oleracea*, uma espécie de palmeira do Brasil central (Oliveira et al., 2014) e *C. oxysporum* em *Solanum melongena* L., na China (Zheng et al., 2014). Dentro do mesmo gênero, *C. caryigenum* (Sin. *Fusicladium effusum*) é relatado em diversos trabalhos como o patógeno responsável por causar sarna em noqueira-pecã (Bock et al., 2014; Gottwald, 1982; Demaree, 1924).

As três espécies de *Cladosporium* sp. inoculadas (*C. cladosporioides*, *C. pseudocladosporioides* e *C. subuliforme*) foram patogênicos nas cultivares ‘Barton’ e ‘Shawnee’, constatando-se diferenças significativas em relação à testemunha (sem inoculação do patógeno) (Tabela 2). Quando avaliadas apenas as três espécies de *Cladosporium* spp. inoculadas na cultivar ‘Barton’, conforme a escala de notas utilizada, a média variou de 4.9 a 5.5 (grau de severidade da doença de 50 a 66.6%), não apresentando diferenças significativas entre as espécies, no entanto, com diferenças em relação à testemunha. Dessa maneira, a cultivar ‘Barton’ foi considerada suscetível (nota de severidade acima de 4) à mancha foliar. Resultados semelhantes foram observados na cultivar ‘Shawnee’, onde foram verificadas notas de severidade entre 5,1 a 5,8 entre as espécies de *Cladosporium* spp. inoculadas, sem diferenças significativas entre as mesmas. Assim, da mesma forma como ocorreu para a cultivar ‘Barton’, a cultivar ‘Shawnee’ também foi considerada suscetível à mancha foliar.

Tabela 2. Valores médios de notas de severidade de mancha foliar induzida por inoculação artificial de espécies de *Cladosporium* spp. em folhas destacadas de noqueira-pecã nas cultivares ‘Barton’ e ‘Shawnee’.

Espécie	Cultivar	
	‘Barton’	‘Shawnee’
<i>Cladosporium pseudocladosporioides</i>	4,9* Ab**	5,4 Bb
<i>Cladosporium subuliforme</i>	5,1 Ab	5,8 Ab
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	5,5 Ab	5,1 Ab
Testemunha	1,0 Aa	1,0 Aa
	C.V. (%)	16,63

*Notas de severidade 1 = 0 lesões; 2 = 1 lesão; 3 = 2 lesões; 4 = 3 lesões; 5 = 4 lesões; 6 = 5 lesões; 7 = 6 lesões.

** médias seguidas de letras diferentes minúsculas na coluna e maiúsculas na linha diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. C.V.(%) = coeficiente de variação.

Em relação as notas de severidade (Tabela 2) constatou-se interação dos fatores espécies de *Cladosporium* spp. e cultivares de noqueira-pecã. Quando inoculada a espécie *C. pseudocladosporioides*, verificou-se efeito significativo entre as cultivares, ocasionando um maior grau de severidade da doença na cultivar ‘Shawnee’ (média de nota de 5,4) em relação a cultivar ‘Barton’ (média de nota de 4,9). Assim, a espécie *C. pseudocladosporioides* mostrou-se mais virulenta na cultivar ‘Shawnee’, quando comparada com a ‘Barton’. No entanto, as duas cultivares se mostraram suscetíveis à doença, pois apresentaram valores médios de notas de severidade acima de 4. Demaree (1924) já havia relatado uma ampla variação do grau de suscetibilidade entre as diferentes cultivares de noqueira-pecã à sarna. Por outro lado, outras cultivares são altamente resistentes, podendo ser consideradas imunes. Dessa maneira, é provável que exista também uma variação na suscetibilidade das cultivares em relação à mancha foliar, objeto do presente estudo, com as espécies incluídas no complexo *C. cladosporioides*.

