

## ARTIGOS

# ***Teratosphaeria nubilosa* em plantações comerciais de *Eucalyptus globulus* nas regiões Sul e Sudeste do Brasil**

Martha Maria Passador<sup>1</sup>, Patrícia Rodrigues de Lima<sup>2</sup>, Cristiane De Pieri<sup>1</sup>, Ricardo Harakava<sup>2</sup>, Elder Finkenauer, Edson Luiz Furtado<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Departamento Ciências Florestais, Faculdade de Ciências Agrônomicas – UNESP, CEP-18.610-307, Botucatu-SP. <sup>2</sup>Instituto Biológico de São Paulo, Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Vegetal, Laboratório de Bioquímica Fitopatológica. <sup>3</sup>Departamento de Produção Vegetal, Faculdade de Ciências Agrônomicas – UNESP, CEP-18.610-307, Botucatu-SP.

Autor para correspondência: Martha Maria Passador (marthamaria\_p@yahoo.com.br)

Data de chegada: 08/07/2011. Aceito para publicação em: 13/02/2012.

1766

### RESUMO

Passador, M.M.; Lima, P.R.; De Pieri, C.; Harakava, R.; Furtado, E.L. *Teratosphaeria nubilosa* em plantações comerciais de *Eucalyptus globulus* nas regiões Sul e Sudeste do Brasil *Summa Phytopathologica*, v.38, n.1, p.11-16, 2012.

Muitos patógenos, principalmente fungos, ocorrem em várias espécies de eucalipto, desde a fase de viveiro até os plantios adultos. Dentre as doenças fúngicas, destaca-se a mancha de micoserela, considerada uma das principais doenças, e o *Eucalyptus globulus*, uma das espécies mais suscetíveis. Esta doença é causada por várias espécies pertencentes aos gêneros *Teratosphaeria* e *Mycosphaerella*, sendo *T. nubilosa* de maior importância. O objetivo do presente estudo foi verificar a presença do fungo *T.nubilosa* em materiais coletados nos seguintes locais: Bagé-RS, Pedras Altas-RS, Botucatu-SP, Jacaréi-

SP e Itapeva-SP. Por meio de isolamentos a partir de folhas de *E. globulus* apresentando mancha de micoserela, foi possível a obtenção de isolados do fungo. A observação quanto ao padrão de germinação dos ascósporos, o seu crescimento micelial, e também por meio de PCR com primers da região genômica ITS1 e ITS4 e sequenciamento, e submissão ao GenBank, foi possível a determinação do gênero e da espécie do patógeno como *T. nubilosa*. Nos cinco locais estudados foi confirmada a presença deste agente causal de mancha de micoserela em plantios de *E. globulus* nas regiões Sul e Sudeste do Brasil.

**Palavras-chave adicionais:** eucalipto, mancha foliar, *Teratosphaeria nubilosa*

### ABSTRACT

Passador, M.M.; Lima, P.R.; De Pieri, C.; Harakava, R.; Furtado, E.L. *Teratosphaeria nubilosa* affecting commercial plantations of *Eucalyptus globulus* in South and Southeast of Brazil. *Summa Phytopathologica*, v.38, n.1, p.11-16, 2012.

A large number of pathogens, especially fungi affect several eucalypt species from the nursery phase to the adult crops. Among fungal diseases, *Mycosphaerella* leaf disease is considered one of the main conditions, to which *Eucalyptus globulus*, is one of the most susceptible species. This disease is caused by several species into the genera *Teratosphaeria* and *Mycosphaerella*, and *Teratosphaeria nubilosa* is the most importance species. The aim of the present study was to verify the presence of *T.nubilosa* in materials collected in: Bagé-RS, Pedras Altas-RS, Botucatu-SP, Jacaréi-SP

and Itapeva-SP. By means of isolations from *E. globulus* leaves presenting characteristic symptoms of *T. nubilosa*, isolates of the fungus could be observed as to ascospore germination pattern and mycelial growth. The pathogen specie was determined by PCR using primers ITS1 and ITS4 and DNA sequencing, and submission to GenBank. From materials collected in all five studied places, confirming the presence of the agent of *Mycosphaerella* leaf disease in some of *E. globulus* crops in the South and Southeast regions of Brazil.

**Keywords:** eucalyptus, leaf disease, *Teratosphaeria nubilosa*

Atualmente, espécies de eucalipto são cultivadas para os mais diversos fins, tais como papel, celulose, lenha, carvão, serraria, óleos para indústrias farmacêuticas, mel, ornamentação e quebra-vento, dentre outros. No mundo o eucalipto é a árvore mais plantada, com mais de 17,8 milhões de hectares (3, 21). No Brasil, as florestas comerciais com espécies de *Eucalyptus* expandiram significativamente nas últimas décadas, apresentando atualmente uma área plantada de 4,75 milhões de hectares (2).

