



GÉSSICA MYLENA SANTANA RÊGO

**PHYLOGENY, MORPHOLOGY AND PATHOGENICITY OF
FUNGI OF THE CRYPHONECTRIACEAE FAMILY IN
DIFFERENT HOSTS**

**LAVRAS-MG
2020**

GÉSSICA MYLENA SANTANA REGO

**PHYLOGENY, MORPHOLOGY AND PATHOGENICITY OF FUNGI OF THE
CRYPHONECTRIACEAE FAMILY IN DIFFERENT HOSTS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitopatologia, área de concentração em Fitopatologia, para a obtenção do título de Doutora.

Profa. Dra. Maria Alves Ferreira
Orientadora

Profa. Dra. Mara Elisa Soares de Oliveira
Coorientadora

**LAVRAS-MG
2020**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Rêgo, Géssica Mylena Santana.

Phylogeny, morphology and pathogenicity of fungi of the
Cryphonectriaceae family in different hosts / Géssica Mylena
Santana Rêgo. - 2020.

66 p.

Orientador(a): Maria Alves Ferreira.

Coorientador(a): Mara Elisa Soares Oliveira.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2020.

Bibliografia.

1. Cryphonectriaceae. 2. Chrysoporthe. 3. Cancro do eucalipto.
I. Ferreira, Maria Alves. II. Oliveira, Mara Elisa Soares. III. Título.

GÉSSICA MYLENA SANTANA REGO

**FILOGENIA, MORFOLOGIA E PATOGENICIDADE DE FUNGOS DA FAMÍLIA
CRYPHONECTRIACEAE EM DIFERENTES HOSPEDEIROS**

**PHYLOGENY, MORPHOLOGY AND PATHOGENICITY OF FUNGI OF THE
CRYPHONECTRIACEAE FAMILY IN DIFFERENT HOSTS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitopatologia, área de concentração em Fitopatologia, para a obtenção do título de Doutora.

Aprovada em 28 de agosto de 2020.

Dr. Flávio Augusto de Oliveira Garcia, UNICENTRO

Dr. Leonardo Sarno Soares de Oliveira, APRIL

Dr. Reginaldo Gonçalves Mafía, SUZANO

Dra. Sandra Marisa Mathioni, SYNGENTA

Profa. Dra. Maria Alves Ferreira
Orientadora

Profa. Dra. Mara Elisa Soares de Oliveira
Coorientadora

**LAVRAS-MG
2020**

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela Sua presença e o Seu cuidado.

Aos meus pais, Fátima e Jailton, e irmão, Breno, por sempre me incentivarem a alcançar vãos maiores durante minha vida e sempre se fazerem presentes, mesmo distantes.

À todas as mulheres da minha família, principalmente a minha avó Maria Rita, por serem minha inspiração.

Ao meu querido Edson pelo amor, paciência, incentivo e principalmente pelo companheirismo na nossa caminhada.

À professora Maria Alves Ferreira, pela orientação, amizade, ensinamentos e pela confiança.

Aos colegas do Laboratório da Patologia Florestal da UFLA: Iêda Alana, Gabrielle Avellar, Thaisa Soares, Aline Ferreira e Enrique pelo convívio e ajuda na condução dos experimentos.

Aos professores do Departamento de Fitopatologia pelos ensinamentos através das disciplinas.

Ao Programa de Pós-graduação em Fitopatologia e a Universidade Federal de Lavras, pela oportunidade de cursar o doutorado.

Aos funcionários da UFLA, pelo apoio durante o desenvolvimento da pesquisa, em especial as técnicas Luísa, Aline e Eliete.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

A todos vocês, muito obrigada por tudo.

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE.....	9
INTRODUÇÃO.....	9
REFERENCIAL TEÓRICO.....	11
REFERÊNCIAS.....	17
SEGUNDA PARTE – ARTIGOS.....	21
ARTIGO 1: <i>Aurantiocollum eucalypti</i> gen. sp. nov (Cryphonectriaceae) em clones híbridos de <i>Eucalyptus</i> no Brasil.....	21
ARTIGO 2- <i>Chrysoporthe puriensis</i> causando cancro e mortalidade na espécie nativa <i>Tibouchina mutabilis</i> no Brasil.....	44

RESUMO

A família Cryphonectriaceae agrupa gêneros fúngicos que podem causar cancro em espécies da família Myrtaceae e Melastomataceae no mundo. O gênero *Chrysoporthe* abrange, até o momento, nove espécies relatadas em países de clima tropical, nos continentes da África, América e Ásia, incidindo em espécies da família Myrtaceae e Melastomataceae. No Brasil, ocorrem as espécies *Chrysoporthe cubensis*, *C. doradensis* e *C. puriensis*. Estas espécies fúngicas foram detectadas em espécies florestais de valor econômico, como *Eucalyptus* sp. e espécies nativas, como *Tibouchina* sp. Descobertas recentes tem revelado novas espécies dentro da família Cryphonectriaceae a nível de gênero e espécies causando cancro em Myrtales. Os sintomas da doença do cancro podem ocasionar lesões no câmbio da planta que reduzem o seu crescimento, levando à ruptura dos tecidos de troncos e galhos culminando em sua morte. O presente trabalho foi dividido em dois artigos, o primeiro teve como objetivo estudar a filogenia e morfologia de um novo gênero da família Cryphonectriaceae. Os isolados do novo gênero, foram obtidos de híbridos de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*, coletados em Tocantins/Brasil, apresentando sintomas de cancro no lenho e sinais de corpos de frutificação na casca da árvore. O fungo foi caracterizado baseado em sua morfologia e em sequências das regiões ITS (Internal Transcribed Spacer), β -tubulina e LSU (Large Subunit of rDNA). Os isolados apresentaram sinais e sintomas característicos da família Cryphonectriaceae. As análises filogenéticas demonstraram que estes isolados encontrados em eucalipto, obtiveram separação de outros gêneros já descritos em Cryphonectriaceae, com alto valor de suporte para os métodos de máxima verossimilhança, máxima parcimônia e inferência bayesiana. Com o segundo artigo foi descrito o primeiro relato do fungo *C. puriensis* em *T. mutabilis*. Os isolados foram coletados na Serra do Mar em São Luiz do Paraitinga (SP) com sinais de corpos de frutificação na casca da árvore. Os isolados dos fungos provenientes de *T. mutabilis* foram identificados com base na caracterização morfológica e análise filogenética através dos métodos de Inferência Bayesiana e Máxima Parcimônia das regiões ITS e β -tubulina. A morfologia dos isolados foi similar ao descrito para *C. puriensis*. As árvores filogenéticas apresentaram topologias similares e alto suporte para as regiões ITS e β -tubulina. Os isolados inoculados causaram cancro em sete clones de eucalipto e mudas de *T. mutabilis* e *T. granulosa*, demonstrando que o fungo é patogênico para esses hospedeiros. Os resultados demonstram a importância de coletas com maior abrangência em indivíduos da ordem Myrtales a fim de estudar a diversidade genética de fungos da família Cryphonectriaceae e a necessidade de incluir estes patógenos em programas de seleção de clones de eucalipto resistentes a esses patógenos.

Palavras-chave: Cryphonectriaceae, filogenia, β -tubulina, cancro do eucalipto.

ABSTRACT

The Cryphonectriaceae family accommodates fungal genera that can cause cancer in species of the family Myrtaceae and Melastomataceae worldwide. The genus *Chrysoporthe* has, so far, covered nine species reported in tropical countries, on the continents of Africa, America and Asia, focusing on species of the family Myrtaceae and Melastomataceae. In Brazil, the species *Chrysoporthe cubensis*, *C. doradensis* and *C. puriensis* occur. These fungal species were detected in forest species of economic value, such as *Eucalyptus* sp. and native species, such as *Tibouchina* sp. Recent discoveries have revealed new species within the Cryphonectriaceae family at the level of genera and species causing cancer in Myrtales. The symptoms of cancer disease can cause lesions in the exchange of the plant that reduce its growth, leading to the rupture of the tissues of trunks and branches culminating in its death. The present work was divided into two articles, the first aimed to study the phylogeny and morphology of a new genus in the family Cryphonectriaceae. The isolates of the new genus were obtained from hybrids of *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*, collected in Tocantins / Brazil, showing symptoms of cancer in the wood and signs of fruiting bodies in the bark of the tree. The fungus was characterized based on its morphology and sequences of the ITS (Internal Transcribed Spacer), β -tubulin and LSU (Large Subunit of rDNA) regions. The isolates showed signs and symptoms characteristic of the Cryphonectriaceae family. Phylogenetic analyzes showed that these isolates found in eucalyptus, obtained separation from other genera already described in Cryphonectriaceae, with high support value for the methods of maximum likelihood, maximum parsimony and Bayesian inference. With the second article, the first report of the fungus *C. puriensis* in *T. mutabilis* was described. The isolates were collected at the Serra do Mar in São Luiz do Paraitinga (SP) with signs of fruiting bodies on the tree bark. The fungi isolates from *T. mutabilis* were identified based on morphological characterization and phylogenetic analysis using the Bayesian Inference and Maximum Parsimony methods of the ITS and β -tubulin regions. The morphology of the isolates was similar to that described for *C. puriensis*. Phylogenetic trees showed similar topologies and high support for the ITS and β -tubulin regions. The inoculated isolates caused cancer in seven eucalyptus clones and *T. mutabilis* and *T. granulosa* seedlings, demonstrating that the fungus is pathogenic for these hosts. The results demonstrate the importance of larger collections in individuals of the order Myrtales in order to study the genetic diversity of fungi of the Cryphonectriaceae family and the need to include these pathogens in programs for the selection of eucalyptus clones resistant to these pathogens.

Keywords: Cryphonectriaceae, phylogeny, β -tubulin, eucalyptus canker.

PRIMEIRA PARTE

INTRODUÇÃO

A família Cryphonectriaceae, da ordem Diaporthales, Filo Ascomycota apresenta atualmente 49 espécies distribuídas em 23 gêneros. A América Latina tem sido centro de recentes descobertas dentro da família a nível de gênero e espécies. Foram descritos os gêneros *Capillaureum*, *Rostraureum* e *Aurapex* incidindo em espécies nativas no Brasil, Equador e Colômbia, respectivamente (FERREIRA et al., 2019; GRYZENHOUT et al., 2009; JIANG et al., 2020).

O gênero *Chrysoporthe*, pertencente à família Cryphonectriaceae, considerado importante patógeno florestal, causa o cancro do eucalipto, predominantemente em regiões tropicais e subtropicais. Essa doença compromete a produtividade dos plantios, devido a lesões que podem surgir próximas ao colo da planta e em outras partes do tronco, levando a morte. As lesões podem ser superficiais ou profundas, chegando ao câmbio (FERREIRA, 1989). As espécies do gênero *Chrysoporthe*, registradas causando doença do cancro são *C. cubensis*, *C. austroafricana*, *C. hodgesiana*, *C. doradensis*, *C. inopina*, *C. deuterocubensis*, *C. zambiensis*, *C. syzygiicola* e *C. puriensis* (GRYZENHOUT et al., 2009; VAN DER MERWE et al., 2010; VERMEULEN et al., 2008; SOARES, et al., 2018; OLIVEIRA, 2018; GRYZENHOUT et al., 2005; HEATH et al., 2006; NAKABONGE et al., 2006; GRYZENHOUT et al., 2004; CHUNGU et al., 2010; GRYZENHOUT et al., 2006).

O diagnóstico de patógenos da família Cryphonectriaceae com base apenas em sua morfologia não é recomendado, pois sua morfologia é muito variável entre as espécies de um mesmo gênero, podendo se apresentar de diversas formas de acordo com o hospedeiro e fase de desenvolvimento do fungo. As variações são das mais diversas, como: quantidade de lóculos (uni ou multiloculares), coloração do conidioma (de preto a alaranjado), posição do conidioma na casca (imerso a levemente imerso), tamanho do pescoço, entre outras características (GRYZENHOUT et al., 2009). Dessa maneira, estudos moleculares utilizando diferentes regiões genômicas são necessários para descrição de espécies, bem como para gêneros, dentro da família, principalmente da região do gene de β -tubulina (GRYZENHOUT et al., 2009; BEGOUDE et al., 2010). São registrados como hospedeiros, principalmente, as espécies de plantas pertencentes às famílias Myrtaceae e Melastomataceae (GRYZENHOUT et al., 2006, MAUSSE-SITOÉ et al., 2016).

No Brasil, *Eucalyptus* spp., pertencente à família Myrtaceae, foi relatado como hospedeiro de *C. cubensis* e *C. doradensis*. O fungo *C. cubensis*, agente etiológico da doença do cancro do eucalipto, é considerado o mais importante dentro da família Cryphonectriaceae

devido ao seu potencial de redução no rendimento volumétrico e perdas energéticas da madeira em uma cultura de valor econômico como o eucalipto (FERREIRA; MILANI, 2004). *Chrysoporthe doradensis* foi descrito pela primeira vez no Equador por Gryzenhout et al. (2005) e recentemente relatado no Brasil por Soares et al. (2018) em híbridos de eucalipto. Além disso, a descrição mais recente de uma nova espécie de *Chrysoporthe* ocorreu no Brasil, nomeada como *C. puriensis*, incidindo em espécies de *Tibouchina* (OLIVEIRA, 2018).

As espécies de *Tibouchina* (Melastomataceae), conhecidas popularmente como quaresmeira ou manacá, são muito utilizadas no meio urbano, devido sua exuberância, apresentando flores brancas, rosas a roxas. Devido a sua larga utilização na arborização urbana associado com diversos relatos de incidência de *Chrysoporthe* spp. em espécies de *Tibouchina*, tornam-se necessárias análises periódicas para verificar a sanidade dessas árvores. A presença de corpos de frutificação do fungo pode sinalizar que a árvore esteja fragilizada apresentando potencial risco de queda, principalmente em períodos chuvosos e ventanias, podendo causar acidentes em áreas de elevada movimentação. Espécies de *Tibouchina* desempenham papel ecológico importante em unidades de conservação e principalmente em áreas de regeneração natural, pois possuem comportamento heliófilo na formação das florestas, funcionando como suporte para formação do dossel das florestas. Isso significa que árvores desse tipo crescem rapidamente em direção à luz e dão condições para árvores de crescimento lento, que exigem sombra, poderem se desenvolver.

As espécies *C. cubensis*, *C. doradensis* e *C. puriensis* não possuem especificidade por hospedeiro, pois causam doença em espécies arbóreas diferentes de seus hospedeiros de origem. Apresentam, portanto, capacidade adaptativa para infectar outras espécies da ordem Myrtales. Tal fenômeno foi observado em *C. cubensis* e *C. doradensis* que foram relatados ocorrendo em *Eucalyptus*, sendo também patogênicas a *Tibouchina* sp. Além disso, *C. puriensis*, foi patogênico a eucalipto. A ausência de especificidade de hospedeiro indica um alto potencial de disseminação do patógeno entre as plantas, de modo que *Chrysoporthe* spp. infectando nativas pode representar possíveis fontes de inóculo para a eucaliptocultura, acarretando prejuízo econômico (GRYZENHOUT et al., 2009).

Diante disso, é importante considerar levantamentos com maior abrangência a fim de conhecer a diversidade de espécies da família Cryphonectriaceae na América Latina, bem como seus centros de origem e variabilidade genética. Isto é necessário para antever pesquisas de resistência clonal para patógenos potenciais que possam representar risco para plantios comerciais e ecossistemas florestais naturais.

REFERENCIAL TEÓRICO

Família Cryphonectriaceae

Cryphonectriaceae, pertencente a ordem Diaphortales, possui 49 espécies, distribuídas em 23 gêneros descritos atualmente. É identificada, morfológicamente, por meio do seu ascostroma submerso ou superficial e sua textura estromática. Os ascósporos são elipsoides, fusiformes ou cilíndricos. Os conídios são pequenos, ovoides e hialinos (FERREIRA et al., 2019; JIANG et al., 2020). A família Cryphonectriaceae difere de outras famílias da ordem Diaphortales devido à presença de tecido preto-fosco e a formação de tecido estromático alaranjado que quando em contato com KOH, produz coloração púrpura, e em contato com ácido láctico, produz coloração amarelada (GRYZENHOUT et al., 2006).

A caracterização morfológica dos gêneros dentro da família Cryphonectriaceae é realizada, principalmente, através da presença ou ausência de pescoço nos corpos de frutificação, massa de ascósporos, presença ou ausência de paráfises, observação dos tecidos estromáticos, comprimento peritecial, cor e forma do conidioma e análise da forma e tamanho de esporos. Contudo, devido a plasticidade e variações morfológicas que ocorrem dentro de uma mesma espécie, a identificação morfológica desses fungos torna-se ineficaz, fazendo-se necessária a comparação de sequências de DNA, principalmente da região do gene de β -tubulina para identificação de gêneros e espécies (GRYZENHOUT et al., 2009; FAN et al., 2018).

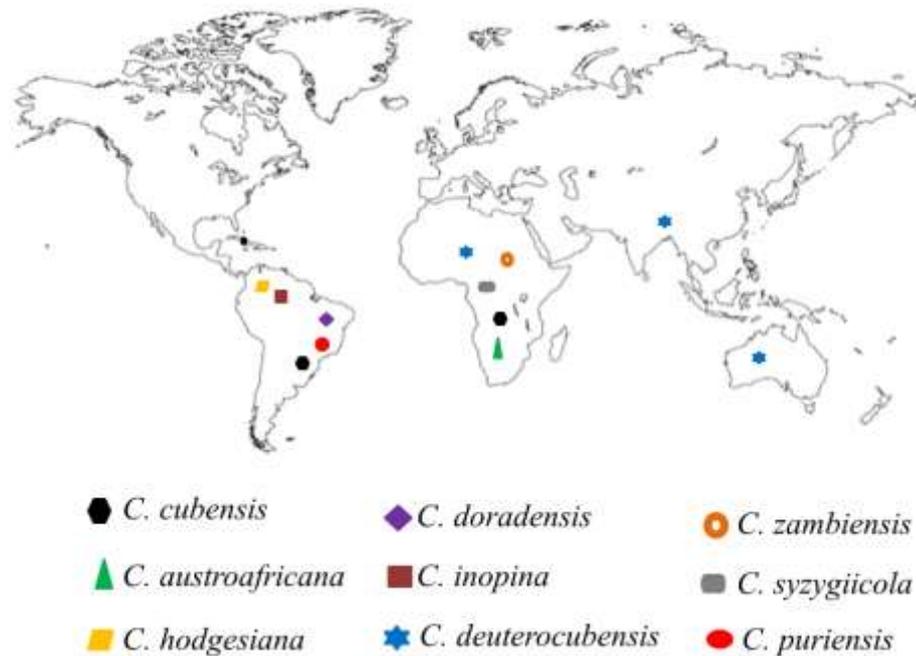
Na América Latina, além das espécies de *Chrysoporthe*, os fungos da família relatados são: *Capillaureum caryovora*, no Brasil, incidindo em *Caryocar brasiliense*, árvore típica do cerrado brasileiro (FERREIRA et al., 2019); *Rostraureum tropicale*, no Equador, incidindo na espécie *Terminalia ivorensis* (GRYZENHOUT et al., 2005); *Aurapex penicillata*, na Colômbia, incidindo em *Miconia theaezans* (GRYZENHOUT et al., 2006)

O gênero *Chrysoporthe*

O gênero *Chrysoporthe* tem como características morfológicas gerais, conidiomas superficiais, piriformes e alaranjados com pescoços periteciais cilíndricos longos. Nove espécies pertencentes ao gênero *Chrysoporthe* foram registradas causando a doença do cancro, dentre elas: *C. cubensis*, *C. austroafricana*, *C. hodgesiana* (GRYZENHOUT et al., 2004), *C. doradensis* (GRYZENHOUT et al., 2005), *C. inopina* (GRYZENHOUT et al., 2006), *C. zambiensis*, *C. syzygiicola* (CHUNGU et al., 2010), *C. deuterocubensis* (VAN DER MERWE et al., 2010) e *C. puriensis* (OLIVEIRA, 2018).; ;). Estas espécies têm sido

relatadas em regiões tropicais e subtropicais do mundo, incluindo África, Sudeste Asiático, América do Sul e Central e Austrália (GRYZENHOUT et al., 2009; PEGG et al., 2010).

Figura 1. Distribuição de *Chrysoporthe* sp. no mundo.



Fonte: O autor (2020).

O primeiro registro de *C. cubensis* incidindo em plantios de eucalipto foi feito por Bruner (1917), em Cuba, identificado pela primeira vez como *Diaporthe cubensis* e transferido para *Cryphonectria* por Hodges (1980) devido às suas características culturais e morfológicas. *Chrysoporthe* foi descrito após a identificação de diferenças morfológicas e filogenéticas de isolados da espécie *Cryphonectria* e *Endothia* (MYBURG et al., 2004). Os isolados de *Chrysoporthe* spp. foram separados por Gryzenhout et al. (2004) e descritos como espécies de *C. cubensis*, *C. austroafricana* e *Chrysoporthella hodgesiana*, conforme análises filogenéticas.

Chrysoporthe austroafricana foi relatado ocorrendo em *Eucalyptus* na África do Sul (WINGFIELD et al., 1989) e em *Syzygium* sp. (HEATH et al., 2006). Desse modo, *C. austroafricana* foi descrita como uma nova espécie do gênero *Chrysoporthe*. Os isolados de *Syzygium* foram agrupados com isolados de *C. austroafricana* e separados dos clados de isolados de *C. cubensis* e *Chrysoporthella hodgesiana* através de suas características morfológicas e sequências do gene β -tubulina (ROUX et al., 2003; GRYZENHOUT et al., 2004; HEATH et al., 2006). A morfologia de *C. austroafricana* suporta a classificação

filogenética, pois possuem ascósporos com ápices arredondados e ascas mais longas que as demais espécies. Os isolados de *Chrysosporthea hodgesiana*, incidindo em *Tibouchina* spp. na Colômbia, não apresentou características morfológicas que os diferenciem dos anamorfos de *C. cubensis* e *C. austroafricana*. No entanto, filogeneticamente são diferentes, possuindo origem distinta e crescimento ótimo em temperatura de 25 °C, diferenciando-se das demais com crescimento ideal aos 30 °C (GRYZENHOUT et al., 2004).

Chrysosporthea hodgesiana foi descrita por Gryzenhout et al. (2004) dentro do gênero *Chrysosporthea* por se tratar de fungos com ausência de estruturas sexuais. Estudo posterior, realizado por Chungu et al. (2010), descreveu mais duas espécies em fase anamórfica, são elas: *C. syzygiicola* e *C. zambiensis*, incidindo em espécies de mirtáceas não nativas da Zâmbia e em *Eucalyptus*, respectivamente. Estas últimas espécies descritas foram nomeadas dentro do gênero *Chrysosporthe*, o qual anteriormente era destinado apenas para fungos com estruturas sexuais. Desse modo, optou-se por adequar também *Chrysosporthea hodgesiana* para *Chrysosporthe hodgesiana*.