Goff et al. (2003) verificaram em um estudo a campo, durante cinco anos, que a cultivar ‘Barton’ não teve incidência de sarna causada por *C. caryigenum*, sendo considerada pelos autores uma cultivar resistente. Da mesma maneira, Conner (2004) examinou a campo a resistência de 19 cultivares de noqueira-pecã contra 12 isolados de *C. caryigenum* e verificou que todas as cultivares apresentaram diferenças de suscetibilidade aos isolados. ‘Barton’, ‘Curtis’ e ‘Summer’ foram resistentes para a maioria dos isolados, no entanto ‘Wichita’ e ‘Schley’ foram suscetíveis para grande parte dos isolados.

Conner & Stevenson (2004) relataram que a presença de um grande número de raças de *Cladosporium* sp. que causam a sarna em noqueira-pecã tem demonstrado que a maioria das cultivares, mesmo aquelas consideradas altamente suscetíveis, apresentam resistência a múltiplas raças desse patógeno.

A realização de um *screening* em outras cultivares de noqueira-pecã é importante para verificar a suscetibilidade desses materiais em relação à mancha foliar causada pelos isolados de *Cladosporium* sp. avaliados no presente estudo. A metodologia utilizada no teste de patogenicidade apresenta padronização nas condições do ambiente testado e facilita os testes com um grande número de isolados e cultivares.

Conclusão

1. *Cladosporium cladosporioides*, *C. pseudocladosporioides* e *C. subuliforme* são patogênicas a noqueira-pecã, causando mancha foliar.

2. As duas cultivares de noqueira-pecã são suscetíveis à mancha foliar para as três espécies de *Cladosporium* sp. testadas e existe diferença de suscetibilidade para *C. pseudocladosporioides*, onde a ‘Shawnee’ apresenta maior severidade da doença em relação a ‘Barton’.

Agradecimentos

À coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela bolsa concedida e ao CNPq pela Bolsa de Produtividade em pesquisa (PQ) para Marlove Muniz.

Referências

ANILKUMAR, T. B.; SESHADRI, V. S. *Cladosporium* leaf spot of sunflower. **Current Science**, v. 44, p. 722, 1975.

BENSCH, K.; GROENEWALD, J. Z.; DIJKSTERHUIS, J.; STARINK-WILLEMSE, M.; ANDERSEN, B.; SUMMERELL, B. A.; SHIN, H. D.; SCHROERS, H. J.; BRAUN, U.; CROUS, P. W. Species and ecological diversity within the *Cladosporium cladosporioides* complex (Davidiellaceae, Capnodiales). **Studies in Mycology**, v. 67, p. 1-94, 2010.

BERNER, D. K.; SMALLWOOD, E. L.; MCMAHON, M. B.; LUSTER, D. G.; KASHEFI, J. First report of leaf spot caused by *Cladosporium herbarum* on *Centaurea solstitialis* in greece. **Plant Disease**, v. 91, p. 463, 2007.

BOCK, C. H., WOOD, B. W., STEVENSON, K. L., ARIAS, R. S. Genetic diversity and population structure of *Fusicladium effusum* on pecan in the United States. **Plant Disease**, v. 98, n. 7, p. 916-923, 2014.

CAMARGO, L. E. A. Controle genético. In: AMORIM, L. et al. **Manual de Fitopatologia**. 4. ed. Piracicaba: Agronômica Ceres, 2011. p. 325-341.

CONNER, P. J.; STEVENSON, K. L. Pathogenic variation of *Cladosporium caryigenum* isolates and corresponding differential resistance in pecan. **Hortscience**, v. 39, p. 553-557, 2004.

CONNER, P. J. A detached leaf technique for studying race-specific resistance to *Cladosporium caryigenum* in pecan. **Journal of the American Society of Horticultural Science**, v. 127, p. 781-785, 2002.

DEMAREE, J. B. Pecan scab with special reference to sources or the early spring infections. **Journal of Agricultural Research**, v. 38, p. 321-333, 1924.

FERREIRA, D.F. SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. **Revista Symposium**, v. 6, p. 36-41, 2008.

GOFF, W. D.; NESBITT, M. L.; BROWNE, C. L. Incidence of scab and foliage condition on pecan cultivars grown without fungicide or insecticide sprays in a humid region. **HortTechnology**, v. 13, p. 381-384, 2003.