Um dos principais problemas na eucaliptocultura é a ocorrência de uma série de doenças e pragas. Dentre as doenças, destaca-se a mancha de micoserela, mancha foliar causada por grande número de espécies de *Mycosphaerella* e *Teratosphaeria* (8, 13), sendo considerada uma das principais doenças, especialmente em *Eucalyptus globulus* Labill e *E. dunii* Maiden (5,6).

Dentre as espécies envolvidas, *Teratosphaeria nubilosa* (Cooke) Crous & U. Braun e *T. cryptica* (Cooke) Crous & U. Braun são

consideradas as mais importantes em nível mundial (5, 17, 23). Estas espécies colonizam os tecidos vivos e saudáveis do hospedeiro, adquirindo nutrientes para sua fase hemibiotrófica (17, 28). Segundo Crous (8) e Crous et al. (14) outras espécies de *Mycosphaerella* e *Teratosphaeria*, aparentemente demonstram patogenicidade fraca, ou podem atuar como saprófitas no tecido necrótico, seguidas pela infecção de outras espécies patogênicas, insetos ou senescência da folha.

Devido a alguns rearranjos taxonômicos, principalmente relacionados a análises filogenéticas (13, 14), algumas espécies que pertenciam ao gênero *Mycosphaerella*, foram transferidas para o gênero *Teratosphaeria*, como: *T. molleriana*, *T. nubilosa*, *T. cryptica*, *T. ohnowa*, *T. parva*, *T. africana*. Porém muitas ainda pertencem ao gênero *Mycosphaerella*, como: *M. crystalina*, *M. lateralis*, *M. marksii*, *M. gregaria*, *M. parkii*. Apesar destas mudanças nos nomes das espécies dos agentes causais, o nome comum para esta doença não foi alterado, desta forma, a doença mancha de micoserela tem como agentes causais *Mycosphaerella* spp. e *Teratosphaeria* spp. (11, 13, 17).

Os sintomas associados a esta doença são variáveis, e diferem entre si dependendo da espécie do hospedeiro e do patógeno. Primeiramente são observadas manchas necróticas localizadas, de coloração parda, que reduzem a capacidade fotossintética das folhas ocasionando desfolha precoce em plantas juvenis (16).

Na região das manchas podem ser observadas pontuações escuras, que correspondem aos corpos de frutificação do patógeno. Estes fungos ao infectarem o hospedeiro, avançam em seus tecidos por meio de crescimento inter e intracelular, adquirindo nutrientes a partir das células do hospedeiro. A produção de ascas ocorre dentro de estromas, que em espécies de *Mycosphaerella* e *Teratosphaeria* são uniloculares peritecióides, denominados pseudotécios.

As ascas são formadas em ascomas presentes nas manchas necróticas localizadas nas folhas, constituídas pelos tecidos mortos devido à presença do fungo. Durante o desenvolvimento do pseudotécio o estroma amadurece e rompe a superfície do hospedeiro (14), ao final de sua formação, os corpos de frutificação não se encontram totalmente imersos no tecido do hospedeiro, sendo parcialmente superficiais.

Os pseudotécios são produzidos em um aglomerado de hifas entrelaçadas, junto ao substrato, composto por hifas, que podem apresentar coloração marrom a marrom acinzentada, sendo características da ordem Capnodiales (1,8).

À medida que a doença evolui no hospedeiro, podem ocorrer cancos e morte prematura dos ramos. Em alguns casos, esta doença pode causar atrofia e morte da árvore (31). As árvores, frequentemente tem o seu metabolismo alterado, o que resulta em redução do crescimento; além disso, esta doença pode contribuir para infecções provocadas por patógenos secundários e promover consideráveis prejuízos econômicos (18).

Os ascósporos são oblíquos, de forma elipsoidal ou fusiforme, hialinos e lisos, apresentam um septo (8), e constituem a primeira fonte de inóculo para a maioria das espécies de *Mycosphaerella* e *Teratosphaeria*; considerando que algumas espécies infectam o hospedeiro primeiramente por conídios (13,29).

Quando há condições de umidade favoráveis, os ascósporos são liberados dos pseudotécios e dispersos pelo vento, atuando como inóculo primário, e infectando o hospedeiro por meio da abertura dos estômatos (25). À medida que o fungo se desenvolve, os tubos germinativos provenientes dos ascósporos produzem hifas que se incham nos ostíolos e câmaras subestomáticas (28).

Nas folhas adultas a penetração do fungo pode ocorrer em ambas as faces, devido à presença dos estômatos. Nas folhas jovens, por outro lado, a penetração ocorre somente na face abaxial, onde os

estômatos estão localizados. Desta forma, os estômatos fornecem o local para a formação dos pseudotécios, e a distribuição destas estruturas pode refletir a distribuição dos estômatos no local onde se encontra a mancha na folha (4).

