



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FITOPATOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOPATOLOGIA

**IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DE *Calonectria* E REAÇÃO
DE ACESSOS DE GRÃO-DE-BICO A ISOLADOS DE
*Calonectria brassicae***

NARA LÚCIA SOUZA RIBEIRO TRINDADE

**Brasília – DF
2019**

NARA LÚCIA SOUZA RIBEIRO TRINDADE

**IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DE *Calonectria* E REAÇÃO DE ACESSOS DE
GRÃO-DE-BICO A ISOLADOS DE *Calonectria brassicae***

Dissertação apresentada à Universidade de Brasília como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Fitopatologia pelo Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia.

Orientador

Luiz Eduardo Bassay Blum, Doutor em Fitopatologia

BRASÍLIA
DISTRITO FEDERAL – BRASIL
2019

FICHA CATALOGRÁFICA

Trindade, Nara Lúcia Souza Ribeiro. Identificação de espécies de *Calonectria* e reação de acessos de grão-de-bico a isolados de *Calonectria brassicae* / Nara Lúcia Souza Ribeiro Trindade.

Brasília, 2019.

60 p.: il.

Dissertação de mestrado. Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, Universidade de Brasília, Brasília.

1. Grão-de-bico – *Calonectria*I.

I. Universidade de Brasília. PPG/FIT.

II. Identificação de espécies de *Calonectria* spp. e reação de acessos de grão-de-bico a isolados de *Calonectria brassicae*.

Trabalho realizado junto ao Departamento de Fitopatologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, sob Orientação do Professor Dr. Luiz Eduardo Bassay Blum, com apoio da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária.

IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DE *Calonectria* E REAÇÃO DE ACESSOS DE GRÃO-DE-BICO A ISOLADOS DE *Calonectria brassicae*

NARA LÚCIA SOUZA RIBEIRO TRINDADE

DISSERTAÇÃO APROVADA em: 17/12/2019 por:

Dra. Cléia Santos Cabral
UNIDESC (Examinador Externo)

Dr. Leonardo Silva Boiteux
Embrapa Hortaliças (Examinador Externo – Vinculado ao PPG-FIT)

Dr. Luiz Eduardo Bassay Blum
Universidade de Brasília – UnB (Presidente – Orientador)

BRASÍLIA – DISTRITO
FEDERAL BRASIL
2019

*Ao meu esposo Welvis, à minha filha Graziela, aos meus pais José Joaquim e Maria
Caetana, aos meus irmãos André e Rodrigo, aos meus Familiares e Amigos,
pelo amor, incentivo e presença inestimáveis...*

Dedico!

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu Deus pela graça em minha vida, pois sem a Sua mão eu não teria forças para chegar até aqui;

Agradeço ao meu esposo Welvis e à minha filha Graziela pelo amor paciente, pois sem vocês eu não teria a inspiração para chegar até aqui;

Agradeço aos meus pais José Joaquim e Maria Caetana pela presença constante, pois sem vocês eu não teria a motivação para chegar até aqui;

Agradeço aos meus irmãos André e Rodrigo pela parceria na vida, pois sem vocês eu não teria a confiança para chegar até aqui;

Agradeço aos meus Orientadores Dr. Ailton Reis e Dr. Luiz Blum pela dedicação à Pesquisa, pois sem vocês eu não teria a direção para chegar até aqui;

Agradeço à Embrapa pela oportunidade, pois sem o meu trabalho eu não teria as ferramentas para chegar até aqui;

Agradeço aos meus amigos Isaac, Lincoln, Elaine, Juliana, Welinton, Evandro, Magelinha, Magelão, Jorge, Elissandra, Daniel, Rosália, Pr. Sérgio, Pra. Zalavi, Vívian, Maurício, Wagner, Fabiana, Renato, Marçal, Patrícia, Lemerson, Caroline e Dr. Warley M. Nascimento pelo encorajamento e generosidade, pois sem vocês não teria sido possível chegar até aqui;

Agradeço a Dra. Maria Esther de Noronha Fonseca e ao técnico Antonio Francisco Costa (Laboratório de Análise Genômica – CNPH) pelo apoio técnico e teórico durante a execução do trabalho de seqüenciamento dos isolados fúngicos.

Agradeço a Dra. Rafaela C. F. Borges pelo apoio nas análises moleculares e filogenia bem como a Dra. Maria do Desterro Santos pela ajuda na documentação microscópica dos isolados.

Agradeço a todos os meus familiares e amigos pelo incentivo em todo tempo, pois sem vocês eu não teria o entusiasmo para chegar até aqui;

Àqueles que, mesmo não citados aqui, se dispuseram e contribuíram comigo para a realização deste trabalho, compartilhando conhecimento, trabalho, conselhos, orações, risadas, eu agradeço de todo o coração e desejo que sejam alcaçados em todo tempo pela boa mão de Deus.

“Não deixo de dar graças por vocês, mencionando-os em minhas orações.” Efésios 1:16

“Mas sejam fortes e não fiquem desanimados, pois o trabalho de vocês será recompensado.

Crônicas 15:7

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	ii
LISTA DE FIGURAS	iii
RESUMO	iv
ABSTRACT	v
1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1. O Grão-de-bico	15
2.2. Problemas relatados na cultura do grão-de-bico	19
2.3 O gênero <i>Calonectria</i> : taxonomia e aspectos gerais	21
3. MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1. Obtenção, isolamento e armazenamento dos isolados	25
3.2. Identificação molecular dos isolados <i>Calonectria</i> spp	26
3.2.1 Extração de DNA genômico dos isolados	26
3.2.2 Reação em cadeia da polimerase – PCR	27
3.2.3 Purificação dos produtos de PCR	27
3.2.4 Sequenciamento dos amplicons	27
3.2.5 Análise Filogenética	28
3.3. Identificação morfológica e morfométrica de isolados <i>Calonectria</i> spp	31
3.4. Preparo das suspensões de inóculo para o teste de patogenicidade com <i>Calonectria</i> spp.	31
3.5. Patogenicidade de Isolados de <i>Calonectria</i> spp. aos acessos de grão-de-bico	32
3.6. Reação de acessos de grão-de-bico a <i>Calonectria brassicae</i>	33
3.7. Análise de variância	34
4. RESULTADOS	35
4.1. Identificação molecular dos isolados <i>Calonectria</i> spp	35
4.2. Identificação morfológica e morfométrica dos isolados <i>Calonectria</i> spp	37
4.3. Patogenicidade e agressividade de Isolados de <i>Calonectria</i> spp. aos acessos de grão-de-bico	39
4.4. Reação de genótipos de grão-de-bico à <i>Calonectria brassicae</i>	42
5. DISCUSSÃO	45
6. CONCLUSÕES	52
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Região genômica (RG) e iniciadores para a identificação molecular e filogenia de isolados de <i>Calonectria</i> obtidos de plantas de grão-de-bico no Brasil Central	27
Tabela 2. Acessos de <i>Calonectria</i> obtidos do GenBank e as correspondentes regiões genômicas [beta-tubulina (tub2), fator de alongação TEF 1- α (TEF 1- α), calmodulina (cmdA), histona (his3)] utilizadas para análise filogenética (informações obtidas de Alfenas <i>et al.</i> (2015)	29 e 30
Tabela 3. Severidade (0 a 5) de doença em grão-de-bico inoculado com <i>Calonectria</i> spp. [<i>Ca. brassicae</i> (isolados EH-2530 e EH-2533) e <i>Ca. orientalis</i> (isolado EH-2536)]	40
Tabela 4. Severidade (0 a 5) de doença em acessos de grão-de-bico inoculados com <i>Calonectria</i> spp. [<i>Ca. brassicae</i> (isolados EH-2530 e EH-2533) e <i>Ca. orientalis</i> (isolado EH-2536)]	40
Tabela 5. Severidade (0 a 5) em avaliações da doença (entre 10 e 25 dias) em acessos de grão-de-bico inoculados com <i>Calonectria</i> spp. [<i>Ca. brassicae</i> (isolados EH-2530 e EH-2533) e <i>Ca. orientalis</i> (isolado EH-2536)]	40
Tabela 6. Severidade da doença (0 a 5) no desdobramento da interação acesso de grão-de-bico e isolados de <i>Calonectria</i> spp. [<i>Ca. brassicae</i> (isolados EH-2530 e EH-2533) e <i>Ca. orientalis</i> (isolado EH-2536)]	41
Tabela 7. Severidade da doença (0 a 5) no desdobramento da interação acesso de grão-de-bico e avaliação (aos 20 e 25 dias) em plantas inoculadas com <i>Calonectria</i> spp. [<i>Ca. brassicae</i> (isolados EH-2530 e EH-2533) e <i>Ca. orientalis</i> (isolado EH-2536)]	42
Tabela 8. Severidade da doença (0 a 5) causada por <i>Calonectria brassicae</i> (isolados EH-2530 e EH-2533) em acessos de grão-de-bico	43 e 44
Tabela 9. Severidade da doença (0 a 5) causada por <i>Calonectria brassicae</i> (isolados EH-2530 e EH-2533) em avaliações entre 7 e 20 dias	44

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Escala de notas usadas para avaliação da doença causada por *Calonectria* em grão-de-bico. (0) sem sintoma aparente (não representada); (1) até 10% das folhas murchas; (2) >10% a 25% das folhas murchas; (3) >25% a 50% das folhas murchas; (4) > 50% a 75% das folhas murchas; (5) planta morta 33
- Figura 2.** Árvore filogenética obtida por Inferência Bayesiana fundamentada em sequências das regiões beta-tubulina, calmodulina, histona e fator de alongação 1- α de espécimes de *Calonectria* spp. Os isolados selecionados nesse trabalho têm denominação iniciada por EH seguida por numeração e local de coleta 36
- Figura 3.** Aspecto da face superior (A) e inferior (B) da cultura do isolado EH-2530; Aspecto da face superior (C) e inferior (D) da cultura do isolado EH-2533; Aspecto da face superior (E) e inferior (F) da cultura do isolado EH-2536. Os tres isolados foram identificados morfometricamente como *Calonectria brassicae* 37
- Figura 4.** Isolados EH-2530, EH-2533 e EH-2536 identificados morfometricamente como *Calonectria brassicae*. Conidióforo e vesícula de EH-2530 (A); conidióforo e conídio de EH-2533 (B); vesícula clavada de EH-2536 (C); conídios de EH-2530 (D) e EH-2536 (F); conidióforo, conídios e vesícula de EH-2533 (E) 38
- Figura 5.** Plantas mortas de Desi 1606 após 25 dias da inoculação com *Calonectria brassicae* (EH-2530) (A); Plantas sintomáticas de BRS Cristalino após 25 dias da inoculação com *Ca. brassicae* (EH-2530) (B); Plantas sintomáticas de BRS Toro após 25 dias da inoculação com *Ca. brassicae* (EH-2533) (C); Plantas sintomáticas de Flip 03-109C após 25 dias da inoculação com *Ca. orientalis* (EH-2536) (D); Plantas sem sintomas (controle) (E) 39
- Figura 6.** Plantas sintomáticas do acesso Jamu-96 após 20 dias da inoculação com isolados de *Calonectria brassicae* (EH-2530 e EH-2533) (A); Plantas sintomáticas do acesso BRS Aleppo após 20 dias da inoculação com isolados de *Calonectria brassicae* (EH-2530 e EH-2533) (B); Plantas sintomáticas dos acessos ‘Gnp’ após 20 dias da inoculação com isolados de *Calonectria brassicae* (EH-2530 e EH-2533) (C) 42

RESUMO

TRINDADE, Nara Lúcia Souza Ribeiro. **Identificação de espécies de *Calonectria* e reação de acessos de grão-de-bico a isolados de *Calonectria brassicae***. 2019. 60p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brasil.

O grão-de-bico (*Cicer arietinum*) ocupa atualmente os primeiros lugares entre as *pulses* (leguminosas com sementes secas comestíveis) mais produzidas e consumidas no mundo. A rica composição nutricional e o elevado valor de mercado são os principais atrativos comerciais do grão-de-bico. No Brasil, a produção é ainda pequena, mas tem aumentado nos últimos anos. A introdução do cultivo dessa leguminosa em novas áreas tropicais pode ser problemática, em especial, devido à presença de doenças causadas por patógenos do solo, incluindo espécies de *Calonectria*. Esses fungos estão difundindo no país e causam perdas em várias hospedeiras, entre elas, leguminosas. O presente trabalho objetivou caracterizar isolados de espécies de *Calonectria* oriundos da Região Centro-Oeste do Brasil e avaliar a reação de acessos de grão-de-bico ao patógeno. Os isolados foram obtidos de plantas sintomáticas e, após cultivo em Batata Dextrose Agar (BDA), o DNA total foi extraído das amostras individuais para emprego em análises moleculares. Foram utilizadas as informações de sequência de quatro regiões genômicas: beta-tubulina, calmodulina, fator de alongação 1 α e histona. Um grupo de isolados obtidos de grão-de-bico apresentou alta similaridade com isolados de *Calonectria brassicae* e um segundo grupo com isolados classificados como *Ca. orientalis*, porém com menores níveis de identidade. A caracterização morfológica e morfométrica das estruturas reprodutivas dos isolados EH-2530, EH-2533 e EH-2536 (obtidos de distintas regiões geográficas) indicou que todos representam isolados da espécie *Ca. brassicae*. Foram conduzidos ensaios de patogenicidade dos isolados em sete acessos de grão-de-bico em casa de vegetação. Para avaliação da patogenicidade e agressividade dos isolados foi empregada uma escala de notas dos sintomas. Foram empregados os isolados EH-2530 e EH-2533 (ambos classificados como *Ca. brassicae*) e EH-2536 (*Ca. orientalis*). O experimento foi conduzido em um delineamento inteiramente casualizado (DIC), num arranjo em parcelas sub-sub-divididas com três repetições, sendo avaliados os sintomas nas plantas (duas plantas/vaso) entre 10 e 25 dias da inoculação. ‘Cícero’, ‘Desi 1606’, ‘Jamu-96’ e ‘Flip 03-109C’ apresentaram sintomas mais severos de murcha e podridões radicular e do colo, enquanto ‘BRS Aleppo’, ‘BRS Toro’ e ‘BRS Cristalino’ foram os acessos menos sintomáticos. Os isolados de *Ca. brassicae* se mostraram mais agressivos do que o isolado de *Ca. orientalis*. Em um outro ensaio em DIC, a reação de 38 acessos de grão-de-bico para os isolados de *Ca. brassicae* foi avaliada entre 7 e 20 dias após a inoculação, num arranjo em parcelas sub-divididas com cinco repetições. Dezenove acessos incluindo ‘Jamu-96’, ‘Desi 1606’, ‘Desi 1605’, ‘Flip 03-109C’, BRS Toro e BRS Cristalino’ apresentaram os sintomas mais severos da doença, enquanto os outros dezenove acessos, incluindo ‘BRS Aleppo’, ‘Cícero’ e demais acessos ‘Gnp’ derivados de ‘Cícero’ foram os menos afetados, sugerindo segregação natural dentro da cultivar. Neste contexto, o conjunto de informações gerado no presente trabalho pode auxiliar os programas de melhoramento genético do grão-de-bico para resistência a espécies de *Calonectria* e fornece importante subsídios para o estabelecimento de sistemas de manejo adequados e sustentáveis desse grupo de patógenos.

Palavras-chave: *Cicer arietinum*; *Calonectria brassicae*; *Calonectria orientalis*; murcha; podridão de raiz; resistência.

Orientador - Dr. Luiz Eduardo Bassay Blum - Universidade de Brasília

ABSTRACT

TRINDADE, Nara Lúcia Souza Ribeiro. **Identification of *Calonectria* species and reaction of chickpea accessions to *Calonectria brassicae* isolates.** 2019. 60p. Dissertation (Master of Science in Plant Pathology) – University of Brasília, Brasília, DF, Brazil.