As espécies de *C. cubensis* e *C. deuterocubensis* são muito similares em sua morfologia. A separação dos isolados em sub-clados distintos ocorreu através da comparação de sequências de DNA, utilizando o gene β -tubulina e a região ITS do rDNA. Assim, os isolados da América do Sul permaneceram como *C. cubensis* e os isolados do Sudeste Asiático passaram a representar a espécie *C. deuterocubensis* (GRYZENHOUT et al., 2009).

A espécie *C. inopina* foi descoberta na Colômbia em *Tibouchina lepidota*. Inicialmente, a descoberta de *C. inopina* indicava ser a fase sexuada de *C. hodgesiana* ou o primeiro relato de *C. cubensis* em *Tibouchina* spp. na América do Sul. No entanto, os isolados da Colômbia agruparam em um novo clado dentro do gênero, demonstrando ser uma nova espécie do gênero. Morfológicamente, *C. inopina* diferenciou de *C. cubensis* por possuir ascas maiores e ascósporos mais largos (GRYZENHOUT et al., 2006).

O fungo *C. doradensis* foi relatado pela primeira vez no Equador, sendo patogênico a *E. deglupta* e a espécie nativa *T. urvilleana*. As análises filogenéticas agruparam este fungo em um sub-clado dentro de *Chrysosporthe*. As características morfológicas que diferem *C. doradensis* de outras espécies de *Chrysosporthe* são as morfologias dos conídios que possuem maior comprimento, podendo ser cilíndricos a ovoides e alantoides (GRYZENHOUT et al., 2005). No Brasil, a espécie já foi relatada no estado de Minas Gerais por Soares et al. (2018) incidindo em *Eucalyptus* ssp. e *T. granulosa*.

A espécie *C. puriensis*, descrita no Brasil por Oliveira (2018), ocorrendo em *Tibouchina* spp., é a última espécie do gênero descrita até o presente momento. O fungo foi

encontrado nas espécies *T. granulosa*, *T. heteromalla* e *T. candolleana* nos estados da Bahia, Rio de Janeiro e Minas Gerais, provocando sintomas de cancro na planta, levando a morte de árvores em matas nativas e de arborização urbana. Suas características são semelhantes as outras espécies do gênero, tendo suporte filogenético para separação desta espécie.

As espécies de *Chrysosporthe* são definidas principalmente através da filogenia, pois a maioria das espécies não possuem marcadores morfológicos devido a elevada variação dos caracteres morfológicos, como no formato de ascósporos e tamanho de ascas. Desse modo, o que torna possível a classificação de uma espécie dentro do gênero são as análises filogenéticas, baseadas no estudo das regiões ITS do rDNA e, principalmente do gene β - tubulina (VAN DER MERWE et al., 2013).

Biogeografia de *Chrysosporthe* spp.

Estudos sobre diversidade genética de uma população de fungos contribuem para o conhecimento das relações evolutivas do patógeno com seus hospedeiros e às mudanças do seu ambiente. Entre os fatores que estão inclusos nos processos evolutivos, estão: mutação, acasalamento, fluxo ou migração de genes, tamanho da população e seleção. Inicialmente, é importante definir a estrutura genética de uma população, que se refere à quantidade e distribuição da diversidade genética dentro e entre populações, apresentando sua história evolutiva e potencial para evoluir (MCDONALD, 1997; MCDONALD; LINDE, 2002).

Os estudos filogenéticos iniciais dentro do gênero *Chrysosporthe* realizados por Gryzenhout et al. (2004), comparando sequências de DNA, apresentavam a formação de três sub-clados dentro de *C. cubensis*, que compreendiam isolados da América do Sul, África do Sul e Sudeste Asiático. Um estudo desenvolvido por Van der Merwe et al. (2010), através de estudos de genética de populações, permitiu indicar o centro de origem de *C. cubensis* e *C. deuterocubensis*, sendo estes, respectivamente, da América do Sul e Sudeste Asiático.

Estudos sobre genética de populações para as espécies *C. austroafricana*, *C. cubensis* e *C. deuterocubensis* corroboram com estudo realizado por Nakabonge et al. (2007), onde foi sugerido que *C. cubensis* e *C. deuterocubensis* não são originalmente da África devido à sua baixa diversidade genética quando comparado à *C. austroafricana*. Os registros de incidência dos fungos *C. cubensis* e *C. deuterocubensis* em espécies nativas da América do Sul e do Sudeste Asiático, respectivamente, também indicavam seus possíveis centros de origem (RODAS et al., 2005; MYBURG et al., 2003; GRYZENHOUT et al., 2009).

Van der Merwe et al. (2010) aponta que *C. deuterocubensis* pode apresentar uma espécie ancestral em relação a *C. cubensis* e *C. austroafricana* por apresentar frequências

mais altas de alguns alelos correspondentes a *C. cubensis* e *C. austroafricana*. Além disso, *C. deuterocubensis* possui maior diversidade alélica quando comparada com *C. cubensis* e *C. austroafricana*.

No Brasil, em estudo de subpopulações realizado com isolados de *C. cubensis* por Oliveira (2018), foi observada maior diversidade genética nas regiões Norte/Nordeste, e a região Sudeste obteve os menores valores de diversidade. A alta diversidade genética de *C. cubensis* no Brasil e, principalmente, na região Norte/Nordeste significa que o patógeno está bem adaptado à área em hospedeiros nativos e exóticos.

As demais espécies do gênero *Chrysosporthe* não possuem estudos conclusivos quanto a sua origem. *Chrysosporthe hodgesiana* e *C. inopina* foram encontradas apenas na Colômbia, infectando *Tibouchina* sp. (RODAS et al., 2005; GRYZENHOUT et al., 2005). *Chrysosporthe zambiensis* e *C. syzygiicola* possuem relatos apenas no continente africano, na Zâmbia (CHUNGU et al., 2010) em espécies de Myrtaceae, *Eucalyptus grandis* e *Syzygium guineense*. *Chrysosporthe doradensis* foi relatado pela primeira vez por Gryzenhout et al. (2006) no Equador, e foi novamente relatada no Brasil, por Soares et al. (2018), onde o fungo teve incidência em *Eucalyptus* spp. e *Tibouchina granulosa*. *Chrysosporthe puriensis* é relatado apenas no Brasil incidindo em *T. granulosa*, *T. heteromalla* e *T. candolleana*.

Oliveira (2018), analisando a diversidade genética de *C. puriensis* e *C. cubensis*, observou que isolados de *C. puriensis* apresentaram maior diversidade dentro da espécie do que entre espécies, quando comparada com *C. cubensis*, sendo possível inferir que esta espécie pode ter seu centro de origem no Brasil. Contudo, uma amostragem com obtenção de mais isolados é necessária para comprovar os estudos de Oliveira (2018).

O gênero *Eucalyptus*

Eucalyptus, pertencente à família Myrtaceae, possui cerca de 730 espécies, onde aproximadamente 20 espécies são utilizadas para fins comerciais. A região sudeste do país onde concentram 66% da área plantada do país, predominam os plantios clonais provenientes de híbridos de *E. grandis* x *E. urophylla* (PALUDZYSZYN FILHO, 2015; SANTAROSA et al., 2014). As espécies normalmente são indicadas em função do produto final requerido e sua adaptabilidade às condições ambientais da região. No entanto, é necessário priorizar o uso de clones com ampla resistência genética, evitando incidência de patógenos como *C. cubensis* (GUIMARÃES et al., 2010).

A área de floresta plantada de eucalipto no Brasil é a de maior relevância entre as demais culturas plantadas, com área plantada de 7,83 milhões de hectares, seguido de *Pinus*

spp., com 1,6 milhão de hectares, e outras espécies, entre elas seringueira, acácia, teca e paricá, que somam 590 mil hectares. Plantios de florestas no Brasil proporcionam exportações que alcançaram 19.691 toneladas de celulose, 6.698 m³ em painéis de madeira e 10.535 toneladas de papel. A representatividade da exportação desses produtos é de US\$ 7,4 bilhões para celulose, US\$ 1,9 bilhões para papel e US\$ 265 milhões em painéis de madeira. Os destinos são em maior parte para a China, 30%; países europeus, 31,4% e Estados Unidos, 16% das exportações. A importância da qualidade desses plantios é fundamental a fim de que a cadeia produtiva não seja interrompida (IBA, 2019).

O cancro do eucalipto é uma das doenças mais importantes causada por fungos pertencentes à família Cryphonectriaceae, devido às perdas na qualidade da madeira e produtividade volumétrica em uma cultura de valor econômico como o eucalipto (GUIMARÃES et al., 2010; SOARES et al., 2015). Os plantios com incidência de cancro podem perder até 71% em produtividade. *Chrysoporthe cubensis* é a espécie com maior ocorrência em plantios comerciais de *Eucalyptus* sp. no Brasil, causando elevadas perdas à cultura. Recentemente, outra espécie do gênero, *C. doradensis*, foi relatada no Brasil por Soares et al. (2018), ocorrendo em plantios de híbridos de eucalipto, com ocorrência relatada anteriormente apenas ao Equador (GRYZENHOUT et al., 2005).

O gênero *Tibouchina*

O gênero *Tibouchina* é pertencente à família Melastomataceae com distribuição pantropical, ou seja, de ocorrência nos trópicos. Seu porte é herbáceo, subarbustivo ou arbóreo (RENNER, 1993; GOLDENBERG et al., 2012). São espécies importantes ecologicamente e para o paisagismo urbano. *Tibouchina* sp. desenvolvem um papel ecológico importante dentro das áreas de regeneração natural, pois são descritas como espécies pioneiras de uma floresta em recuperação, consideradas colonizadoras de áreas degradadas. Possuem comportamento heliófilo, de modo que crescem rapidamente em busca da luz, preparando a área para espécies que tem crescimento lento e necessitam de sombra. Portanto, espécies pioneiras como *Tibouchina* sp. desempenham, papel fundamental no desenvolvimento de ecossistemas florestais naturais (TABARELLI; MANTOVANI, 1999; BORTOLINI et al., 2008). Em trabalho desenvolvido por Zaia e Takaki (1998), observou-se que quando as sementes das espécies foram condicionadas a pouca luz, não germinavam.

Há diversos relatos de *Chrysoporthe* spp. em *Tibouchina* spp. ao redor do mundo, como *C. austroafricana* em *T. granulosa*, na África do Sul (MYBURG et al. 2002); *C. deuterocubensis* em *T. urvilleana* e *T. heteromalla* (GRYZENHOUT et al., 2006; PEGG et al.

2010); *C. hodgesiana* em *T. lepidota*, *T. semidecandra* e *T. urvilleana*, ocorrendo na Colômbia (GRYZENHOUT et al. 2005); *C. doradensis* em *Tibouchina granulosa*, no Brasil (SOARES et al., 2018); *C. puriensis* em *T. candolleana*, *T. heteromalla*, *T. granulosa*, também no Brasil (OLIVEIRA, 2018).

A incidência destas espécies do gênero *Chrysoporthe* causando cancro em espécies nativas de diversas partes do mundo representa um alerta para espécies florestais e para o paisagismo urbano, devido a utilização de árvores do gênero *Tibouchina* na arborização urbana de parques, jardins e parte viária. Isso é importante devido ser necessário selecionar plantas saudáveis para a arborização urbana e que apresentam poucos riscos, para evitar possíveis quedas em transeuntes e uma maior vida útil desses indivíduos arbóreos, servindo para educação ambiental, qualidade de vida e ecológica dentro dos centros urbanos.

REFERÊNCIAS

- BEGOUDE, B. A. D. et al. *Aurifilum*, a new fungal genus in the Cryphonectriaceae from *Terminalia* species in Cameroon. **Antonie Van Leeuwenhoek**, n.98, n.3, p. 263–278, 2010.
- BORTOLINI M. F. et al. *Tibouchina sellowiana* (Cham.) Cogn.: Enraizamento, anatômica e análises bioquímicas nas quatro estações do ano. **Revista Ciência Florestal**, v.18, n.2, p.159-171, 2008.
- BRUNER, S. C. Una enfermedad gangrenosa de lós eucaliptos. **Estaciòn Experimental Agronòmica**, Santiago de las Vegas, v. 37, p. 1-33, 1917.
- CHUNGU, D. et al. Taxonomy and pathogenicity of two novel *Chrysoporthe* species from *Eucalyptus grandis* and *Syzygium guineense* in Zambia. **Mycological Progress**, v. 9, n. 3, p. 379-393, 2010.
- FAN, X. L.; BEZERRA, J. D. P.; TIAN, C. M., CROUS, P. W. Families and genera of diaporthalean fungi associated with canker and dieback of tree hosts. **Persoonia**, v. 40, p.119–134, 2018.
- FERREIRA, M. A. et al. *Capillaureum caryovora* gen.sp.nov. (Cryphonectriaceae) pathogenic to pequi (*Caryocar brasiliense*) in Brazil. **Mycological Progress**, v 18, n.3, p.385-403, 2019.
- FERREIRA, F. A. **Patologia florestal: principais doenças florestais no Brasil**. Viçosa, MG: UFV; SIF, 1989. 570 p.
- FERREIRA, A. F.; MILANI, D. Avaliação de resistência de clones de Eucalipto às infecções naturais de *Cryphonectria cubensis*, com nova metodologia. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 28, n. 2, p. 313-316, 2004.

GOLDENBERG, R.; BAUMGRATZ, J. F. A.; SOUZA, M. L. D'el R. Taxonomia de Melastomataceae no Brasil: retrospectiva, perspectivas e chave de identificação para os gêneros. **Rodriguésia**, v.63, n.1, p.145-161, 2012.

GRYZENHOUT, M. et al. *Chrysoporthe*, a new genus to accommodate *Chryphonectria cubensis*. **Studies in Mycology**, Berlin, v. 50, p. 119-142, 2004.

GRYZENHOUT, M. et al. *Chrysoporthe doradensis* sp. nov. pathogenic to Eucalyptus in Ecuador. **Fungal Diversity**, Hong Kong, v. 20, n. 2, p. 39-57, 2005.

GRYZENHOUT, M. et al. *Aurapex penicillata* gen. sp. nov. from native *Miconia theaezans* and *Tibouchina* spp. in Colombia. **Mycologia**, v.1, n.98, p.105-115, 2006.

GRYZENHOUT, M. et al. Novel hosts of the Eucalyptus canker pathogen *Chrysoporthe cubensis* and a new *Chrysoporthe* species from Colombia. **Mycological Research**, Cambridge, v. 110, n. 7, p. 833-845, 2006.

GRYZENHOUT, M.; WINGFIELD, B. D.; WINGFIELD, M. J. **Taxonomy, phylogeny, and ecology of bark-infecting and tree killing fungi in the Cryphonectriaceae**. Saint Paul: American Phytopathological Society Press, 2009.

GUIMARÃES, L.M.D.S. et al. Genetic control of *Eucalyptus urophylla* and *E. grandis* resistance to canker caused by *Chrysoporthe cubensis*. **Genetics and Molecular Biology**, v.33, p.525-531, 2010.

HEATH, R.N. et al. Discovery of the canker pathogen *Chrysoporthe austroafricana* on native *Syzygium* spp. in South Africa. **Plant Disease**, v.90, n.4, p. 433-438, 2006.

HODGES, C. S. The taxonomy of *Diaporthe cubensis*. **Mycologia**, New York, v. 72, p. 542-548, 1980.

Instituto Brasileiro de Árvores (2019) Relatório 2019. Disponível em <https://www.iba.org/datafiles/publicacoes/relatorios/iba-relatorioanual2019.pdf> acessado em 15/04/2020.

JIANG, N.; FAN, X.; TIAN, C.; CROUS, P.W. Reevaluating Cryphonectriaceae and allied families in Diaporthales. **Mycologia**, v,112, n.1, p. 1-26, 2020.

MAUSSE-SITOE S. et al Endophytic Cryphonectriaceae on native Myrtales: possible origin of *Chrysoporthe* canker on plantation-grown Eucalyptus. **Fungal Biology**, v.120, p.827-835, 2016..

MCDONALD, B. A. The population genetics of fungi: tools and techniques. **Phytopathology**, v. 87, n. 4, p. 448-453, 1997.

MCDONALD, B.; LINDE, C. Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. **Annual Review of Phytopathology**, n.40, p.349-79, 2002.

MYBURG H. et al. *Cryphonectria* canker on *Tibouchina* in South Africa. **Mycological Research**. v.106, p.1299–1306, 2002.

- MYBURG, H. et al. Conspecificity of *Endothia eugeniae* and *Cryphonectria cubensis*: a re-evaluation based on morphology and DNA sequence data. **Mycoscience**, v.44, p.187–196, 2003.
- MYBURG, H. et al. A reassessment of the fungal genera *Cryphonectria* and *Endothia* based on DNA sequence data. **Mycologia**, New York, v. 96, p. 990- 1001, 2004.
- NAKABONGE, G. et al. Distribution of *Chrysoporthe* canker pathogens on *Eucalyptus* and *Syzygium* spp. in eastern and southern Africa. **Plant Disease**, v.90, p.734-740, 2006.
- NAKABONGE, G. et al. Genetic diversity of *Chrysoporthe cubensis* in eastern and southern Africa. **South African Journal of Science**, v.103, n.5-6, p.261-264, 2007.
- OLIVEIRA, M.E.S. **Genetic variability of *Chrysoporthe* spp. in Brazil**. Tese (Doutorado Agronomia/Fitopatologia) – Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras, Lavras – MG, p.79, 2018.
- PALUDZYSZYN FILHO, E (2015) **Indicações de espécies para plantio e clones**. Brasília: 4ªEd. Embrapa Florestas.
- PEGG, G. S. et al. The Eucalyptus canker pathogen *Chrysoporthe cubensis* discovered in eastern Australia. **Australasian Plant Pathology**, v. 39, n. 4, p. 343-349, 2010.
- RENNER, S.S. Phylogeny and classification of the Melastomataceae and Memecylaceae. **Nordic Journal of Botany**, v.13, p.519-540, 1993.
- RODAS, C. A. et al. Discovery of the Eucalyptus canker pathogen *Chrysoporthe cubensis* on native *Miconia* (Melastomataceae) in Colombia. **Plant Pathology**, v. 54, n. 4, p. 460-470, Aug. 2005.
- ROUX, J. et al. Biological and Phylogenetic Analyses Suggest that Two *Cryphonectria* spp. cause Cankers of *Eucalyptus* in Africa. **Plant Disease**, v.87, n.11, 2003
- SANTAROSA, E. et al.. Importância socioeconômica e principais usos do eucalipto. In: SANTAROSA, E.; PENTEADO JÚNIOR, J. F.; GOULART, I. C. G. R. (Org.). **Transferência de tecnologia florestal: cultivo de eucalipto em propriedades rurais: diversificação da produção e renda**. Brasília: Ed. EMBRAPA, p.13-26, 2014.
- SOARES, T.P.F. et al. Canker disease caused by *Chrysoporthe doradensis* and *C. cubensis* on *Eucalyptus* sp. and *Tibouchina* spp. in Brazil. **Tropical Plant Pathology**, v.43, p.314–322, 2018.
- TABARELLI, M.; MANTOVANI, W. Clareiras naturais e a riqueza de espécies pioneiras em uma Floresta Atlântica Montana. **Revista Brasileira de Biologia**, v.59, n.2, p.251-261, 1999.
- VAN DER MERWE, N. A. et al. Multigene phylogenetic and population differentiation data confirm the existence of a cryptic species within *Chrysoporthe cubensis*. **Fungal Biology**, v.114, p. 966-979, 2010.

VAN DER MERWE, N.A. et al. Host switching between native and non-native trees in a population of the canker pathogen *Chrysosporthe cubensis* from Colombia, **Plant Pathology**, v.62, p.642–648, 2013.

VERMEULEN, M. et al. *Cryphonectriaceae* canker pathogens on native and non-native Myrtales in southern Africa. **South African Journal of Botany**, v.74, n.2, p.381-382, 2008.

WINGFIELD, M.; SWART, W.; ABEAR, B. First record of *Cryphonectria* canker of *Eucalyptus* in South Africa. **Phytophylactica**, v. 21, n. 3, p. 311-313, 1989.

ZAIA, J.E.; TAKAKI, M. Estudo da germinação de sementes de espécies arbóreas pioneiras: *Tibouchina pulchra* Cogn. e *Tibouchina granulosa* Cogn. (Melastomataceae). **Acta Botanica Brasilica**, v. 12, n.3, p. 221-229, 1998.

SEGUNDA PARTE – ARTIGOS

ARTIGO 1: *Aurantiocollum eucalypti* gen. sp. nov (Cryphonectriaceae) em clones híbridos de *Eucalyptus* no Brasil

RESUMO

O cancro-do-eucalipto, causado por *Chrysoporthe* spp. (Cryphonectriaceae), é considerada uma importante doença na eucaliptocultura, pois pode ocasionar perdas quantitativas e qualitativas significativas em plantações comerciais. Descobertas de outras espécies e gêneros da família Cryphonectriaceae têm impulsionado os estudos para antever ameaças aos plantios de eucalipto. No presente estudo foi descrito um novo gênero dentro da família Cryphonectriaceae. Os isolados estudados foram recuperados de híbridos de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*, coletados no estado de Tocantins/Brasil, apresentando sintomas de cancro no lenho e sinais de corpos de frutificação na casca da árvore. O fungo foi caracterizado pela utilização de sequências das regiões ITS (Internal Transcribed Spacer), β -tubulina e LSU (Large Subunit of rDNA) e análises morfológicas. Os isolados apresentaram sinais e sintomas característicos da família Cryphonectriaceae. Pelas análises filogenéticas foi constatado que os isolados obtidos de eucalipto formaram um clado distinto de outros gêneros já descritos dentro da família Cryphonectriaceae, com alto valor de suporte para os métodos de máxima verossimilhança, máxima parcimônia e inferência bayesiana. Desse modo, propõe-se que este fungo é um novo gênero da família Cryphonectriaceae e, portanto, denominamos de *Aurantiocollum eucalypti*.

Palavras-chave: eucalipto, híbridos, filogenia, gênero, Cryphonectriaceae

1. INTRODUÇÃO

O cultivo de floresta plantada no Brasil é considerado importante, pois apresenta cerca de 6% do PIB industrial, responsável por 5,2% das exportações brasileiras (IBA, 2019). A madeira produzida possui os mais diversos destinos, entre eles: celulose e papel (36%), siderurgia e carvão vegetal (12%), painéis de madeira e pisos laminados (6%). O cultivo de eucalipto no Brasil tem maior abrangência quando comparado aos demais plantios de outras espécies arbóreas, pois representa cerca de 7,83 milhões de hectares de árvores plantadas, seguido da área de plantio de pinus que somam 1,6 milhão de hectares. Os plantios de eucalipto estão distribuídos por todo o Brasil, mas sua predominância está em Minas Gerais (24%), São Paulo (17%) e Mato Grosso do Sul (16%) (IBA, 2019).