GOTTWALD, T. R. Taxonomy of the pecan scab fungus *Cladosporium caryigenum*. **Mycologia**, v. 74, p. 382-390, 1982.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Lavoura permanente**. 2015. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/estadosat/temas.php?sigla=rs&tema=lavourapermanente2013>. Acesso em 22 de agosto de 2015.

LAZAROTTO, M.; MILANESI, P. M.; MUNIZ, M. F. B.; REINIGER, L. R. S.; BELTRAME, R.; HARAKAWA, R. Morphological and molecular characterization of *Fusarium* spp. pathogenic to pecan tree in Brazil. **Genetics and Molecular Research**, v. 13, p. 9390-9402, 2014a.

LAZAROTTO, M.; BOVOLINI, M. P.; MUNIZ, M. F. B.; HARAKAWA, R.; REINIGER, L. R. S.; SANTOS, A. F. Identification and characterization of pathogenic *Pestalotiopsis* species to pecan tree in Brazil. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 49, p. 440-448, 2014b.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Registro Nacional de Cultivares**. 2015. Disponível em: http://extranet.agricultura.gov.br/php/proton/cultivarweb/cultivares_registradas.php. Acesso em 22 de agosto de 2015.

OLIVEIRA, R. R.; AGUIAR, R. L.; TESSMANN, D. J.; NUNES, W. M. C.; SANTOS, A. F.; VIDA, J. B. First report of leaf spot caused by *Cladosporium perangustum* on *Syagrus oleracea* in Brazil, **Plant Disease**, v. 98, p. 280, 2014.

PAYNE, A. **Evaluation of pecan scab disease management strategies to improve orchard production and reduce pesticide inputs**. 2011. 118p. Master of Science - Faculty of the Graduate College of the Oklahoma State University, Oklahoma.

STEIN, L. A.; McEACHERN, G. R.; NESBITT, M. L. (Eds.). Texas pecan handbook. In: JOHNSON, J. D.; BLACK, M. C. **Pecan disease identification and control**, p. 128-138, 2012.

THOMPSON, T. E.; CONNER, P. J. Pecan. In: BADENES, M. L.; BYRNE, D. H. **Fruit Breeding, Handbook of Plant Breeding**, p. 771-801, 2012.

TURECHEK, W. W.; STEVENSON, K. L. Effects of host resistance, temperature, leaf wetness, and leaf age on infection and lesion development of pecan scab. **Phytopathology**, v. 88, p. 1294-1301, 1998.

YATES, I. E et al. Developing the pecan scab fungus on susceptible and resistant host and nonhost leaves. **Journal of American of Society for Horticultural Scienc**, v. 121, p. 350-357, 1996.

ZHENG, C.; LIU, Z. H.; TANG, S. S.; LU, D.; HUANG, X. Y. First report of leaf spot caused by *Cladosporium oxysporum* on greenhouse eggplant in China, **Plant Disease**, v. 98, p. 566, 2014.

DISCUSSÃO

De acordo com a proposta inicial deste estudo, buscou-se o isolamento do patógeno responsável pela doença conhecida como sarna da noqueira-pecã causada por *Cladosporium caryigenum*. A taxonomia do fungo passou por diversas mudanças nas últimas décadas e o organismo foi renomeado como *Fusicladium effusum* (BECK et al., 2005). Segundo Demaree (1924), a sarna é a doença mais importante da noqueira-pecã no sudeste dos Estados Unidos e outras regiões úmidas localizadas no leste da África do Sul, sul do Brasil e nordeste do México onde a espécie é cultivada. Ortiz e Camargo (2005) também relataram no Brasil, na mesma cultura, a ocorrência de sarna ocasionada por *C. caryigenum*. No entanto, na literatura não existe comprovação por técnicas/ferramentas moleculares da ocorrência dessa doença no Brasil. Dessa maneira, no presente estudo, inicialmente buscaram-se informações relacionadas ao fungo *F. effusum* (Sin. *C. caryigenum*).