Chickpea (*Cicer arietinum*) currently ranks first among the most produced and consumed pulses (legume with edible dry seeds) in the world. The rich nutritional composition and high market value are the main commercial attractions of chickpeas. In Brazil, production is still small, but it has been increasing in recent years. The introduction of cultivation of this legume in new tropical areas can be problematic, especially due to the presence of diseases caused by soil pathogens, including *Calonectria* species. These fungi are widespread in the country and cause losses in several hosts, including leguminous. The present work aimed to characterize isolates of *Calonectria* species from the Midwest region of Brazil and to evaluate the reaction of chickpea accessions to the pathogen. The isolates were obtained from symptomatic plants and, after cultivation in Potato Dextrose Agar (BDA), the total DNA was extracted from individual samples for molecular analysis. Sequence information from four genomic regions was used: beta-tubulin, calmodulin, elongation factor 1 α and histone. One group of chickpea isolates showed high similarity with *Calonectria brassicae* isolates and a second group with isolates classified as *Ca. orientalis*, but with lower levels of identity. The morphological and morphometric characterization of the reproductive structures of the isolates EH-2530, EH-2533 and EH-2536 (obtained from different geographical regions) indicated that they all represent isolates of the species *Ca. brassicae*. Pathogenicity assays of isolates were conducted in seven chickpea accessions in greenhouse. To evaluate the pathogenicity and aggressiveness of the isolates, a symptom score scale was used. Isolates EH-2530 and EH-2533 (both classified as *Ca. brassicae*) and EH-2536 (*Ca. orientalis*) were used. The experiment was conducted in a completely randomized design (DIC), in an arrangement in sub-subdivided plots with three replications, and plant symptoms (two plants/pot) were evaluated 10 to 25 days after inoculation. 'Cicero', 'Desi 1606', 'Jamu-96' and 'Flip 03-109C' showed more severe wilting and root and cervical rot, while 'BRS Aleppo', 'BRS Toro' and 'BRS Cristalino' were the less symptomatic accessions. *Ca. brassicae* isolates were more aggressive than *Ca. orientalis* isolates. In another DIC assay, the reaction of 38 chickpea accessions to *Ca. brassicae* isolates was evaluated between 7 and 20 days after inoculation in a split-plot arrangement with five replications. Nineteen accessions including 'Jamu-96', 'Desi 1606', 'Desi 1605', 'Flip 03-109C', 'BRS Toro' and 'BRS Cristalino' had the most severe symptoms of the disease, while the other nineteen accessions including 'BRS Aleppo', 'Cicero' and other 'Gnp' derived from 'Cicero' were the least affected, suggesting natural segregation within the cultivar. In this context, the set of information generated in the present work can help the chickpea genetic improvement programs for resistance to *Calonectria* species and provides important subsidies for the establishment of adequate and sustainable management systems of this group of pathogens.

Keywords: *Cicer arietinum*; *Calonectria brassicae*; *Calonectria orientalis*; wilt; root rot; resistance.

Guidance Committee - Dr. Luiz Eduardo Bassay Blum - University of Brasilia (Advisor)

1. INTRODUÇÃO

O grão-de-bico (*Cicer arietinum* L.) ocupa a terceira colocação em produção mundial de grãos entre as *pulses* (leguminosas com sementes secas comestíveis) mais importantes no mundo, juntamente com feijão e ervilha (FAO, 2017). O Brasil não é um grande produtor e consumidor de grão-de-bico, tendo que importar a maior parte do que é consumido, porém o seu cultivo começou a ganhar espaço, principalmente na Região Centro-Oeste, pela notável adaptação da cultura e desempenho de cultivares. Tornou-se uma alternativa para a diversificação da produção pelo atrativo econômico aos produtores interessados no mercado externo, em especial a Índia, que é o maior consumidor e importador mundial desse alimento (Artiaga *et al.*, 2015; Nascimento *et al.*, 2016).

As sementes do grão-de-bico destacam-se como fontes de proteína de alta qualidade, o que é relevante em países cuja base da alimentação protéica não se concentra na produção animal (Diapari *et al.*, 2014). Além dos aminoácidos essenciais, a leguminosa apresenta em sua composição carboidratos, ácidos graxos, minerais e vitaminas muito importantes para o bom funcionamento do organismo (Maiti, 2001; Jukanti *et al.*, 2012).

A introdução do grão-de-bico em novos ambientes expõe a cultura a diversos fatores que podem contribuir para uma baixa produtividade. Segundo Pande *et al.* (2010) as perdas de rendimento, devido a doenças, podem chegar a cem por cento. De acordo com Sharma & Muehlbauer (2007) e Nene *et al.* (2012), o grão-de-bico é atacado por vários agentes patogênicos, sendo grande parte deles fungos de solo, os quais estão presentes na maior parte das regiões produtoras. Esses patógenos causam importantes doenças, como a murcha vascular por *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* (Jendoubi *et al.*, 2017), podridão radicular por *Fusarium solani* (Cabral *et al.*, 2016), tombamento por *Pythium* spp. (Leisso *et al.*, 2009), podridão seca da raiz por *Rhizoctonia bataticola* (sin. *Macrophomina phaseolina*) (Sharma *et al.*, 2015) e

podridão do colo por *Sclerotium rolfsii* (Khan & Javaid, 2015) entre outros. *Calonectria* (Sinônimo: *Cylindrocladium*) é um gênero de fungos que possui muitas espécies que são patógenos de solo associados a uma variedade de hospedeiras em todo o mundo entre espécies florestais e agrícolas de importância econômica (Lombard *et al.*, 2010a), incluindo o grão-de-bico (Dianese *et al.*, 1987; Crous, 2002). De acordo com Alfenas *et al.* (2015), várias espécies de *Calonectria* são encontradas no Brasil, inclusive na Região Centro-Oeste, onde atualmente se concentra a maior área de produção de grão-de-bico no país.

Nos relatos de ocorrência de *Calonectria* spp. em cultivos comerciais no cerrado brasileiro (Dianese *et al.*, 1986; 1987; Ferreira & Dianese, 1999), o fungo foi identificado apenas pela observação de caracteres morfológicos. Nesse contexto, o aumento do uso das ferramentas moleculares em estudos voltados à identificação de espécies fúngicas impulsionou uma série de modificações em nível taxonômico de *Calonectria* spp. e, a partir da diferenciação filogenética dentro dessa espécie, obteve-se maior precisão nos resultados, comparando-se à identificação somente por critérios morfológicos (Crous *et al.*, 2006; Lombard *et al.*, 2010c).

Diante da escassez de informações sobre o gênero *Calonectria* como agente causal de doenças na cultura do grão-de-bico no Brasil e no mundo, o trabalho teve como objetivo a identificação morfológica e molecular de isolados de *Calonectria* obtidos de plantas dessa leguminosa provenientes de áreas na Região Centro-Oeste do Brasil. Além disso, foram conduzidos ensaios para caracterizar a patogenicidade de isolados de *Calonectria* bem como a reação de cultivares e linhagens de grão-de-bico a um subgrupo desses isolados fúngicos. Essa informação é considerada de extrema relevância para os programas de melhoramento genético e para o estabelecimento de sistemas de manejo adequados e sustentáveis desse grupo de patógenos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. O Grão-de-bico

O grão-de-bico (*Cicer arietinum* L.) pertence à família Fabaceae (sin. Leguminosae), subfamília Papilionaceae e tribo Cicereae. O gênero *Cicer* compreende 43 espécies botânicas sendo que 34 são consideradas perenes e nove anuais (Singh *et al.*, 2008). Apenas a espécie *C. arietinum* é cultivada (Singh *et al.*, 2008). De acordo com Tayyar & Waines (1996), a domesticação do grão-de-bico ocorreu em associação às culturas de trigo, cevada, centeio, ervilha, lentilha e linho com os primeiros registros no Egito e no Oriente Médio datando de cerca de 3.300 a.C. A região sudeste da Turquia, nas adjacências com a Síria, é considerada o centro de origem do grão-de-bico, onde ele é chamado ‘*lablabi*’ ou ‘*nakhut*’. No mundo, os nomes mais populares são ‘*bengal gram*’, ‘*chickpea*’ e ‘*garbanzo*’ (Singh *et al.*, 2014).

Segundo dados da FAO (2017), as zonas tropicais da África e da Ásia são áreas primárias do cultivo e diversificação do grão-de-bico e respondem por quase a totalidade da produção no mundo, embora a cultura tenha ganhando destaque em outros países, constituindo-se como um dos principais ingredientes em dietas vegetarianas e veganas.

O grão-de-bico é considerado em volume de produção mundial, a terceira *pulse*, nome a que são chamadas as leguminosas de alto valor nutritivo consumidas como grãos secos e incluem feijões, lentilhas e ervilhas (Akibode & Maredia, 2012; Joshi & Rao, 2017). De acordo com dados da FAO (2017), foram cultivados em 2016 no mundo 12 milhões de hectares de grão-de-bico, com uma produção aproximada de 11 milhões de toneladas. Destacam-se a Índia e o Paquistão que respondem juntos por quase 80% do total (Joshi & Rao, 2017). Outros grandes produtores mundiais são Austrália, Iran, Rússia, Turquia, Mianmar, Etiópia e Tanzânia. Nas Américas, os maiores produtores são Estados Unidos, com menos de 250 mil hectares e de 300 mil toneladas, seguido por México, Canadá e Argentina (FAO, 2017).

De acordo com os dados apresentados por Nascimento *et al.* (2016), a produção de grão-de-bico no Brasil ainda é incipiente, com menos de dez mil hectares de área de produção e, apesar do consumo ser pouco difundido entre os brasileiros, ainda é necessário importar, principalmente da Argentina e do México, a maior parte do que é consumido. Em 2016 foram importadas quase oito mil toneladas deste grão, gerando despesas em torno de sete milhões de dólares. A partir de 2015, foi observado um aumento no interesse do cultivo do grão-de-bico no país, tanto para diversificação na produção quanto pelo atrativo econômico visando a exportação, sendo que a expectativa é de uma demanda crescente (Nascimento *et al.*, 2016).

Segundo Singh & Diwakar (1995) o nome do gênero '*Cicer*' possui origem latina e deriva da palavra grega 'kikus' que significa força, o que pode estar relacionado ao seu alto valor nutricional. De acordo com os trabalhos de Maiti (2001) e Jukanti *et al.* (2012), o grão-de-bico é boa fonte de carboidratos, principalmente de cadeia longa (poli e oligossacarídeos) com metabolização mais lenta no organismo, além de açúcares simples (glicose e sacarose) em menor proporção. Essa leguminosa se destaca pelo teor protéico de alta qualidade, contendo a maioria dos aminoácidos essenciais (Braga *et al.*, 1997). O triptofano, presente em sua composição, é o aminoácido precursor da produção da serotonina no organismo, hormônio que ativa a sensação de bem-estar e satisfação (Maiti, 2001). O grão-de-bico é rico em ácidos graxos insaturados como o ômega 3 e o 6, que auxiliam na prevenção de doenças cardiovasculares, apresenta elevadas concentrações de Ca, Mg, P, K, além de vitaminas (riboflavina, niacina, tiamina e folato) e pró-vitaminas (ex. beta-caroteno) e importantes esteróis como beta-sitosterol, campesterol e estigmasterol (Luengo *et al.*, 2011; Jukanti *et al.*, 2012). Segundo Udaogora (2012), o grão-de-bico atua na redução dos efeitos de radicais livres no organismo e seus possíveis danos ao DNA e a outras estruturas.

A planta do grão-de-bico é diploide ($2n = 2x = 16$), autógama, herbácea, possui hastes ramificadas a partir da base e cobertas por densa pubescência (Singh & Saxena, 1999).

Reproduz-se por sementes e a germinação é do tipo hipógea, onde os cotilédones permanecem sob o solo com o surgimento dos primórdios foliares e radícula (Vieira & Vieira, 2001; Redden & Berger, 2007). As folhas são compostas e imparipinadas em sua maioria, porém alguns acessos possuem folhas simples (Singh & Diwakar, 1995). As flores são pequenas e predominantemente de cor branca ou púrpura. As vagens são infladas e podem conter uma ou duas sementes, embora até quatro sementes já tenham sido registradas (Singh & Saxena, 1999).

De acordo com Upadhyaya *et al.* (2008) e Gaur *et al.* (2010), o grão-de-bico pode ser classificado em dois tipos botânicos/agronômicos/varietais: desi e kabuli. O tipo desi é caracterizado por sementes com superfície áspera, angular, tegumento com coloração mais escuras (verde, marrom, preto), pigmentação antocianina no caule, flores e outras partes da planta, hábito de crescimento ereto ou semi-ereto. O tipo kabuli apresenta sementes com superfície lisa, geralmente de coloração bege clara e em formato de ‘cabeça de carneiro’, flores brancas, ausência de pigmentação antocianina nas plantas e hábito de crescimento semi-ereto, principalmente.

As plantas de grão-de-bico apresentam um sistema radicular vigoroso, formado por raiz principal e ramificações de raízes laterais. O tecido parenquimático é rico em amido e as raízes podem chegar a dois metros de profundidade (Gaur *et al.*, 2010). O grão-de-bico tem capacidade de formar nódulos com rizóbios para fixação biológica de nitrogênio e essa característica favorece o seu cultivo de forma sustentável. Laranjo *et al.* (2008), relataram que *Mesorhizobium* sp. é um eficiente nodulador e Mandal & Sinharoy (2019), utilizaram cepas de *Mesorhizobium* para verificar a localização de marcadores subcelulares nas raízes de grão-de-bico e confirmaram que a forma dos bacteróides (alteração morfofisiológica dos rizóbios) nas zonas de nodulação está diretamente correlacionada com a eficiência da fixação de nitrogênio.

O cultivo do grão-de-bico é apropriado em sistemas de rotação de culturas, pois além de contribuir com a fertilidade do solo para as culturas sucessoras pelo acréscimo de nitrogênio,

se mostra eficiente na redução do uso da água por ser uma cultura tolerante à escassez hídrica (Pande *et al.*, 2011). Sua considerável tolerância ao déficit hídrico entre outras características, fazem do grão-de-bico uma cultura rústica (Pande *et al.*, 2011). Mesmo sendo uma cultura de clima frio, se adapta bem em regiões de clima tropical, com um potencial produtivo que pode superar 2 t.ha⁻¹, já que a média da produção mundial é inferior a 1 t.ha⁻¹ (Mota, 2013; Avelar *et al.*, 2018).

Estudos com a cultura apontam que a melhor época de plantio no Brasil é no inverno e, na Região Centro-Oeste, o período mais favorável para o plantio vai de fevereiro até a primeira quinzena de maio com colheita de julho até a primeira quinzena de setembro (Nascimento *et al.*, 2014). Atualmente, pesquisas com o grão-de-bico têm avançado no Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais e Rio Grande do Sul (Nascimento *et al.*, 2016).

De acordo com Braga *et al.* (1997), uma das contribuições pioneiras nos estudos com o grão-de-bico no Brasil foi realizada pelo Instituto Agrônomo de Campinas - IAC com o lançamento da cultivar IAC-Marrocos em 1989, introduzida do Marrocos em 1964. Mais recentemente, a Embrapa Hortaliças, com o registro da cultivar Cícero em 2002 e da cultivar BRS Aleppo em 2014, assumiu a liderança no desenvolvimento e condução de pesquisas com o grão-de-bico no Brasil, sendo apoiada por parcerias como a do Instituto ICARDA (International Center for Agricultural Research in the Dry Areas) na Índia, com a cessão de cedido acessos de seu banco de germoplasma. A Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (FAPDF) e produtores da região Centro-Oeste têm sido fomentadores do desenvolvimento de cultivares de grão-de-bico mais adaptadas às condições brasileiras, com melhor desempenho em termos de produtividade e de resistência a pragas e doenças (Nascimento *et al.*, 2016).

Em virtude do aumento da área cultivada com o grão-de-bico e do interesse pela cultura no Brasil, estudos nas diversas áreas vem sendo desenvolvidos (fitotecnia, fitopatologia,

entomologia), buscando-se obter um maior aporte intelectual, em especial com possíveis danos que a cultura venha a sofrer e que possam comprometer o seu uso.

2.2. Problemas relatados na cultura do grão-de-bico

Segundo Pande *et al.* (2011) o grão-de-bico é suscetível a distúrbios por fatores abióticos como o estresse ao frio, seca e salinidade e fatores bióticos, como o ataque por insetos, competição por plantas daninhas e doenças causadas por fungos, bactérias, nematoides, vírus e fitoplasmas, embora nem todos representem impacto significativo para a cultura.

Arvayo-Ortiz *et al.* (2012), relataram que as doenças fúngicas são as mais numerosas e mais importantes na cultura do grão-de-bico. Diante de muitos relatos de perdas econômicas relacionados à cultura no mundo, destacam-se a queima de *ascochyta* e a murcha vascular causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* Matuo & K. Sato com potencial de inviabilizar completamente os campos de produção (Cunnington *et al.*, 2007; Jimenez-Díaz *et al.*, 2015).