Para o manejo de doenças em plantios de eucalipto, é adotada a prevenção como medida principal de controle de doenças, utilizando-se clones mais resistentes aos patógenos. Entre as doenças que incidem no gênero *Eucalyptus*, podem ser citadas: a ferrugem, provocada pelo fungo *Austropuccinia psidii*; manchas foliares e desfolha de *Calonectria* causada por *Calonectria* spp., o cancro-do-eucalipto, provocada por *Chrysoporthe* spp., dentre outras. O cancro-do-eucalipto pode apresentar alta agressividade se atacar plantios

suscetíveis, causando perdas volumétricas de madeira de em média 70% quando comparadas às árvores de plantios saudáveis. Além da perda volumétrica, a árvore perde sua qualidade para o setor de celulose, por exemplo, pois os polissacarídeos são fontes de energia para fungos causadores do cancro-do-eucalipto, tornando a madeira lignificada e com maior deposição de extrativos, o que afeta diretamente o clareamento do produto (Foekel, 1974; Souza et al., 2010).

Chrysoporthe spp. pertence à família Cryphonectriaceae, que atualmente é composta por 23 gêneros, nos quais 5 gêneros incidem em *Eucalyptus* sp. no mundo, são eles: *Aurantiosacculus*, *Celoporthe*, *Chrysoporthe*, *Cryptometrion* e *Microthia*. As espécies dentro da família Cryphonectriaceae, normalmente, ocorrem ao longo da casca das árvores, exceto as espécies de *Aurantiosacculus*, que se manifestam em folhas, causando manchas. *Aurantiosacculus* é composto por *A. eucalyptorum* e *A. actutatus* causando doença em eucalipto na Austrália (Crous et al., 2012). *Celoporthe* agrupa as espécies *C. cerciana*, *C. eucalypti*, *C. guangdongensis*, *C. indoniensis* distribuídas na China e Indonésia, causando cancro do eucalipto (Chen et al., 2011; Wang et al., 2018), *Cryptometrion aestuescens*, na Indonésia e *Microthia Havanensis* em Cuba (Gryzenhout et al., 2010; Gryzenhout et al., 2006). *Chrysoporthe* tem sua distribuição mais ampla, ocorrendo no Sudeste Asiático (Hodges et al., 1986), África do Sul (Heath et al., 2006), Congo (Hodges et al., 1986), Zâmbia (Chungu et al., 2010), Equador (Gryzenhout et al., 2005), Colômbia (Rodas et al., 2005), Brasil (Soares et al., 2018) e Austrália (Pegg et al., 2010).

Nos últimos anos, outras duas espécies de *Chrysoporthe* spp. foram relatadas causando cancro no Brasil, além de *C. cubensis*. Uma delas já descrita anteriormente no Equador, *Chrysoporthe doradensis*, foi relatada causando cancro em híbridos de eucalipto (Soares et al., 2018). A outra foi descrita recentemente como *C. puriensis* incidindo nas espécies *Tibouchina granulosa*, *T. candolleana* e *T. heteromalla*, mas demonstrou ser patogênico ao eucalipto nos testes de patogenicidade (Oliveira, 2018).

Em coletas realizadas em talhão de híbridos de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* no estado do Tocantins/Brasil, foram observados sintomas de cancro no lenho das árvores, e sinais característicos daqueles provocados pela família Cryphonectriaceae. Entretanto verificou-se a presença de características morfológicas distintas dos gêneros e espécies já descritos. Desse modo, objetivou-se, com esse estudo, caracterizar filogeneticamente e morfológicamente isolados pertencentes à família Cryphonectriaceae provenientes de clones de híbridos de eucalipto.

2. METODOLOGIA

2.1 Coleta de amostras e descrição dos sintomas

O material sintomático foi coletado em um talhão de híbridos de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* com cinco anos de implantação na fazenda experimental da Universidade Federal do Tocantins, campus Gurupi, Tocantins, Brasil. As amostras foram coletadas de árvores que apresentavam sintomas de cancro, totalizando oito amostras. O material foi armazenado em sacos de papel e encaminhado ao Laboratório de Patologia Florestal da Universidade Federal de Lavras. As culturas monospóricas foram obtidas pelo fracionamento do corpo de frutificação do fungo com uma agulha estéril para a liberação dos esporos. Os esporos foram suspensos em água estéril e transferidos para placas de Petri contendo meio de batata-dextrose-ágar (BDA) a 20%. As placas foram incubadas a 28 °C por 24h. De cada placa, esporos únicos germinados foram transferidos para placas contendo meio YEMA (extrato de levedura a 0,2%, extrato de malte a 2%, ágar a 2%) e incubados a 28 °C por 7 dias. Em seguida, as culturas puras dos isolados fúngicos foram preservadas em microtubo a seco, armazenados a 10 °C e pelo método de Castellani (1939), mantidos em temperatura ambiente.

2.2 Amplificação de fragmentos e análises filogenéticas

Oito isolados foram cultivados em meio líquido de extrato de malte por 10 dias para obtenção de biomassa fúngica suficiente para extração de DNA. Cerca de 200 mg de micélio seco foi macerado em nitrogênio líquido, e o DNA foi extraído utilizando o método CTAB (Doyle e Doyle, 1987). A qualidade e quantidade do DNA foram verificadas usando o equipamento NanoDrop®. As amostras de DNA foram diluídas em água ultrapura para a concentração de 50 ng/μl e 1 μl do DNA foi utilizado em cada reação de PCR.

A região do espaçador interno transcrito (ITS1-5.8S-ITS2) foi amplificada utilizando os primers ITS1 e ITS4 (White et al., 1990). A região do gene β-tubulina foi amplificada utilizando dois pares de primers, Bt1a/Bt1b e Bt2a/Bt2b (Glass e Donaldson, 1995). A região da subunidade grande (LSU) do DNA ribossômico foi amplificada usando os primers LROR e LR5 (White et al., 1990). Todas as reações de PCR foram preparadas em um volume final de 25 μl, usando 2,5 μl de 10 × tampão de reação, 2,5 μl de MgCl₂ (25 mM), 0,5 μl de dNTPs (10 mM), 0,5 μl de cada primer (10 μM), 1 μl de solução de DNA e 0,3 μl de Taq polimerase usando a Polimerase de DNA GoTaq® (Promega, Madison, WI, EUA) e 17,2 μl de água MiliQ. A PCR foi realizada em um termociclador (My Cycler™ -BIO-RAD) e as condições foram ajustadas para cada gene como descrito por Glass e Donaldson (1995) e White et al. (1990). Os produtos da PCR foram visualizados em géis de agarose a 1% que foram corados

com GelRed (Biotium®) adicionado ao gel, seguido da corrida de eletroforese e posterior visualização realizada em fotodocumentador MiniBis Pro (Uniscience). A purificação do produto de PCR e sequenciamento foi realizada em laboratório da Macrogen Company, na Coreia.

As sequências de nucleotídeos foram editadas, utilizando o Sequence Assembly Software – Seqassem e alinhadas no Mafft online. As sequências foram comparadas com as sequências de referência da família Cryphonectriaceae disponíveis no banco de dados de nucleotídeos do GenBank do NCBI (Tabela 1). As sequências das regiões ITS e β -tubulina foram analisadas separadamente e combinadas.

A análise de máxima parcimônia (MP) foi realizada utilizando o software PAUP * 4.0 (Swofford, 2002). Uma análise de bootstrap (1000 réplicas) também foi feita no conjunto de dados para determinar os níveis de confiança dos ramos. Foram calculados também o número de caracteres informativos para parcimônia, índice de consistência (IC), índice de retenção (IR) e índice composto (RCI). A análise de verossimilhança foi realizada através do software MEGA v.6 (Tamura et al., 2013), utilizando modelo de evolução Tamura-Nei (Tamura e Nei, 1993) para ITS. Para região β -tubulina e análise combinada de ITS e β -tubulina (BT) foi utilizado o modelo Hasegawa-Kishino-Yano (Hasegawa et al., 1985). Para a região LSU foi utilizado o modelo de evolução Kimura 2-parâmetros (Kimura, 1980). A confiança dos ramos foi calculada usando 1000 réplicas de bootstrap. A inferência bayesiana (IB) foi usada para gerar probabilidades posteriores (PP) para nós de consenso usando MRBAYES v 3.1 (Huelsenbeck, 2001). A análise foi realizada utilizando o algoritmo MCMC (Markov Chain Monte Carlo) utilizando o modelo de melhor ajuste selecionado pelo critério de informação de Akaike em MrModeltest2.3. (Larget e Simon, 1999). As árvores foram visualizadas e editadas no software FigTree. As análises de ML, MP e IB foram feitas para as regiões ITS e β -tubulina separadamente e combinadas duas porções do gene BT e da região ITS. A combinação foi determinada através do teste de homogeneidade de partição (PHT) (Farris et al., 1995).

As sequências de *Diaporthe ambigua* foram definidas como outgroup para as análises filogenéticas das regiões ITS e β -tubulina. Para as análises das sequências de LSU foram utilizadas *Diaporthe eres* e *D. fibrosa* como outgroup.

Tabela 1. Espécies, identificação dos isolados e número de acesso no GenBank das sequências de referência da família Cryphonectriaceae e as sequências de *outgroup* utilizadas nas análises. Isolados em negrito foram sequenciados neste estudo.

Espécies	Identificação dos isolados	Hospedeiros	Localização	Número de acesso ao Genbank			
				LSU	ITS	BT1	BT2
	HUGUFT31A	<i>Eucalyptus sp.</i>	Brasil	MT770831	MT770823	MW030513	MW030513
	HUGUFT31B	<i>Eucalyptus sp.</i>	Brasil	MT770833	MT770825	MW030514	MW030514
	HUGUFT32B	<i>Eucalyptus sp.</i>	Brasil	MT770834	MT770826	MW030515	MW030515
	HUGUFT33A	<i>Eucalyptus sp.</i>	Brasil	MT770836	MT770828	MW030517	MW030517
	HUGUFT33B	<i>Eucalyptus sp.</i>	Brasil	MT770837	MT770829	-	-
	HUGUFT34A	<i>Eucalyptus sp.</i>	Brasil	MT770835	MT770827	MW030516	MW030516
	HUGUFT34B	<i>Eucalyptus sp.</i>	Brasil	MT770838	MT770830	MW030518	MW030518
	HUGUFT35A	<i>Eucalyptus sp.</i>	Brasil	MT770832	MT770824	-	-
<i>Amphilogia gyrosa</i>	CMW10469	<i>Elaeocarpus dentatus</i>	Nova Zelândia	AY194107	AF452111	AF525707	AF525714
	CMW10470	<i>Elaeocarpus dentatus</i>	Nova Zelândia	AY194108	AF452112	AF525708	AF525715
<i>Aurantioportha corni</i>	ATCC66834	<i>Cornus alternifolia</i>	EUA	AF277133	N/A	N/A	N/A
	CMW10526	<i>Cornus alternifolia</i>	EUA	N/A	DQ120762	AH015163	AH015163
	CBS24590	<i>Cornus alternifolia</i>	EUA	AF408343	N/A	N/A	N/A
<i>Aurantiosacculus eucalyptorum</i>	CPC13229	<i>Eucalyptus globulus</i>	Austrália	JQ685521	N/A	N/A	N/A
<i>Aurapex penicillata</i>	CMW10030	<i>Miconia theaezans</i>	Colômbia	AY194103	AY214311	AY214239	AY214275
	CMW11295	<i>Miconia theaezans</i>	Colômbia	AY194089	N/A	N/A	N/A
	CMW10035	<i>Miconia theaezans</i>	Colômbia	N/A	AY214313	AY214241	AY214277
<i>Aurifilum marmelostoma</i>	CMW28285	<i>Terminalia mantaly</i>	Camarões	HQ171215	FJ882855	FJ900585	FJ900590
	CMW28288	<i>Terminalia ivorensis</i>	Camarões	HQ171216	FJ882856	FJ900586	FJ900591
<i>Aurifilum terminali</i>	CSF10748	<i>Terminalia ivorensis</i>	China	MN258782	MN199834	MN258772	MN258767
	CSF10754	<i>Terminalia ivorensis</i>	China	MN258783	MN199835	MN258773	MN258768
<i>Capillaureum caryovora</i>	CBC04	<i>Caryocar brasiliense</i>	Brasil	MG192100	MG192090	MG211833	MG211814
	CBING01	<i>Caryocar brasiliense</i>	Brasil	MG192103	MG192093	MG211826	MG211807
	CBL02	<i>Caryocar brasiliense</i>	Brasil	MG192104	MG192094	MG211827	MG211808
<i>Celoportha borbonica</i>	CMW44128	<i>Tibouchina grandiflora</i>	La Reunión	N/A	MG585741	N/A	MG585725

<i>Celoporthe cerciana</i>	CERC9128	<i>Eucalyptus sp.</i>	GuangDong, China	N/A	MH084352	MH084412	MH084382
<i>Celoporthe dispersa</i>	CMW9976	<i>Syzygium cordatum</i>	África do Sul	HQ730853	DQ267130	DQ267136	DQ267142
	CMW9978	<i>Syzygium cordatum</i>	África do Sul	HQ730854	AY214316	DQ267135	DQ267141
<i>Celoporthe eucalypti</i>	CMW26900	<i>Eucalyptus sp.</i>	China	HQ730862	HQ730836	HQ730816	HQ730826
	CMW26908	<i>Eucalyptus sp.</i>	China	HQ730863	HQ730837	HQ730817	HQ730827
<i>Celoporthe fontana</i>	CMW29375	<i>Syzygium guineense</i>	Zâmbia	N/A	GU726940	GU726952	GU726952
	CMW29376	<i>Syzygium guineense</i>	Zâmbia	N/A	GU726941	GU726953	GU726953
<i>Celoporthe guangdongensis</i>	CMW12750	<i>Eucalyptus sp.</i>	China	HQ730856	HQ730830	HQ730820	HQ730810
<i>Celoporthe indonesiensis</i>	CMW10781	<i>Syzygium aromatiun</i>	Indonésia	HQ730855	N/A	N/A	N/A
<i>Celoporthe tibouchineae</i>	CMW44126	<i>Tibouchina grandiflora</i>	La Reunión	N/A	MG585747	N/A	MG585731
<i>Celoporthe syzygii</i>	CMW34023	<i>Syzygium cumini</i>	China	HQ730857	HQ730831	HQ730811	HQ730821
	CMW24912	<i>Syzygium cumini</i>	China	HQ730859	N/A	N/A	N/A
<i>Celoporthe woodiana</i>	CMW13936	<i>Tibouchina granulosa</i>	África do Sul	N/A	DQ267131	DQ267137	DQ267143
<i>Chrysocrypta corymbiaie</i>	CBS132528	<i>Corymbia sp.</i>	Austrália	JX069851	N/A	N/A	N/A
<i>Chrysomorbus lagerstroemiae</i>	CERC8780	<i>Lagerstroemia speciosa</i>	China	KY929320	KY929330	KY929340	KY929350
<i>Chrysoporthe austroafricana</i>	CMW62	<i>Eucalyptus sp.</i>	África do Sul	AY194097	N/A	N/A	N/A
	CMW10192	<i>Syzygium cordatum</i>	África do Sul	N/A	AY214299	GQ290176	GQ290187
	CMW9327	<i>Tibouchina granulosa</i>	África do Sul	N/A	GQ290158	GQ290185	GQ290194
<i>Chrysoporthe cubensis</i>	CMW10028	<i>Miconia rubiginosa</i>	Colômbia	N/A	GQ290153	GQ290175	GQ290186
	CMW10669	<i>Eucalyptus sp.</i>	República do Congo	N/A	GQ290154	GQ290177	GQ290188
	CMW12734	<i>Rhyncanthera mexicana</i>	México	N/A	DQ368769	AH015646	GQ290191
	CBS101281	<i>Eucalyptus urophylla</i>	Camarões	AF408338	N/A	N/A	N/A
	CBS50563	<i>Eucalyptus saligna</i>	República do Congo	AF408339	N/A	N/A	N/A
	CC3	<i>Eucalyptus sp.</i>	Brasil	N/A	KX639125	KX639091	KX639108
	CT25	<i>Tibouchina heteromalla</i>	Brasil	N/A	KX639129	KX639095	KX639112
<i>Chrysoporthe deuterocubensis</i>	CMW8758	<i>Eucalyptus grandis</i>	Venezuela	AY194098	N/A	N/A	N/A
	CMW8650	<i>Syzygium aromaticum</i>	Indonésia	N/A	AY084001	AY084024	GQ290193

	CMW12745	<i>Tibouchina urvilleana</i>	Singapura	N/A	DQ368764	GQ290183	AH015651
<i>Chrysoportha doradensis</i>	CMW11287	<i>Eucalyptus grandis</i>	Equador	N/A	GQ290156	GQ290179	GQ290190
	CMW9126	<i>Eucalyptus deglupta</i>	Equador	N/A	DQ224037	DQ224044	DQ224045
	CE38	<i>Eucalyptus sp.</i>	Brasil	N/A	KX639134	KX639100	KX639117
<i>Chrysoportha hodgesiana</i>	CMW9995	<i>Tibouchina semidencandra</i>	Colômbia	N/A	AY956969	AH014904	AH014904
	CMW10625	<i>Tibouchina theaezans</i>	Colômbia	N/A	AY262399	AY262391	AY956979
<i>Chrysoportha inopina</i>	CMW12727	<i>Tibouchina lepidota</i>	Colômbia	N/A	DQ368777	GQ290180	DQ368806
	CMW12731	<i>Tibouchina lepidota</i>	Colômbia	N/A	DQ368779	GQ290182	DQ368811
	CMW12729	<i>Tibouchina lepidota</i>	Colômbia	N/A	DQ368778	AH015656	DQ368809
<i>Chrysoportha syzygiicola</i>	CMW29942	<i>Syzygium guineense</i>	Zâmbia	N/A	FJ655007	FJ805232	FJ805238
	CMW29940	<i>Syzygium guineense</i>	Zâmbia	N/A	JN942335	FJ805230	FJ805236
<i>Chrysoportha zambiensis</i>	CMW29930	<i>Eucalyptus grandis</i>	Zâmbia	N/A	FJ655004	FJ858711	FJ805235
	CMW29928	<i>Eucalyptus grandis</i>	Zâmbia	N/A	FJ655002	FJ858709	FJ805233
<i>Corticimorbus sinomyrti</i>	CERC3629	<i>Rhodomyrtus tomentosa</i>	China	KT167179	KT167169	KT167189	KT167189
	CERC3631	<i>Rhodomyrtus tomentosa</i>	China	KT167180	KT167170	KT167190	KT167190
	CERC3061	<i>Rhodomyrtus tomentosa</i>	China	N/A	KT167164	KT167184	KT167184
<i>Cryphonectria decipiens</i>	CMW10436	<i>Quercus suber</i>	Portugal	JQ862750	AF452117	AF525703	AF525710
<i>Cryphonectria macrospora</i>	CMW10914	<i>Castanea cuspidata</i>	Japão	JQ862749	N/A	N/A	N/A
<i>Cryphonectria nitschkei</i>	CMW10527	<i>Quercus mongolica</i>	Rússia	AF408341	DQ120761	AH015162	AH015162
<i>Cryphonectria parasitica</i>	CMW7048	<i>Quercus virginiana</i>	EUA	AY194100	AF368330	AF273076	AF273470
<i>Cryphonectria quercicola</i>	CFCC52140	<i>Quercus wutaishansea</i>	China	N/A	MG866026	MG896113	MG896117
<i>Cryphonectria quercus</i>	CFCC52138	<i>Quercus aliena</i>	China	N/A	MG866024	MG896111	MG896115
<i>Cryphonectria radicalis</i>	CMW10477	<i>Quercus aliena</i>	Itália	AY194102	AF368328	AF368347	AF368347
<i>Cryptometrion aestuescens</i>	CMW18790	<i>Eucalyptus grandis</i>	Indonésia	HQ171211	GQ369458	GQ369455	GQ369455
	CMW18793	<i>Eucalyptus grandis</i>	Indonésia	HQ171212	N/A	N/A	N/A
<i>Diversimorbus metrosiderotis</i>	CMW37321	<i>Meterosideros angustifolia</i>	África do Sul	JQ862827	JQ862870	JQ862911	JQ862952
	CMW37322	<i>Meterosideros angustifolia</i>	África do Sul	JQ862828	JQ862871	JQ862912	JQ862953
<i>Endothia gyrosa</i>	AR3396	<i>Quercus sp.</i>	EUA	AF362555	N/A	N/A	N/A

	CMW2091	<i>Quercus palustris</i>	EUA	AY194114	AF368325	AH011601	AH011601
	CMW10442	<i>Quercus palustris</i>	EUA	AY194115	AF368326	AH011602	AH011602
<i>Holocryphia capensis</i>	CMW37887	<i>Meterosideros angustifolia</i>	África do Sul	JQ862811	JQ862854	JQ862895	JQ862936
<i>Holocryphia eucalypti</i>	CMW7033	<i>Meterosideros angustifolia</i>	África do Sul	JQ862794	JQ862837	JQ862878	JQ862919
	CMW7035	<i>Meterosideros angustifolia</i>	África do Sul	JQ862795	JQ862838	JQ862879	JQ862920
<i>Holocryphia gleniana</i>	CMW37334	<i>Meterosideros angustifolia</i>	África do Sul	N/A	JQ862834	JQ862875	JQ862916
<i>Holocryphia mzansi</i>	CMW37337	<i>Meterosideros angustifolia</i>	África do Sul	JQ862798	JQ862841	JQ862882	JQ862923
<i>Immersiporthe knoxdaviesiana</i>	CMW37314	<i>Rapanea melanophloeos</i>	África do Sul	JQ867555	JQ862765	JQ862785	JQ862775
	CMW37315	<i>Rapanea melanophloeos</i>	África do Sul	JQ862756	JQ862766	JQ862786	JQ862776
<i>Latruncellus aurorae</i>	CMW28274	<i>Galpinia transvaalica</i>	Suazilândia	HQ171213	GU726946	GU726958	GU726958
	CMW28276	<i>Galpinia transvaalica</i>	Suazilândia	HQ730872	GU726947	GU726959	GU726959
<i>Luteocirrhus shearii</i>	CMW130775	<i>Banksia baxteri</i>	Austrália	KC197018	KC197024	KC197015	KC197009
	CMW130776	<i>Banksia baxteri</i>	Austrália	KC197019	KC197021	KC197012	KC197006
<i>Microthia havanensis</i>	CMW11299	<i>Myrcia faya</i>	Madeira	AY194087	N/A	N/A	N/A
	CMW11300	<i>Myrcia faya</i>	Madeira	AY194088	N/A	N/A	N/A
	CMW11301	<i>Eucalyptus saligna</i>	Azores	N/A	AY214323	AY214251	AY214287
	CMW14550	<i>Eucalyptus saligna</i>	México	N/A	DQ368735	AH015792	AH015792
<i>Myrtonectria myrtacearum</i>	CMW46433	<i>Heteropyxis natalensis</i>	África do Sul	MG585750	MG585736	MG585734	MG585720
<i>Rostraureum tropicale</i>	CMW9972	<i>Terminalia ivorensis</i>	Equador	AY194092	AY167436	AY167426	AY167436
	CMW10796	<i>Terminalia ivorensis</i>	Equador	N/A	AY167438	AY167428	AY167433
<i>Ursicollum fallax</i>	CMW18119	<i>Coccoloba uvifera</i>	EUA	EF392860	DQ368755	AH015658	DQ368759
	CMW18115	<i>Coccoloba uvifera</i>	EUA	N/A	DQ368756	AH015659	DQ368761
<i>Diaporthe ambigua</i>	CMW5587	<i>Coccoloba uvifera</i>	N/A	N/A	AJ458388	AF543822	AF543820
<i>Diaporthe eresb</i>	AR3538	<i>Acer campestre</i>	Áustria	AF408350	N/A	N/A	N/A
<i>Diaporthe fibrosab</i>	AR3425	<i>Rhamnus catharticus</i>	Áustria	AF408351	N/A	N/A	N/A

2.3 Caracterização morfológica dos isolados

Os picnídios foram seccionados e as lâminas foram confeccionadas para caracterização morfológica e medições, utilizando microscópio LABOMED Lx400, Labo America, Fremont, Canadá, câmera iVu 500 e software Capture Pro 2.8.8.5. Foram realizadas 50 medições de cada estrutura, definindo tamanhos máximo (máx) e mínimo (mín) das estruturas de conídios, conidióforos, picnídios e lóculos. As medições foram representadas como: (mín-)(média-DP)-(média + DP)(-máx) μm , em que DP é o desvio padrão.