Para identificação de muitos fitopatógenos, um fator importante é a especificidade com relação ao hospedeiro, porém, muitas espécies apesar de serem específicas, podem também infectar outros hospedeiros. Desta forma, atualmente a taxonomia dos gêneros *Mycosphaerella* spp. e *Teratosphaeria* spp., está baseada em uma série de dados e características, incluindo sintomas no hospedeiro, morfologia do fungo, relação com anamorfos, padrões de germinação dos ascósporos e filogenia (8, 10).

Sendo assim o uso de técnicas baseadas em biologia molecular, com o sequenciamento de DNA de isolados obtidos a partir de espécies de *Eucalyptus* tornaram-se instrumentos essenciais na identificação das espécies de agentes causais da mancha de micoserela em *Eucalyptus*, e de outros hospedeiros (8,12).

Assim este trabalho teve como objetivo, detectar o fungo *T. nubilosa* em plantios de *E. globulus* provenientes de cinco diferentes locais, por meio de isolamentos a partir de folhas com sintomas e sinais da doença, observação do padrão de germinação dos ascósporos, identificação taxonômica por meio de PCR e sequenciamento da região ITS.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas folhas jovens e adultas de *E. globulus* apresentando a doença, coletadas no período de novembro de 2007 a janeiro de 2010. Estes materiais foram coletados em cinco locais distintos: dois plantios na região de Bagé-RS (Fazenda São José: 31°03'57.70"S e 53°44'16.01"O; Fazenda São José III: 31°5'30" S e 53°44'10" O - FIBRIA Papel e Celulose); Pedras Altas-RS (Fazenda São Luiz: 31°56'42" S e 52°56'48" O - FIBRIA Papel e Celulose). Vale ressaltar que em ambos os casos, os plantios estavam com um ano de idade. Outros locais de coleta foram: Botucatu-SP, (Fazenda Lageado: 22°50'36"S e 48°25'3"O - Câmpus da FCA-UNESP); Jacaré-SP (Viveiro Jacaré: 23°17'49"S e 45°54'51"O - FIBRIA Papel e Celulose) e Itapeva-SP (Fazenda Karamacy: 23°52'29" S e 48°53'45"O - FIBRIA Papel e Celulose). Quanto aos materiais coletados no estado de São Paulo, foram provenientes de plantios com três anos, um ano, e dois anos e quatro meses, respectivamente.

Os sintomas causados por *T. nubilosa* são bem característicos. Para os isolamentos, foram utilizadas folhas que apresentavam manchas arredondadas e de coloração parda características de *T. nubilosa* (Figura 1A-D).

Os isolamentos foram realizados no Laboratório de Patologia Florestal do Departamento de Produção Vegetal, FCA-UNESP, de acordo com a metodologia elaborada por Crous (8). Nesta metodologia, pequenos pedaços das folhas de *E. globulus* com os sintomas e sinais do fungo foram mergulhados em água destilada estéril por um período de duas horas, com a finalidade de umedecer os corpos de frutificação e proporcionar a ejeção de ascósporos.

Após duas horas em água destilada, os pedaços de folha foram retirados da água e colocados na face interna de tampas de placas de Petri (90 x 15 mm), as quais continham meio de extrato de malte (MEA – 2 %). Nas tampas, os pedaços de folhas ficaram fixados devido à umidade presente nos mesmos. Estas placas foram mantidas em câmara de temperatura controlada (BOD) a 25 °C durante 24 h, quando já foi possível observar em estereoscópio, os ascósporos, ejetados a partir dos pseudotécios presentes nos pedaços de folha, e

germinados no meio de cultura.

A partir dos ascósporos germinados foram realizados os isolamentos monospóricos em meio MEA. Após a realização dos isolamentos monospóricos, as placas de Petri permaneceram em BOD a 25 °C no escuro, tendo seu crescimento observado por um período de 30 dias.

Para complementação dos dados dos isolados obtidos, foram realizadas análises moleculares, sendo esta etapa desenvolvida no Laboratório de Bioquímica do Instituto Biológico, São Paulo-SP. Para tanto, pequenas porções das colônias fúngicas, mantidas em meio V8 acrescido de extrato de malte, foram retiradas para extração do DNA de acordo com o protocolo CTAB (hexadecyl trimethyl ammonium bromide) adaptado de Dellaporta et al. (15).

O procedimento foi iniciado com a ruptura dos tecidos realizada por meio da maceração do material vegetal em nitrogênio líquido. Posteriormente, as amostras trituradas foram ressuspensas em 600µL do CTAB tampão de extração [100mM Tris-HCl (pH 8,0), 1,4 M NaCl, 2 mM *Ethylenediaminetetraacetic acid* (EDTA) e 2% de CTAB, solução que facilita a ação das endonucleases.

Para a remoção de proteínas e carboidratos, foram utilizados clorofórmio e álcool isoamílico na proporção de 29:1 v/v; sendo adicionados 600µL de clorofórmio-isoamílico e as amostras centrifugadas a 10.000 rpm, 4°C durante 5 min. Após a centrifugação foi retirado o sobrenadante que foi transferido para novos ependorfs. Ao sobrenadante retirado foi adicionado 1/10 de CTAB/NaCl o que correspondeu a 40µL uma vez que o volume de sobrenadante retirado foi de 400µL.

Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm, 4°C por 5 min, e novamente foi repetida a purificação com clorofórmio-isoamílico. Após a centrifugação, foram retirados 300 µL do sobrenadante, sendo este volume transferido para um novo tubo ao qual foi adicionada a mesma quantidade de CTAB tampão de precipitação [50 mM Tris Cl (pH 8,0) e 10 mM EDTA (pH 8,0)]. As amostras foram colocadas a 65°C, sem agitação, por 30 min, para que o DNA se depositasse no fundo do tubo. Transcorrido o tempo de 30 min, as amostras foram centrifugadas a 4°C, 2.700 rpm, por 5 min, o sobrenadante descartado e foi adicionado 500µL da solução high salt TE [ 2M de Tris Cl (pH 8,0), 0,5 M de EDTA (pH 8,0) e 5M NaCl]. Os tubos foram, então, vertidos manualmente para descarte da solução high salt TE, sendo a seguir, o DNA precipitado com 300µL de isopropanol absoluto, e os tubos foram vertidos manualmente para que o isopropanol fosse descartado.

Posteriormente, foi realizada uma lavagem com 300µL de etanol 70%, os tubos foram invertidos manualmente e colocados na centrífuga a 4°C, 13.000 rpm por 5 min. Em seguida, o etanol foi descartado cuidadosamente para o DNA não se desprender do fundo do tubo. Após o descarte do etanol, os ependorfs foram secos em uma centrífuga a vácuo, por 5 min. A seguir, realizou-se a ressuspensão do DNA, adicionando 50µL de água MiliQ estéril, e os ependorfs contendo o DNA dos isolados foram armazenados em freezer.

Para a reação de PCR, foi preparado um volume final de 20µL, para cada isolado, sendo todos os reagentes misturados no mesmo ependorf, exceto o DNA que foi posteriormente adicionado. Para o preparo do mix foram utilizados: 0,2 µL do primer ITS1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3') e 0,2 µL do primer ITS4 (5'- TCC TCC GCT TATTGA TAT GC-3'); 4,0 µL do tampão 5x; 0,2 iL de DNTPs; 0,1 µL de Taq; 14,3 µL de água MiliQ estéril e 1 µL do DNA de cada amostra. O termociclador foi programado para um ciclo de 94°C por 2 minutos (desnaturação), seguido de 40 ciclos de 94°C por 15 segundos (desnaturação), 54°C por 30 segundos (anelamento), 72°C

por 30 segundos (extensão), e um ciclo de 72°C por 4 minutos (extensão final) e a etapa de manutenção programada para 4°C. Para a eletroforese, foi utilizado o gel de Agarose na concentração 0,8%.

O sequenciamento foi realizado em sequenciador automático ABI377 existente no Laboratório de Bioquímica do Instituto Biológico de São Paulo-SP. Foi utilizado gel de poliacrilamida (9g de uréia, 12,5ml de água MilliQ (estéril), 2,5g tampão TBE e 2,5g de poliacrilamida).

As buscas no BLAST no NCBI GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>) foram conduzidas utilizando as sequências obtidas nesse estudo, as quais, foram analisadas e editadas no programa MEGA v. 4.1, sendo comparadas com sequências referentes a espécies de *Mycosphaerella* e *Teratosphaeria*, que ocorrem em eucalipto, juntamente com a sequência de *Botryosphaeria ribis* como grupo taxonômico externo, que se encontram depositadas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

Os isolados obtidos nesse estudo foram depositados na “Micoteca Mário Barreto Figueiredo”, coleção de fungos fitopatogênicos do Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Vegetal do Instituto Biológico (IB) de São Paulo-SP.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos materiais analisados foi possível observar grande quantidade de pseudotécios, dispersos na área da mancha, na face abaxial em folhas jovens (Figura 1A-B) e em ambas as faces nas folhas adultas (Figura 1C-D). Também foi possível observar pseudotécios escuros, puntiformes, globosos, ostiolados, apresentando paredes espessas, maduros e contendo as ascas e ascósporos em seu interior (Figura 1E).