A queima de *ascochyta* (causada por *Ascochyta rabiei* [Pass.] Labrousse) é a doença foliar mais importante do grão-de-bico em todo o mundo. Essa enfermidade tem um efeito devastador na produção da cultura, causando perdas de rendimento que podem chegar a 100%. Pela natureza instável do patógeno, raças evoluem continuamente e quebram a resistência do hospedeiro, reduzindo a vida útil das cultivares (Chen *et al.*, 2004; Singh *et al.*, 2014).

A murcha do grão de bico causado por *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* ocorre em 32 países nos seis continentes. As perdas de rendimento causadas pelo patógeno variam de 10 a 90%. Atualmente há oito raças fisiológicas dessa espécie, sendo muito difícil desenvolver cultivares que mostram estabilidade à doença em diferentes regiões, além da persistência do fungo no solo ano após ano, na ausência da hospedeira (Singh *et al.*, 2014). Os clamidósporos (esporos de resistência do patógeno) de *F. oxysporum* podem ter uma ou duas células e são resultantes da transformação das hifas, podendo permanecer viáveis no solo por anos, ressaltando-se a

importância da adoção de medidas que impeçam a entrada do fungo em áreas onde ainda não foi constatada a murcha (Costa *et al.*, 2007).

Com o avanço da produção do grão-de-bico pelo mundo, algumas doenças ganharam importância pela dificuldade de controle (Sharma & Pande, 2013). Um grupo muito importante de patógenos para a cultura é o chamado complexo de doenças do solo (‘soil-borne diseases’). Esse complexo é composto por fungos habitantes do solo e está associado à ocorrência de podridão do colo e raiz, refletindo, muitas vezes, na murcha das plantas. Esses fungos podem agir isoladamente ou em conjunto, sendo difícil a diferenciação dos agentes causais exclusivamente via sintomas, uma vez que os quadros sintomatológicos são muito semelhantes (Nene *et al.*, 2012).

Outros fungos associados ao complexo de doenças do solo no cultivo do grão-de-bico no Brasil e no mundo são: *Fusarium solani* [Mart.] Sacc. (Cabral *et al.*, 2016; Azevedo *et al.*, 2017), *Pythium* spp. Ness (Leisso *et al.*, 2009), *Rhizoctonia bataticola* [Taubenh.] (sin. *Macrophomina phaseolina* [Tassi] Goid.) (Sharma *et al.*, 2015), *Sclerotium rolfsii* Sacc. (Khan & Javaid, 2015) e *Calonectria* spp. De Not. (sin. *Cylindrocladium* spp. Morgan), relatado no grão-de-bico pela primeira vez no Brasil por Dianese *et al.* (1986), associado à podridão radicular.

O controle de doenças de plantas pela resistência é uma das estratégias mais desejáveis. No entanto, pouco progresso foi obtido no melhoramento genético do grão-de-bico visando à seleção de acessos resistentes às doenças causadas por patógenos de solo e, há muito trabalho ainda a ser feito pela pesquisa em diversos patossistemas que seguem ainda pouco explorados (Singh *et al.*, 2014).

2.3. O gênero *Calonectria*: taxonomia e aspectos gerais

A ordem Hypocreales (Hypocreomycetidae, Sordariomycetes, Pezizomycotina, Ascomycota) é composta por aproximadamente 2.700 espécies de fungos divididos em oito famílias (Crous *et al.* 2014). A família Nectriaceae está dividida em cerca de 55 gêneros e esses subdividem-se em, aproximadamente, 900 espécies, incluindo *Calonectria* spp. (www.mycobank.org/). A partir de estudos dentro de Nectriaceae envolvendo conceitos taxonômicos com base em inferência filogenética multi-gênica, gêneros importantes de fitopatopatógenos foram subdivididos em vários novos gêneros ou, por vezes, combinados e um único gênero (Chaverri *et al.* 2011). Estes estudos mais refinados permitiram o ressurgimento ou re-adoção de alguns dos nomes genéricos mais antigos tais como *Calonectria* (Lombard & Crous, 2012). O estudo desenvolvido por Crous *et al.* (2006), foi precursor ao descrever novos gêneros em Botryosphaeriaceae ligados a linhagens filogenéticas na família e usando o nome mais antigo do fungo, independentemente de se tratar de forma assexual ou sexual. Seguindo o mesmo critério, Lombard *et al.* (2009, 2010a, b, c), descreveram espécies de *Cylindrocladium* usando o nome genérico mais antigo *Calonectria*.

No início dos anos 1990, impulsionados pelo estudo pioneiro de Berbee & Taylor (1992), os métodos moleculares começaram a ter um impacto significativo na taxonomia dos fungos quando baseados em inferência filogenética, proporcionando grandes contribuições no estabelecimento de novas organizações taxonômicas neste grupo de organismos. Segundo Crous *et al.* (2015), tais estudos, com informações cada vez mais robustas, reforçaram alguns questionamentos, como o da perpetuação de uma dupla nomenclatura para fungos. De acordo com Crous *et al.* (2006), o acúmulo exponencial de dados das sequências de DNA de fungos revelou importantes descobertas. Fungos, antes considerados causadores de determinadas doenças de plantas, na verdade não as causavam ou ocupavam táxons diferentes dos que pertenciam anteriormente. A inferência filogenética tornou possível o reconhecimento de

diferenças entre espécies de forma mais precisa, mas não excluiu a aplicação de estudos com base nas características morfológicas, ecológicas e outras, que são complementares nos estudos de identificação de espécies (Lombard *et al.*, 2010a). Cerca de 150 espécies de *Calonectria* já foram descritas com base em comparações de dados da sequência de DNA (Lombard *et al.*, 2016, Marin-Felix *et al.*, 2017). De acordo com Jayawardena *et al.* (2019), os marcadores genéticos mais recomendados para identificação ao nível de espécie para *Calonectria* são beta-tubulina (TUB), fator de alongação TEF 1- α (translation elongation factor 1- α –TEF 1- α), calmodulina (cmdA), histona (His3) e actina (AC).

Os fungos desse gênero apresentam ascomas coloridos (alaranjado, avermelhado) que mudam de cor quando colocadas em solução de KOH a 3% e formam peritécios com aspecto de verrugas formando bases estromáticas escuras (Chaverri *et al.* 2011). De acordo com Crous & Wingfield (1994), *Calonectria* spp. em sua fase ‘anamorfa’ (*Cylindrocladium* spp.), caracteriza-se por apresentar esporulação esbranquiçada, conidióforos penicilados de onde se originam uma estrutura denominada estipe terminando em uma vesícula de formato variado e conídios cilíndricos. Os anamorfos são as formas mais encontradas e apresentam grande variabilidade quanto às características morfológicas, incluindo forma e tamanho das vesículas (clavada, esférica, piriforme, fusiforme e outras), comprimentos de estipe, número de septos (uni ou multiseptados) e tamanho dos conídios (Crous & Wingfeld, 1994; Lombard *et al.*, 2015). Apesar da variação morfológica intraespecífica existente em *Calonectria*, em especial quanto às características da vesícula e conídios, tais critérios não são suficientes para a identificação em nível de espécie de forma precisa, reforçando a importância da aplicação das técnicas moleculares e estudos filogenéticos (Crous *et al.*, 2006; Lombard *et al.*, 2015).

O gênero *Calonectria* (Anamorfo: *Cylindrocladium* Morgan, 1892) foi descrito em 1867 por De Notari, inclui vários patógenos importantes que causam danos significativos a muitas hospedeiras (Lombard *et al.*, 2010a; Alfenas *et al.*, 2015). Cerca de 335 espécies de plantas de

100 famílias são hospedeiras de *Calonectria* spp. incluindo espécies silvícolas, das quais as mais importantes estão associadas às famílias Fabaceae (*Acacia* spp.), Myrtaceae (*Eucalyptus* spp.) e Pinaceae (*Pinus* spp.). Em *Eucalyptus* spp., as espécies de *Calonectria* associadas a doenças podem causar queima das folhas e desfolhamento. Segundo Lombard *et al.* (2015) e Alfenas *et al.* (2015), além de espécies florestais, *Calonectria* spp. também estão associadas a hospedeiras herbáceas de grande importância econômica como amendoim, batata, ervilha, soja e ornamentais, além do grão-de-bico (Dianese *et al.*, 1987; Crous, 2002).

O gênero *Calonectria* é composto essencialmente por fungos do solo, entretanto, além dos sintomas comuns à infecção por esse tipo de patógeno, como as podridões com tecidos necróticos na base do caule (colo) e radicular, associadas a desfolhamento e murcha, podem ocorrer também outros sintomas como, por exemplo, cancro (nas hastes), ferrugem (nas folhas) e lesões necróticas (nos frutos) de algumas hospedeiras (Lombard *et al.*, 2010a, 2015).

Grande parte dos estudos no Brasil conduzidos com espécies de *Calonectria* foram realizados utilizando-se *Eucalyptus* spp. onde a doença se desenvolve principalmente em regiões úmidas e de alta temperatura causando queima das folhas e tombamento (‘damping-off’) em mudas (Blum *et al.*, 1992; Alfenas *et al.*, 2015; Schultz *et al.*, 2015; Freitas, 2016). No entanto há trabalhos como o de Lopes & Reifschneider (1982), que relataram pela primeira vez no país *Cylindrocladium clavatum* causando podridão do colo em ervilha (*Pisum sativum* L.), Ferreira & Dianese (1999) que identificaram *Cylindrocladium clavatum* (sin. *Calonectria brassicae*) como componente de um complexo de patógenos causadores de podridão radicular em soja (*Glycine max* L.) nos solos do cerrado do brasileiro. Outros estudos com patógenos do gênero *Calonectria* foram conduzidos com o morangueiro (*Fragaria x ananassa*) associado ao apodrecimento dos frutos (Lopes *et al.*, 2018), espatifílio ou lírio da paz (*Spathiphyllum wallisii*) associado à podridão de raiz e colo (Reis *et al.*, 2004) e erva-mate (*Ilex paraguariensis*) associada à pinta-preta (Grigoletti Júnior & Lau, 1999), os quais demonstraram a potencialidade

de danos de *Calonectria* spp. em relação a diferentes hospedeiras.

Por todos os motivos apresentados há a necessidade de se ampliar o conhecimento sobre esse importante fungo fitopatogênico presente nos solos brasileiros, em especial na região central do Brasil, onde o grão-de-bico tem avançado em proporção de área cultivada, podendo representar um fator de risco ao desenvolvimento da cultura e o seu estabelecimento como alternativa de produção.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios foram conduzidos nas dependências do Centro Nacional de Pesquisa de Hortaliças – CNPH (Coordenadas S 15° 55' 56,0" e W 48° 08' 40,5") a aproximadamente 1000 metros de altitude (Rodovia BR 060, km 09, S/N – Fazenda Tamanduá, Brasília-DF).

3.1. Obtenção, isolamento e armazenamento dos isolados

Os isolados utilizados foram obtidos a partir da coleta de plantas de grão-de-bico apresentando sintomas de murcha, podridão do colo e radicular, provenientes de campos de produção da cultura em áreas na Região Centro-Oeste (Tabela 1) entre 2018 e 2019. As plantas coletadas foram encaminhadas ao Laboratório de Fitopatologia do CNPH, onde foi descartada a parte aérea e realizada a desinfestação superficial na região do colo e raiz por sucessivas lavagens em água corrente e em álcool etílico (70%) (Adaptado de Fernandez, 1993).

Com auxílio de uma lâmina de bisturi esterilizada, foram seccionados fragmentos (~ 2 mm) nos pontos de intersecção das lesões do colo e raiz com o tecido sadio. Os fragmentos foram depositados em placas de Petri com meio BDA_t [batata-dextrose-ágar + tetraciclina (50 µg/mL⁻¹)]. As placas foram mantidas por 48 horas à temperatura ambiente. Após esse período, em dias consecutivos, fragmentos de hifa foram retirados e transferidos para novas placas com meio BDA_t até a obtenção de culturas puras. Os isolados receberam identificação e foram incluídos na Coleção Micológica do Laboratório de Fitopatologia do CNPH. Os isolados utilizados foram: EH-2527, EH-2529, EH-2530 (originários de Gama/DF), EH-2536 (originário de Campo Verde/MT), EH-2531, EH-2533, EH-2545, EH-2586 e EH-2589 (originários de Cristalina/GO) coletados entre os anos de 2018 e 2019.

3.2. Identificação molecular dos isolados *Calonectria* spp.

As etapas realizadas para a identificação molecular dos isolados foram realizadas nos Laboratórios de Fitopatologia e de Análise Genômica do CNPH.

3.2.1. Extração de DNA genômico dos isolados

A extração foi realizada a partir de micélio obtido dos isolados cultivados por 7-10 dias em placas de Petri com meio batata dextrose ágar (BDA), mantidas em incubadora (Luz / 12 horas; $25\pm 1^\circ\text{C}$). A extração de DNA foi realizada de acordo com a metodologia de CTAB 2X com algumas modificações (Boiteux *et al.*, 1999). Pequena quantidade de micélio de cada isolado foi transferida para tubos Eppendorf contendo 250 μL de CTAB. Em cada tubo foram colocadas seis esferas metálicas, juntamente com o micélio fúngico. As amostras foram trituradas no aparelho Precellys® 24 (Bertin Technologies). Após 30 segundos de agitação a 5.000 rpm, as amostras foram retiradas e colocadas em banho-maria a 65°C durante 10 minutos. Após isto, acrescentou-se 750 μL de clorofil em cada tubo e estes foram agitados em vortex por 30 segundos. As amostras foram centrifugadas por 9.000 rpm durante 5 minutos. Cuidadosamente, os tubos foram retirados da centrífuga e 600 μL do sobrenadante foram retirados e colocados em novos tubos de micro-centrífuga. Foram acrescentados 300 μL de isopropanol gelado e para homogeneizar, os tubos foram suavemente agitados de forma manual e posteriormente centrifugados a 13.000 rpm durante 13 minutos. O sobrenadante foi eliminado e o 'pellet' lavado cuidadosamente com álcool 70%, e então, os tubos foram colocados em estufa (37°C / 20 minutos). Posteriormente, foi acrescentado 100 μL de TE+RNAse aos tubos e então mantidos em refrigerador (5°C). Doze horas após, os tubos com DNA foram agitados (vortex) e guardados em freezer ($- 20^\circ\text{C}$). As quantificações das amostras de DNA foram feitas visualmente através de eletroforese em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídeo (1,5 $\mu\text{L}/100\text{ mL}$ de gel), comparando-se com amostras de concentração conhecida de DNA λ (20 a 400 ng).

3.2.2. Reação em cadeia da polimerase – PCR

Para todas as reações da PCR foi usado 50 µL, sendo desse volume 3,0 µL de DNA (50ng/µL) e 47 µL do *Master Mix* preparado com os seguintes componentes: 31,6 µL de água ultrapura esterilizada; 5,0 µL de tampão (tris-HCl 10 mM, KCl 500 mM, MgCl₂ 15 mM); 4,0 µL de MgCl₂; 1,0 µL de solução 20mM de nucleotídeos (dNTPs); 2,6 µL de *primer* (10 µM) senso; 2,6 µL de *primer* (10 µM) antisenso; 0,2 µL Taq-DNA-polimerase (5U/µL). As sequencias de DNA de todos os isolados foram amplificadas e sequenciadas com os iniciadores das regiões beta-tubulina, calmodulina, histona e fator de alongação 1- α (Tabela 1).

Tabela 1. Região genômica (RG) e iniciadores para a identificação molecular e filogenia de isolados de *Calonectria* obtidos de plantas de grão-de-bico no Brasil Central.