3. RESULTADOS

3.1 Obtenção dos isolados e sintomatologia

Foram obtidos oito isolados do fungo de um híbrido de *E. grandis* x *E. urophylla* com sintomas de cancro e rachaduras ao longo do tronco (Figura 1a). Os sinais foram encontrados na casca do tronco (Figura 1b-c). Os isolados foram obtidos dos picnídios provenientes de diversas alturas do tronco. Os sintomas observados foram semelhantes aos descritos para *C. cubensis* e *C. doradensis*, como a presença de cancrs típicos, rachadura na casca e presença de picnídios ao longo do tronco.



Figura 1. Sintomatologia de *Aurantiocollum eucalypti* em indivíduos híbridos de *E. grandis* x *E. urophylla*. a) Árvore doente de eucalipto apresentando cancro no tronco na cidade de Gurupi, no estado do Tocantins, Brasil. b, c) Sinais de *Aurantiocollum eucalypti* presentes na casca.

3.2 Análises filogenéticas

As sequências dos oito isolados em estudo foram comparados com 111 sequências pertencentes a família Chyphonectriaceae das regiões ITS (Internal Transcribed Spacer), BT1 (β -tubulina-1) e BT2 (β -tubulina-2) e LSU (Large Subunit of rDNA). (Tabela 1). O Teste de Homogeneidade de Partição revelou que o conjunto de dados de ITS e β -tubulina não apresentam nenhum conflito significativo ($p=0,01$) e, portanto, podem ser combinados.

As árvores filogenéticas apresentaram consistência e topologias semelhantes para as regiões gênicas separadas e combinadas nas diferentes análises. As estatísticas obtidas para as árvores de máxima parcimônia para ITS foram: índice de consistência (IC) de 0,51; índice de retenção (IR) de 0,83; índice composto (RCI) de 0,42. Os valores obtidos para região β -tubulina foram 0,54 (IC); 0,83 (IR); 0,45 (RCI). A análise concatenada das regiões ITS e β -tubulina apresentaram os seguintes índices: 0,52 (IC); 0,81 (IR); 0,42 (RCI). Já as estatísticas obtidas para a região LSU são: 0,62 (IC); 0,82 (IR); 0,50 (RCI).

Para análise da região ITS foram utilizadas 84 sequências, e as bases nucleotídicas alinhadas produziram 694 caracteres, sendo 441 constantes, 62 variáveis e 191 informativos. O clado correspondente aos isolados sequenciados no presente estudo foi suportado por 99 e 100% de bootstrap para análise máxima verossimilhança (ML) e de máxima parcimônia (MP), respectivamente, e 1,0 de probabilidade posterior (PP) (Anexo A). Para região β -tubulina, foram utilizadas 90 sequências, com bases nucleotídicas alinhadas totalizando 2089 caracteres, sendo 1274 constantes, 127 variáveis e 688 informativos. O clado foi suportado com 99% (ML), 97% (MP) e 1.0 (PP) (Anexo B). O alinhamento dos dados combinados de ITS e β -tubulina continham 81 sequências, que geraram 2783 caracteres, 1717 constantes, 188 variáveis e 878 informativos. O clado foi suportado por 99% (ML), 100% (MP) e 1.0 (PP) (Figura 2).

Para LSU foram utilizadas 66 sequências que produziram 862 caracteres, 777 constantes, 24 variáveis e 61 informativos. O clado formado com os isolados em estudo foi suportado por 93% (MP) e 0.97 (PP) (Figura 3).

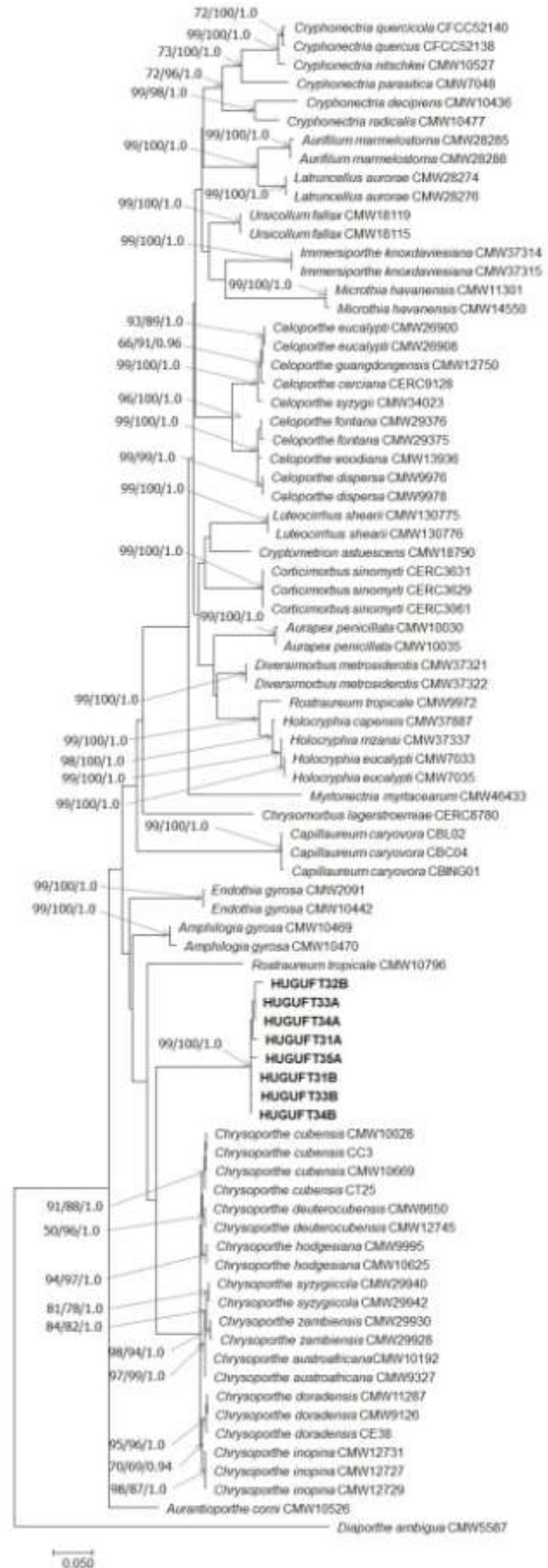


Figura 2. Árvore filogenética baseada na análise de máxima verossimilhança obtida de dados combinados das regiões ITS e β -tubulina. Valores de bootstrap (>60%) para análise de verossimilhança (ML), máxima parcimônia (MP) e probabilidade posterior (PP) são indicados nos ramos (ML/MP/PP). Os isolados em negrito foram sequenciados nesse estudo. *Diaporthe ambigua* foi definido como *outgroup*.

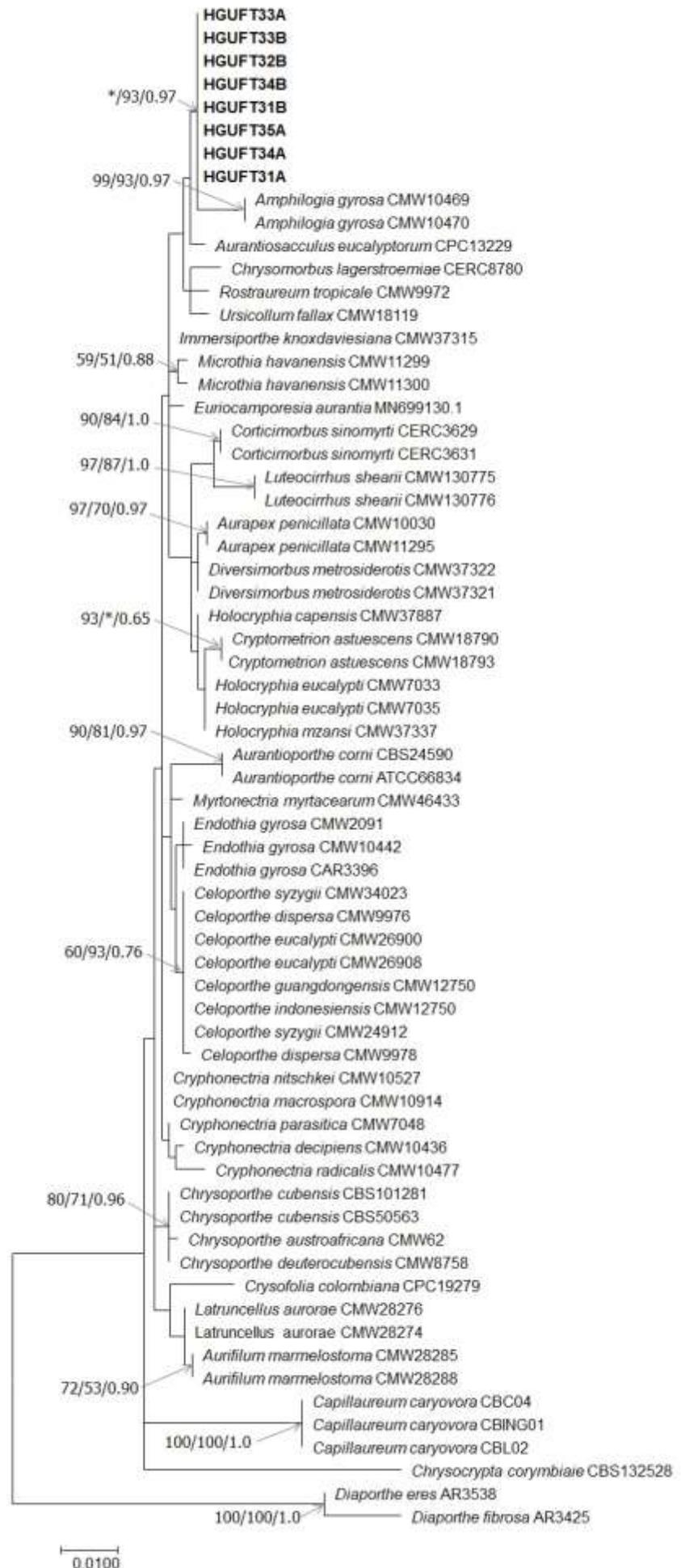


Figura 3. Árvore filogenética baseada na análise verossimilhança obtida de dados de seqüências da região LSU. Valores de bootstrap (>60%) para análise de verossimilhança (ML), máxima parcimônia (MP) e probabilidade posterior (PP) são indicados nos ramos (ML/MP/PP). Isolados em negrito foram sequenciados nesse estudo. *Diaporthe eres* e *D. fibrosa* foram definidas como *outgroup*.

3.3 Caracterização morfológica e taxonômica

Aurantiocollum G.M.S. Rego, M.E.S. Oliv., J. N. Rodr., I.A.L.Souz. & M.A.Ferr. gen. nov.

Etimologia: Latim, Aurantio, cor alaranjada. Collum, pescoço, sinais de estrutura de frutificação.

Notas: Apenas estruturas anamórficas puderam ser observadas para *Aurantiocollum eucalypti*.

Espécie-tipo: *Aurantiocollum eucalypti* G.M.S. Rego, M.E.S. Oliv., J. N. Rodr., I.A.L.Souz. & M.A.Ferr.

Diagnóstico: *Aurantiocollum* é semelhante a *Ursicollum* considerando a cor da base do conidioma, alaranjada e posição superficial a levemente imersa. Difere dos gêneros *Amphilogia*, *Aurantioportha*, *Celoportha* e *Rostraureum* em relação a quantidade de lóculos, pois estes gêneros se apresentam apenas como uniloculares. *Aurantiocollum* não possui paráfises, diferenciando-se dos gêneros: *Aurifilum*, *Celoportha*, *Holocryphia*, *Immersiportha* e *Microthia*. A forma dos conídios é semelhante apenas aos gêneros *Chrysomorbus* e *Corticomorbus* descritos como fusóides a ovoides (Gryzenhout et al., 2009, Ferreira et al., 2019). A caracterização morfológica de *Aurantiocollum* permite afirmar que este fungo não consegue ser enquadrado em nenhum dos gêneros da família devido às suas diferenças. As análises filogenéticas de regiões combinadas e região LSU permitem inferir que este gênero é separado de outros gêneros dentro da família Cryphonectriaceae.

Descrição: As características das estruturas assexuadas em *Aurantiocollum* são típicas de fungos na família Cryphonectriaceae. conidioma de cor alaranjada, base do conidioma superficial a levemente imerso. Forma do conidioma de pulvinato a piriformes e multiloculares. Conidióforos flask-shaped (formato de frasco), hialinos. Células conidiogênicas flask-shaped (formato de frasco). Paráfises são ausentes. Conídios asseptados, hialinos, ovoides a elipsoides. Tecido de *Textura intricata* na parte central e margens do conidioma. A fase sexual é desconhecida.

Aurantiocollum eucalypti G.M.S. Rego, M.E.S. Oliv., J. N. Rodr., I.A.L.Souz. & M.A.Ferr.

(Figura 4).

Etimologia: Refere-se ao nome do gênero do hospedeiro, *Eucalypti*.

Holotipo: Brasil: Gurupi, estado do Tocantins. Universidade Federal do Tocantins, coletado por Jovielly Neves Rodrigues e Mara Elisa Soares de Oliveira.

Outras amostras coletadas: HUGUFT31A, HUGUFT31B, HUGUFT32B, HUGUFT33A, HUGUFT33B, HUGUFT34A, HUGUFT34B e HUGUFT35A em Gurupi, estado do Tocantins.

Descrição: Conidioma ocorrendo na superfície da casca ou levemente imersas, cor alaranjada, piriforme a pulvinato (Figura 4a). Bases do conidioma (Figura 4b,c,d), (89,58-) (114,926) - (380,98)(-734,9) μm de comprimento, (60,12-)(123,986)-(391,33)(-616,0) μm de largura. Lóculos, geralmente multiloculares (Figura 4b,c,d) (55,35-)(54,113)-(159,719)(-386,7) μm de comprimento e (26,91-) (30,641)-(235,127)(-455,5) μm de largura. Conidióforos flask-shaped, (8,967-)(9,888)-(12,416)(-13,831) μm . Células conidiogênicas em formato de frasco (Figura 4e), (3,894-)(4,889)-(6,785) (-7,487) μm . Paráfises ausentes. Conídios (Figura 4f) hialinos, asseptados, ovóides a elipsóides, (1,403-)(1,97)-(2,93)(-3,56) μm de comprimento, (1,031-)(1,246)-(2,026)(-2,831) μm de largura. Tecido de *Textura intricata* na parte central e margens do conidioma (Figura 4g).

Características da cultura: O crescimento das colônias em meio YEMA formaram colônias brancas com aspecto cotonoso, quando jovens, tornando-se laranja após 15 dias (Figura 4h), assumindo coloração marrom em colônias com mais de 60 dias (Figura 4i) quando mais velhas. Temperatura ótima de crescimento variou de 25 a 30°C.

Substrato: Casca de tronco de indivíduo híbrido de *E. grandis* x *E. urophylla*.

Distribuição: Cidade de Gurupi, estado do Tocantins.

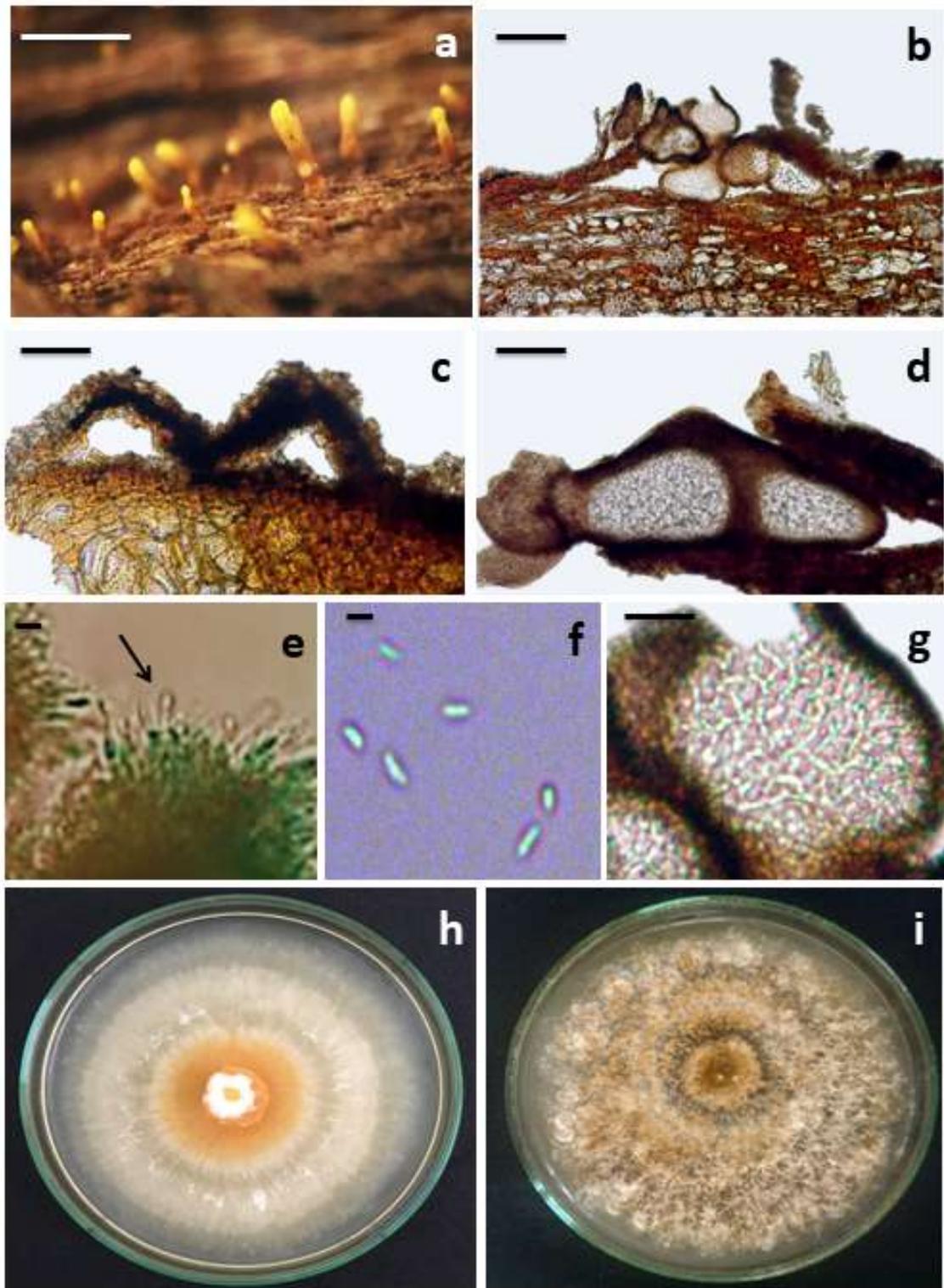


Figura 4. Fotomicrografias de picnídios de *Aurantiocollum eucalypti*. a) Picnídio sobre a casca. b,c,d) Corte longitudinal do conidioma. e) Célula conidiogênica. f) Conídios. g) Tecido textura intricata. h) Cultura em meio YEMA aos 15 dias i) Cultura em meio YEMA aos 60 dias. Barras de escala: a (500 µm); b, c, d, g (100 µm); e, f (20 µm).

4. DISCUSSÃO

Nesse estudo foi isolado um fungo, associado ao cancro em árvores, ocorrendo em plantio clonal de híbridos de *Eucalyptus* no Brasil. Após as análises filogenéticas e caracterização morfológica, constatou-se que o fungo em questão é uma espécie de um novo gênero pertencente à família Cryphonectriaceae. Sendo neste estudo descrito como *Aurantiocollum eucalypti*.

As características morfológicas da família Cryphonectriaceae são marcadas por variações na coloração da massa de esporos, posição e coloração dos corpos de frutificação, variação no tamanho, forma de estruturas reprodutivas e textura. Como exemplo, a posição do picnídio na casca de espécies dessa família pode variar de imersa, semi-imersa, levemente imersa e superficial. Em *Aurantiocollum eucalypti*, os picnídios se manifestam em posições distintas ao longo da casca, de levemente imersa a superficial, semelhante a gêneros como *Aurapex*, *Celoporthes*, *Chrysoporthes*, *Rostraureum* e *Ursicollum* (Gryzenhout et al., 2009). *Aurantiocollum*, diferencia-se dos gêneros *Aurantioporthes*, *Celoporthes* e *Rostraureum* em relação a quantidade dos lóculos, pois se apresentam como uniloculares (Beier et al., 2015; Gryzenhout et al., 2009). *Aurantiocollum* tem como característica bem evidenciada, a *textura* intricada na parte central e margens do conidióma, diferenciando-se de gêneros com textura globulosa, como: *Aurantioporthes*, *Chrysomorbus*, *Latruncellus*, *Luteocirrhus* (Beier et al., 2015; Chen et al., 2017; Vermeulen et al., 2011; Crane e Burgess, 2013); globulosa e porrecta em *Aurapex* e *Chrysoporthes* (Gryzenhout et al., 2006; Gryzenhout et al., 2004), porrecta em *Aurifilium* (Begoude et al., 2010), angularis em *Chrysocrypta* (Crous e Groenwald, 2012), e intricada no centro, mas globulosa nas margens em *Capillaureum* (Ferreira et al., 2019).