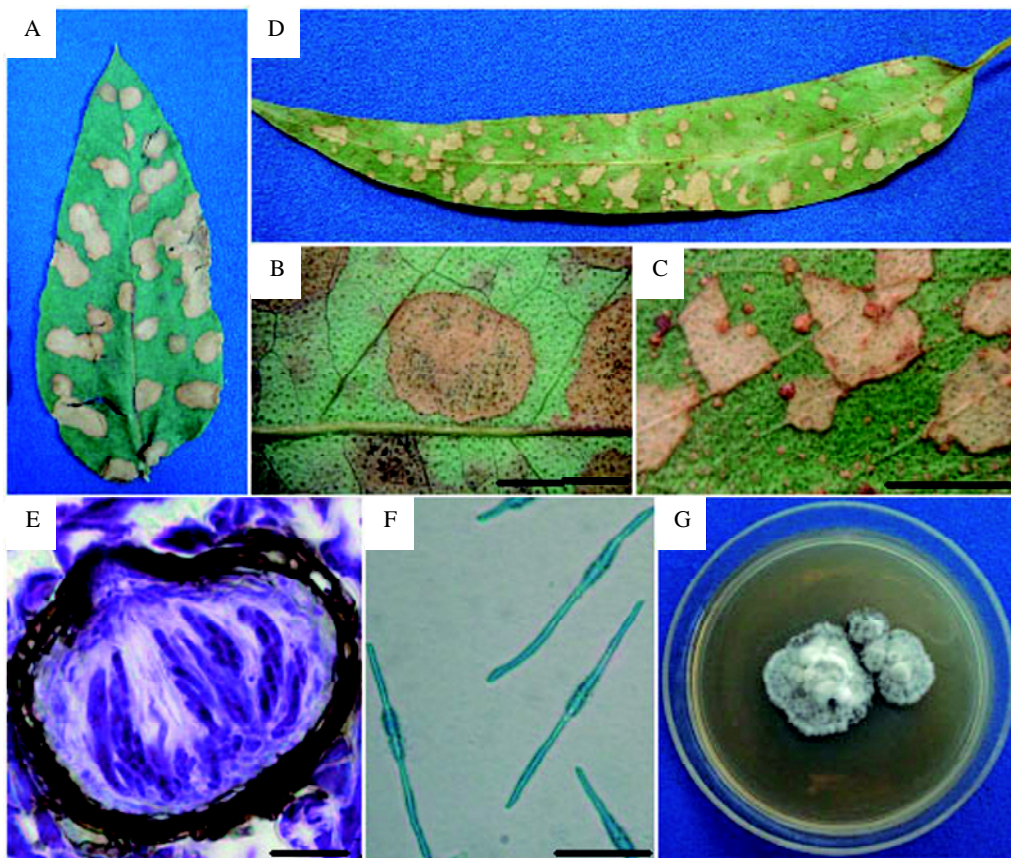
A grande intensidade dos sintomas desta doença em folhas jovens de *E. globulus*, indica o grau de suscetibilidade destas folhas. As folhas adultas apresentavam a doença de forma menos intensa, as manchas eram em menor quantidade e mais dispersas pela superfície foliar, porém apresentando pseudotécios, ascas e ascósporos, constituindo também uma importante fonte de inóculo.

Na natureza, as folhas jovens caem mais rapidamente que as folhas adultas, devido à intensidade da doença, assim, as folhas adultas permanecem por mais tempo anexadas nas árvores, prolongando o contato com o vento e a chuva, do que as folhas caídas. Segundo Park & Keane (29), as folhas velhas, ainda presas na planta, são as principais fontes de inóculo, sendo o longo período de incubação do fungo nas folhas adultas, importante fator para garantir quantidade suficiente de inóculo inicial para o próximo ciclo epidêmico.

A metodologia utilizada para os isolamentos monospóricos (8) possibilitou a identificação parcial, devido ao padrão de germinação dos ascósporos, produzindo tubos germinativos paralelos, no mesmo eixo dos esporos, sem ramificações laterais (Figura 1F). Estas observações corresponderam com os resultados obtidos após sequenciamento do DNA dos isolados.

Certos padrões de germinação dos ascósporos podem ser utilizados para identificações em nível de espécie (8), em muitas, os esporos se tornam escuros ou verrucosos durante a germinação (10), sendo assim, tais espécies, de fato foram incluídas dentro do gênero *Teratosphaeria*, e não dentro de *Mycosphaerella*, sugerindo uma característica válida em nível de gênero.

A partir das amostras coletadas foram obtidos 13 isolados, que em meio de cultivo, apresentaram crescimento lento, aproximadamente 1,5 cm de diâmetro, após 30 dias, em BOD a 25°C e no escuro. As culturas destes isolados formaram micélio aéreo de coloração branca no centro da cultura mudando para verde pálida a acinzentada quando



**Figura 1.** A-D: Folhas de *Eucalyptus globulus* com manchas causadas por *Teratosphaeria nubilosa*. A: manchas em folha jovem. B: face abaxial de folha jovem. C: manchas em folha adulta. D: face abaxial de folha adulta. E: pseudotécio contendo ascas e ascósporos. F: ascósporos germinados em meio de extrato de malte (MEA). G: cultura de *Teratosphaeria nubilosa* em meio MEA. Barras: 5 mm (B, D) e 20  $\mu$ m (E, F).

próxima de suas margens irregulares (Figura 1G).