Assim, no projeto inicial, foi previsto o sequenciamento da região *Internal Transcribed Spacers* (ITS) do rDNA, pois na literatura consultada, essa região é uma das utilizadas para identificação e realização de estudos de relação filogenética da espécie *F. effusum*. Schanabel et al. (1999) realizaram um estudo com espécies do gênero *Venturia*, a maioria das quais são patógenos que atacam frutos e folhas de importantes árvores frutíferas. Dentre elas, *V. inaequalis*, patógeno responsável por causar sarna em maçã. Em uma análise filogenética, os autores compararam sequências das regiões ITS1 e ITS2 do rDNA das seguintes espécies: *Cladosporium caryigenum*, *V. asperata*, *V. carpophila*, *V. cerasi*, *V. inaequalis*, *V. nashicola* e *V. pyrina*. Espécies incluídas na família Venturiaceae têm como anamorfo *Cladosporium* sp., contudo, *C. caryigenum* foi separado filogeneticamente das espécies de *Venturia* spp. baseado na análise das sequências da região ITS.

Contudo, Beck et al. (2005) analisaram filogeneticamente, utilizando sequências da região ITS do nrDNA, o gênero *Fusicladium* (incluindo *Pollaccia* e *Spilocaea*). Nesse estudo, os sinônimos *C. caryigenum* e *F. effusum* formaram um grupo monofilético, com suporte de altos valores de *bootstrap*. Baseado no cladograma formado, *F. effusum* foi considerado membro da família Venturiaceae e, de acordo com os autores, o fungo não possui seu teleomorfo conhecido. As informações na literatura sobre a existência do teleomorfo de *F. effusum* são escassas e muitos autores relatam que a fase sexual do fungo é desconhecida. No entanto, em um estudo recente, Seyran et al. (2010) realizaram o sequenciamento de uma

região conservada do gene citocromo b de *F. effusum* utilizando o método de máxima parcimônia na construção da árvore filogenética baseado nas sequências de nucleotídeos, *F. effusum* e *Venturia inaequalis* foram alocadas no mesmo clado do dendrograma e obtiveram 92% no valor de *bootstrap*.

Para esclarecer a diversidade de espécies incluídas no complexo *Cladosporium cladosporioides*, Bensch et al. (2010), utilizaram três regiões do DNA (ITS, actina e fator de alongação TEF-1 α), suplementadas com características morfológicas e culturais. Posteriormente, Bensch et al. (2012) em uma revisão do gênero *Cladosporium* utilizaram as mesmas regiões do DNA, incluindo um panorama histórico detalhado de *Cladosporium* sp. aliado ao gênero, com notas de sua filogenia, sistemática e ecologia.

Através da bibliografia mencionada anteriormente, verificou-se que, para o gênero *Cladosporium*, as regiões utilizadas para o sequenciamento são ITS, actina, fator de alongação (TEF-1 α), histona e calmodulina. A partir dessas informações, optou-se por sequenciar apenas duas regiões do DNA, buscando-se resultados confiáveis e menores custos de análises. Diante do exposto, foi realizado, inicialmente, a amplificação da região ITS do rDNA e do gene do fator de alongação (TEF-1 α) por PCR para apenas três isolados, após sequenciamento e comparação com sequências depositadas no *GenBank*. De acordo com o dendrograma filogenético formado, os resultados mostraram que a região ITS não possibilitou a identificação e separação desses isolados em nível de espécie.

A partir da análise do dendrograma filogenético da região do fator de alongação (TEF-1 α), foi possível a identificação dos isolados. Assim, essa região do DNA permitiu a identificação e distinção entre as espécies do presente estudo, apresentando similaridade genética com alguns acessos do *Genbank* com as espécies *C. cladosporioides* e *C. pseudocladosporioides*. Dessa maneira, a partir desse resultado e indicação pessoal (Ricardo Harakava, Instituto Biológico de São Paulo), a região do fator de alongação (TEF-1 α) seria suficiente para a identificação dos demais isolados. Além disso, os custos de extração e sequenciamento de DNA poderiam impossibilitar a realização dessa análise para os 40 isolados e com a utilização de mais regiões do DNA.