As características morfológicas são importantes e podem ser úteis para a descrição de fungos. Porém, a filogenia permanece sendo a única ferramenta capaz de separar gêneros e espécies dentro da família Cryphonectriaceae. Isto porque, de acordo com as características consideradas como gerais para a família, como alteração de coloração para roxo em contato com KOH, a espécie *Aurantisaccullus castanae* não pertenceria à família, por ter essa característica ausente. Entretanto, através das análises filogenéticas, *A. castanae* permanece na família Cryphonectriaceae (Cheewangkoon et al., 2009; Jiang et al., 2020). A sintomatologia das espécies dentro da família Cryphonectriaceae também ocorre de modo comum, incidindo na casca das árvores em sua maioria. No entanto, a exceção dentro do gênero são as espécies *Aurantisaccullus actutatus* e *A. eucalyptorum*, que apresentam sintomas nas folhas (Crous et al., 2012; Jiang et al., 2020).

Nos estudos filogenéticos, os isolados de *Aurantiocollum eucalypti* foram comparados com 23 gêneros pertencentes a família Cryphonectriaceae, e foram agrupados em clados distintos e bem suportados. A filogenia do presente estudo foi baseada nos modelos de Máxima Verossimilhança (MV), Máxima Parcimônia (MP) e Inferência Bayesiana (IB), as quais obtiveram alto valor de suporte no clado que abrigou os isolados de *A. eucalypti*. As análises para as regiões estudadas apresentaram os seguintes valores de *bootstrap* e probabilidade posterior: a região ITS apresentou valores de 99% (ML), 100% (MP) e 1.0 (PP); a região β -tubulina com 99% (ML), 97% (MP), e 1.0 (PP); a análise concatenada com 99% (ML), 100% (MP) e 1.0 (PP), e a região LSU apresentou 93% (MP) e 1.0 (PP).

A reclassificação da família Cryphonectriaceae proposta por Jiang et al (2020), utilizando as regiões ITS, 28S, *tef-1 α* e *rpb2* dividiu a família em dois grandes sub-clados, onde o sub-clado 1 acomodou os gêneros: *Aurapex*, *Aurifilum*, *Celoporthe*, *Chrysomorbus*, *Corticomorbus*, *Cryphonectria*, *Cryptometrion*, *Diversimorbus*, *Holocryphia*, *Immersiporthe*, *Latruncellus*, *Luteocirrhus*, *Microthia*, *Myrtonectria* e *Ursicollum*. No sub-clado 2, foram agrupados: *Amphilogia*, *Aurantioporthe*, *Aurantiosacculus*, *Chrysoporthe*, *Endothia* e *Rostraureum*. Levando em consideração a reclassificação proposta por Jiang et al. (2020) é possível inferir que *Aurantiocollum eucalypti* estaria agrupado no sub-clado 2, juntamente com as demais espécies citadas. Esta hipótese é fundamentada a partir da filogenia do presente trabalho mediante a análise da região β -tubulina, indicada por Gryzenhout et al. (2009) para separação de gêneros e espécies dentro de Cryphonectriaceae. O gênero *Capillaureum* (Ferreira et al., 2019) estaria agrupado no sub-clado 1. Para os gêneros *Euriocamporesia* (Hyde et al., 2020) e *Chrysocrypta* (Crous et al., 2012), não é possível indicar em qual sub-clado seria alocado por possuir sequências disponíveis somente para as regiões ITS e LSU, que juntas tem se mostrado insuficientes para agrupar com confiabilidade o gênero dentro da família Cryphonectriaceae.

Cheewangkoon et al. (2009) e Crous et al (2015) descreveram os gêneros *Filiocryphia* e *Chrysifolia*, respectivamente, ambos incidindo em *Eucalyptus* sp. Contudo, a filogenia consistiu somente nas análises das regiões LSU e ITS. Atualmente, a reclassificação realizada por Jiang et al. (2020) com o objetivo de reagrupar os gêneros dentro das famílias corretas em Diaporthales, demonstrou que *Filiocryphia* e *Chrysifolia* não são pertencentes à família Cryphonectriaceae, sendo realocadas para à família Foliocryphiaceae, pois não agrupou nos dois sub-clados que compreendem a família Cryphonectriaceae.

Recentemente, houve descobertas de novos gêneros da família Cryphonectriaceae no Brasil e em outros países da América do Sul. No Brasil, foi descrito o gênero *Capillaureum* por Ferreira et al. (2019) incidindo em uma árvore típica do cerrado brasileiro, o pequi (*Caryocar brasiliense*). Na América Latina, foram descritos os gêneros *Rostraureum*, no Equador (Gryzenhout et al., 2005) e *Aurapex* na Colômbia, incidindo em *Terminalia* sp. e *Miconia* sp., respectivamente (Gryzenhout et al., 2006). Além das descobertas de novos gêneros, novas espécies fúngicas foram reportadas e descritas dentro do gênero *Chrysoporthe* no Brasil. *Chrysoporthe doradensis* foi relatado pela primeira vez em *Eucalyptus* sp. e *Tibouchina* sp. no Brasil (Soares et al., 2018), sendo que se acreditava que este patógeno estava restrito apenas ao Equador (Gryzenhout et al., 2005). *Chrysoporthe puriensis*, incidindo em *Tibouchina* spp., foi descoberto no Brasil por Oliveira (2018). Até o presente estudo, a ocorrência de cancro em eucalipto no Brasil, causado por espécies da família Cryphonectriaceae, sempre esteve associada aos fungos *Chrysoporthe cubensis* (Hodges et al., 1976) e *C. doradensis* (Soares et al., 2018).

Aurantiocollum, ocorre em *Eucalyptus*, assim como *Aurantiosacculus*, representante do único gênero da família ocorrendo em folhas na Austrália (Crous et al., 2012; Diko et al., 1979), *Celoporthes* na China e Indonésia (Wang et al., 2018; Chen et al., 2011), *Cryptometrion* na Indonésia (Gryzenhout et al., 2010), *Microthia* em Cuba (Gryzenhout et al., 2006) e *Chrysoporthe*, com ocorrência na América Latina, Brasil e Equador e no continente africano, África do Sul e Zâmbia (Soares et al., 2018; Gryzenhout et al., 2004; Gryzenhout et al., 2005; Gryzenhout et al., 2010). Destes gêneros apresentados, apenas *Chrysoporthe* e *Aurantiocollum* possuem relatos em *Eucalyptus* na América Latina, apresentando ameaças a eucaliptocultura no Brasil e em outros países da América Latina.

Em vista do relato de *Aurantiocollum eucalypti*, novo fungo associado ao cancro, em *Eucalyptus* no Brasil, são necessários novos estudos para a comprovação da sua patogenicidade, bem como para a sua inserção na fenotipagem nos programas de melhoramento genético de eucalipto.

Diante destas recentes descobertas dentro da família Cryphonectriaceae na América Latina, nossos achados indicam um novo gênero fúngico, sustentado pelas análises morfológicas e filogenéticas. Desse modo, podemos considerar mais investigações de modo pontual a fim de conhecer a diversidade genética do novo fungo descrito. Além disso, novos estudos são necessários para elucidar a ocorrência e a disseminação dessas espécies já relatadas quanto aos seus respectivos centros de origem e variabilidade genética. Isto é

necessário para antever pesquisas de resistência clonal para patógenos potenciais que possam representar risco para plantios comerciais e ecossistemas florestais naturais.

REFERÊNCIAS

Begoude ADB, Gryzenhout M, Wingfield MJ, Roux, J (2010) *Aurifilum*, a new fungal genus in the Cryphonectriaceae from *Terminalia* species in Cameroon. *Antonie van Leeuwenhoek* 98:263–278.

Beier GL, Hokanson SC, Bates ST, Blanchette RA (2015) *Aurantioportha corni* gen. Et comb. nov., an endophyte and pathogen of *Cornus alternifolia*. *Mycologia* 107:66–79.

Castellani A (1939) Viability of some pathogenic fungi in distilled water. *Journal of Tropical Medicine & Hygiene*, Austin 24: 270-276.

Chen SF, Gryzenhout M, Roux J, Xie Y, Wingfield MJ, Zhou X (2011) Novel species of *Celoporthe* from *Eucalyptus* and *Syzygium* trees in China and Indonesia. *Mycologia* 103:1384–1410.

Chen SF, Liu QL, Li GQ, Wingfield MJ, Roux J (2017) A new genus of Cryphonectriaceae isolated from *Lagerstroemia speciosa* in southern China. *Plant Pathology* 67:107-123

Cheewangkoon R, Groenewald JZ, Summerell BA, Hyde KD, To-Anun C, Crous PW. 2009. Myrtaceae, a cache of fungal biodiversity. *Persoonia* 23:55–85.

Chungu D, Gryzenhout M, Muimba-Kankolongo A, Wingfield MJ, Roux J (2010) Taxonomy and pathogenicity of two novel *Chrysoportha* species from *Eucalyptus grandis* and *Syzygium guineense* in Zambia. *Mycological Progress* 9:379-393.

Chungu D, Gryzenhout M, Muimba-Kankolongo A, Wingfield MJ, Roux J (2010) Taxonomy and pathogenicity of two novel *Chrysoportha* species from *Eucalyptus grandis* and *Syzygium guineense* in Zambia. *Mycological Progress* 9:379–393.

Crane C, Burgess TI (2013) *Luteocirrhus shearii* gen. sp. nov. (Diaporthales, Cryphonectriaceae) pathogenic to Proteaceae in the south Western Australian Floristic Region. *IMA Fungus* 4:111–122.

Crous PW et al. (2015) Fungal Planet description sheets: 320-370. *Persoonia* 34: 167-266.

Crous PW, Summerell BA, Alfenas AC, Edwards J, Pascoe IG, Porter IJ, Groenewald JZ (2012) Genera of diaporthalean coelomycetes associated with leaf spots of tree hosts. *Persoonia* 28:66–75.

Crous PW, Groenewald JZ, Summerell BA (2012) *Chrysocrypta corymbiae*. *Persoonia* 28:164-165.

Doyle JJ, Doyle JL (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19: 11-15.

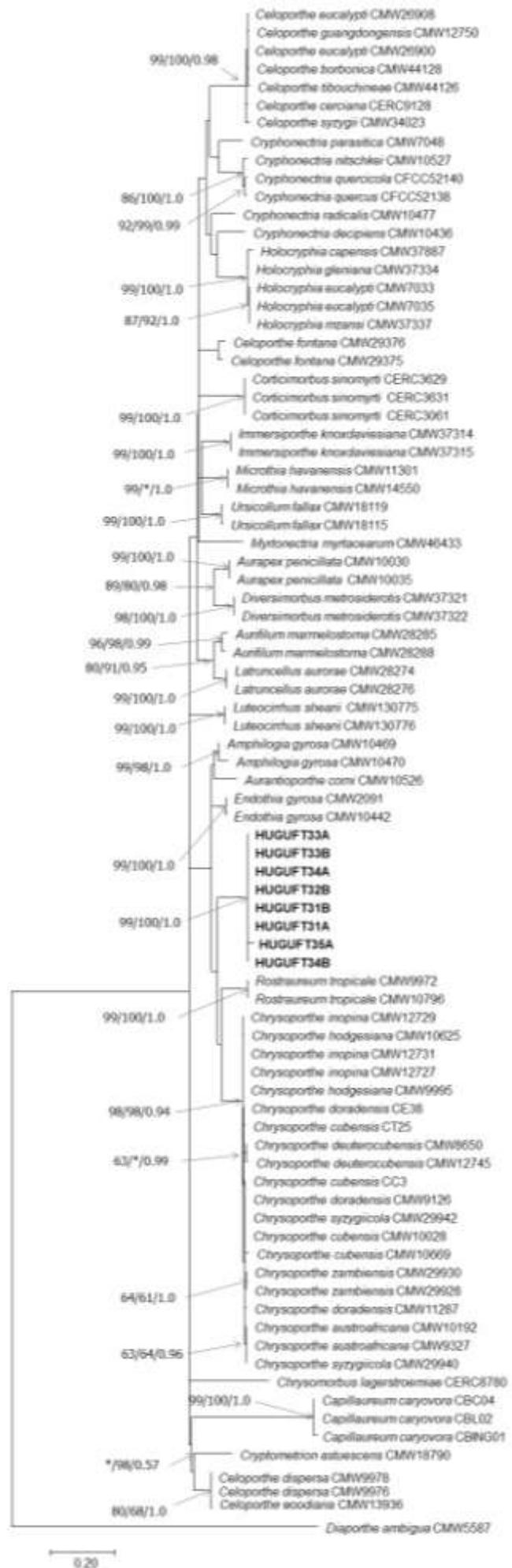
Dyko BJ, Sutton BC, Roquebert MF (1979) The genus *Protostegia*. *Mycologia* 71:918–934.

Farris JS, Källersjö M, Kluge AG, Bult C (1995) Testing significance of incongruence. *Cladistics* 10:315-9.

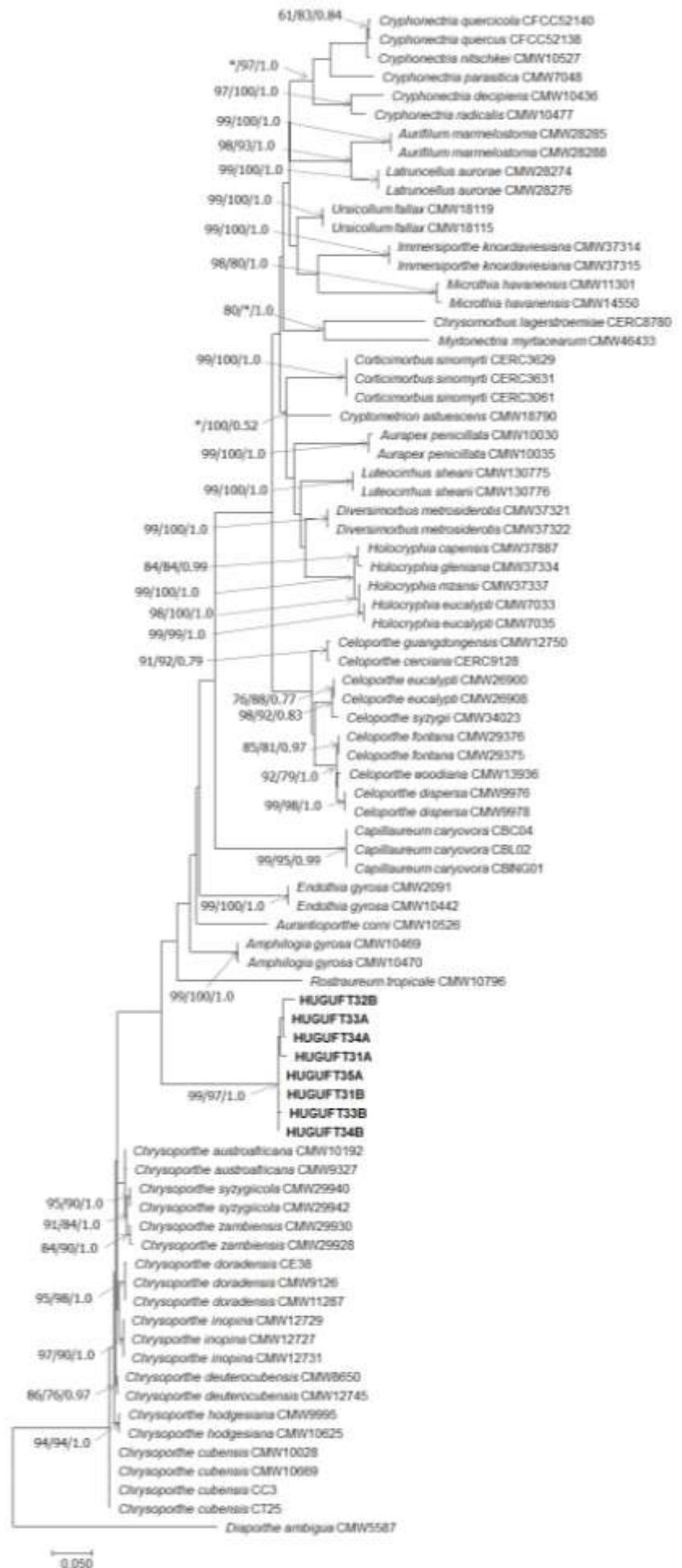
Ferreira MA, Oliveira, MES, Silva, GA, Mathioni SM, Mafia RG (2019) *Capillaureum caryovora* gen. sp. nov. (Cryphonectriaceae) pathogenic to pequi (*Caryocar brasiliense*) in Brazil. *Mycological Progress* 18: 385-403.

- Foelkel C (1974) Rendimento em celulose sulfato de *Eucalyptus* spp em função do grau de deslignificação e da densidade da madeira. IPEF, 9: 61-77.
- Glass NL, Donaldson GC (1995) Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. Applied and Environmental Microbiology, Washington 61: 1323-1330.
- Gryzenhout M, Myburg H, Van der Merwe NA, Wingfield BD, Wingfield MJ (2004) *Chrysosporthe*, a new genus to accommodate *Chryphonectria cubensis*. Studies in Mycology, 50: 119-142.
- Gryzenhout M, Myburg H, Wingfield B, Montenegro F, Wingfield M (2005) *Chrysosporthe doradensis* sp. nov. pathogenic to Eucalyptus in Ecuador. Fungal Diversity 20, 39-57.
- Gryzenhout M, Wingfield BD, Wingfield MJ (2009) Taxonomy, phylogeny, and ecology of bark-inhabiting and tree pathogenic fungi in the Cryphonectriaceae. APS Press, St Paul 119 pp
- Gryzenhout M, Tarigan M, Clegg PA, Wingfield MJ (2010) *Cryptometrion aestuescens* gen. sp. nov. (Cryphonectriaceae) pathogenic to Eucalyptus in Indonesia. Australasian Plant Pathology 39:161–169.
- Gryzenhout M, Myburg H, Hodges CS, Wingfield BD, Wingfield MJ (2006) *Microthia*, *Holocryphia* and *Ursicollum*, three new genera on *Eucalyptus* and *Coccoloba* for fungi previously known as *Cryphonectria*. Studies in Mycology 55:35–52.
- Gryzenhout M, Myburg H, Rodas CA, Wingfield BD, Wingfield MJ (2006). *Aurapex penicillata* gen. sp. nov. from native *Miconia theaezans* and *Tibouchina* spp. in Colombia. Mycologia 98:105–115.
- Gryzenhout M, Myburg H, Wingfield BD, Montenegro F, Wingfield MJ (2005) *Rostraureum tropicale* gen. sp. nov. (Diaporthales) associated with dying *Terminalia ivorensis* in Ecuador. *Mycological Research*, 109(9):1029-1044.
- Hasegawa M, Kishino H, Yano T (1985). Dating the human-ape Split by a molecular clock of mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Evolution* 22:160-174.
- Heath RN, Gryzenhout M, Roux J, Wingfield MJ (2006) Discovery of the canker pathogen *Chrysosporthe austroafricana* on native *Syzygium* spp. in South Africa. *Plant Disease*. 90:433-438.
- Hodges CS, Reis MS, Ferreira FA, Henfling JDM (1976) O cancro do eucalipto causado por *Diaporthe cubensis*. *Fitopatologia Brasileira* 1:129–170.
- Hodges CS, Alfenas AC, Cordell CE (1986). The conspecificity of *Cryphonectria cubensis* and *Endothia eugeniae*. *Mycologia* 78: 334–350.
- Hyde KD, Dong Y, Phookamsak R, Jeewon R, Bhat DJ (2020) Fungal diversity notes 1151–1276: taxonomic and phylogenetic contributions on genera and species of fungal taxa. *Fungal Diversity*. 100:5-277.
- Huelsenbeck JP (2001) MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17:754–755.
- Instituto Brasileiro de Árvores (2019) Relatório 2019. Disponível em <https://www.iba.org/datafiles/publicacoes/relatorios/iba-relatorioanual2019.pdf> acessado em 15/04/2020.
- Jiang N, Fan X, Tian C, Crous P (2020) Reevaluating Cryphonectriaceae and allied families in Diaporthales. *Mycologia* 112: 267-292.

- Kimura M (1980) A simple method evolutionary of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16:111-120.
- Larget B, Simon DL (1999) Markov chain Monte Carlo algorithms for the Bayesian analysis of phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 16:750–759.
- Micales JA, Stipes RJ (1987). A reexamination of the fungal genera *Cryphonectria* and *Endothia*. *Phytopathology* 77: 650–654.
- Oliveira MES (2018) Genetic variability of *Chrysosporthe* spp. no Brazil. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Lavras, Lavras 90pp.
- Pegg GS, Gryzenhout M, O'Dwyer C, Drenth A, Wingfield MJ (2010) The Eucalyptus canker pathogen *Chrysosporthe cubensis* discovered in eastern Australia. *Australasian Plant Pathology*, 39 (4): 343-349.
- Rodas CA, Gryzenhout M, Myburg H, Wingfield BD, Wingfield MJ (2005) Discovery of the eucalyptus canker pathogen *Chrysosporthe cubensis* on native *Miconia* (Melastomataceae) in Colombia. *Plant Pathol* 54:460–470
- Soares TPF, Ferreira MA, Mafia RG, Oliveira LSS, Hodges CS, Alfenas AC (2018) Canker disease caused by *Chrysosporthe doradensis* and *C. cubensis* on *Eucalyptus* sp. and *Tibouchina* spp. in Brazil. *Tropical Plant Pathol* 43:314–322.
- Souza S, Sansigolo C, Furtado E, Jesus Junior W, Oliveira R (2010) Influência do cancro basal em *Eucalyptus grandis* nas propriedades da madeira e polpação Kraft. *Scientia forestalis*, 38 (88): 547-557.
- Swofford DL (2002) PAUP: Phylogenetic analysis using parsimony Version 4.0 beta. Sunderland, MA: Sinauer Associates Inc, software.
- Tamura K, Nei M (1993). Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution* 10:512-526.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipiński A, Kumar S (2013) MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular biology and evolution* 30: 2725-2729.
- Vermeulen M, Gryzenhout M, Wingfield MJ, Roux J (2011) New records of the Cryphonectriaceae from Southern Africa including *Latruncellus aurorae* gen. sp. nov. *Mycologia* 103:554–569.
- Wang W, Liu Q, Li G, Liu F, Chen S (2018) Phylogeny and Pathogenicity of *Celoporthes* Species from Plantation Eucalyptus in Southern China, *Plant Disease* 102(10)1-44.
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications*, 18: 315-322.