RG	Iniciador	Sequencia 5'-3'	Sentido	Referencia	°C*
Beta-tubulina	Bt2a T1	5'GGTAACAAATCGGTGCTGCTTC 3' 5'AACATGCGTGAGATTGTAAGT 3'	Senso Antisens o	(Glass & Donaldson, 1995) (O'Donnell & Cigelnik, 1997)	58
Calmodulina	CAL-228F CAL-737R	5'GAGTTCAAGGAGGCCTTCTCCC 3' 5'CATCTTTCTGGCCATCATGG 3'	Senso Antisens o	(Carbone & Kohn, 1999) Carbone & Kohn, 1999)	55
Histona H3	CYLH3F CYLH3R	5'AGGTCCACTGGTGGCAAG 3' 5'AGCTGGATGTCCTTGGACTG 3'	Senso Antisens o	(Crous <i>et al.</i> , 2004) (Crous <i>et al.</i> , 2004)	52
Fator elong. 1- α	EF1-728F EF1-986R	5'CATCGAGAAGTTCGAGAAGG 3' 5'TACTTGAAGGAACCCTTACC 3'	Senso Antisens o	(Carbone & Kohn, 1999) Carbone & Kohn, 1999)	58

*Temperatura de anelamento

Amostras dos produtos das reações de PCR (5µL) foram aplicados em gel de agarose (1%), utilizando marcador (P.M. 1kb) de DNA ladder (Invitrogen® Life Technologies), em cuba de voltagem (100 V). Os produtos obtidos pela PCR foram purificados e sequenciados.

3.2.3. Purificação dos produtos de PCR

A purificação dos produtos de PCR foi feita conforme o protocolo de fabricação do kit ReliaPrep™ DNA Clean-up and Concentration System – Promega® e a quantificação final por análise em gel de agarose a 1,5%.

3.2.4. Sequenciamento dos amplicons

O sequenciamento Sanger dos amplicons foi realizado em um sequenciador ABI PRISM

3130 pertencente ao Laboratório de Análise Genômica do CNPH, utilizando-se o Kit ABI Prism BigDye[®] version 3.1 (Applied Biosystems do Brasil). A análise da qualidade das sequências, remoção dos segmentos de baixa qualidade e a obtenção das sequências consenso foram realizadas usando o programa SeqMan[®] (Lasergene, Madison, Wisconsin-WI) (Alex, 1999). As sequências foram comparadas com as disponíveis no banco de dados do GenBank, empregando-se o algoritmo BLASTn (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/). O tamanho de cada região variou, sendo 517 pb (pares de bases) para beta tubulina, 430 pb (calmodulina), 431 pb (histona) e 261 pb (fator de alongação 1- α).

3.2.5. Análise Filogenética

As sequências resultantes do sequenciamento Sanger foram montadas no programa Geneious Prime 2019 (Kearse *et al.*, 2012) e corrigidas manualmente. Após a montagem, todas as sequências foram analisadas com a ferramenta BLAST (Altschul *et al.*, 1990) e aquelas que não eram do gênero *Calonectria* foram removidas pela possibilidade de contaminação em alguma etapa prévia. Acessos das regiões genômicas de *Calonectria* utilizadas foram retiradas de Alfenas *et al.* (2015) e baixadas do GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank) (Tabela 2).

O alinhamento foi realizado separadamente para cada região genômica no ‘software’ mencionado, com o algoritmo MAFFT (Kato et al., 2002). As extremidades foram removidas manualmente. A escolha do modelo filogenético mais adequado para cada alinhamento foi realizada no programa MEGA X (Kumar et al., 2018) sendo selecionado o modelo GTR+G+I (Tavaré & Miura, 1986) para todas as regiões. A análise filogenética foi realizada por inferência Bayesiana no plugin do MrBayes (Huelsenbeck & Ronquist, 2001) no Geneious Prime 2019 com 2 milhões de gerações e 25% de burn in. Após a análise da topologia da árvore filogenética de cada região genômica, os alinhamentos foram concatenados para a análise final. Como outgroup, foi utilizado o isolado código CBS 134846 de *Calonectria eucalypticola*, selecionado devido à distância filogenética em comparação ao clado que está sendo estudado.

Tabela 2. Acessos de *Calonectria* obtidos do GenBank e as correspondentes regiões genômicas [beta-tubulina (tub2), fator de alongação TEF 1- α (TEF 1- α), calmodulina (cmdA), histona (his3)] utilizadas para análise filogenética (informações obtidas de Alfenas *et al.* (2015).

Espécies	Isolados	Localidade	Coletor	Código de acesso no GenBank			
				tub2	cmdA	his3	tef1- α
<i>Calonectria brachiatica</i>	CBS 123699; CMW 25302	Colômbia	M.J. Wingfield	FJ716708	GQ267365	FJ716712	GQ267295
<i>Calonectria brachiatica</i>	CBS 123700 ; CMW 25298	Colômbia	M.J. Wingfield	FJ696388	GQ267366	FJ696396	GQ267296
<i>Calonectria brachiatica</i>	CBS134665; LPF305	Brasil	R.F. Alfenas	KM395933	KM396020	KM396103	KM395846
<i>Calonectria brachiatica</i>	CBS134666; LPF298	Brasil	R.F. Alfenas	KM395934	KM396021	KM396104	KM395847
<i>Ca. brassicae</i> (= <i>Cy. clavatum</i>)	CBS 134657; LPF236	Brasil	E. Zauza	KM395918	KM396005	KM396088	KM395831
<i>Ca. brassicae</i> (= <i>Cy. clavatum</i>)	CBS 134658; LPF234	Brasil	E. Zauza	KM395919	KM396006	KM396089	KM395832
<i>Ca. brassicae</i> (= <i>Cy. clavatum</i>)	CBS 134659; LPF216	Brasil	D.B. Pinho	KM395920	KM396007	KM396090	KM395833
<i>Ca. brassicae</i> (= <i>Cy. clavatum</i>)	CBS 134660; LPF493	Brasil	D.B. Pinho	KM395921	KM396008	KM396091	KM395834
<i>Ca. brassicae</i> (= <i>Cy. clavatum</i>)	LPF235	Brasil	E. Zauza	KM395922	KM396009	KM396092	KM395835
<i>Ca. brassicae</i> (= <i>Cy. clavatum</i>)	LPF237	Brasil	E. Zauza	KM395923	KM396010	KM396093	KM395836
<i>Ca. clavata</i>	CBS 114557 ; ATCC 66389; CPC 2536	EUA	C.P. Seymour & E.L. Barnard	AF333396	GQ267377	DQ190623	GQ267305
<i>Ca. clavata</i>	CBS 114666; CMW 30994; CPC 2537	EUA	D. Ferrin & N.E. El-Gholl	DQ190549	GQ267378	DQ190624	GQ267306
<i>Ca. duoramosa</i>	CBS 134656 ; LPF434	Brasil	R.F. Alfenas	KM395940	KM396027	KM396110	KM395853
<i>Ca. duoramosa</i>	LPF453	Brasil	R.F. Alfenas	KM395941	KM396028	KM396111	KM395854
<i>Ca. ecuadoriae</i>	CBS 111394; CPC 1628	Equador	M.J. Wingfield	DQ190599	GQ267376	DQ190704	GQ267304
<i>Ca. ecuadoriae</i>	CBS 111406 ; CPC 1635	Equador	M.J. Wingfield	DQ190600	GQ267375	DQ190705	GQ267303
<i>Ca. eucalypticola</i>	CBS 134846; LPF121	Brasil	A.C. Alfenas	KM395963	KM396050	KM396133	KM395876
<i>Ca. gracilis</i>	CBS 111284	Brasil	P.W. Crous	DQ190567	GQ267408	DQ190647	GQ267324
<i>Ca. gracilis</i>	CBS 111807	Brasil	M. Aragaki	AF232858	GQ267407	DQ190646	GQ267323
<i>Ca. orientalis</i>	CMW 20273	Indonésia	M.J. Wingfield	GQ267237	GQ267449	GQ267286	GQ267357
<i>Ca. orientalis</i>	CMW 20291	Indonésia	M.J. Wingfield	GQ267236	GQ267448	GQ267285	GQ267356
<i>Ca. paraensis</i>	CBS 134669 ; LPF430	Brasil	R.F. Alfenas	KM395924	KM396011	KM396094	KM395837
<i>Ca. paraensis</i>	LPF306	Brasil	R.F. Alfenas	KM395925	KM396012	KM396095	KM395838
<i>Ca. paraensis</i>	LPF308	Brasil	R.F. Alfenas	KM395926	KM396013	KM396096	KM395839
<i>Ca. paraensis</i>	LPF309	Brasil	R.F. Alfenas	KM395927	KM396014	KM396097	KM395840
<i>Ca. paraensis</i>	LPF429	Brasil	R.F. Alfenas	KM395928	KM396015	KM396098	KM395841
<i>Ca. pini</i>	CMW 31209	Colômbia	C.A. Rodas	GQ267224	GQ267436	GQ267273	GQ267344
<i>Ca. pini</i>	CMW 31210	Colômbia	C.A. Rodas	GQ267225	GQ267437	GQ267274	GQ267345
<i>Ca. pseudobrassicaceae</i>	CBS 134661; LPF260	Brasil	A.C. Alfenas	KM395935	KM396022	KM396105	KM395848
<i>Ca. pseudobrassicaceae</i>	CBS 134662 ; LPF280	Brasil	A.C. Alfenas	KM395936	KM396023	KM396106	KM395849
<i>Ca. quinquerosa</i>	CBS 134654 ; LPF065	Brasil	R.F. Alfenas	KM395942	KM396029	KM396112	KM395855
<i>Ca. quinquerosa</i>	CBS 134655; LPF281	Brasil	A.C. Alfenas	KM395943	KM396030	KM396113	KM395856
<i>Ca. quinquerosa</i>	CBS 134863; LPF302	Brasil	R.F. Alfenas	KM395944	KM396031	KM396114	KM395857
<i>Ca. robigophila</i>	CBS 134652 ; LPF192	Brasil	R.F. Alfenas	KM395937	KM396024	KM396107	KM395850
<i>Ca. robigophila</i>	CBS 134653; LPF193	Brasil	R.F. Alfenas	KM395938	KM396025	KM396108	KM395851
<i>Ca. robigophila</i>	LPF190	Brasil	R.F. Alfenas	KM395939	KM396026	KM396109	KM395852

Espécies	Isolados	Localidade	Coletor	Código de acesso no GenBank			
				<u>tub2</u>	<u>cmdA</u>	<u>his3</u>	<u>tef1-α</u>
<i>Ca. telluricola</i>	CBS 134663; LPF214	Brasil	D.B. Pinho	<u>KM395929</u>	<u>KM396016</u>	<u>KM396099</u>	<u>KM395842</u>
<i>Ca. telluricola</i>	CBS 134664 ; LPF217	Brasil	E. Zauza	<u>KM395930</u>	<u>KM396017</u>	<u>KM396100</u>	<u>KM395843</u>
<i>Ca. telluricola</i>	CBS 134667; LPF263	Brasil	E. Zauza	<u>KM395931</u>	<u>KM396018</u>	<u>KM396101</u>	<u>KM395844</u>
<i>Ca. telluricola</i>	CBS 134668; LPF254	Brasil	E. Zauza	<u>KM395932</u>	<u>KM396019</u>	<u>KM396102</u>	<u>KM395845</u>

3.3. Caracterização morfológica de isolados *Calonectria* spp.

A partir de colônias em placas de BDA incubadas por sete dias, foram preparadas microculturas (cultivo em meio mínimo sobre lâminas em condições de umidade saturada) visando induzir a formação de estruturas reprodutivas dos isolados de *Calonectria* (EH-2530, EH-2533 e EH-2536) as dimensões e formatos de vesícula, conidióforos bem como as dimensões e formatos dos conídios foram avaliados para amostras dos três isolados. Foram retirados discos coloniais de *Calonectria* e as amostras fixadas em lactoglicerol entre lâmina e lamínula para observação em microscópio de luz. As imagens das estruturas fúngicas foram obtidas com uma câmera Leica DFC 490 conectada a computador. As análises morfológicas foram realizadas com o programa Leica QWin-Plus. As medidas referentes às estruturas fúngicas foram realizadas com 30 repetições e consideradas as dimensões extremas.

3.4. Preparo das suspensões de inóculo para o teste de patogenicidade com *Calonectria*

Na câmara de fluxo contínuo os fragmentos preservados de *Calonectria* spp. (obtidos conforme descrito no tópico 3.1) foram colocados sobre papel filtro esterilizado, para absorção do excesso de água. Em seguida, foram depositados em placas de Petri com meio BDA (um fragmento por placa) e levados para uma câmara incubadora tipo BOD (luz 12/12h a 25±1°C).

Após a incubação nessas condições por cinco dias, os meios de cultura foram “raspados” com o auxílio de um bisturi esterilizado para “ferir” o micélio fúngico, favorecendo a formação de conídios, o que ocorreu dois dias após esse procedimento e as placas serem deixadas em BOD nas condições descritas acima.

Cada placa com esporulação do fungo recebeu 20 mL de água destilada e com o auxílio de uma escova de cerdas macias, os conídios foram raspados da superfície da cultura, ficando livres na suspensão. A suspensão de conídios foi retida em um bequer e depositada a alíquota de 1ml da suspensão na câmara de Neubauer para visualização e contagem de conídios sob Microscópio Óptico (400X). A suspensão de cada isolado foi diluída para 2×10^5 conídios.mL⁻¹.

3.5. Patogenicidade de Isolados *Calonectria* spp. aos acessos de grão-de-bico

A agressividade de isolados de *Calonectria* spp. foi avaliada pela mensuração da severidade da doença nas plantas após a inoculação dos isolados de diferentes localidades de coleta, dois deles *Ca. brassicae* (EH-2530 - Gama/DF e EH-2533 - Cristalina/GO) e um isolado de *Ca. orientalis* (EH-2536 - Campo Verde/MT), em sete acessos de grão-de-bico, do banco de germoplasma do CNPH: BRS Aleppo, BRS Cristalino, BRS Toro, Cícero, Desi-1606, Flip 03-109C e Jamu-96.

As sementes utilizadas para a obtenção das mudas dos acessos citados acima foram cedidas da coleção de germoplasma do CNPH. A semeadura foi realizada em bandejas de poliestireno com substrato vegetal estéril (Carolina Soil[®]) misturado ao adubo granulado (Osmocot[®], 19-06-10, 12g.kg⁻¹). As bandejas foram mantidas em casa de vegetação e 20 dias após a germinação, foi realizada a inoculação.

Para inoculação, as mudas de cada acesso foram retiradas das bandejas e as raízes lavadas em bandeja com água limpa. Em seguida, 20ml da suspensão de inóculo foram colocados em um becker onde as raízes ficaram imersas por 3 minutos. O transplante foi feito em vasos de 0,5L com solo autoclavado. Com uma pipeta, 2 mL da suspensão contida no becker foi depositada no colo de cada planta. Para o tratamento controle foi realizado procedimento similar, porém apenas com água destilada. Os vasos foram mantidos em casa de vegetação. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com três repetições. Os tratamentos foram em um arranjo em parcelas sub-sub-divididas 7x3x4 (7 acessos; 3 isolados; 4 avaliações de severidade da doença) e a parcela experimental composta por um vaso com duas plantas. A avaliação de severidade dos sintomas foi realizada a cada 5 dias, entre 10 e 25 dias após a inoculação. Como testemunhas (controle) foram utilizados três vasos com duas plantas dos mesmos acessos de grão-de-bico tratadas apenas com água destilada.

Para avaliar a severidade dos sintomas nas plantas (murcha decorrente de podridão do

colo e radicular), foram atribuídas notas de 0 a 5 (Figura 1), sendo: 0 = sem sintoma; 1 = \leq 10% de folhas murchas; 2 = $>10\%$ a 25% de folhas murchas; 3 = $>25\%$ a 50% de folhas murchas; 4 = $>50\%$ a 75% de folhas murchas; 5= planta morta (Adaptado de Tena *et al.*, 2017).



Figura 1. Escala de notas usadas para avaliação da doença causada por *Calonectria* em grão-de-bico. (0) sem sintoma aparente (não representada); (1) até 10% das folhas murchas; (2) $>10\%$ a 25% das folhas murchas; (3) $>25\%$ a 50% das folhas murchas; (4) $>50\%$ a 75% das folhas murchas; (5) planta morta.

Ao final das avaliações do ensaio de patogenicidade, a fim de recuperar os isolados inoculados e completar os postulados de Koch, foram coletadas mudas sintomáticas, repetindo-se os procedimentos descritos no item 3.1, exceto a inclusão na coleção micológica.

3.6. Reação de acessos de grão-de-bico a *Calonectria brassicae*

Os ensaios foram conduzidos em casa de vegetação (T média; URA média) no CNPH, sendo avaliada a severidade dos sintomas em trinta e oito acessos de grão-de-bico (Tabela 6) após inoculação com *Ca. brassicae*.