Assim, após o sequenciamento dos 40 isolados foi construído o dendrograma filogenético, o qual possibilitou a identificação das espécies. Os valores de *bootstrap* demonstraram resultados confiáveis de proximidade genética entre os isolados de *Cladosporium* sp. do presente estudo com acessos do *Genbank*. No **artigo 2**, verificou-se que o resultado da análise filogenética permitiu a identificação dos isolados como pertencentes ao complexo *Cladosporium cladosporioides*, confirmando 21 isolados com alta similaridade

genética com os acessos do *Genbank* das espécies *Cladosporium cladosporioides*, enquanto 18 isolados com *C. pseudocladosporioides* e, apenas um isolado, com a espécie *C. subuliforme*. Diante desses resultados, nesse estudo não foi observada a espécie *C. caryigenum* causando sarna em pomares de noqueira-pecã da região sul do Brasil. Sendo assim, esse trabalho aponta a necessidade de pesquisa em outros pomares de noqueira-pecã para investigar se *C. caryigenum* realmente ocorre em outras regiões no país.

A caracterização morfológica dos isolados corroborou com as descrições das espécies do complexo *C. cladosporioides* descritas por Bensch et al. (2010), conforme foi demonstrado no **artigo 2**. Entretanto, a identificação dos isolados utilizando apenas a chave de identificação para espécies do complexo *C. cladosporioides* proposta por Bensch et al. (2010) não permitiu a identificação dos isolados. As características morfológicas das três espécies identificadas (Apêndice B) na análise de filogenia molecular são muito semelhantes e algumas características são indistinguíveis. Por exemplo, a dificuldade de se obter a estrutura completa do fungo e diferenciar ramoconídios primários dos secundários para obter as medidas de largura e comprimento; obter o número e as medidas dos conídios terminais da cadeia; além de outras características. Assim, foi necessário confrontar a caracterização morfológica com a caracterização molecular.

O dendrograma formado pelo método de agrupamento *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean* (UPGMA) construído com os caracteres morfológicos (crescimento micelial, esporulação, largura e comprimento de conídios e ramoconídios) dos isolados de *Cladosporium* spp. permitiu o agrupamento dos isolados com características similares (**artigo 2**). O resultado da análise multivariada demonstrou que a característica que mais contribuiu para a divergência dos isolados foi a esporulação, sendo responsável por 96,13%.

Além disso, no **artigo 2** o dendrograma filogenético construído, a partir de sequências de DNA da região do fator de alongação (TEF-1 α), permitiu fazer uma análise da diversidade e variabilidade genética de espécies de *Cladosporium* sp. nas áreas de coleta. Por exemplo, na área localizada em Cachoeira do Sul – RS, ocorreram as três espécies de *Cladosporium* spp., indicando alta diversidade de espécies. Da mesma maneira, na área localizada na Fepagro em Santa Maria – RS, dos oito isolados, três pertencem à espécie *C. pseudocladosporioides* e cinco, à espécie *C. cladosporioides*. Porém, na área localizada em Porto Amazonas – PR, não ocorreu variabilidade de espécies, haja visto que, todos os isolados coletados pertencem à espécie *C. cladosporioides*. Além disso, dentro da mesma área de coleta, alguns isolados da mesma espécie apresentaram variabilidade genética, pois foram alocadas em diferentes clados

no dendrograma. Por exemplo, os isolados da área de Porto Amazonas – PR, pertencentes à espécie *C. cladosporioides* apresentaram alta variabilidade genética, pois no dendrograma filogenético foram encontrados em clados diferentes, indicando que existe uma certa distância genética entre eles. Esse resultado é muito importante para o manejo da doença, pois o desenvolvimento de estratégias de controle de doenças de plantas é baseado no conhecimento da variabilidade das populações de fitopatógenos (MILGROOM, 2001). Além disso, a ampla variabilidade genética inter e intra-específica do hospedeiro quanto à resistência à doença possibilita a seleção e o plantio de genótipos resistentes e, estudos sobre herança e base genética da resistência são essenciais para os programas de melhoramento genético, visando a obtenção de plantas resistentes (ALFENAS et al., 2004).