Anexo A. Árvore filogenética baseada na análise de máxima verossimilhança obtida de dados de sequências da região ITS. Valores de bootstrap (>60%) para análise de verossimilhança (ML), máxima parcimônia (MP) e probabilidade posterior (PP) são indicados nos ramos (ML/MP/PP). Isolados em negrito foram sequenciados nesse estudo. *Diaporthe ambigua* foi definido como outgroup.



Anexo B. Árvore filogenética baseada na análise de verossimilhança obtida de dados de sequências da região β -tubulina. Valores de bootstrap (>60%) para análise de verossimilhança (ML), máxima parcimônia (MP) e probabilidade posterior (PP) são indicados nos ramos (ML/MP/PP). Isolados em negrito foram sequenciados nesse estudo. *Diaporthe ambigua* foi definido como *outgroup*.

ARTIGO 2: *Chrysosporthe puriensis* causando cancro e mortalidade na espécie nativa *Tibouchina mutabilis* no Brasil

RESUMO

O fungo *Chrysosporthe puriensis*, recentemente descrito no Brasil, como uma nova espécie do gênero, ocorre em espécies de *Tibouchina granulosa*, *T. candolleana* e *T. heteromalla*, da família Melastomataceae. Até o momento, o patógeno foi relatado apenas no Brasil, causando cancro e morte em espécies arbóreas nativas comumente utilizadas para a arborização urbana. O presente trabalho consiste no primeiro relato do fungo *C. puriensis* em *T. mutabilis*, conhecido popularmente como manacá da serra. Os isolados foram coletados na Serra do Mar em São Luiz do Paraitinga-SP, com presença de corpos de frutificação na casca da árvore. Os isolados dos fungos provenientes de *T. mutabilis* foram identificados com base na caracterização morfológica e análise filogenética através dos métodos de Inferência Bayesiana e Máxima Parcimônia das regiões gênicas de ITS (Internal Transcribed Spacer) e β -tubulina. A morfologia dos isolados com base no tamanho das células conidiogênicas, conídios, ascas e ascósporos, foram similares aos descritos para *C. puriensis*. As árvores filogenéticas apresentaram topologias similares e alto suporte para as regiões ITS e β -tubulina. A árvore de consenso revelou altos valores de probabilidade posterior e *bootstrap* para *C. puriensis*, sendo de 0.96 e 99%, respectivamente, que agrupou os isolados deste estudo com *C. puriensis*. Os isolados inoculados causaram cancro em sete clones de eucalipto e mudas de *T. mutabilis* e *T. granulosa*, demonstrando que o fungo é patogênico para esses hospedeiros. Os resultados demonstram a importância da abrangência de coletas para *C. puriensis* a fim de rastrear sua disseminação em outros hospedeiros. Isto é importante devido a não-especificidade de hospedeiro observada nos testes de inoculação, gerando um alerta para a inclusão deste patógeno nos programas de seleção de clones de eucalipto resistentes a *C. puriensis*.

Palavras-chave: Cryphonectriaceae, filogenia, β -tubulina, manacá

1. INTRODUÇÃO

A espécie *Tibouchina mutabilis*, ordem Myrtales, família Melastomataceae, é conhecida popularmente como manacá-da-serra. Sua floração ocorre entre os meses de setembro e fevereiro, é marcante nas florestas nativas, podendo apresentar coloração branca, rosa e roxa (Lorenzi, 2002; Genini et al., 2009). Normalmente é encontrada no bioma da Mata Atlântica Brasileira, da floresta ombrófila densa (FOD) com ocorrência em regiões da Serra do Mar nos estados do Paraná, Rio de Janeiro, Santa Catarina e São Paulo (Grandtner e Chevrette, 2014).

As espécies do gênero *Tibouchina* possuem importante papel na ecologia dos ecossistemas florestais. Fazem parte do grupo de espécies pioneiras, as quais são utilizadas para reflorestamentos e recuperação de áreas degradadas, pois auxiliam no estabelecimento de florestas secundárias. As espécies pioneiras têm como característica comportamento heliófilo,

ou seja, exigem luz para germinação e crescimento. Desse modo, são responsáveis pela cobertura rápida do solo das florestas, permitindo o desenvolvimento de espécies de crescimento lento e espécies clímax, que exigem sombra para seu desenvolvimento. Assim, podem ser formados os diferentes estratos da floresta. Além de seu papel ecológico, *T. mutabilis* é recomendada no paisagismo e arborização urbana, devido à sua floração exuberante, pequeno porte e fácil adaptação a ambientes degradados e poluídos como o meio urbano (Tabarelli e Mantovani, 1999; Bortolini et al., 2008)

As espécies de *Chrysoporthe* são relatadas em árvores da família Melastomataceae como *Tibouchina* spp. e *Miconia* spp e em Myrtaceae, como *Eucalyptus* sp. Atualmente são relatadas nove espécies de *Chrysoporthe* no mundo e apenas três espécies foram relatadas no Brasil, sendo elas, *C. cubensis*, *C. doradensis* e *C. puriensis* (Hodges et al., 1976; Soares et al., 2018; Oliveira, 2018). Os patógenos do gênero *Chrysoporthe* causam desde o anelamento de mudas jovens ao cancro típico que pode ocorrer em diferentes alturas da árvore, mas normalmente se apresenta na base, podendo provocar lesões superficiais a profundas, levando a planta à morte (Alfenas et al., 2009; Gryzenhout et al., 2009).

A primeira espécie do gênero *Chrysoporthe* foi identificada pela primeira vez como *Diaporthe cubensis* (Bruner, 1917), e reclassificada como *Cryphonectria cubensis* por Hodges (1980). Atualmente o fungo é denominado *C. cubensis* devido separação de outras espécies de *Cryphonectria* através de análises filogenéticas. A filogenia também permitiu a separação das espécies dentro do gênero *Chrysoporthe*, as quais foram denominadas *Chrysoporthe cubensis*, *C. austroafricana*, *C. hodgesiana*, *C. doradensis*, *C. inopina*, *C. deuterocubensis*, *C. zambiensis*, *C. syzygiicola* (Gryzenhout et al., 2004; Gryzenhout et al., 2005; Gryzenhout et al., 2006; Gryzenhout et al., 2010). E por último, a espécie descrita recentemente, denominada *C. puriensis* por Oliveira (2018).

Chrysoporthe puriensis foi relatada pela primeira vez incidindo em espécies de *Tibouchina*, como: *T. granulosa*, *T. heteromalla* e *T. candolleana* (Oliveira, 2018). Até o presente momento, esta nova espécie foi relatada apenas nestas espécies nativas, contudo, é possível que tenha ocorrido salto de hospedeiro (host-jump) em espécies do gênero *Chrysoporthe*, como discutido por Van der Merwe et al. (2013). O estudo demonstrou que uma mesma população de *C. cubensis* pode ser recuperada de nativas e posteriormente serem encontradas infectando *Eucalyptus* spp. Este fenômeno provoca maior preocupação devido ao impacto da doença em plantios de valor econômico, além do impacto na sucessão florestal conforme a intensidade da doença.

Nesse sentido, objetivou-se com este estudo descrever o primeiro relato de *C. puriensis* em *T. mutabilis*, baseado em análises filogenéticas das regiões ITS e β -tubulina e caracterização morfológica, e avaliar a patogenicidade do fungo à *T. mutabilis* e em diferentes clones de eucalipto.

2. METODOLOGIA

2.1 Coleta de amostras

As amostras contendo corpos de frutificação do fungo, típicos da família Cryphonectriaceae, foram coletados da espécie *T. mutabilis* na Serra do Mar, localizado na mata atlântica, no estado de São Paulo, nas coordenadas de 23° 19' 08" S 45° 09' 09" W. Foram coletadas 48 amostras que foram armazenadas em sacos de papel e levadas ao Laboratório de Patologia Florestal da Universidade Federal de Lavras. As culturas monospóricas foram obtidas pelo fracionamento do corpo de frutificação do fungo com uma agulha estéril para a liberação dos esporos. Os esporos foram suspensos em água estéril e transferidos para placas de Petri contendo meio YEMA (extrato de levedura a 0,2%, extrato de malte a 2%, ágar a 2%). As placas foram incubadas a 28°C por 24 horas. De cada placa, esporos únicos germinados foram transferidos para placas contendo meio YEMA e incubados a 28°C por 7 dias. Em seguida, as culturas puras dos isolados fúngicos foram preservadas em microtubo a seco, armazenados a 10°C e pelo método de Castelani (1939), mantidos em temperatura ambiente na coleção de fungos do Laboratório de Patologia Florestal da Universidade Federal de Lavras.

2.2 Amplificação de fragmentos e análises filogenéticas

Onze culturas monospóricas foram cultivadas em meio líquido de extrato de malte por 10 dias para obtenção de biomassa fúngica suficiente para extração de DNA. O micélio seco em câmara de fluxo foi utilizado para extração de DNA utilizando método CTAB (Doyle e Doyle, 1987). A qualidade e quantidade do DNA foram verificadas usando o NanoDrop®. As concentrações de DNA foram ajustadas usando água ultrapura para 50 ng/ μ l e 1 μ l do DNA foi utilizado em cada reação de PCR.

A região do espaçador interno transcrito (ITS1-5.8S-ITS2) foi amplificada utilizando os primers ITS 1 (GTAACAAGGTTTCCGTAGGTG) e ITS4 (TTCTTTTCTCCGCTTATTGATATGC) (White et al., 1990). A região gênica de β -tubulina foi amplificada usando dois pares de primers Bt1a (TTCCCCCGTCTCCACTTCTTCATG) e Bt1b (GACGAGATCGTTCATGTT-GAA-CTC)

e Bt2a (GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC) e Bt2b
(ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC) (Glass e Donalson, 1995).

Todas as reações de PCR foram preparadas em um volume final de 25 µl, usando 2,5 µl de 10 × tampão de reação, 2,5 µl de MgCl₂ (25 mM), 0,5 µl de dNTPs (10 mM), 0,5 µl de cada primer (10 µM), 1 µl de solução de DNA e 0,3 µl de Taq polimerase usando a Polimerase de DNA GoTaq® (Promega, Madison, WI, EUA) e 17,2 µl de água MiliQ. A PCR foi realizada em um termociclador (My Cycler™ -BIO-RAD) e seguiram as condições para primers ITS: 94 °C, por 1 minuto; 34 ciclos: 94 °C, por 40 segundos; 55 °C, por 55 segundos; 72 °C, por 2 minutos e 72 °C, por 5 minutos (White et al., 1990). Para cada região de β-tubulina com primers BT1 foram: 94 °C, por 1 minuto; 34 ciclos: 94 °C, por 1 minuto; 55 °C, por 1 minuto; 72 °C, por 2 minutos e 72 °C, por 10 minutos. Para BT2 foram: 94 °C, por 1 minuto; 34 ciclos: 94 °C, por 30 segundos; 61 °C, por 45 segundos; 72 °C, por 1 minuto e 72 °C, por 5 minutos (Glass e Donaldson, 1995). Os produtos de PCR foram visualizados em géis de agarose a 1% que foram corados com GelRed (Biotium®) adicionado no gel, e eletroforese com posterior visualização em fotodocumentador MiniBis Pro (Uniscience®). A purificação do produto de PCR e sequenciamento foi realizada pela Macrogen Company, na Coreia. As sequências de nucleotídeos foram editadas, utilizando o Sequence Assembly Software – Seqassem e alinhadas no Mafft online. As sequências foram comparadas com as sequências de referência do gênero *Chrysosporthe* disponíveis no banco de dados de nucleotídeos do GenBank do NCBI (Tabela 1). E sequências de *Amphilogia gyrosa* foram utilizadas como *outgroup*, com base nos resultados obtidos por Van der Merwe et al. (2010).

A análise de máxima parcimônia (MP) foi realizada usando o software PAUP * 4.0 (Swofford, 2002). Uma análise de *bootstrap* (1000 réplicas) foi realizada no conjunto de dados para determinar os níveis de confiança dos ramos. Foram calculados: o número de caracteres informativos para parcimônia, índice de consistência (IC), índice de retenção (IR) e índice composto (RCI).

A inferência bayesiana (IB) foi usada para gerar valores de probabilidades posteriores (PP) para nós de consenso usando MRBAYES v 3.1 (Huelsenbeck, 2001). A análise foi realizada utilizando o algoritmo MCMC (Markov Chain Monte Carlo) utilizando o modelo de melhor ajuste selecionado pelo critério de informação de Akaike em MrModeltest 2.3. (Larget e Simon, 1999). As árvores foram visualizadas e editadas no software FigTree. As análises de MP e IB foram feitas para as regiões BT1, BT2 e ITS individualmente e combinadas. A combinação foi determinada com um teste de homogeneidade de partition (PHT) (Farris et al., 1995).

Tabela 1. Espécies, identificação dos isolados, e número de acesso ao GenBank das sequências de referência do gênero *Chrysoportha* e do *outgroup* *Amphilogia gyrosa* utilizada neste estudo. Os isolados em negrito foram sequenciados neste estudo.

Espécies	Identificação dos isolados	Hospedeiro	Localização	Número de acesso ao GenBank		
				ITS	BT1	BT2
<i>Chrysoportha puriensis</i>	MSL02M	<i>Tibouchina mutabilis</i>	Brasil	MT776815	MT765274	MT765274
	MSL07M	<i>Tibouchina mutabilis</i>	Brasil	MT776819	MT765278	MT765278
	MSL11M	<i>Tibouchina mutabilis</i>	Brasil	MT776822	MT765281	MT765281
	MSL12M	<i>Tibouchina mutabilis</i>	Brasil	MT776820	MT765279	MT765279
	MSL14M	<i>Tibouchina mutabilis</i>	Brasil	MT776825	MT765284	MT765284
	MSL16M	<i>Tibouchina mutabilis</i>	Brasil	MT776816	MT765275	MT765275
	MSL31M	<i>Tibouchina mutabilis</i>	Brasil	MT776817	MT765276	MT765276
	MSL32M	<i>Tibouchina mutabilis</i>	Brasil	MT776818	MT765277	MT765277
	MSL101M	<i>Tibouchina mutabilis</i>	Brasil	MT776823	MT765282	MT765282
	MSL107M	<i>Tibouchina mutabilis</i>	Brasil	MT776824	MT765278	MT765278
	MSL110M	<i>Tibouchina mutabilis</i>	Brasil	MT776821	MT765280	MT765280
<i>Chrysoportha cubensis</i>	CMW10669	<i>Eucalyptus sp.</i>	República do Congo	GQ290154	GQ290177	AF535126
	CMW10778	<i>Syzygium aromaticum</i>	Brasil	GQ290155	GQ290178	GQ290189
	CMW10639	<i>Eucalyptus grandis</i>	Colômbia	AY263421	AY263419	AY263420
	CMW10028	<i>Miconia rubiginosa</i>	Colômbia	GQ290153	GQ290175	GQ290186
<i>Chrysoportha deuterocubensis</i>	CMW12745	<i>Tibouchina urvilleana</i>	Singapura	DQ368764	GQ290183	DQ368781
	CMW12746	<i>Eucalyptus sp.</i>	China	HM142105	HM142121	HM142137
	CMW17178	<i>Tibouchina urvilleana</i>	Tailândia	DQ368766	AH015649	AH015649
	CMW2631	<i>Eucalyptus marginata</i>	Austrália	GQ290157	GQ290184	AF543825
	CMW8650	<i>Syzygium aromaticum</i>	Indonésia	AY084001	AY084024	GQ290193
<i>Chrysoportha hodgesiana</i>	CMW10641	<i>Tibouchina semidecandra</i>	Colômbia	AY692322	AY692326	AY692325
	CMW9995	<i>Tibouchina semidecandra</i>	Colômbia	AY956969	AH014904	AH014904
<i>Chrysoportha austroafricana</i>	CMW10192	<i>Syzygium cordatum</i>	África do Sul	AY214299	GQ290176	GQ290187
	CMW9327	<i>Tibouchina granulosa</i>	África do Sul	GQ290158	GQ290185	AF273455

	CMW2113	<i>Eucalyptus grandis</i>	África do Sul	AF046892	AF273067	AF273462
<i>Chrysosporthe syzygiicola</i>	CMW29940	<i>Syzygium guineense</i>	Zambia	FJ655005	FJ805230	FJ805236
	CMW29942	<i>Syzygium guineense</i>	Zambia	FJ655007	FJ805232	FJ805238
<i>Chrysosporthe zambiensis</i>	CMW29928	<i>Eucalyptus grandis</i>	Zambia	FJ655002	FJ858709	FJ805233
	CMW29930	<i>Eucalyptus grandis</i>	Zambia	FJ655004	FJ858711	FJ805235
<i>Chrysosporthe inopina</i>	CMW12729	<i>Tibouchina lepidota</i>	Colômbia	DQ368778	AH015656	AH015656
	CMW12727	<i>Tibouchina lepidota</i>	Colômbia	DQ368777	AH015657	AH015657
	CMW12731	<i>Tibouchina lepidota</i>	Colômbia	DQ368779	AH015655	AH015655
<i>Chrysosporthe doradensis</i>	CMW11286	<i>Eucalyptus grandis</i>	Equador	AY214290	AY214218	AY214254
	CMW11287	<i>Eucalyptus grandis</i>	Equador	GQ290156	GQ290179	GQ290190
<i>Chrysosporthe puriensis</i>	CT13	<i>Tibouchina granulosa</i>	Brasil	MN590029	MN590041	MN590041
	TCL01	<i>Tibouchina candolleana</i>	Brasil	MN590030	MN590042	MN590042
	TGCD01	<i>Tibouchina granulosa</i>	Brasil	MN590037	MN590049	MN590049
	TGPNI01	<i>Tibouchina granulosa</i>	Brasil	MN590032	MN590044	MN590044
	THSC01	<i>Tibouchina heteromalla</i>	Brasil	MN590039	MN590051	MN590051
<i>Amphilogia gyrosa</i>	CMW10469	<i>Elaeocarpusdentatus</i>	Nova Zelândia	AF452111	AF525797	AF525714
	CMW10470	<i>Elaeocarpusdentatus</i>	Nova Zelândia	AF452112	AF535708	AF525715

2.3 Caracterização morfológica dos isolados

As estruturas do fungo foram seccionadas e as lâminas foram confeccionadas para caracterização morfológica, utilizando microscópio LABOMED Lx400, Labo America, Fremont, Canadá, câmera iVu 500 e software Capture Pro 2.8.8.5. Foram realizadas 50 medições de largura e comprimento de cada estrutura, definindo tamanhos máximo (máx) e mínimo (mín) das estruturas de conídios, conidióforos, ascas, ascósporos, peritécios, picnídios e lóculos. As medições foram representadas como: (mín-)(média-DP)-(média + DP)(-máx) µm, onde DP é o desvio padrão. As estruturas morfológicas do corpo de frutificação seccionado foram caracterizadas conforme o exposto por Micales e Stipes (1987), Kirk et al., (2001) e Gryzenhout et al. (2009).

2.4 Experimento de Patogenicidade de *C. puriensis* e avaliação de resistência

Os ensaios de patogenicidade foram realizados em mudas de 12 meses de *T. mutabilis*. Foram também realizados testes de inoculação cruzada com *T. mutabilis*, *T. granulosa* e sete clones híbridos de eucalipto (GG68, E4, V41, E6, VE77, 1407 e AZ17). Para o teste de patogenicidade e inoculação cruzada em *Tibouchina* sp., foram utilizados três isolados representativos: MSL02M, MSL14M e MSL110M. Os isolados foram testados em 15 mudas de *T. mutabilis* e *T. granulosa*, utilizando 5 mudas de *Tibouchina* spp. para cada isolado e 5 mudas para o controle de cada tratamento. Para avaliação de resistência dos clones de eucalipto, foi utilizado um isolado fúngico representativo, MSL14M, inoculado em 5 mudas de cada clone e 5 mudas como controle de cada clone.

Foram realizados ferimentos na casca com auxílio de um vazador cilíndrico central de 5mm de diâmetro, de modo a retirar discos da casca e expor o lenho. O ferimento do lenho foi preenchido com discos miceliais de 5 mm, provenientes da borda da cultura fúngica cultivada em meio malte. O local da inoculação foi coberto com filme plástico Parafilm® para fixação de discos e proteção contra dessecação de feridas. O filme plástico foi mantido na ferida por um período de 30 dias após a inoculação (dai), e as mudas inoculadas com discos contendo apenas meio malte foram utilizadas como testemunhas (Ferreira, 1989; Alfenas et al., 2016). A avaliação do tamanho da lesão no xilema foi realizada 60 dias após a inoculação. O experimento foi conduzido em casa de vegetação na Universidade Federal de Lavras durante os meses de dezembro a fevereiro, quando as temperaturas variaram de 25°C a 35°C.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC). Os isolados selecionados para a inoculação foram baseados nos resultados das análises filogenéticas. As médias de cada tratamento foram agrupadas de acordo com o teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$). As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software SISVAR.

RESULTADOS

3.1 Obtenção de isolados

A partir de 48 amostras coletadas, foram obtidas onze culturas monospóricas de *C. puriensis*, provenientes de São Luiz do Paraitinga, no estado de São Paulo, Brasil (Figura 1a-c). Os principais sintomas observados foram cancos, rachaduras ao longo do tronco e mortalidade (Figura 1d-e). As estruturas fúngicas foram observadas na casca de tronco e galhos de árvores de *T. mutabilis* com sintomas de cancro (Figura 1f).



Figura 1. Sintomatologia de *Chrysosporthe puriensis* em árvore de *Tibouchina mutabilis*. a) Floresta Ombrófila Densa, Serra do Mar, SP. b-c) Floração de *Tibouchina* sp. d) Árvore doente com sintomas de cancro e - f) Presença de corpos de frutificação na casca das árvores.

3.2 Análises filogenéticas

As árvores filogenéticas foram geradas pela utilização dos métodos de Inferência Bayesiana (IB) e Máxima Parcimônia (MP) para as regiões ITS e β -tubulina, individualmente e combinadas, usando sequências de 11 isolados de *C. puriensis*, provenientes de *T. mutabilis*. As sequências foram comparadas com 30 sequências de *Chrysosporthe*, obtidas do GenBank, contendo todas as espécies de *Chrysosporthe* já descritas, totalizando um conjunto de dados de 41 sequências para cada região.