Utilizou-se uma suspensão de inóculo de *Ca. brassicae* composta pela mistura, em igual concentração, de conídios dos isolados EH-2530 e EH2533. O método utilizado para preparo da suspensão de conídios, inoculação e avaliação da severidade foram descritos no tópico 3.6.

A maioria dos acessos avaliados, identificados nesse trabalho como ‘Gnp’ seguido por

numeração, foi selecionada dentro de uma população da cultivar Cícero. As sementes ‘Gnp’ foram obtidas de plantas de uma área no CNPH cultivada com a cv. Cícero que apresentaram, ao longo do ciclo, características que as diferenciavam positivamente (arquitetura mais ereta, maior número de vagens, sem ocorrência de sintomas de doenças em geral), quando comparadas às características típicas da cultivar. Os demais acessos de grão-de-bico avaliados foram os mesmos do ensaio de patogenicidade, acrescidos do acesso desi-1605.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com cinco repetições. Os tratamentos foram dispostos em um arranjo em parcelas sub-divididas (38 acessos x 5 avaliações de severidade da doença) e a parcela experimental composta por um vaso com duas plantas. A avaliação de severidade dos sintomas foi realizada a cada 3 dias, entre 7 e 20 dias após a inoculação. Como testemunhas (controle) foram utilizados vasos com duas plantas dos mesmos acessos de grão-de-bico tratadas apenas com água destilada.

3.7. Análise de variância

Na análise estatística dos dois ensaios foi utilizado o software AGROESTAT (Barbosa & Maldonado Júnior, 2011) para a análise de variância das médias pelo Teste F ($p \leq 0,05$) e, quando da significância dos efeitos, compararam-se as médias pelo teste Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

4. RESULTADOS

4.1. Identificação molecular dos isolados *Calonectria* spp.

Os isolados EH-2586, EH-2589, EH-2545, EH-2533, EH-2531, EH-2530, EH-2529 apresentaram alta similaridade (probabilidade posterior de 98%) com as sequências dos isolados de referência de *Calonectria brassicae*, sendo agrupados dentro dessa espécie (Figura 1). Por sua vez os isolados EH-2536 e EH-2527 apresentaram maior similaridade com a espécie *Ca. orientalis*, mas a probabilidade posterior de apenas 83% em relação às sequências de isolados referencia desta espécie (Figura 2).

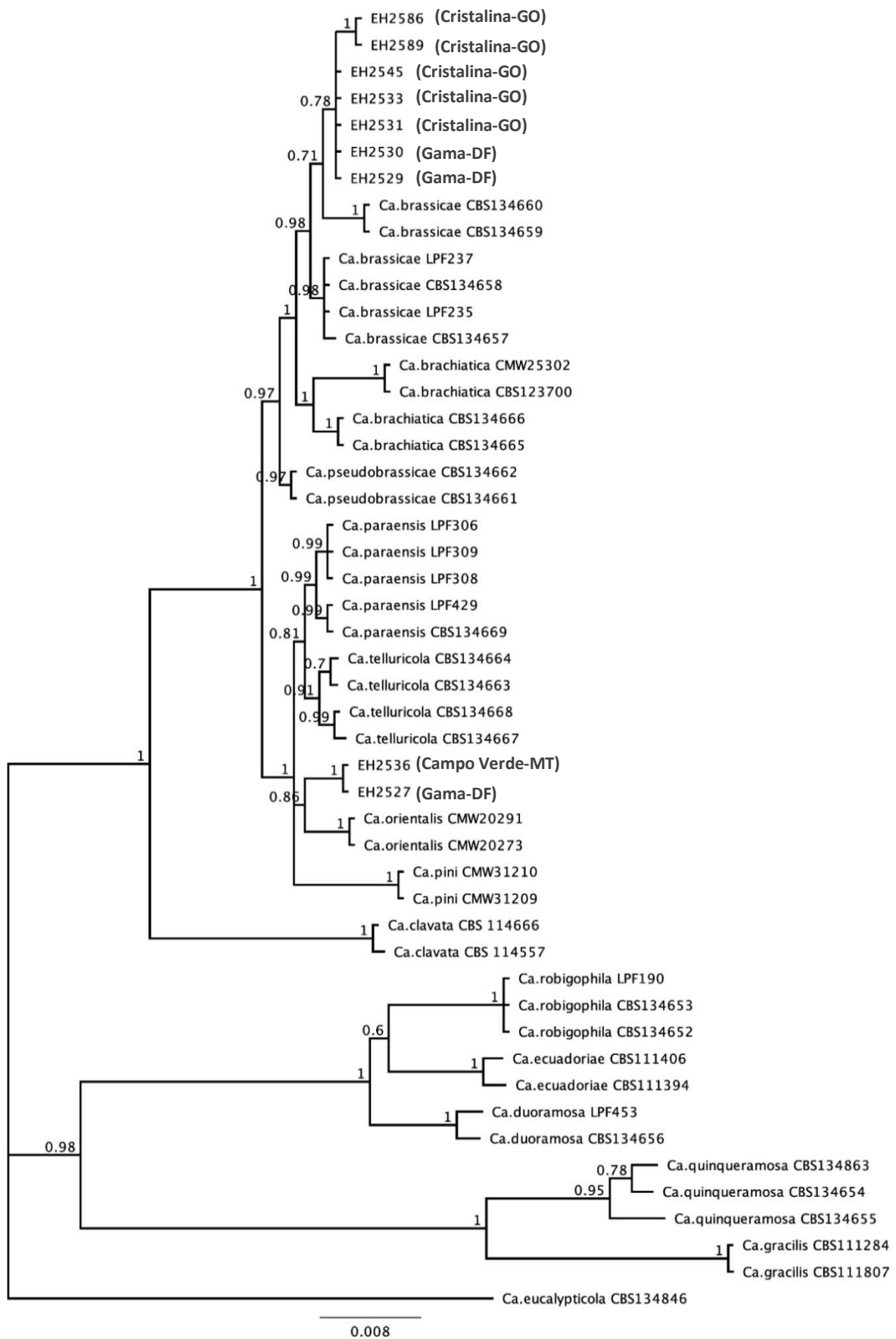


Figura 2. Árvore filogenética obtida por Inferência Bayesiana fundamentada em sequências das regiões beta-tubulina, calmodulina, histona e fator de alongação 1- α de espécimes de *Calonectria* spp. Os isolados selecionados nesse trabalho têm denominação iniciada por EH seguida por numeração e local de coleta.

4.2. Identificação morfométrica dos isolados *Calonectria* spp.

As colônias apresentaram dois tipos de micélio, sendo um rasteiro esbranquiçado (EH-2530 e EH-2533) e outro aéreo marrom claro com aspecto cotonoso (EH-2536). Os isolados foram considerados morfometricamente *Ca. brassicae* (Figuras 3 e 4).

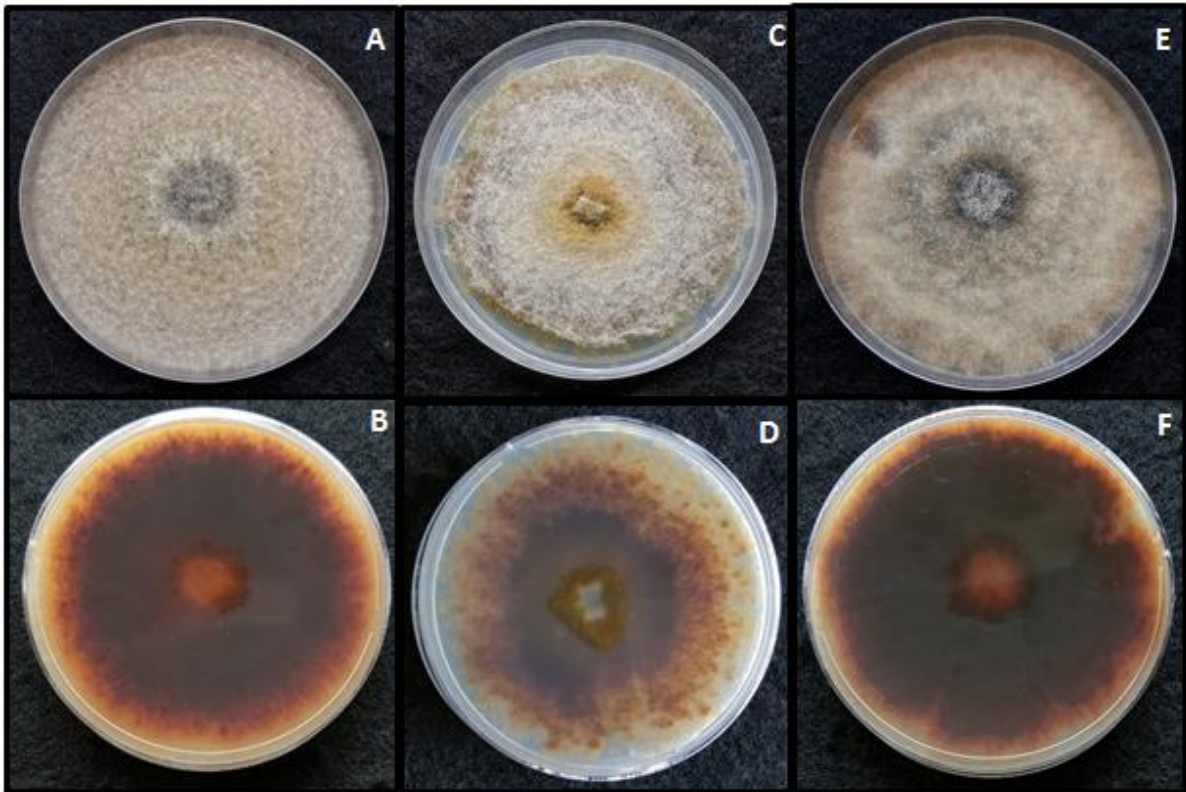


Figura 3. Aspecto da face superior (A) e inferior (B) da cultura do isolado EH-2530; Aspecto da face superior (C) e inferior (D) da cultura do isolado EH-2533; Aspecto da face superior (E) e inferior (F) da cultura do isolado EH-2536. Os tres isolados foram identificados morfometricamente como *Calonectria brassicae*.

Os conidióforos são penicilados com ramos férteis e um estipe. A extensão do estipe (3 isolados) é septada, hialina, com dimensões variando de 168-180 x 4,29-5,49 μ m e terminando em uma vesícula clavada com diâmetro de 4,40-7,23 μ m. Os macroconídios (3 isolados) são hialinos, cilíndricos, retos, arredondados em ambas as extremidades, com um septo e dimensões variando de 39-44 x 4,0-5,75 μ m. Cada ramo terminal produziu (3 isolados) de 2-6 fiáldes, doliformes, hialinas, asseptadas com dimensões variando de 10-15 x 3-4 μ m. Microconídios,

ascos e ascósporos não foram observados. Com base nas características morfométricas (Lombard *et al.*, 2009), os três isolados foram identificados como *Calonectria brassicae* (Figura 4).

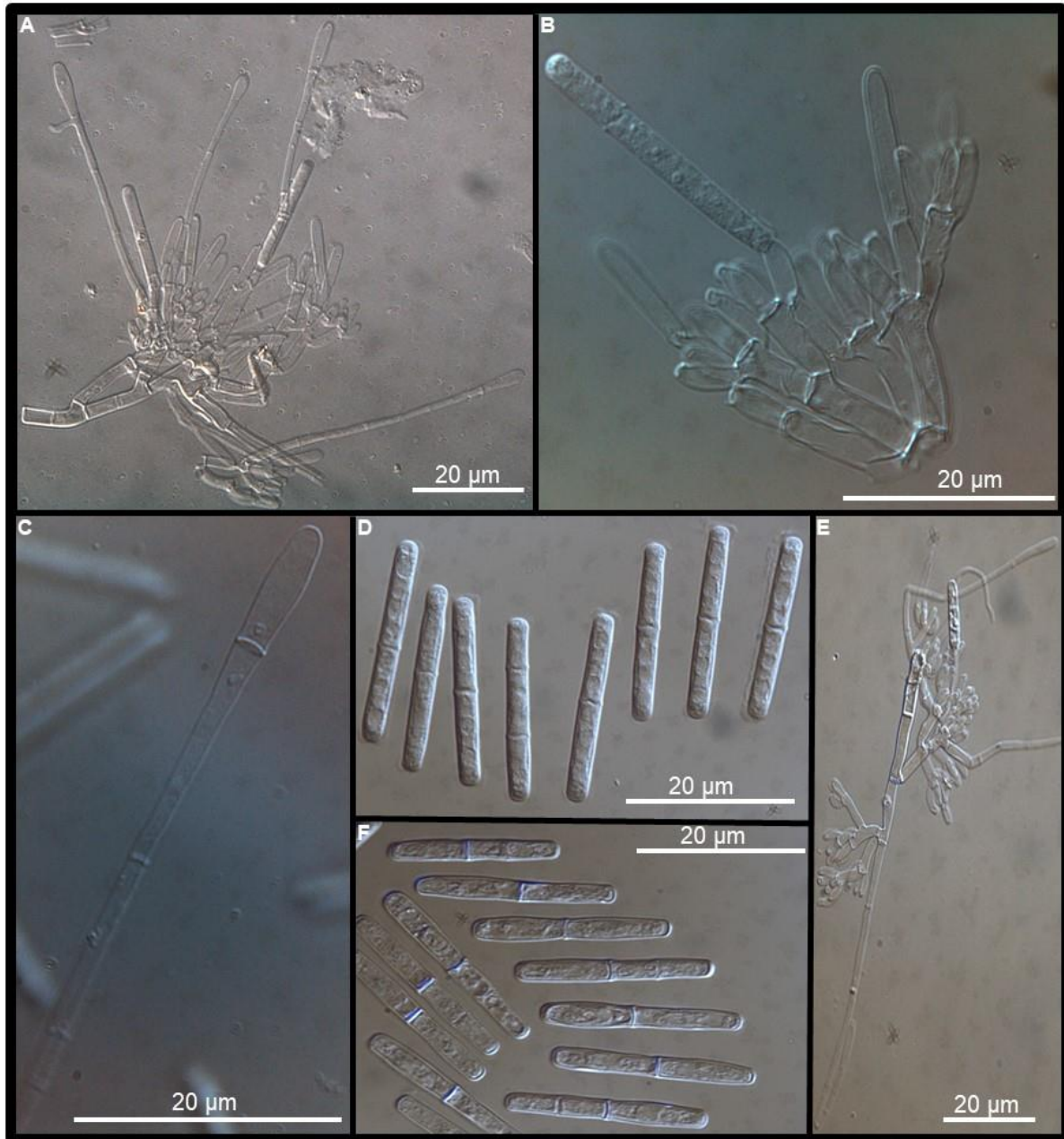


Figura 4. Isolados EH-2530, EH-2533 e EH-2536 identificados morfometricamente como *Calonectria brassicae*. Conidióforo e vesícula de EH-2530 (A); conidióforo e conídio de EH-2533 (B); vesícula clavada de EH-2536 (C); conídios de EH-2530 (D) e EH-2536 (F); conidióforo, conídios e vesícula de EH-2533 (E).

4.3. Patogenicidade e agressividade de Isolados *Calonectria* a acessos de grão-de-bico

Calonectria brassicae e *Ca. orientalis* foram patogênicos aos acessos de grão-de-bico. Foram observados sintomas de murcha, podridão do colo e radicular em todos os acessos durante o ensaio (Figura 5).



Figura 5. Plantas mortas de Desi 1606 após 25 dias da inoculação com *Calonectria brassicae* (EH-2530) (A); Plantas sintomáticas de BRS Cristalino após 25 dias da inoculação com *Ca. brassicae* (EH-2530) (B); Plantas sintomáticas de BRS Toro após 25 dias da inoculação com *Ca. brassicae* (EH-2533) (C); Plantas sintomáticas de Flip 03-109C após 25 dias da inoculação com *Ca. orientalis* (EH-2536) (D); Plantas sem sintomas (controle) (E);

Pela análise de variancia, houve diferença significativa quanto à severidade da doença entre os isolados, acessos e avaliações. O isolado EH-2530 de *Ca. brassicae* foi o mais agressivo e diferiu estatisticamente do isolado EH-2533 da mesma espécie e de *Ca. orientalis* (isolado EH-2536). *Calonectria orientalis* mostrou-se o menos agressivo (Tabela 3).