A coloração e disposição do micélio em meio de cultura, bem como a forma e padrão de germinação dos ascósporos, em alguns casos, são características importantes para a identificação de espécies (8, 19, 20). A análise do padrão de germinação dos ascósporos observados, aliados ao crescimento e aspecto cultural destes fungos, tornou possível identificar a espécie do agente causal de mancha de micosferela.

Conforme já mencionado anteriormente, foram visualizados pseudotécios em algumas manchas foliares, entretanto, houve ausência de formação desse importante caractere taxonômico (27, 28) em meio de cultura, sendo assim, as extrações de DNA e o sequenciamento da região ITS dos isolados, complementaram a identificação das espécies de fungos causadores de mancha de micosferela. Tais avaliações foram de grande importância e necessidade para a realização do presente estudo, pois demonstraram que mesmo na ausência de caracteres morfológicos importantes, é possível também realizar identificações seguras de *T. nubilosa* através da biologia molecular. Desta forma, análises morfológicas associadas às análises moleculares são extremamente viáveis na identificação destes fungos.

Por meio da reação de PCR, foram obtidos fragmentos com cerca de 500 - 600 pb, para cada isolado, os quais foram submetidos ao sequenciamento.

O alinhamento da região ITS1 permitiu a comparação entre as sequências obtidas e também com outras sequências de agentes causais de mancha de micosferela depositadas no GenBank, utilizando o programa Blast-n, sendo a sequência *Botryosphaeria*

*ribis* utilizada como grupo taxonômico externo (Figura 2).

As análises filogenéticas têm possibilitado a identificação de um elevado número de espécimes desconhecidos. Estas análises permitiram o agrupamento de todas as sequências de DNA dos isolados de *T. nubilosa* obtidos no presente estudo.

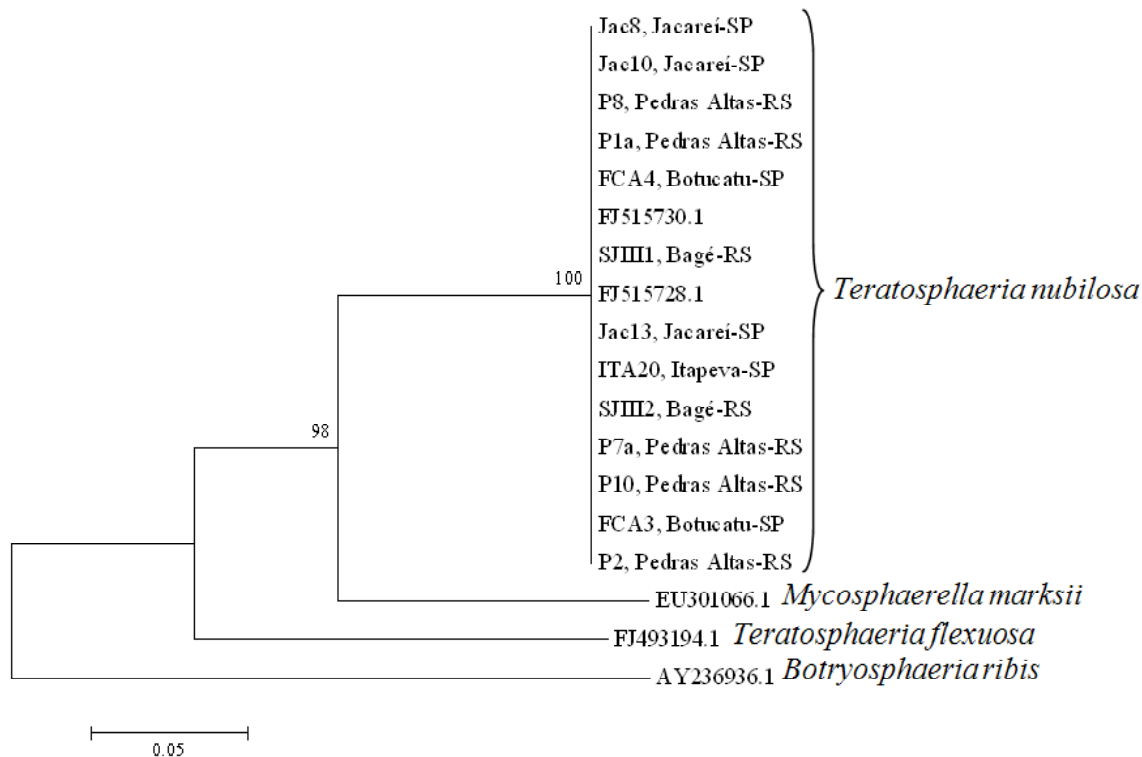
A detecção de espécies de agentes causais de mancha de micosferela no Brasil sugere que foram introduzidas pelo movimento de sementes ou mesmo de mudas entre Brasil, Uruguai e Argentina, sendo que *T. nubilosa* foi recentemente constatada no Uruguai (30). Outra possibilidade de introdução, poderia ter sido por meio da dispersão dos ascósporos pelo vento, uma vez que, este é um fator importante na distribuição e na disseminação destes (15, 24, 26).