Foram obtidas árvores filogenéticas de topologias semelhantes e consistentes. As estatísticas para árvores de máxima parcimônia para ITS foram: índice de consistência (IC) de 0,965; índice de retenção (IR), 0,976; índice composto (RCI), 0,942. Os valores obtidos para BT1 foram: de 0,885 (IC); 0,935 (IR), 0,828 (RCI). Para BT2: 0,961 (CI); 0,975 (IR); e 0,938 (RCI). O Teste de Homogeneidade de Partição mostrou que o conjunto de dados combinados de ITS e β -tubulina não tiveram nenhum conflito significativo ($P=0,02$) e, portanto, podem ser combinados. Desse modo, a árvore concatenada, que compreende as duas regiões combinadas, apresentou os seguintes índices: 0,965 (CI); 0,976 (RI) e 0,9425 (RCI).

Para a análise combinada das regiões ITS e β -tubulina foram utilizadas 41 sequências concatenadas com um total de 1133 caracteres, 1025 constantes, 65 variáveis não informativos e 43 informativos. Os isolados sequenciados neste estudo, agruparam com *C. puriensis*. O ramo foi suportado por altos valores de probabilidade posterior e *bootstrap* para *C. puriensis*, sendo de 0,96 e 99%, respectivamente (Figura 2). Os resultados das análises das sequências de DNA apoiaram o resultado da análise morfológica, agrupando os isolados de *T. mutabilis* com os isolados de *C. puriensis* provenientes de *T. granulosa*, *T. candolleana* e *T. heteromalla*. Dentro do clado de *C. puriensis*, houve a formação de um sub-clado, composto pelos isolados CT13, TCL01 e TGPNI01, provenientes de estudo realizado por Oliveira (2018) em *Tibouchina* spp. A formação deste sub-clado foi decorrente da presença de um nucleotídeo polimórfico a mais que os demais isolados de *C. puriensis* (Tabela 1).

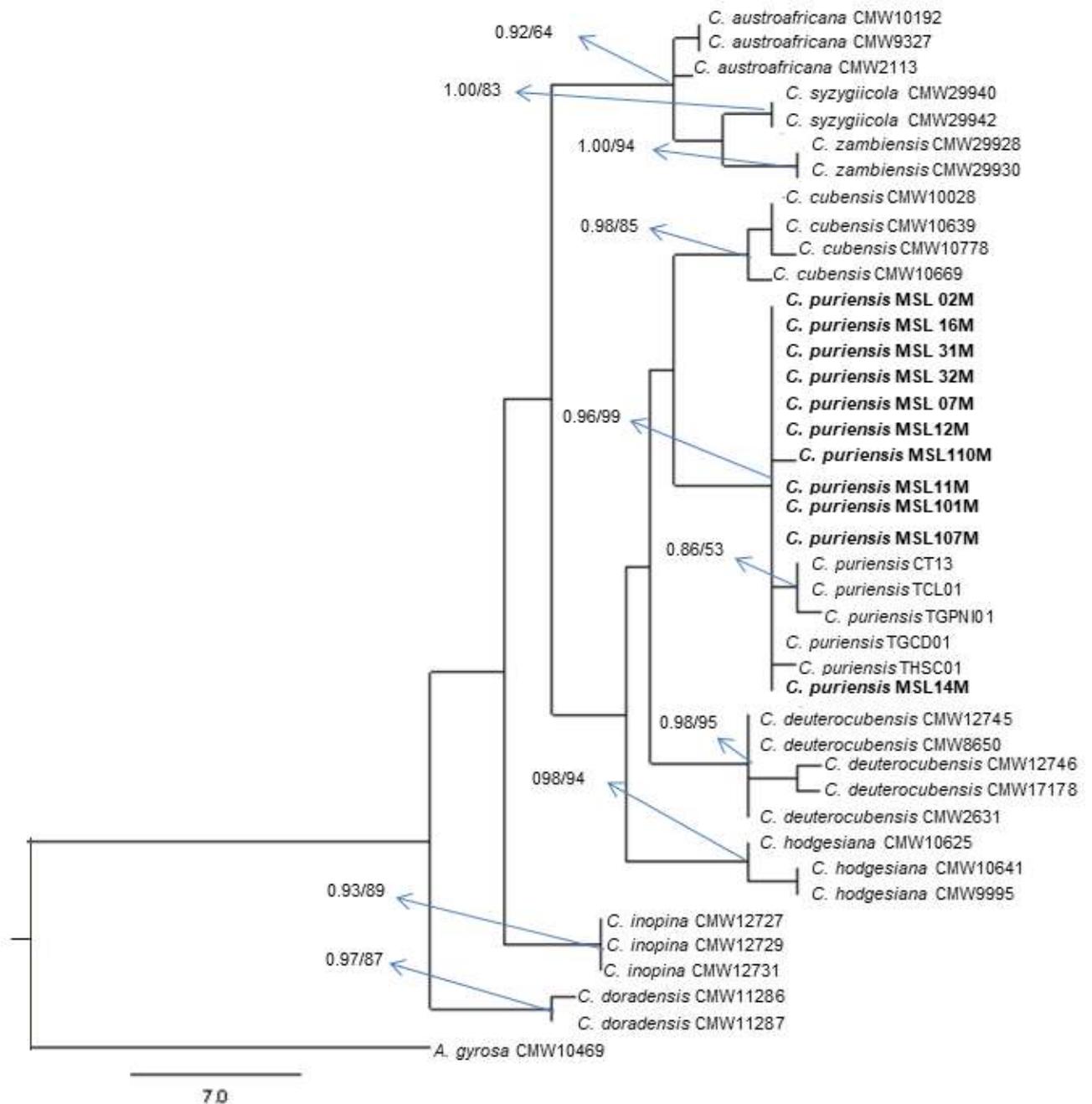


Figura 2. Árvore filogenética baseada na análise de máxima parcimônia obtida de dados combinados das regiões ITS e β -tubulina. Valores de probabilidade posterior ($> 86\%$) para inferência bayesiana (PP) e *bootstrap* ($>53\%$) para análise de máxima parcimônia (MP) são indicados nos ramos (PP/MP). Isolados em negrito foram sequenciados nesse estudo. *Amphilogia gyrosa* foi utilizada como *outgroup*.

Tabela 2. Posição dos sítios de nucleotídeos polimórficos (SNPs) encontrados nas sequências da região ITS e do gene β -tubulina para as espécies de *Chrysosporthe*. Os isolados do presente estudo estão em negrito e os nucleotídeos polimórficos exclusivos de cada espécie estão destacados.

Espécies	Isolados	β -tubulina 2 (BT2A/BT2B)										β -tubulina 1 (BT1A/BT1B)										ITS1/5.8S/ITS4												
		27	66	74	95	97	146	202	290	299	338	347	422	424	435	442	443	445	457	477	478	479	480	482	534	585	588	612	639	971	1043	1048	1080	1109
<i>C. puriensis</i>	MSL14M	T	G	C	T	G	C	A	T	C	G	C	T	T	C	G	G	A	A	-	-	-	-	C	C	C	G	C	T	C	A	T	C	T
	MSL02M	T	G	C	T	G	C	A	T	C	G	C	T	T	C	G	G	A	A	-	-	-	-	C	C	C	G	C	T	C	A	T	C	T
	TGCD01	T	G	C	T	G	C	A	T	C	G	C	T	T	C	G	G	A	A	-	-	-	-	C	C	C	G	C	T	C	A	T	C	T
	CT13	T	G	C	T	G	C	A	T	C	G	C	T	T	C	G	G	A	A	-	-	-	-	T	C	C	G	C	T	C	A	T	C	T
<i>C. austroafricana</i>	CMW10192	C	G	C	C	G	C	A	T	C	G	C	C	C	C	G	G	C	A	-	-	-	-	C	C	C	G	C	T	T	A	-	C	-
<i>C. cubensis</i>	CMW10028	C	G	C	C	G	C	A	T	C	G	C	C	C	C	G	A	A	-	-	-	-	C	T	C	G	C	T	C	A	-	C	-	
<i>C. ayglicola</i>	CMW29940	C	G	C	C	G	C	A	T	C	G	C	C	C	C	G	G	C	A	-	-	-	-	C	C	A	T	C	T	C	A	-	C	-
<i>C. zambiensis</i>	CMW29928	C	G	C	C	G	A	A	T	C	G	C	C	C	C	G	G	C	A	-	-	-	-	C	C	C	G	C	A	C	A	-	A	-
<i>C. hodgsoniana</i>	CMW10625	C	A	C	C	G	C	A	C	C	A	C	C	C	C	G	G	A	G	-	-	-	-	C	C	C	G	C	T	C	A	-	C	-
<i>C. deuterocubensis</i>	CMW12745	C	G	C	C	G	C	A	T	T	G	C	C	C	C	G	G	A	A	-	-	-	-	C	C	C	G	C	T	C	G	T	C	-
<i>C. doradensis</i>	CMW11286	C	G	T	C	G	C	G	T	C	G	T	C	C	T	A	G	A	A	-	-	-	-	C	C	C	G	A	T	C	A	-	C	-
<i>C. inopina</i>	CMW12727	C	G	T	C	A	C	A	T	C	G	C	C	C	C	G	G	A	A	T	T	G	T	C	C	C	G	C	T	C	A	-	C	-

3.3 Caracterização morfológica dos isolados

A caracterização morfológica foi realizada a partir do isolado MSL110M, selecionado com base nos resultados da análise filogenética. A partir de secções transversais do material contendo corpos de frutificação foi possível caracterizar a fase assexuada e sexuada.

O fungo estudado possui morfologia típica de *C. puriensis*, descrito em *T. granulosa*, *T. candolleana*, *T. heteromalla*, nos estados de Minas Gerais e Rio de Janeiro (Oliveira, 2018). A coloração da massa de esporos foi alaranjada (Figura 3b). Tecido com *Textura porrecta* no centro e *Textura globulosa* nas laterais da estrutura (Figura 3c). Em sua fase anamórfica foram caracterizados os conidiomas, que possuem único lóculo, piriforme a pulvinato, com apenas um pescoço (Figura 3d). Conidióforos hialinos, (4-) 19,9 - 7,5 (-37,5) x (3-) 11 - 7,2 (-27) μm (Figura 3e). Conídios (3-) 1,6 - 0,2 (-2,4) x (0,6 -) 1 - 0,2(-1,6) μm são hialinos, asseptados, oblongos a cilíndricos (Figura 3f).

Na fase sexuada do fungo foi observado o peritécio semi-imerso, subgloboso, ostíolo rostrado que possuem normalmente dois ou mais lóculos (Figura 3g). Ascas (17,7-) 25,1 - 3 (-30) x (1,5-) 4,7-1,1(-6,7) μm , unitunicadas, fusoides a elipsoides, oito esporos (Figura 3h). Ascósporos (4,2-) 5-0,5 (-6,7) x (1,5-) 2 - 2 (-2,8) μm são hialinos, septados, oval a elipsoide, com septo central e ápice obtuso (Figura 3i).

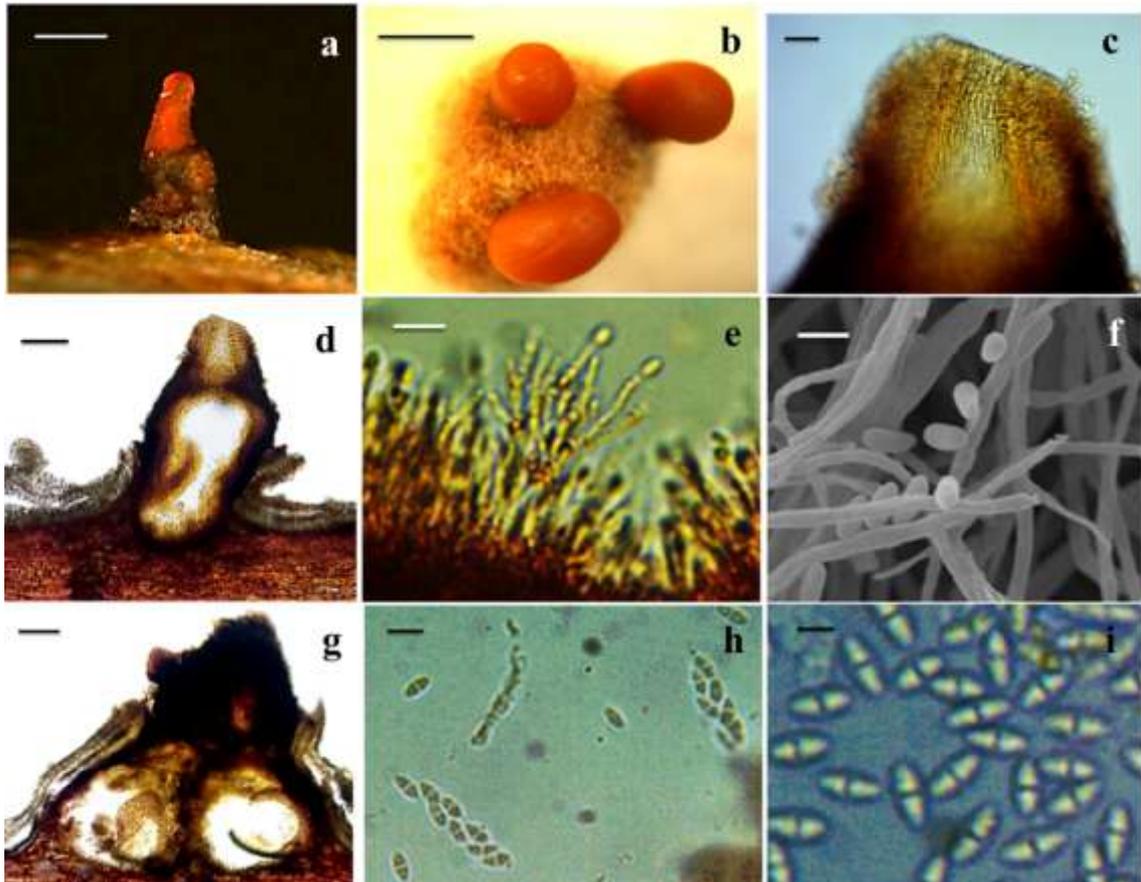


Figura 3. Fotomicrografias de estruturas de frutificação de *Chrysosporthe puriensis*. **a)** Corpo de frutificação sobre a casca. **b)** Massa de esporos de cor alaranjada em meio de cultura YEMA. **c)** Tecido de *Textura globosa* na região da base do pescoço. **d)** Corte longitudinal do conidioma. **e)** Célula conidiogênica. **f)** Conídios e hifas em microscopia eletrônica de varredura. **g)** Seção longitudinal do ascostroma com multilóculos. **h)** Ascas. **i)** Ascósporos. Barras de escala: a (500 μm), b (200 μm), d, g (100 μm), c, e, h, i (20 μm), f (2 μm).

3.4 Patogenicidade em mudas de *Tibouchina* spp. e resistência de clones de *Eucalyptus* sp.

As inoculações de *C. puriensis* para o teste de patogenicidade em *T. mutabilis* resultaram em lesões no caule, as quais se estenderam da base do colo até os galhos. Após 60 dias foi possível o reisolamento das plantas e confirmação da presença de *C. puriensis*, cumprindo-se assim os postulados de Koch. Nenhuma espécie fúngica foi observada no tratamento controle.

Houve diferença na severidade da doença entre os isolados testados (Figura 4b). As maiores lesões foram causadas pelo isolado MSL14M, com 385 mm de comprimento de lesão (Figura 4b), porém sem diferenças estatísticas significativas do isolado MSL02M. (Figura 5). Em *T. granulosa*, o isolado MSL14M também causou as maiores lesões, com médias de 43,3 mm de comprimento (Figura 4d), diferindo-se estatisticamente dos demais tratamentos. (Figura 5). Todos os clones inoculados apresentaram lesão, porém, houve diferença entre eles

quanto a resistência ao patógeno. O clone VE77 demonstrou ser o mais suscetível ao fungo, apresentando a maior média de comprimento de lesão (Figura 4h), com 12,1 mm de comprimento (Figura 4h). A menor média de comprimento de lesão foi observada nos clones 1407 (7,2 mm) (Figura 4f), que diferiu, estatisticamente, dos demais clones inoculados, podendo ser considerado o mais resistente entre eles (Figura 6).

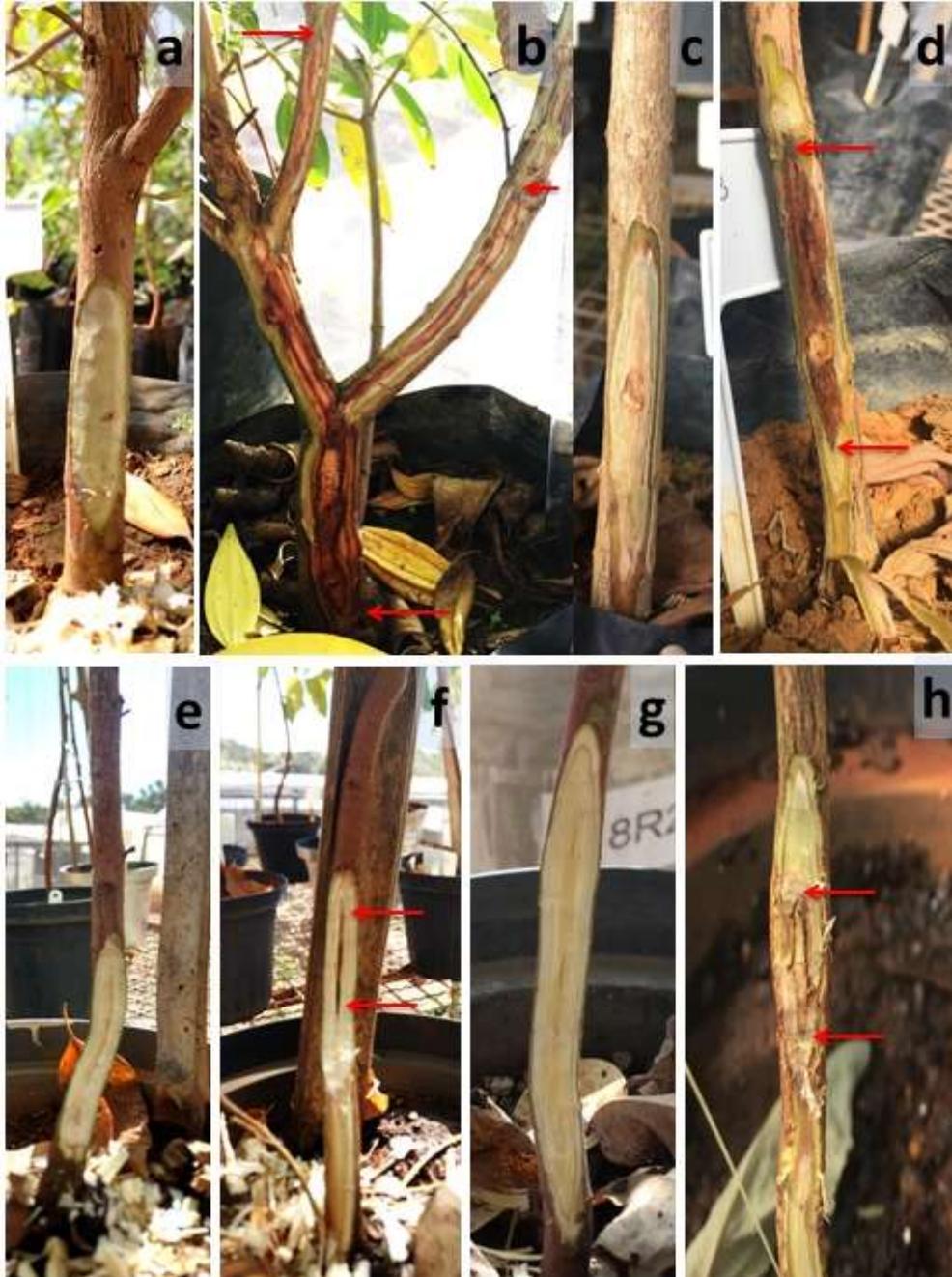


Figura 4. Inoculação de *C. puriensis* avaliada após 60 dias. **a e b)** Mudanças de *T. mutabilis* sem inoculação (controle) e inoculada. **c e d)** Mudanças de *T. granulosa* sem inoculação (controle) e inoculada. **e e f)** Clone 1407 sem inoculação (controle) e inoculado. **g e h)** Clone VE77 sem inoculação (controle) e inoculado.

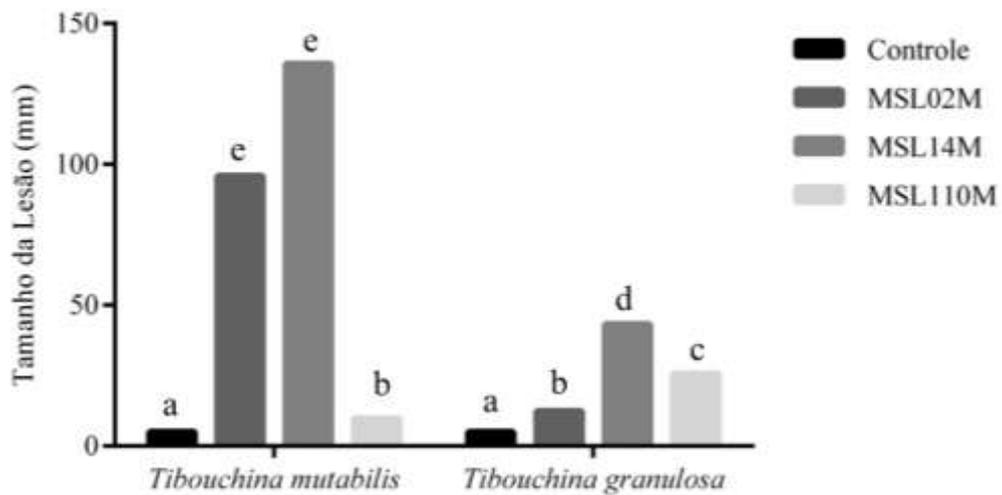


Figura 5. Comprimento da lesão (mm) de isolados fúngicos representativos de *Chrysosporthe puriensis* em mudas de *Tibouchina mutabilis* e *T. granulosa* aos 60 dias após a inoculação (dai). Médias seguidas pela mesma letra não apresentam diferença estatística ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott.