Tabela 3. Severidade (0 a 5) de doença em grão-de-bico inoculado com *Calonectria* spp. [*Ca. brassicae* (isolados EH-2530 e EH-2533) e *Ca. orientalis* (isolado EH-2536)].

Isolados de <i>Calonectria</i> spp.	Severidade (0-5)
<i>Calonectria brassicae</i> (EH-2530)	1,93 a
<i>Calonectria brassicae</i> (EH-2533)	1,48 b
<i>Calonectria orientalis</i> (EH-2536)	0,83 c

Tratamentos com médias seguidas por mesma letra não diferem pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

A doença foi mais severa em Cícero, Desi 1606, Jamu-96 e Flip 03-109C do que para BRS Cristalino, BRS Toro e BRS Aleppo, havendo diferença significativa entre esses dois grupos de acessos (Tabela 4).

Tabela 4. Severidade (0 a 5) de doença em acessos de grão-de-bico inoculados com *Calonectria* spp. [*Ca. brassicae* (isolados EH-2530 e EH-2533) e *Ca. orientalis* (isolado EH-2536)].

Acessos de grão-de-bico	Severidade (0-5)
Cícero	2,47 a
Desi 1606	1,92 a
Jamu-96	1,68 a
Flip 03-109C	1,43 a
BRS Cristalino	1,00 b
BRS Toro	0,74 b
BRS Aleppo	0,65 b

Tratamentos com médias seguidas por mesma letra não diferem pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

Os sintomas observados foram mais severos aos 25 dias após a inoculação e menos severos na aos 10 dias após a inoculação, havendo diferença significativa entre todas as avaliações (Tabela 5).

Tabela 5. Severidade (0 a 5) em avaliações da doença (entre 10 e 25 dias) em acessos de grão-de-bico inoculados com *Calonectria* spp. [*Ca. brassicae* (isolados EH-2530 e EH-2533) e *Ca. orientalis* (isolado EH-2536)].

Avaliação	Severidade (0-5)
4 (25 dias após inoculação)	2,47 a
3 (20 dias após inoculação)	1,77 b
2 (15 dias após inoculação)	0,98 c
1 (10 dias após inoculação)	0,44 d

Tratamentos com médias seguidas por mesma letra não diferem pelo teste de Scott-($p \leq 0,05$).

Pelo desdobramento da interação acesso x isolado, com relação ao isolado EH-2530 de *Ca. brassicae*, os sintomas mostraram-se mais severos para Desi 1606, Cícero e Jamu-96, do que para, Flip 03-109C, BRS Cristalino, BRS Aleppo e BRS Toro, havendo diferença significativa entre esses dois grupos de acessos (Tabela 6). Quanto a EH-2533 (*Ca. brassicae*), os sintomas foram mais severos em Cícero do que nos demais acessos, havendo diferença significativa entre os dois grupos de acessos e com EH-2536 (*Ca. orientalis*), não houve diferença significativa entre os acessos (Tabela 6).

Tabela 6. Severidade da doença (0 a 5) no desdobramento da interação entre acesso de grão-de-bico e isolados de *Calonectria* spp. [*Ca. brassicae* (isolados EH-2530 e EH-2533) e *Ca. orientalis* (isolado EH-2536)].

Acessos / grão-de-bico	Severidade (EH-2530)	Severidade (EH-2533)	Severidade (EH-2536)
Desi 1606	3,50 a	1,37 b	0,87 a
Cícero	2,67 a	2,92 a	1,83 a
Jamu-96	2,46 a	1,79 b	0,79 a
Flip 03-109C	1,83 b	1,33 b	1,12 a
BRS Cristalino	1,50 b	1,04 b	0,46 a
BRS Aleppo	1,04 b	0,62 b	0,29 a
BRS Toro	0,50 b	1,25 b	0,46 a

Tratamentos com médias seguidas por mesma letra não diferem pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

Pelo desdobramento da interação entre acesso e avaliação, houve diferença significativa entre os acessos nas duas últimas avaliações. Aos 20 dias após a inoculação a doença mostrou-se mais severa para Cícero, Desi 1606, Jamu-96 e Flip 03-109C do que para BRS Cristalino, BRS Aleppo e BRS Toro. Aos 25 dias após a inoculação a doença foi mais severa para Cícero, enquanto Desi 1606 e Jamu-96 formaram um segundo agrupamento com médias intermediárias e Flip 03-109C, BRS Cristalino, BRS Toro e BRS Aleppo foram os acessos menos sintomáticos (Tabela 7). Não houve diferença significativa entre os acessos nas avaliações aos 10 e 15 dias.

Tabela 7. Severidade da doença (0 a 5) na interação acesso de grão-de-bico e avaliação em plantas inoculadas com *Calonectria* spp. [*Ca. brassicae* (EH-2530 e EH-2533) e *Ca. orientalis* (EH-2536)].

Acessos de grão-de-bico	Avaliação 3 (20 dias)	Avaliação 4 (25 dias)
Cícero	3,22 a	4,22 a
Desi 1606	2,28 a	3,11 b
Jamu-96	2,28 a	2,72 b
Flip 03-109C	1,83 a	2,44 c
BRS Cristalino	1,16 b	1,83 c
BRS Aleppo	0,83 b	1,44 c
BRS Toro	0,78 b	1,50 c

Tratamentos com médias não seguidas por mesma letra diferem pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

Ao final das avaliações foi feito o reisolamento em cultura pura dos patógenos, das plantas sintomáticas e estes apresentavam características morfológicas iguais às das culturas originais, completando-se assim os postulados de Koch.

4.4. Reação de genótipos de grão-de-bico à *Calonectria brassicae*

Todos os acessos avaliados apresentaram sintomas de murcha, podridão do colo e radicular (Figura 6). As plantas usadas como controle (não inoculadas com o patógeno) mantiveram-se assintomáticas durante o ensaio.

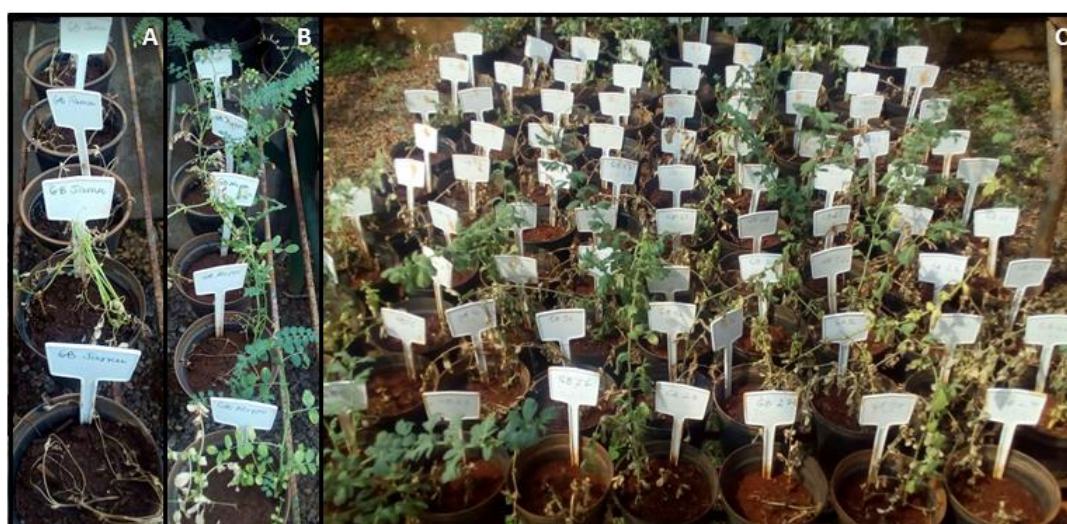


Figura 6. Plantas sintomáticas do acesso Jamu-96 após 20 dias da inoculação com isolados de *Calonectria brassicae* (EH-2530 e EH-2533) (A); Plantas sintomáticas do acesso BRS Aleppo após 20 dias da inoculação com isolados de *Ca. brassicae* (EH-2530 e EH-2533) (B); Plantas sintomáticas dos acessos 'Gnp' após 20 dias da inoculação com isolados de *Ca. brassicae* (EH-2530 e EH-2533) (C).

Pela análise de variância, houve diferença estatística significativa quanto à severidade da doença entre acessos e avaliações. Dezesesseis acessos apresentaram maior severidade da doença em relação aos outros vinte e dois acessos. As menores médias foram obtidas por acessos ‘Gnp’ que apresentaram valores entre 1,70 e 0,10 agrupando-os a BRS Aleppo (1,86) e a Cícero (1,78) como os acessos menos afetados pela doença. Por outro lado, os acessos com as maiores médias, variando de 4,14 (Jamu 96) a 2,44 (Gnp-30), foram agrupados aos demais acessos e considerados muito sensíveis aos sintomas de murcha, podridão do colo e radicular (Tabela 8).

Tabela 8. Severidade da doença (0 a 5) causada por *Calonectria brassicae* (isolados EH-2530 e EH-2533) em acessos de grão-de-bico.

Acesso	Severidade (0-5)
Jamu-96	4,14 a
Gnp-29	3,54 a
Gnp-20	3,50 a
Gnp-02	3,34 a
Gnp-18	3,28 a
Gnp-27	3,28 a
Desi 1605	3,18 a
Gnp-03	2,78 a
BRS Cristalino	2,76 a
Gnp-23	2,74 a
Gnp-28	2,74 a
Desi 1606	2,70 a
Gnp-26	2,64 a
Gnp-05	2,62 a
Flip 03-109C	2,62 a
BRS Toro	2,60 a
Gnp-22	2,54 a
Gnp-01	2,48 a
Gnp-30	2,44 a
BRS Aleppo	1,86 b
Cícero	1,78 b
Gnp-10	1,70 b
Gnp-14	1,66 b
Gnp-8	1,56 b
Gnp-18	1,22 b
Gnp-13	1,20 b
Gnp-24	1,14 b
Gnp-25	1,06 b

Acesso	Severidade (0-5)
Gnp-11	1,06 b
Gnp-04	1,02 b
Gnp-09	0,92 b
Gnp-15	0,88 b
Gnp-17	0,84 b
Gnp-19	0,78 b
Gnp-07	0,72 b
Gnp-12	0,38 b
Gnp-06	0,16 b
Gnp-21	0,10 b

Tratamentos com médias seguidas por mesma letra não diferem pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

Os sintomas foram mais severos aos 20 dias após a inoculação e menos severos na avaliação realizada 7 dias após a inoculação, havendo diferença significativa entre todas as avaliações (Tabela 9).

Tabela 9. Severidade da doença (0 a 5) causada por *Calonectria brassicae* (isolados EH-2530 e EH-2533) em avaliações entre 7 e 20 dias.

Tratamentos (avaliações das plantas)	Médias (severidade da doença)
Avaliação 5 (20 dias após inoculação)	3,23 a
Avaliação 4 (17 dias após inoculação)	2,68 b
Avaliação 3 (14 dias após inoculação)	2,00 c
Avaliação 2 (10 dias após inoculação)	1,44 d
Avaliação 1 (7 dias após a inoculação)	0,63 e

Tratamentos com médias seguidas por mesma letra não diferem pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

5. DISCUSSÃO

Esse é o primeiro relato com base em análise filogenética e a partir de sequências de quatro regiões gênicas (beta-tubulina, calmodulina, histona e fator de alongação 1- α) de que isolados de *Calonectria brassicae* e *Ca. Orientalis* estão associados à ocorrência de murcha, podridão do colo e radicular na cultura de grão-de-bico na Região Centro-Oeste do Brasil. Dianese *et al.* (1987) já haviam relatado o grão-de-bico como hospedeira de *Cylindrocaldium clavatum* (sin. *Ca. brassicae*) no Distrito Federal – Brasil causando podridão radicular. Entretanto, neste trabalho as plantas foram inoculadas com um isolado obtido de soja (*Glycine max*) ou algumas plantas de grão-de-bico foram plantadas em uma área anteriormente cultivada com soja e batata (*Solanum tuberosum*), duas hospedeiras de *Cy. clavatum* (sin. *Ca. brassicae*). Entretanto, de modo diferente deste trabalho, não foi constatada a ocorrência natural da doença em plantios comerciais de grão-de-bico. Além disso, o fungo foi encontrado apenas no Distrito Federal e sua identificação foi feita apenas com base em caracteres morfológicos (Dianese *et al.* 1987).

A elevada similaridade de *Ca. brassicae* com sete dos dez isolados estudados, agrupando-os a essa espécie, sugere a predominância desta espécie em relação à *Ca. orientalis* como agente causal podridões de colo e raiz em grão-de-bico na Região Centro Oeste do Brasil. De fato, este patógeno já tinha sido registrado no cultivo da ervilha (Lopes & Reifschneider, 1982) e também como sendo um dos principais agentes causais de podridão de raiz em soja, no cerrado do Brasil (Dianese *et al.*, 1986; Ferreira & Dianese, 1999).

Há concordância do presente estudo no que se refere à maior confiabilidade da identificação molecular a partir do uso de regiões genômicas variadas, como indicado por Lombard *et al.* (2016) e Marin-Felix *et al.* (2017), que permitiram a identificação de mais de 100 espécies de *Calonectria* com base em comparações de sequências variadas de DNA e

também com o estudo de Jayawardena *et al.* (2019), que propuseram as regiões beta-tubulina, fator de alongação 1- α , calmodulina, histona e actina como os principais marcadores genéticos para a identificação de espécies de *Calonectria*.

Em um trabalho de filogenia, a partir das análises de sequências de beta-tubulina e histona H3, realizado por Crous *et al.* (2006), *Cy. clavatum* e *Cy. gracile* foram considerados a mesma espécie e, alguns anos mais tarde, *Cy. gracile* foi incluída no complexo de *Ca. brassicae* por meio de análises das mesmas sequências de beta-tubulina e histona H3 (Lombard *et al.*, 2009). Sequências do gene fator de alongação 1- α foram incluídas nas análises feitas por Lombard *et al.* (2010c), além de beta-tubulina e histona H3 e, como resultado, *Ca. orientalis* foi agrupada ao complexo de *Ca. brassicae* (Clado IV), juntamente com *Ca. brachiatica*, *Ca. pini*, *Ca. clavata*, *Ca. ecuadoriae* e *Ca. gracilis*.

Entretanto, a partir das inferências de Alfenas *et al.* (2015), também utilizando sequências de beta-tubulina, calmodulina, histona H3 e fator de alongação 1- α , *Ca. orientalis* e *Ca. brassicae* passaram a integrar Clados distintos. No Clado I, *Ca. orientalis* foi agrupada a *Ca. paraensis*, *Ca. telluricola* e *Ca. pini*, enquanto *Ca. brassicae* passou a ocupar o Clado II, incluindo *Ca. brachiatica*, *Ca. pseudobrassicae* e *Ca. clavata*. Houve então um distanciamento filogenético entre as duas espécies em relação aos estudos anteriores.

Semelhantemente, no presente estudo foi observado distanciamento filogenético entre os isolados agrupados a *Ca. brassicae* e os isolados agrupados a *Ca. orientalis*, diferindo de Alfenas *et al.*, 2015 apenas com relação a posição de *Ca. clavata*, que se apresentou mais próxima a *Ca. olericola* de que de *Ca. brassicae*.

O agrupamento de *Ca. orientalis* com dois isolados deste trabalho, a princípio, foi aceito mesmo com um baixo nível de similaridade, considerando-se a confiabilidade dos resultados pelo uso de regiões genômicas variadas, conforme discutido anteriormente. Entretanto, novos estudos mais aprofundados deverão ser feitos com estes dois isolados de *Calonectria* uma vez

que esta baixa similaridade com a espécie *Ca. orientalis* levanta a hipótese de estes isolados pertencerem a uma nova espécie de *Calonectria*. Caso se confirme essa hipótese e tais isolados pertençam a uma espécie ainda desconhecida pela comunidade científica, deverão ser propostas como novas seguindo as normas do Código Internacional de Nomenclatura de Algas, Fungos e Plantas.

De acordo com Alfenas *et al.* (2015), há uma grande variabilidade de *Calonectria* spp. nos solos brasileiros associadas à diversas hospedeiras e, não é improvável que além de *Ca. brassicae* e *Ca. orientalis*, outras espécies do mesmo gênero possam estar relacionadas a doenças na cultura do grão-de-bico, levantando a necessidade de novos estudos sobre a etiologia da doença no Brasil, utilizando um número maior de isolados, coletados nas diferentes regiões produtoras.