A presença de mancha de micosferela no Brasil, e em países próximos conduz à necessidade de elaboração de formas de conjuntas de controle.

A estratégia mais adequada para o controle seria o desenvolvimento de variedades resistentes ou a utilização de variedades já existentes como *E. nitens*, amplamente utilizada na substituição de plantas suscetíveis, como por exemplo *E. delegatensis* e *E. regnans*, na Nova Zelândia (9).

Outro importante método seria a utilização de híbridos entre *E. globulus* e *E. grandis* suscetível e resistente a *T. nubilosa*, respectivamente (5, 7, 22).

Para eficiência no controle além de técnicas e metodologias suficientemente avançadas como o melhoramento genético, é essencial o conhecimento do ciclo vital do patógeno em todas as suas fases para que



**Figura 2.** Árvore Filogenética construída pelo método UPGMA a partir do alinhamento da sequência da região ITS dos isolados obtidos e as sequências dos fungos *Mycosphaerella marksii* e *Teratosphaeria flexuosa*, e também *Botryosphaeria ribis* como grupo taxonômico externo (outgroup), obtida no GenBank.

seja possível conter a doença e os prejuízos econômicos relacionados.

O estudo do patógeno e seu habitat, estratégias de sobrevivência, dispersão, penetração, relações patógeno/hospedeiro etc., não somente para espécies de *Mycosphaerella* e *Teratosphaeria*, como também para agentes causais de outras doenças são fundamentais, visando desenvolver métodos de controle e soluções mais eficazes e menos agressivas ao meio ambiente.

## REFERÊNCIAS

- Alexopoulos, C. J.; Mims, C. W.; Blackwell, M. *Introductory mycology*. 4. ed. New York: Wiley & Sons, 1996. 869 p.
- ABRAF. **Anuário estatístico 2011 – Ano Base 2010**. Brasília, DF: ABRAF, 2011. 130 p.
- Alfenas, A. C.; Zauza, A. A. V.; Mafia, R. G.; Assis, T. F. **Clonagem e doenças do eucalipto**. 2. ed. Viçosa: UFV, 2004. 442 p.
- Beadle, C. J. Physiology of eucalypts in relation to disease. In: Keane P. J.; Kile G. A.; Podger F. D. **Diseases and pathogens of eucalypts**. Melbourne: CSIRO Publishing, 2000. 565 p.
- Carnegie A. J.; Ades, P. Added phosphorus is associated with reduced severity of *Mycosphaerella cryptica* in *Eucalyptus globulus*. **Australian Forestry**, Yarralumla, v. 64, n. 4, p. 203-208, 2002.
- Carnegie, A. J.; Keane, P. J. Further *Mycosphaerella* species associated with leaf diseases of Eucalyptus. **Mycological Research**, Cambridge, v. 98, n. 4, p. 413-418, 1994.
- Carnegie, A. J.; Keane, P. J. *Mycosphaerella vespa* from diseased Eucalyptus leaves in Australia. **Mycological Research**, Cambridge, v.102, n. 10, p.1274-1276, 1998.
- Crous, P. W. *Mycosphaerella* spp. and their anamorphs associated with leaf spot diseases of Eucalyptus. **Mycologia Memoirs**, St. Paul, v. 21, n. 170, 1998. 170 p.
- Crous, P. W. Taxonomy and phylogeny of the genus *Mycosphaerella* and its anamorphs. **Fungal Diversity**, Mae Taeng, v. 38, p. 1-24, 2009.
- Crous, P.W.; Aptroot, A.; Kang, J.C.; Braun, U.; Wingfield, M.J. The genus *Mycosphaerella* and its anamorphs. **Studies in Mycology**, Utrecht, v. 45, p. 107-121, 2000.
- Crous, P. W.; Braun, U.; Groenewald, J. Z. *Mycosphaerella* is polyphyletic. **Studies in Mycology**, Utrecht, v.58, p.1-32, 2007a.
- Crous, P. W.; Kang, J. C.; Braun, U. A phylogenetic redefinition of anamorph genera in *Mycosphaerella* based on ITS rDNA sequence and morphology. **Mycologia**, Lawrence, v. 93, n. 6, p.1081-1101, 2001.
- Crous, P. W.; Summerell, B. A.; Carnegie, A. J.; Mohammed, C.; Himaman, W.; Groenewald, J. Z. Foliicolous *Mycosphaerella* spp. and their anamorphs on *Corymbia* and *Eucalyptus*. **Fungal Diversity**, Mae Taeng, v. 26, n. 3, p. 143-185, 2007b.
- Crous, P. W.; Wingfield, M. J.; Mansilla, J. P.; Alfenas, A. C.; Groenewald, J. Z. Phylogenetic reassessment of *Mycosphaerella* spp. and their anamorphs occurring on Eucalyptus II. **Studies in Mycology**, Utrecht, v. 55, p. 99-131, 2006.
- Dellaporta, S. L.; Woods, J.; Hicks, J. B. A plant DNA minipreparation: Version II. **Plant Molecular Biology Reporter**, Athens, v. 1, n. 4, p. 19-21, 1983.
- Ganapathi, A. **Studies of the etiology of the leaf blotch disease of Eucalyptus spp. caused by Mycosphaerella nubilosa (Cooke) Hansf.** 138 f. Thesis (Doctorate)-University of Auckland, New Zealand, 1979.
- Hunter, G.C.; Crous, P.W.; Carnegie, A.J.; Wingfield, M.J. *Teratosphaeria nubilosa*, a serious leaf disease pathogen of Eucalyptus spp. in native and introduced areas. **Molecular Plant Pathology**, London, v. 10, n. 1, p. 1-14, 2009.
- Hunter, G. C.; Roux, J.; Wingfield, B. D.; Crous, P. W.; Wingfield, M. J. *Mycosphaerella* species causing leaf disease in South African Eucalyptus plantations. **Mycological Research**, Cambridge, v. 108, n. 6, p. 672-681, 2004.
- Maxwell, A. **The taxonomy, phylogeny and impact of Mycosphaerella**