Neste estudo foi confirmada a existência de diversidade e variabilidade genética dos isolados de *Cladosporium* sp. e, do ponto de vista prático, esta informação é importante para a avaliação de genótipos de noqueira-pecã em programas de melhoramento genético de cultivares resistentes na região sul do Brasil. Assim, a detecção de isolados mais agressivos poderão ser utilizados na seleção e para o melhor discernimento entre genótipos resistentes e suscetíveis. Parlevliet (1993) afirma que os efeitos do patógeno sobre o hospedeiro, ou seja, as lesões causadas pelo patógeno podem ser observadas em avaliações de resistência de uma cultivar à determinada doença.

Dessa maneira, a partir dos resultados apresentados no **artigo 2**, em que a investigação da variabilidade genética de isolados de *Cladosporium* sp. nas regiões estudadas no presente estudo, possibilitou selecionar alguns isolados e testar a sua agressividade em duas cultivares de noqueira-pecã ('Barton' e 'Shawnee'), sendo os resultados apresentados no **artigo 3**. A cultivar 'Barton' foi selecionada para os testes por ser considerada resistente à sarna e a cultivar 'Shawnee' por ser suscetível. Os isolados utilizados no teste de patogenicidade foram selecionados a partir do dendrograma filogenético e da análise das espécies nos clados, buscando representar a variabilidade existente entre os isolados de *Cladosporium* sp. (**artigo 2**).

Em relação aos testes de patogenicidade, na literatura não foram observados estudos de patogenicidade de *Cladosporium* sp. em mudas de noqueira-pecã, pois nos Estados Unidos e em outros países esses trabalhos são realizados a campo. No presente estudo, a realização de um teste a campo não seria possível devido à inexistência de uma área disponível para essa pesquisa. Além disso, um teste de patogenicidade em mudas enxertadas também se tornaria inviável, dado a necessidade de um grande número de mudas e seu alto preço. No entanto, o presente trabalho foi baseado em testes de patogenicidade utilizando outra metodologia de

inoculação, baseado no trabalho de Conner (2002), em que o autor utilizou a técnica de folhas destacadas para testar a resistência de raças específicas de *C. caryigenum* em noqueira-pecã. Posteriormente, Mantz et al. (2009) também utilizaram a mesma metodologia, com algumas modificações, em folhas destacadas de noqueira-pecã para testar a patogenicidade de *C. caryigenum*.

Os resultados do teste de patogenicidade discutidos no **artigo 3** revelaram que os 26 isolados testados foram patogênicos, apresentando diferentes graus de severidade, tanto na cultivar ‘Barton’ como na ‘Shawnee’, resultando em manchas foliares com pequenas pontuações circulares de coloração marrom a preta, que se alongam com o avanço da doença. Quando avaliada a severidade da doença entre as cultivares, verificou-se que a ‘Barton’ e a ‘Shawnee’ são suscetíveis à mancha foliar. No entanto, quando inoculada a espécie *C. pseudocladosporioides*, a ‘Shawnee’ apresentou maior grau de severidade da doença em relação à ‘Barton’.

Os resultados do teste de patogenicidade confirmaram que a metodologia de folhas destacadas em noqueira-pecã é eficiente, pois além da possibilidade de utilização de um grande número de isolados e cultivares, o teste padroniza as condições de incubação, uma vez que é realizado sob condições controladas em laboratório. Ainda, a redução nos custos de instalação dos testes é considerada muito inferior aos testes com mudas e no campo.