O uso exclusivo de critérios morfométricos para a identificação de espécies dentro de *Calonectria* pode ser inconclusivo, como foi observado no presente estudo. Comparando-se aos resultados de Lombard *et al.* (2009), que obtiveram medidas conidiais de *Ca. brassicae* variando entre 35-45 x 3-6 μ m (comprimento x largura), extensão de estipe medindo 120-195 x 3-5 μ m, vesículas clavadas com 4-6 μ m e fiálides medindo 7-11 x 2-4 μ m, pode-se considerar uma concordância de valores, embora observada maior amplitude (diferença entre máxima e mínima) nas medidas dos macroconídios e extensão de estipe.

Nos resultados obtidos por Novaes *et al.* (2012) na identificação de *Cy. clavatum* (sin. *Ca. brassicae*) como agente causal da podridão do colo em cedro vermelho (*Toona ciliata*), o comprimento da estipe variou de 162-190 μ m, a vesícula de 3-5 μ m de diâmetro, fiálides de 9-14 x 3-5 μ m e conídios 34-42 x 4-5 μ m. Esses resultados também foram semelhantes aos do presente trabalho, com pequenas variações de amplitude.

Já em relação às medidas dos conídios de *Cy. clavatum* (28,5-38,7 x 3,5-4,2 μ m) obtidas por Aparecido *et al.* (2008), estas foram consideravelmente menores que as do presente

trabalho, podendo-se observar que o comprimento e largura, respectivamente, tiveram medidas máximas muito semelhantes às equivalentes mínimas do estudo em discussão.

Semelhantemente ao que se observa em outros gêneros, *Calonectria* possui alta complexidade dificultando uma correta identificação de espécies através da utilização apenas de caracteres morfológicos. No presente trabalho, não houve variabilidade morfológica de vesículas entre os isolados e não foram observados microconídios, assim como ascos e ascósporos (estruturas sexuais), concordando com Crous *et al.* (2006), que relataram que essas estruturas são raramente observadas em *Ca. brassicae*.

A identificação dos isolados como *Ca. brassicae* com base em critérios morfológicos, se considerados isoladamente, seriam resultados inconclusivos. Estudos como o de Lombard *et al.* (2010c), mostraram que o uso dos caracteres morfológicos, ecológicos e outros, embora importantes, são insuficientes para uma identificação final, sendo considerados complementares na identificação de espécies, já que há variações morfológicas intraespecíficas em *Calonectria* e, como visto no presente trabalho, os critérios morfológicos não foram suficientes para a diferenciação de *Ca. brassicae* e *Ca. orientalis*.

A patogenicidade dos isolados de *Calonectria* spp. mensurada pela severidade da doença na hospedeira, demonstraram que o patógeno é agressivo e apresenta-se como um risco potencial para a cultura do grão-de-bico na Região Centro-Oeste do Brasil. Outros autores também têm relatado problemas causados por essa espécie fúngica *Cy. clavatum* (sin. *Ca. brassicae*) em outras culturas de importância econômica nos cerrados do Brasil. Ferreira & Dianese (1999) demonstraram que *Cy. clavatum* foi o principal componente do complexo de fungos causadores de podridão radicular na cultura da soja nos solos do Cerrado Brasileiro. Segundo Nascimento *et al.* (2016) a produção do grão-de-bico em sucessão ao cultivo de soja no período de safrinha é uma prática comum na região Central do Brasil e a ausência de rotação de culturas pode favorecer o aumento do potencial de inóculo do patógeno, favorecendo a

ocorrência de doença em plantas de grão-de-bico.

De acordo com Silva *et al.* (2012), que relataram pela primeira vez no Brasil lesões profundas em raízes da cenoura causadas por isolados de *Cy. gracile* (sin. *Ca. brassicae*) e afirmaram que essa associação (patógeno e hospedeira) já havia sido observada em tubérculos de batata, o que é relevante para os produtores de culturas olerícolas que pretendam cultivar o grão-de-bico, não sendo indicada a sucessão dessas culturas na mesma área, sob risco do aumento de inóculo do patógeno.

Apesar de todos os acessos de grão-de-bico avaliados terem apresentado sintomas causados por *Calonectria* spp., Cícero e Jamu-96 foram os mais suscetíveis nos ensaios de patogenicidade e de resistência, respectivamente, o que pode ser explicado pelo fato de serem cultivares mais antigas, avaliadas quando o cultivo do grão-de-bico ainda era incipiente no Brasil, impedindo a seleção para resistência à doenças de solo de modo geral. De fato, a cultivar Cícero tem se mostrado altamente suscetível a outros patógenos de solo como *F. solani* e *F. oxysporum* f. sp. *ciceroi*, conforme observado em ensaios conduzidos nos campos experimentais da Embrapa Hortaliças e da Universidade de Montes Claros (Cabral *et al.*, 2016; Azevedo *et al.*, 2017). Outro exemplo da suscetibilidade de Cícero a patógenos de solo e que concorda com os resultados do presente trabalho (por se tratar do mesmo gênero do patógeno), foi observada por Reis *et al.* (2004), que além desta cultivar, avaliaram ervilha, lentilha e lírio-da-paz (espatifílio) e todos se mostraram suscetíveis a *Cy. spathiphylli* (sin. *Ca. spathiphylli*), manifestando sintomas típicos de podridão do colo e de raiz.

Nos dois ensaios realizados neste trabalho, pode-se observar o rápido avanço da doença, que entre 7 e 25 dias foi capaz de causar sérios danos às plantas de grão-de-bico, principalmente nos acessos mais sensíveis, o que sugere a necessidade da utilização de cultivares com algum nível de resistência. Um avanço nesse aspecto ocorreu com o desenvolvimento da cultivar ‘BRS Aleppo’ em 2013 que, segundo Nascimento *et al.* (2014), possui maior tolerância a fungos de

solo. Isso pode ser observado nos ensaios do presente trabalho, onde ‘BRS Aleppo’ apresentou menor severidade da doença nos ensaios de patogenicidade e de avaliação dos níveis de resistência, o que sugere a continuidade de seu uso em ensaios de melhoramento genético, visando a resistência à doença.

Por outro lado, a maioria dos acessos que se destacaram como aqueles com menor severidade da doença são derivados da cultivar ‘Cícero’. Isso pode indicar a ocorrência de segregação natural dentro dessa cultivar, resultando no acúmulo nestes acessos de QTLs (*Quantitative Trait Loci*) envolvidos na expressão do caráter associado à resistência quantitativa à doença. Em concordância com Gaur *et al.* (2012), que citaram casos em que a análise de dados de fenotipagem e de genotipagem identificaram marcadores moleculares associados aos genes ou loci de características quantitativas (QTLs) controlando resistência de importantes doenças em grão-de-bico, como a mancha de *Ascochyta* e a murcha de *Fusarium*, o que pode sugerir, no futuro, estudos semelhantes com *Calonectria* relacionadas à cultura.

Como foi observado no presente estudo e em estudos anteriores, espécies do gênero *Calonectria* representam um importante grupo de patógenos do solo que causam perdas em várias hospedeiras e em diferentes regiões no Brasil. *Calonectria* spp. podem representar ameaça quando introduzidas em áreas com condições favoráveis ao desenvolvimento de doenças e, portanto, poderiam se tornar um sério problema para o estabelecimento de diversas culturas, em especial o grão-de-bico, diante de sua atual expansão no país.

A maioria das identificações anteriores de *Calonectria* spp. se baseava em caracteres morfométricos. Os marcadores moleculares podem ser uma ferramenta robusta para uma diagnose rápida e mais precisa das doenças causadas por este grupo de patógenos.

Apesar de poucas informações com relação ao manejo de *Calonectria* spp na cultura do grão-de-bico, propõem-se, como medidas gerais para a redução do risco de ocorrência de doenças fúngicas de solo, o uso de cultivares que apresentem menor susceptibilidade ao ataque

do patógeno (por exemplo, o 'BRS Aleppo'), a rotação de culturas (entre gramíneas e leguminosas, preferencialmente), o uso de sementes com origem comprovada, o plantio em áreas não compactadas que possam favorecer o acúmulo de água e o manejo adequado da irrigação. Ainda não há fungicidas registrados pelo Ministério da Agricultura para o tratamento de sementes em grão-de-bico, embora, haja indícios de que o uso de produtos à base de thiram e iprodione auxiliem no controle de patógenos de solo.

6. CONCLUSÕES

- As regiões genômicas beta-tubulina, calmodulina, histona e fator de alongação 1- α foram eficazes para discriminar e identificar as espécies de *Calonectria* associadas com podridões de raiz e colo em grão-de-bico no Brasil Central;
- A identificação morfométrica, isoladamente, não foi conclusiva na identificação dos isolados de *Calonectria* spp. de grão-de-bico;
- Isolados geneticamente relacionados com as espécies *Calonectria brassicae* e *Calonectria orientalis* estão envolvidos com sintomas de murcha, podridão do colo e podridão radicular em grão-de-bico.
- A cultivar de grão-de-bico 'BRS Aleppo' apresentou menor sensibilidade em relação aos sintomas provocados pelo patógeno e pode ser incluída em outros estudos visando resistência a doenças causadas por fungos de solo, em especial para isolados de *Calonectria* spp.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKIBODE, S. & MAREDIA, M.; (2012) Global and regional trends in production, trade and consumption of food legume crops. *In*: Staff Paper. Department of Agricultural, Food and Resource Economics Michigan State University East Lansing, Michigan-US. 90p. <https://ageconsearch.umn.edu/record/136293>. Consultado em fevereiro de 2019.
- ALFENAS, R.F.; LOMBARD, L.; PEREIRA, O.L.; ALFENAS, A.C.; CROUS, P.W. (2015) Diversity and potential impact of *Calonectria* species in *Eucalyptus* plantations in Brazil. *Studies in Mycology* 80: 89–130.
- ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215: 403-410.
- APARECIDO, C.C.; FURTADO, E.L.; FIGUEIREDO, M.B. (2008) Caracterização morfofisiológica de isolados do gênero *Cylindrocladium*. *Summa Phytopathologica* 34: 38-47.
- ARTIAGA, O.P.; SPEHAR, C.R.; BOITEUX L.S.; NASCIMENTO, W.M. (2015) Avaliação de genótipos de grão de bico em cultivo de sequeiro nas condições de Cerrado. *Revista Brasileira de Ciências Agrárias - Agraria* 10:102-109.
- ARVAYO-ORTIZ, R.M.; ESQUEDA, M.; ACEDO-FELIX, E.; GONZALEZ-RIOS, H.; VARGAS-ROSALES, G. (2012) New lines of chickpea against *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* wilt. *American Journal Applied Science* 9: 686–693.
- AVELAR, R.I.S.; COSTA, C.A.; ROCHA, F.S.; BRANDÃO JÚNIOR, D.S.; PARAÍSO, H.A.; NASCIMENTO, W.M. (2018) Production and quality of chickpea seeds in different sowing and harvest periods. *Journal of Seed Science* 40: 146-155.
- AZEVEDO, D.M.Q.; ROCHA, F.S.; COSTA, C.A.; PFENNING, L.H.; DA COSTA, S.S.; MELO, M.P.; DA SILVA, J.G.; FERNANDES, M.F.G. (2017) Etiology of root rot and wilt disease of chickpea in Brazil. *Tropical Plant Pathology* 42: 273–283.
- BARBOSA, J.C. & MALDONADO JÚNIOR, W. (2011) AgroEstat - Sistema para análises estatísticas de ensaios agrônômicos. Versão 1.1.0.626. Jaboticabal: FVCAP/UNESP.
- BASIC LOCAL ALIGNMENT SEARCH TOLL (BLAST) – National Center for Biotechnology Information (NCBI). [http:// www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/). Consultado em maio de 2019.
- BERBEE, M.L. & TAYLOR, J.W. (1992) 18S ribosomal RNA gene sequence characters place the human pathogen *Sporothrix schenckii* in the genus *Ophiostoma*. *Experimental Mycology* 16: 87–91.

BLUM, L.E.B.; DIANESE, J.C.; COSTA, C.L. (1992) Comparative pathology of *Cylindrocladium clavatum* and *C. scoparium* on *Eucalyptus* spp. and screening of *Eucalyptus* provenances for resistance to *Cylindrocladium* damping-off. *Tropical Pest Management* 38: 155–159.

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

BRAGA, N.R.; VIEIRA, C.; VIEIRA, R.F. (1997) Comportamento de cultivares de grão-de-bico (*Cicer arietinum* L.) na microrregião de Viçosa-MG. *Revista Ceres* 44: 577-591.

CABRAL, C.S.; MELO, M.P.; FONSECA, M.E.N.; BOITEUX, L.S.; REIS, A. (2016) A root rot of chickpea caused by isolates of the *Fusarium solani* species complex in Brazil. *Disease Notes. Plant Disease* 100: 2171.

CARBONE, I. & KOHN, L.M. (1999) A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia* 91: 553-556.

CHAVERRI, P.; SALGADO, C.; HIROOKA, Y.; ROSSMAN, A.Y.; SAMUELS, G.J. (2011) Delimitation of *Neonectria* and *Cylindrocarpon* (Nectriaceae, Hypocreales, Ascomycota) and related genera with *Cylindrocarpon*-like anamorphs. *Studies in Mycology* 68: 57–78.

CHEN, W.; COYNE, C.J.; PEEVER, T.L.; MUEHLBAUER, F.J. (2004) Characterization of chickpea differentials for pathogenicity assay of ascochyta blight and identification of chickpea accessions resistant to *Didymella rabiei*. *Plant Pathology* 53:759-769.

COSTA, H.; ZAMBOLIM, L.; VENTURA, J.A. (2007) Doenças de hortaliças que se constituem em desafio para o controle. In: ZAMBOLIM, L.; LOPES, C.A.; PICANÇO, M.C.; COSTA, H. (Eds.) Manejo integrado de doenças e pragas hortaliças. Editora UFV. Viçosa. p.319-337.

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

CROUS, P.W. & WINGFIELD, M.J. (1994) A monograph of *Cylindrocladium*, including anamorphs of *Calonectria*. *Mycotaxon* 51: 341–435.

CROUS, P.W.; GIRALDO, A.; HAWKSWORTH, D.L.; ROBERT, V.; KIRK, P.M.; GUARRO, J.; ROBERTSE, B.; SCHOCH, C. L.; DAMM, U.; TRAKUNYINGCHAROEN, T.; GROENEWALD, J.Z. (2014). The Genera of Fungi: Fixing the application of type species of generic names. *International Mycological Association - IMA Fungus* 5: 141–160.

CROUS, P.W.; GROENEWALD, J.Z.; RISEDE, J-M.; SIMONEAU, P.; HYDE, K.D. (2006). *Calonectria* species and their *Cylindrocladium* anamorphs: species with clavate vesicles. *Studies in Mycology* 55: 213–226.

CROUS, P.W.; GROENEWALD, J.Z.; RISEDE, J.-M.; SIMONEAU, P.; HYWEL-JONES, N.L. (2004). *Calonectria* species and their *Cylindrocladium* anamorphs: species with sphaeropedunculate vesicles. *Studies in Mycology* 50: 415–430.

CROUS, P.W.; HAWKSWORTH, D.L.; WINGFIELD, M.J. (2015) Identifying and naming plant-pathogenic fungi: Past, present, and future. *Annual Review of Phytopathology* 53: 247–267.

CUNNINGTON, J.; LINDBECK, K.; JONES, R.H. (2007). National diagnostic protocol for the detection of fusarium wilt of chickpea (*Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*). Plant Health Australia. <https://www.planthealthaustralia.com.au/wp-content/uploads/2013/03/Fusarium-wilt-of-chickpea-DP-2007.pdf>. Consultado em fevereiro de 2019.

DIANESE, J.C.; RIBEIRO, W.R.C.; SHARMA, R.D.; FERREIRA, M.A.S.V.; URBEN, A.F. (1987). Chickpea: a new host of *Cylindrocladium clavatum*. *Fitopatologia Brasileira* 12: 403-404.

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

DIAPARI, M.; SINDHU, A.; BETT, K.; DEOKAR, A.; WARKENTIN, T.D.; TAR'AN B. (2014). Genetic diversity and association mapping of iron and zinc concentration in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Genome* 57: 459-468.