- phaerella* species on **Eucalypts in South-Western Australia**. 2004. 231 f. Thesis (Doctorate)-School of Biological Sciences and Biotechnology, Murdoch University, Perth, 2004.
20. Maxwell, A.; Dell, B.; Neumeister-Keip, H. G.; Hardy, G. E. S. J. *Mycosphaerella* species associated with *Eucalyptus* in south-western Australia: new species, new records and a key. **Mycological Research**, Amsterdam, v. 107, p. 53-63, 2003.
  21. Medrado, M. J. S.; Hoeflich, V. A.; Castro, A. W. V. Embrapa: evolução do setor florestal no século XXI. 2005. Disponível em: <<http://www.celuloseonline.com.br/Colunista/colunista.asp?IDAssuntoMateria=271&iditem>>. Acesso em: 26 jan. 2006.
  22. Milgate, A.W.; Potts, B.M.; Joyce, K.; Mohammed, C.; Vaillancourt, R.E. Genetic variation in *Eucalyptus globulus* for susceptibility to *Mycosphaerella nubilosa* and its association with tree growth. **Australasian Plant Pathology**, Sidney, v. 34, n. 1, p. 11-18, 2005.
  23. Mohammed, C.; Wardlaw, T.; Smith, A.; Pinkard, E.; Battaglia, M.; Glen, M.; Tommerup, I.; Potts, B.; Vaillancourt, R. *Mycosphaerella* leaf diseases of temperate eucalypts around the southern pacific rim. **New Zealand Journal of Forestry Science**, Rotorua, v. 33, n. 3, p. 362-372, 2003.
  24. Niyo, K. A.; Mc Nabb Jr., H. S.; Tiffany, L. H. Ultrastructure of the ascocarps, asci and ascospores of *Mycosphaerella populorum*. **Mycologia**, Lawrence, v. 78, n. 2, p. 202-212, 1986.
  25. Park, R. F. Effect of certain host, inoculum, and environmental factors on infection of *Eucalyptus* species by two *Mycosphaerella* species. **Transactions of the British Mycological Society**, London, v. 90, n. 2, p. 221-228, 1988a.
  26. Park, R. F. Epidemiology of *Mycosphaerella nubilosa* and *M. cryptica* on *Eucalyptus* spp. in south-western Australia. **Transactions of the British Mycological Society**, London, v. 91, n. 2, p. 261-266, 1988b.
  27. Park, R. F.; Keane, P. J. Three *Mycosphaerella* species from leaf diseases of *Eucalyptus*. **Transactions of the British Mycological Society**, London, v. 79, n. 1, p. 95-100, 1982a.
  28. Park, R. F.; Keane, P. J. Leaf diseases of *Eucalyptus* associated with *Mycosphaerella* species. **Transactions of the British Mycological Society**, London, v. 79, n. 1, p. 101-115, 1982b.
  29. Park, R. F.; Keane, P. J. Spore productions by *Mycosphaerella* species causing leaf diseases of *Eucalyptus*. **Transactions of the British Mycological Society**, London, v. 89, n. 4, p. 461-470, 1987.
  30. Pérez, C. A.; Wingfield, M. J.; Altier, N. A.; Blanchette, R. A. Mycosphaerellaceae and Teratosphaeriaceae associated with *Eucalyptus* leaf diseases and stem cankers in Uruguay. **Forest Pathology**, Aberdeen, v. 39, n. 5, p. 349-360, 2009.
  31. Smith, A.H.; Gill, W.M.; Pinkard, E.A.; Mohammed, C.L. Anatomical and histochemical defence responses induced in juvenile leaves of *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus nitens* by *Mycosphaerella* infection. **Forestry Pathology**, Aberdeen, v. 37, n. 6, p. 361-373, 2007.