Diante desses resultados, cabe salientar que esse é o primeiro estudo sobre a doença mancha foliar em noqueira-pecã no Brasil, bem como no mundo, causada por espécies do gênero *Cladosporium* incluídas no complexo *C. cladosporioides*, o que possibilitou a realização do primeiro relato da doença descrito no **artigo 1**. Os resultados dos três artigos do presente estudo representam a primeira etapa para estudos futuros de medidas de controle para a doença mancha foliar.

CONCLUSÃO

Os seguintes resultados foram obtidos no presente estudo:

- A mancha foliar em noqueira-pecã é causada por *Cladosporium cladosporioides*, *C. pseudocladosporioides* e *C. subuliforme*, sendo esse o primeiro relato no Brasil, bem como no restante do mundo;

- A região do fator de alongação (TEF-1 α) é eficiente para identificar e agrupar as espécies associadas à noqueira-pecã e incluídas no complexo *C. cladosporioides*, sendo elas: *Cladosporium cladosporioides*, *C. pseudocladosporioides* e *C. subuliforme*;

- A análise morfológica deve ser confrontada com a análise molecular, pois alguns caracteres são indistinguíveis entre as espécies. A esporulação é uma importante característica morfológica para diferenciar as espécies de *Cladosporium* spp.;

- *Cladosporium cladosporioides*, *C. pseudocladosporioides* e *C. subuliforme* são agentes causais de mancha foliar em noqueira-pecã, sendo patogênicas às cultivares ‘Barton’ e ‘Shawnee’;

- As cultivares de noqueira-pecã, ‘Barton’ e ‘Shawnee’, são suscetíveis à mancha foliar para as três espécies de *Cladosporium* sp. testadas e existe diferença de suscetibilidade para *C. pseudocladosporioides*, onde a ‘Shawnee’ apresenta maior severidade da doença em relação a ‘Barton’.

REFERÊNCIAS

ALFENAS, A. C. et al. **Clonagem e doenças do eucalipto**. Viçosa: UFV, 2004. 442 p.

BECK, A. et al. Phylogenetic relationship of the anamorphic genus *Fusicladium* s. lat. as inferred by ITS data. **Mycological Progress**, v. 4, n. 2, p. 111-116, 2005.

BENSCH, K. et al. The genus *Cladosporium*. **Studies in Mycology**, v. 72, p. 1-401, 2012.

BENSCH, K. et al. Species and ecological diversity within the *Cladosporium cladosporioides* complex (Davidiellaceae, Capnodiales). **Studies in Mycology**, v. 67, p. 1-94, 2010.

COLLEGE OF AGRICULTURAL AND ENVIRONMENTAL SCIENCES. **Pecan Breeding: cultivar information**. 2015. Disponível em: http://www.caes.uga.edu/commodities/fruits/pecanbreeding/cultivars/cultivar_list.html. Acesso em: 27 de setembro de 2015.

CONNER, P. J. A detached leaf technique for studying race-specific resistance to *Cladosporium caryigenum* in pecan. **Journal of the American Society of Horticultural Science**, v. 127, p. 781-5. 2002.

DEMAREE, J. B. Pecan scab with special reference to sources or the early spring infections. **Journal of Agricultural Research**, v. 38, p. 321-333, 1924.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Lavoura permanente**. 2014. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/estadosat/temas.php?sigla=rs&tema=lavourapermanente2014>. Acesso em 05 de dezembro de 2015.

LAZAROTTO, M. et al. Morphological and molecular characterization of *Fusarium* spp. pathogenic to pecan tree in Brazil. **Genetics and Molecular Research**, v. 13, p. 9390-9402, 2014a.

LAZAROTTO, M. et al. Identification and characterization of pathogenic *Pestalotiopsis* species to pecan tree in Brazil. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 49, p. 440-448, 2014b.

LESLIE, J. F.; SUMMERELL, B. A. **The Fusarium Laboratory Manual**. Ames: Blackwell Publishing, 2006. 388 p.

ORTIZ, E. R. N.; CAMARGO, L. E. A. Doenças da Nogueira Pecan. In: KIMATI, H. et al. (Eds.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. p. 501-505.