FERNANDEZ, M. R. (1993) Manual para Laboratório de Fitopatologia. EMBRAPA-CNPT Passo Fundo-RS. 128 p.

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

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION – FAO (2017) Statistical Database of the United Nation Food and Agriculture Organization Statistical Division-FAOSTAT. <http://www.fao.org/faostat/en/#data>. Consultado em fevereiro de 2019.

FREITAS, R.G. (2016) Diversidade genética e agressividade de isolados de *Calonectria pteridis* no Brasil (Dissertação de Mestrado). Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, Brasil.

GAUR, P.M.; JUKANTI, A.K.; VARSHNEY, R.K. (2012) Impact of Genomic Technologies on Chickpea Breeding Strategies. *Agronomy* 2: 199-221.

GAUR, P.M.; TRIPATHI, S.; GOWDA, C.L.L.; RANGA RAO, G.V.; SHARMA, H.C.; PANDE, S.; SHARMA, M. (2010) Chickpea seed production manual. International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics – ICRISAT. Andhra Pradesh, India. http://www.icrisat.org/TropicalLegumesII/pdfs/ChickpeaManual_full.pdf. Consultado em outubro de 2018.

GENBANK DATABASE – National Center for Biotechnology Information (NCBI). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>. Consultado em maio de 2019.

GLASS, N.L. & DONALDSON, G. (1995). Development of primer sets designed for use with PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Applied and Environmental Microbiology* 61: 1323–1330.

GRIGOLETTI JÚNIOR, A. & LAU, D. (1999). Crescimento de isolados de *Cylindrocladium spathulatum* da erva-mate, de cinco regiões do estado do Paraná. *Boletim de Pesquisa Florestal* 38: 67-75.

HUELSENBECK, J.P. & RONQUIST, F. (2001). MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17: 754-755.

JAYAWARDENA, S.; HYDE, K.D.; JEEWON, R.; GHOBAD-NEJHAD, M.; WANASINGHE, D.N.; LIU, N.G.; PHILLIPS, A.J.L.; OLIVEIRA-FILHO, J.R.C., DA SILVA, G.A.; GIBERTONI, T.B.; ABEYWIKRAMA, P.; CARRIS, L.M.; CHETHANA, K. W.T.; DISSANAYAKE, A.J.; HONGSANAN, S.; JAYASIRI, S.C.; MCTAGGART, A.R.; PERERA, R.H.; PHUTTHACHAROEN, K.; SAVCHENKO K.G.; SHIVAS, R.G.; THONGKLANG, N.; DONG, W.; WEI, D.; WIJAYAWARDENA, N.N.; KANG, J. (2019) One stop shop II: taxonomic update with molecular phylogeny for important phytopathogenic genera: 26–50. *Fungal Diversity* 94:41–129.

JENDOUBI, W.; BOUHADIDA, M.; BOUKTEB, A.; BÉJI, M.; KHARRAT, M. (2017) Fusarium wilt affecting chickpea crop. Review. *Journal Agriculture* 7:1-16

JIMENEZ-DÍAZ, R.M.; CASTILLO, P.; JIMENEZ-GASCO, M.M.; LANDA, B.B.; NAVAS-CORTES, J.A. (2015) Fusarium wilt of chickpeas: biology, ecology and management. *Crop Protection* 73: 16-27.

JOSHI, P.K. & RAO, P.P. (2017) Global pulses scenario: status and outlook. *In: Annals of the New York Academy of Sciences* 1392: 6–17. <https://nyaspubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/nyas.13298>. Consultado em outubro de 2018.

JUKANTI, A.K.; GAUR, P.M.; GOWDA, C.L.L., CHIBBAR, R.N. (2012) Nutritional quality and health benefits of chickpea (*Cicer arietinum* L.): a review. *British Journal of Nutrition* 108: S11–S26.

KATOH, K.; MISAWA, K.; KUMA, K.I.; MIYATA, T. (2002). MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Research* 30: 3059-3066.

KEARSE, M.; MOIR, R.; WILSON, A.; STONES-HAVAS, S.; CHEUNG, M.; STURROCK, S.; THIERER, T. (2012). Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* 28: 1647-1649.

- KHAN, I.H. & JAVAID, A. (2015) Chemical control of collar rot disease of chickpea. *Pakistan Journal of Phytopathology* 27: 61-68.
- KUMAR, S.; STECHER, G.; LI, M.; KNYAZ, C.; TAMURA, K. (2018) MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution* 35:1547-1549.
- LARANJO, M.; ALEXANDRE, A.; RIVAS, R.; VELÁZQUEZ, E.; YOUNG, J.P.; OLIVEIRA, S. (2008) Chickpea rhizobia symbiosis genes are highly conserved across multiple *Mesorhizobium* species. *FEMS Microbiology Ecology* 66:391–400.
- LEISSO, R.S., MILLER P.R., BURROWS M.E. (2009). The influence of biological and fungicidal seed treatments on chickpea (*Cicer arietinum*) damping-off. *Canadian Journal Plant Pathology* 31:38-46.
- LOMBARD, L.; CROUS, P.W.; WINGFIELD, B.D.; WINGFIELD, M.J. (2010a) Species concepts in *Calonectria* (*Cylindrocladium*). *Studies in Mycology* 66: 1–14.
- LOMBARD, L.; CROUS, P.W.; WINGFIELD, B.D.; WINGFIELD, M.J. (2010b) Multigene phylogeny and mating tests reveal three cryptic species related to *Calonectria pauciramosa*. *Studies in Mycology* 66: 15–30.
- LOMBARD, L.; CROUS, P.W.; WINGFIELD, B.D.; WINGFIELD, M.J. (2010c) Phylogeny and systematics of the genus *Calonectria*. *Studies in Mycology* 66: 31–69.
- LOMBARD, L. & CROUS, P.W. (2012) Phylogeny and taxonomy of the genus *Gliocladiopsis*. *Persoonia* 28: 25–33.
- LOMBARD, L.; RODAS, C.A.; CROUS, P.W.; WINGFIELD, B.D.; WINGFIELD, M.J. (2009) *Calonectria* (*Cylindrocladium*) species associated with dying *Pinus* cuttings. *Persoonia* 23: 41–47.
- LOMBARD, L.; VAN DER MERWE, N.A.; GROENEWALD, J.Z.; CROUS, P.W. (2015) Generic concepts in Nectriaceae. *Studies in Mycology* 80: 189–245.
- LOMBARD L., WINGFIELD M.J., ALFENAS A.C., CROUS P.W. (2016) The forgotten *Calonectria* collection: Pouring old wine into new bags. *Studies in Mycology* 85: 159–198.
- LOPES, C.A; REIFSCHNEIDER, F.J.B. (1982) Pathogenicity of *Cylindrocladium clavatum* to pea, a new host and preliminary evaluation of its virulence. *Plant Disease* 66: 951-952.
- LOPES, U.P.; ALFENAS, R.F.; ZAMBOLIM, L.; CROUS, P.W.; COSTA, H.; PEREIRA, O. L. (2018) A new species of *Calonectria* causing rot on ripe strawberry fruit in Brazil. *Australasian Plant Pathology* 47:1–11.
- LUENGO, R.F.A.; PARMAGNANI, R.M.; PARENTE, M.R.; LIMA, M.F.B.F. (2011) Tabela de Composição Nutricional das Hortaliças. 2ª Edição. Embrapa Hortaliças, Brasília.

MAITI, R.K. (2001) The chickpea crop. *In*: MAITI, R.K. & WESCHE-EBELING, P. (Eds). *Advances in Chickpea Science*. Science Publishers Incorporated. Enfield: 1-31.

MANDAL, D.; SINHAROY, S. (2019). A toolbox for nodule development studies in chickpea: a hairy-root transformation protocol and an efficient laboratory strain of *Mesorhizobium* sp. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 32: 367-378.

MARIN-FELIX, Y.; GROENEWALD, J.Z.; CAI, L.; CHEN, Q.; MARINCOWITZ, S.; BARNES, I.; BENSCH, K.; BRAUN, U.; CAMPORESI, E.; DAMM, U.; DE BEER, Z.W.; DISSANAYAKE, A.; EDWARDS, J.; GIRALDO, A.; HERNANDEZ-RESTREPO, M.; HYDE, K.D.; JAYAWARDENA, R.S.; LOMBARD, L.; LUANGSA-ARD, J.; MCTAGGART, A.R.; ROSSMAN, A.Y.; SANDOVAL-DENIS, M.; SHEN, M.; SHIVAS, R.G.; TAN, Y.P.; VAN DER LINDER, E.J.; WINGFIELD, M.J.; WOOD, A.R.; ZHANG, J.Q.; ZHANG, Y.; CROUS, P.W. (2017) Genera of phytopathogenic fungi: GOPHY 1. *Studies in Mycology* 86:99–216.

MOTA, T. C. (2013) Desempenho produtivo de grão-de-bico irrigado em função da época de plantio em Montes Claros-MG (Monografia). Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, Brasil.

MUEHLBAUER, F.J.; KAISER, W.J.; SIMON, C.J. (1994) Potential for wild species in cool season food legume breeding. *Euphytica* 73:109–114.

MYCOBANK DATABASE Fungal Databases, Nomenclature & Species Banks – International Mycological Association. <http://www.mycobank.org/>. Consultado em maio de 2019.

NASCIMENTO, W.M.; ARTIAGA, O.P.; BOITEUX, L. S.; SUINAGA, F. A.; REIS, A.; PINHEIRO, J. B., SPEHAR, C. R. (2014) BRS Aleppo: grão de bico. Maior tolerância a fungos de solo. Embrapa Hortaliças. Brasília. <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/134623/1/digitalizar0025.pdf>. Consultado em fevereiro de 2019.

NASCIMENTO, W.M.; DA SILVA, P.P.; ARTIAGA, O.P.; SUINAGA, F.A. (2016) Grão-de-bico. *In*: Nascimento, W.M. (Ed.) *Hortaliças Leguminosas*. Embrapa. Brasília-DF. p.89-118.

NENE, Y.L.; REDDY, M.V.; HAWARE, M.P., GHANEKAR, A.M.; AMIN, K.S.; PANDE, S.; SHARMA, M. (2012) Field Diagnosis of Chickpea Diseases and their Control. *Information Bulletin* 28. Technical Report. International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics. Andhra Pradesh, India. http://oar.icrisat.org/6601/1/InfoBulletin_28-ICRISAT_2012.pdf. Consultado em fevereiro de 2019.

NOVAES, Q.S.; SOUZA, V.C.; DIAS, P.C.; SANTOS, A.; BEZERRA, J.L. (2012) *Toona ciliata*, a new host of *Cylindrocladium clavatum* in Brazil. *Summa Phytopathologica* 38: 251-252.

O'DONNELL, K. & CIGELNIK, E. (1997) Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are non-orthologous. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 7:103-116.

PANDE, S.; SHARMA, M.; GAUR, P.M.; GOWDA, C.L.L. (2010) Host Plant Resistance to Ascochyta Blight of Chickpea. International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics. Bulletin 82. Andhra Pradesh, India. <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.652.2053&rep=rep1&type=pdf>. Consultado em fevereiro de 2019.

PANDE, S.; SHARMA, M.; GAUR, P.M.; TRIPATHI, S.; KAUR, L.; BASANDRAI, A.; KHAN, T.; GOWDA, C.L.L.; SIDDIQUE, K.H.M. (2011) Development of screening techniques and identification of new sources of resistance to Ascochyta blight disease of chickpea. Australasian Plant Pathology 40:149–156.

REDDEN, R.J. & BERGER, J.D. (2007) History and Origin of chickpea. In: YADAV, S.S.; REDDEN, R.J.; CHEN, W.; SHARMA, B (Eds.). Chickpea Breeding and Management. CABI. Pondicherry, Índia. https://www.academia.edu/735165/Chickpea_breeding_and_management. Consultado em fevereiro de 2019.

REIS, A.; MAFIA, R.G.; SILVA, P.P.; LOPES, C.A.; ALFENAS, A.C. (2004). *Cylindrocladium spathiphylli*, causal agent of *Spathiphyllum* root and collar rot in the Federal District-Brazil. Fitopatologia Brasileira 29: 102.

SCHULTZ, B.; SBRAVATTI JUNIOR, J.A.; AUER, C.G.; DOS SANTOS, A.F. (2015). Impacto da mancha foliar causada por *Cylindrocladium candelabrum* em plantios jovens de *Eucalyptus benthamii* em Rio Negrinho – SC. Ciência Florestal 25: 307-316.

SHARMA, K.D. & MUEHLBAUER, F.J. (2007) Fusarium wilt of chickpea: Physiological specialization, genetics of resistance and resistance gene tagging. Euphytica 157: 1-14.

SHARMA, M. & PANDE, S. (2013) Unravelling effects of temperature and soil moisture stress response on development of dry root rot [*Rhizoctonia bataticola* (Taub.)] butler in chickpea. American Journal of Plant Science 4: 584-589.

SHARMA, M.; GHOSH, R.; PANDE, S. (2015) Dry root rot [*Rhizoctonia bataticola* (Taub.) Butler]: an emerging disease of chickpea – where do we stand? Archives of Phytopathology and Plant Protection 48: 797-812.

SILVA, B.C.; AGUIAR, F.M.; LOPES, C.A. (2012) *Cylindrocladium gracile* a potential threat to carrot production in Rio Paranaíba Valley. Tropical Plant Pathology 37 (Suplemento). In: Anais do 45º Congresso Brasileiro de Fitopatologia. Manaus-AM. <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/72889/1/Fito-45-Congress-490.pdf>. Consultado em maio de 2019.

SINGH, F. & DIWAKAR, B. (1995) Chickpea Botany and Production Practices. Skill Development Series 16. International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics. India. <http://oar.icrisat.org/2425/1/Chickpea-Botany-Production-Practices.pdf>. Consultado em março de 2019.

SINGH, K.B.; SAXENA, M.C. (1999) Chickpeas. The Tropical Agriculturalist Series. CTA/Macmillan/ICARDA. Macmillan Education. London-UK.

SINGH, R.; SHARMA, P.; VARSHNEY, R.K.; SHARMA, S.K.; SINGH, N.K. (2008) Chickpea Improvement: Role of Wild Species and Genetic Markers. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews* 25: 267–314.

SINGH, S.; SINGH, I.; KAPOOR, K.; GAUR, P.M.; CHATURVEDI, S.K.; SINGH, N.P.; SANDHU, J.S. (2014) Chickpea. *In*: SINGH, M.; BISHT, I.; SINGH, D.; MANORANJAN (Eds.) *Broadening the Genetic Base of Grain Legumes*. Springer, India, p. 51-73.

TAVARÉ, S. & MIURA, R.M. (1986) Some probabilistic and statistical problems in the analysis of DNA sequences, some mathematical questions in biology - DNA sequence analysis, Providence (RI) American Mathematical Society: 57-86.

TAYYAR, R.I. & WAINES, J.G. (1996) Genetic relationships among annual species of *Cicer* (*Fabaceae*) using isozyme variation. *Theoretical Applied Genetics* 92:245–254.

TENA, A.R.; ENRÍQUEZ, G.R.; PÉREZ, L.L.; AGUILAR, E.E.Q. (2017) Effect of mycorrhizae and actinomycetes on growth and bioprotection of *Capsicum annuum* L. against *Phytophthora capsici*. *Pakistan Journal of Agricultural Sciences* 54: 513-522.

UDAHOGORA, M. (2012) Health benefits and bioactive compounds in field peas, faba beans, and chickpeas. *In*: SHAHIDI, F.; YU, L.; TSAO, R. (Eds). *Cereals and Pulses Nutraceutical Properties and Health Benefits*. 1st Edition. Wiley-Blackwell. Ames- Iowa.

UPADHYAYA, H.D.; DWIVEDI, S.L.; BAUM, M.; VARSHNEY, R.K.; UDUPA, S.M.; GOWDA, C.L.L.; HOISINGTON, D.; SINGH, S. (2008) Genetic structure, diversity, and allelic richness in composite collection and reference set in chickpea (*Cicer arietinum* L.) *BMC Plant Biology* 8:106.

VIEIRA, R.F.; VIEIRA C.; VIEIRA, R.F. (2001) *Leguminosas graníferas*. UFV. Viçosa-MG. 206p.