MILGROOM, M. C. The synthesis of genetics and epidemiology contributions of population biology in plant pathology. **Journal of Plant Pathology**, v. 83, p. 57-62. 2001.

MANTZ, G. et al. Occurrence of scab disease of pecan caused by *Cladosporium caryigenum* in Argentina. **Plant Pathology**, v. 58, p. 802. 2009.

MARCHIORI, J. N. C. **Dendrologia das Angiospermas: das Magnoliáceas às Flacourtiáceas**. Santa Maria: UFSM, 1997. 272 p.

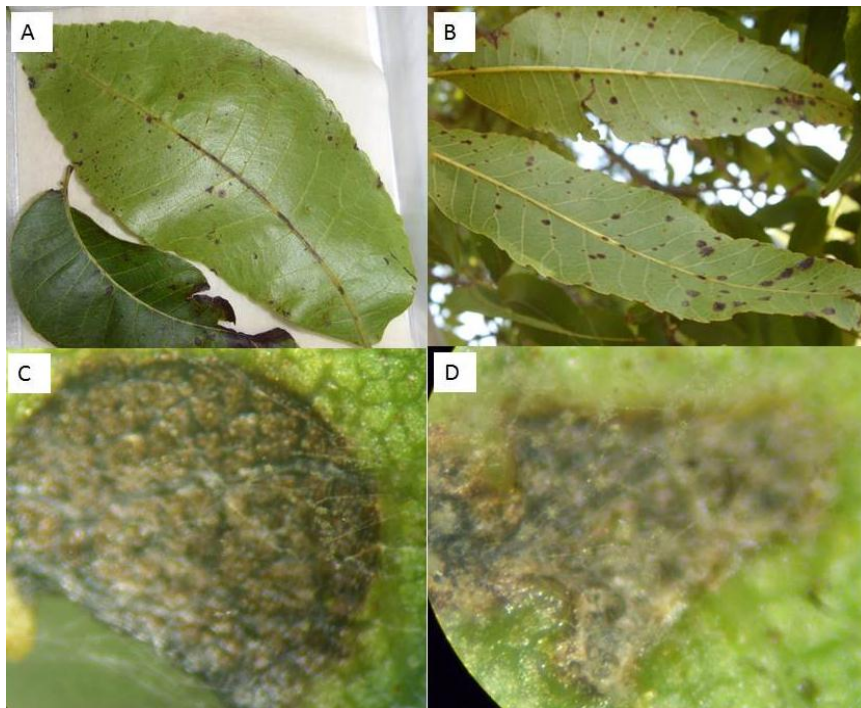
PARLEVLIET, J. E. What is durable resistance, a general outline. In: JACOBS, Th.; PARLEVLIET, J. E. (Ed.). **Durability of disease resistance**. Netherlands: Kluwer Academics, p. 23-39. 1993.

SCHNABEL, G.; SCHNABEL, E. L.; JONES, A. L. Characterization of ribosomal DNA from *Venturia inaequalis* and its phylogenetic relationship to rDNA from other tree fruit *Venturia* species. **Phytopathology**, v. 89, p. 100-108, 1999.

SEYRAN, M. et al. Phylogeny of the pecan scab fungus *Fusicladium effusum* G. Winter based on the cytochrome b gene sequence. **Mycological Progress**, v. 9, p. 305-308, 2010.

APÊNDICES

Apêndice A - Mancha foliar em noqueira-pecã causada por *Cladosporium* spp. A e B: aspecto da mancha foliar nos folíolos; C e D: aspecto da mancha foliar com a presença de sinais do patógeno visualizada em microscópio estereoscópico. Fonte: Walker (2014).



Apêndice B - Características morfológicas de *Cladosporium cladosporioides*: micélio em meio de cultura BDA (A), conídio (B) e ramoconídio (C); *C. pseudocladosporioides*: micélio em meio de cultura BDA (D), conídio (E) e ramoconídio (F); *C. subuliforme*: micélio em meio de cultura BDA (G), conídio (H) e ramoconídio (I). Fonte: Walker (2014).