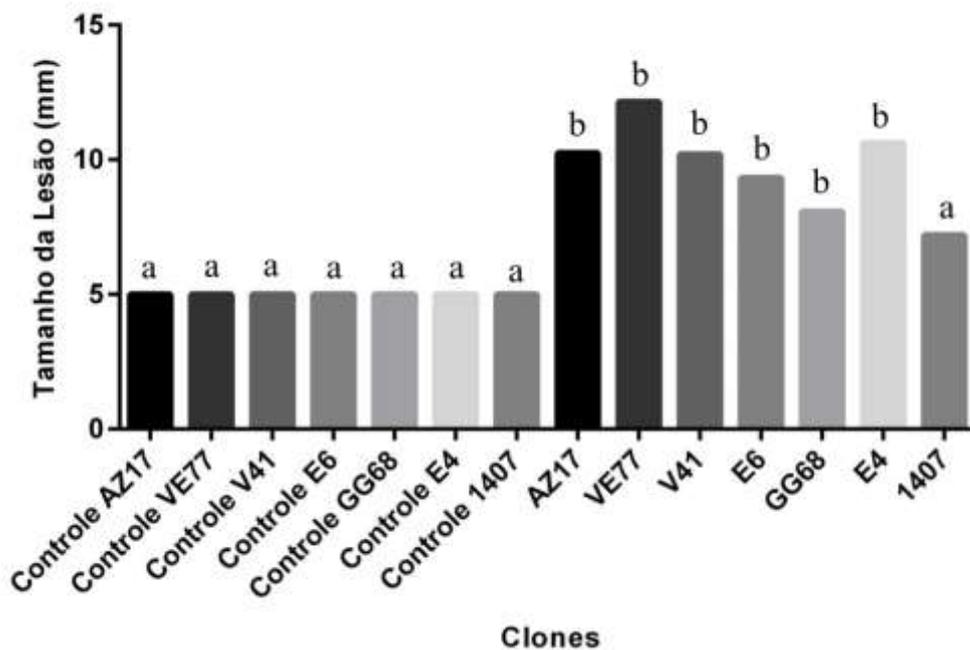


Figura6. Comprimento da lesão (mm) do isolado MSL14M de *Chrysosporthe puriensis* em clones de eucalipto aos 60 dias após a inoculação (dai). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

4. DISCUSSÃO

A espécie *Chrysoporthe puriensis* descrita pela primeira vez no Brasil por Oliveira (2018), foi observada incidindo em *T. heteromalla*, *T. candolleana* e *T. granulosa* nos estados da Bahia, Minas Gerais e Rio de Janeiro. O sintoma observado pelo estudo foi o cancro e consequente morte de árvores da arborização urbana e de florestas nativas. Os estudos em torno das espécies de Melastomataceae e Myrtaceae no Brasil, nos últimos anos, têm sido motivados pela diversidade de espécies e gêneros da família Cryphonectriaceae ocorrendo na América Latina (Soares et al., 2018; Gryzenhout et al., 2005; Oliveira, 2018; Ferreira et al., 2019; Gryzenhout et al., 2009; Crous et al., 2015).

Neste trabalho foi relatada pela primeira vez a incidência de *C. puriensis* em *Tibouchina mutabilis* com ocorrência na Mata Atlântica em São Paulo. Foram realizadas análises filogenéticas utilizando os métodos de Inferência Bayesiana e Máxima Parcimônia. Os isolados sequenciados neste estudo foram agrupados no clado da espécie correspondente a *C. puriensis*, com suporte de 0.96 de probabilidade posterior e 99% de *bootstrap*. A árvore filogenética gerada através das regiões combinadas permitiu observar a formação de um sub-clado dentro do clado de *C. puriensis* com os isolados CT13, TGPNI01 e TCL01 de Oliveira (2018) provenientes dos hospedeiros *T. granulosa* e *T. candolleana* que apresentam 6 nucleotídeos polimórficos. Os isolados do presente estudo agruparam com os demais isolados *C. puriensis* que contém cinco sítios polimórficos, formando um sub-clado. Assim, a formação deste sub-clado nos permite inferir que existe variabilidade genética dentro da espécie de *C. puriensis*, onde isolados de uma espécie hospedeira podem ser agrupados em diferentes sub-clados com isolados de outra espécie hospedeira. Isto é suportado por estudo realizado por Oliveira (2018), onde comparou populações de *C. puriensis* e *C. cubensis* no Brasil e demonstrou a existência de maior variabilidade genética dentro das populações de *C. puriensis* (62%) que entre as populações de *C. cubensis* (38%).

A variabilidade genética dentro das populações de *C. puriensis* pode ser um indicativo de que o Brasil seja o centro de origem do fungo. Em estudo de Van der Merwe et al. (2010), com dados filogenéticos multigênicos foi possível determinar o centro de origem de *C. cubensis* e *C. deuterocubensis*, sendo estes respectivamente, da América do Sul e Sudeste Asiático. Contudo, são necessárias coletas de maior abrangência em vários locais da América Latina para verificar em quais regiões ocorre maior variabilidade, permitindo assim, determinar o centro de origem deste fungo. A variabilidade genética dentro de *C. puriensis* também pode ser decorrente do seu sistema de reprodução. *Chrysoporthe puriensis* apresenta ambas as estruturas, sexuais e assexuais, podendo conferir às populações maior variabilidade,

assim como em *C. austroafricana*, *C. cubensis* e *C. deuterocubensis*. Essas espécies comumente manifestam a presença de estruturas sexuais (peritécios) causando cancro, diferenciando-se portanto, das demais espécies de *Chrysosporthe*, com rara ocorrência de peritécios, como *C. hodgesiana*, *C. syzygiicola* e *C. zambiensis* (Heath et al., 2006; Nakabonge et al., 2006).

A caracterização das estruturas dos corpos de frutificação dos materiais coletados permitiu verificar a presença de estruturas assexuadas e sexuadas similares ao descrito para *C. puriensis* por Oliveira (2018). Esta é uma espécie que não possui nenhum marcador morfológico que seja possível diferenciá-lo das demais espécies do gênero *Chrysosporthe*. A dificuldade na distinção das espécies através de suas características morfológicas não é restrita ao gênero *Chrysosporthe*, pois ocorre variabilidade morfológica em outros gêneros pertencentes à família Cryphonectriaceae. Soares et al. (2018) observaram massa de esporos de coloração marrom amarelada em isolados de *C. doradensis* provenientes de *Eucalyptus* no Brasil, enquanto Gryzenhout et al. (2005) relatou a cor amarelo-claro da mesma espécie proveniente de plantações de *Eucalyptus* no Equador. Ademais, *C. cubensis* e *C. austroafricana* possuem como única diferença morfológica o formato dos ápices de ascas e ascósporos, cônicos em *C. cubensis* e arredondados em *C. austroafricana* (Gryzenhout et al. 2004). Contudo, tamanho e formatos de estruturas devem ser levados em consideração apenas como marcadores morfológicos.

Os testes de patogenicidade, inoculação cruzada e resistência clonal realizados permitiram concluir que os isolados *C. puriensis* foram patogênicos à *T. mutabilis*, *T. granulosa* e aos sete clones de eucalipto, respectivamente, confirmando, a ausência de especificidade do patógeno ao hospedeiro. *Tibouchina granulosa* demonstrou ser menos suscetível aos isolados *C. puriensis* que *T. mutabilis*, com maior média de comprimento de lesão (43,3 mm) e *T. mutabilis*, com 135,6 mm. Os isolados de Oliveira (2018) quando inoculados em *T. granulosa* obtiveram um comprimento médio de 51 mm em um período próximo de avaliação do presente estudo, e também apresentaram menor suscetibilidade quando comparado a *T. heteromalla*. Todos os clones de eucalipto inoculados apresentaram lesão, porém, com diferentes níveis de suscetibilidade. Os testes de resistência permitem selecionar materiais genéticos de eucalipto mais resistentes e a mesma estratégia pode ser adotada para selecionar *Tibouchina* sp. (Alfenas et al., 2009; Soares et al., 2018).

Os relatos de incidência/ocorrência natural de *C. puriensis*, até o presente momento, são restritos às espécies de *Tibouchina* sp., no entanto são patogênicos a clones de eucalipto em inoculações artificiais. Apesar de *C. puriensis* não ter sido relatado em *Eucalyptus*, Van

der Merwe et al. (2013), em estudo realizado na Colômbia relatou a ocorrência de salto de hospedeiro (host-jump), em que a mesma população de *C. cubensis*, encontrada em *Miconia* sp. (Melastomataceae) também foi identificada em *Eucalyptus* sp. (Myrtaceae), de modo que não houve diferença genética entre populações de hospedeiros distintos. Portanto, é possível considerar que *Eucalyptus* sp. possa se tornar hospedeiro alternativo de espécies como *C. puriensis* no Brasil como relatado na Colômbia, por exemplo.

O presente estudo relata um novo hospedeiro de *C. puriensis* no Brasil, e reforça os resultados da existência de variabilidade genética de isolados *C. puriensis* provenientes de regiões e hospedeiros distintos no Brasil. O presente estudo sugere a necessidade de se buscar maior diversidade de genótipos de eucaliptos resistentes. Visando prevenir a ocorrência de cancro, decorrente do surgimento de novos patossistemas que representem risco para plantios comerciais e para o desenvolvimento de ecossistemas florestais. Nesse sentido, no programa de melhoramento genético de eucalipto ou, mesmo de plantas utilizadas para arborização urbana é relevante a inoculação de diferentes espécies de *Chrysoporthe* para seleção de materiais resistentes.

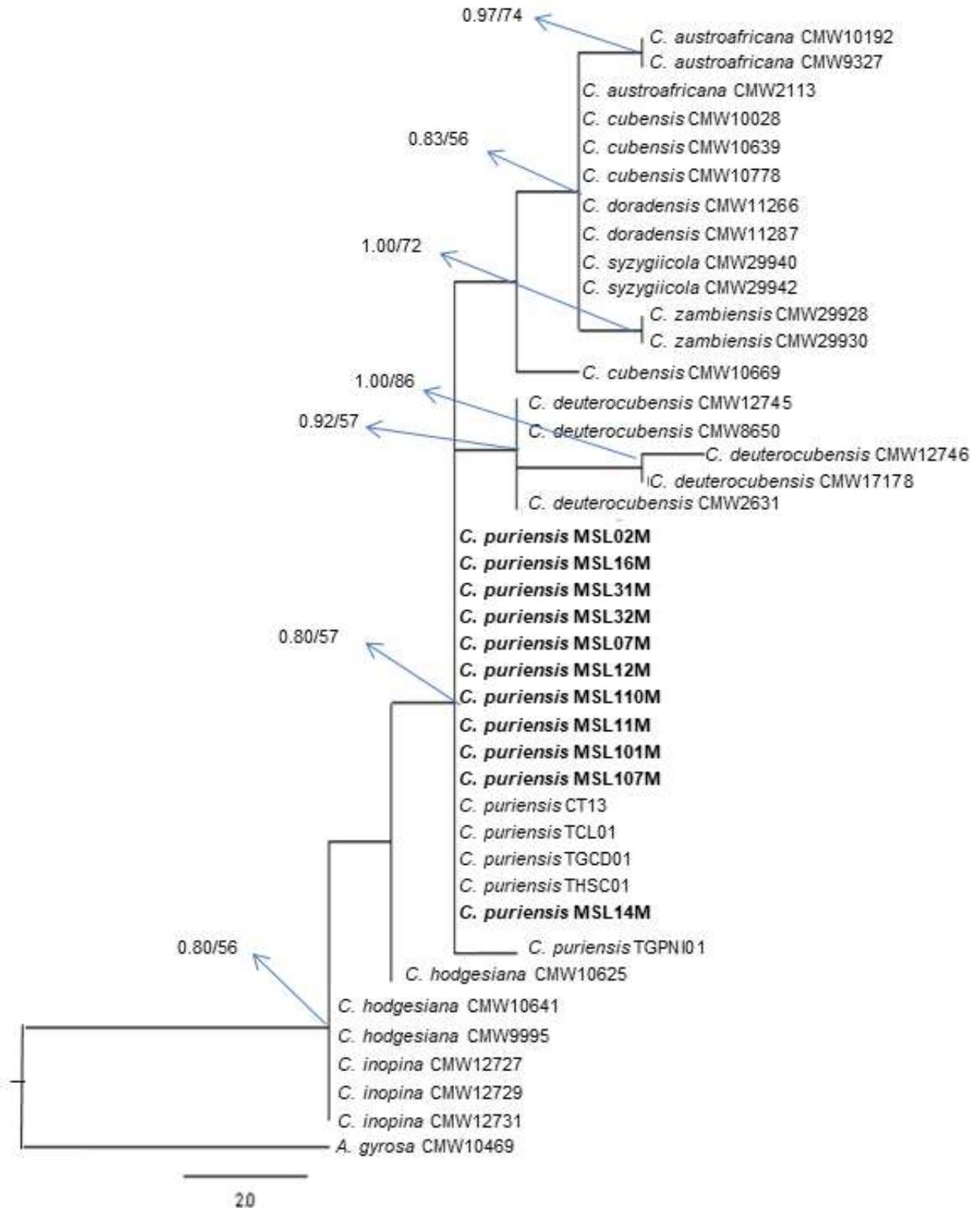
REFERÊNCIAS

- Alfenas AC, Zauza EAV, Mafia RG, Assis TF (2009) Clonagem e doenças do eucalipto, 2nd edn. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 500 p.
- Alfenas AC, Mafia RG (2016) Métodos em Fitopatologia. Editora UFV, Viçosa, 450p.
- Bortolini MF, Zuffellato-Ribas KC, Koehler HS, Carpanezzi AA, Descalhmps C, Oliveira MC, Bona C, Mayer JLS (2008) *Tibouchina sellowiana* (Cham.) Cogn.: Enraizamento, anatômica e análises bioquímicas nas quatro estações do ano. Revista Ciência Florestal, 18 (2):159-171.
- Bruner SC (1917) Una enfermedad gangrenosa de lós eucaliptos. Estaciòn Experimental Agronòmica 37:1–33
- Castellani A (1939) Viability of some pathogenic fungi in distilled water. Journal of Tropical Medicine & Hygiene, Austin 24: 270-276.
- Doyle JJ, Doyle JL (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochemical Bulletin, 19: 11-15.
- Farris JS, Kallersjo M, Kluge AG, Bult C (1995) Testing significance of incongruence. Cladistics 10:315-9.
- Ferreira MA, Oliveira, MES, Silva, GA, Mathioni SM, Mafia RG (2019) *Capillaureum caryovora* gen. sp. nov. (Cryphonectriaceae) pathogenic to pequi (*Caryocar brasiliense*) in Brazil. Mycological Progress 18: 385-403.
- Ferreira FA (1989) Patologia florestal: principais doenças florestais no Brasil. Viçosa, MG: UFV; SIF, 570 p.
- Genini J, Galetti M, Morellato C (2009) Fruiting phenology of palms and trees in na Atlantic rainforest land-bridge island. Flora, 204: 131-145.
- Glass NL, Donaldson GC (1995) Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. Applied and Environmental Microbiology, Washington 61: 1323-1330.
- Gryzenhout M, Myburg H, Van der Merwe NA, Wingfield BD, Wingfield MJ (2004) *Chrysoporthe*, a new genus to accommodate *Chryphonectria cubensis*. Studies in Mycology, 50: 119-142.
- Gryzenhout M, Myburg H, Wingfield B, Montenegro F, Wingfield M (2005) *Chrysoporthe doradensis* sp. nov. pathogenic to Eucalyptus in Ecuador. Fungal Diversity 20, 39-57.
- Gryzenhout M, Tarigan M, Clegg PA, Wingfield MJ (2010) *Cryptometrion aestuescens* gen. sp. nov. (Cryphonectriaceae) pathogenic to Eucalyptus in Indonesia. Australasian Plant Pathology 39:161–169.
- Gryzenhout M, Myburg H, Hodges CS, Wingfield BD, Wingfield MJ (2006) *Microthia*, *Holocryphia* and *Ursicollum*, three new genera on *Eucalyptus* and *Coccoloba* for fungi previously known as *Cryphonectria*. Studies in Mycology 55:35–52.
- Gryzenhout M, Myburg H, Rodas CA, Wingfield BD, Wingfield MJ (2006). *Aurapex penicillata* gen. sp. nov. from native *Miconia theaezans* and *Tibouchina* spp. in Colombia. Mycologia 98:105–115.

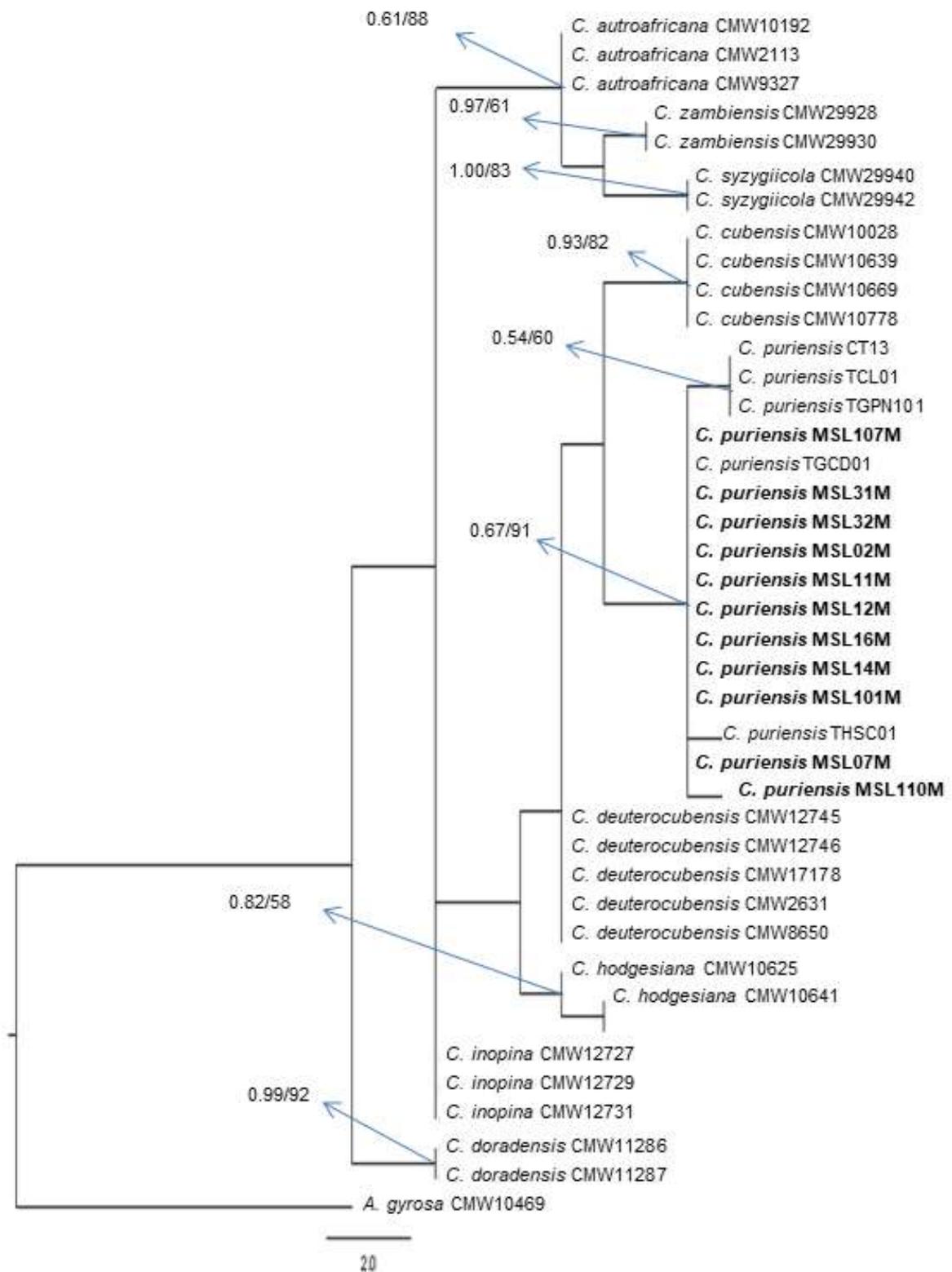
- Gryzenhout, M, Wingfield, B, Wingfield, MJ (2009) Taxonomy, Phylogeny, and Ecology of Bark-Inhabiting and Tree-Pathogenic Fungi in the Cryphonectriaceae. The American Phytopathological Society.
- Grandtner MM, Chevrette J (2014) Dictionary of trees, volume 2: South America: Nomenclature, Taxonomy and Ecology, 1172 p.
- Heath RN, Gryzenhout M, Roux J, Wingfield MJ (2006) Discovery of the canker pathogen *Chrysosporthe austroafricana* on native *Syzygium* spp. in South Africa. Plant Dis. 90, 433–438.
- Hodges CS, Reis MS, Ferreira FA, Henfling JDM (1976) O cancro do eucalipto causado por *Diaporthe cubensis*. Fitopatologia Brasileira, 1: 129-170.
- Hodges CS (1980) The taxonomy of *Diaporthe cubensis*. Mycologia, 72: 542-548 1980.
- Huelsenbeck JP (2001) MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. Bioinformatics 17:754–755.
- Kirk, PM, Cannon, PF, David, JC, Stalpers, JA (2001) Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi, 9ª edição. CAB International, Oxon, U.K.
- Larget B, Simon DL (1999) Markov chain Monte Carlo algorithms for the Bayesian analysis of phylogenetic trees. Mol Biol Evol 16:750–759
- Lorenzi, Harri (2002) Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil, vol. 1. Instituto Plantarum, Nova Odessa, SP, 4a. edição. ISBN 85-86174-16-X
- Micales, JA, Stipes, RJ (1987). A reexamination of the fungal genera *Cryphonectria* and *Endothia*. *Phytopathology* 77, 650-654.
- Nakabonge G, Roux J, Gryzenhout M, Wingfield MJ, (2006) Distribution of *Chrysosporthe* canker pathogens on *Eucalyptus* and *Syzygium* spp. in eastern and southern Africa. Plant Dis. 90, 734–740.
- Oliveira MES (2018) Genetic variability of *Chrysosporthe* spp. no Brazil. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Lavras, Lavras 90pp.
- Soares TPF, Ferreira MA, Mafia RG, Oliveira LSS, Hodges CS, Alfenas AC (2018) Canker disease caused by *Chrysosporthe doradensis* and *C. cubensis* on *Eucalyptus* sp. and *Tibouchina* spp. in Brazil. Tropical Plant Pathol 43:314–322.
- Swofford DL (2002) PAUP: Phylogenetic analysis using parsimony Version 4.0 beta. Sunderland, MA: Sinauer Associates Inc, software.
- Tabarelli M, Mantovani W (1999) Clareiras naturais e a riqueza de espécies pioneiras em uma Floresta Atlântica Montana. Revista Brasileira de Biologia, 59(2):251-261.
- Van der Merwe, N, Gryzenhout M, Steenkamp E, Wingfield B, Wingfield, M (2010). Multigene phylogenetic and population differentiation data confirm the existence of a cryptic species within *Chrysosporthe cubensis*. Fungal biology. 114. 966-79. 10.1016/j.funbio.2010.09.007.
- Van der Merwe NA, Steenkamp ET, Rodas C, Wingfield BD, Wingfield MJ (2013) Host switching between native and non-native trees in a population of the canker pathogen *Chrysosporthe cubensis* from Colombia, Plant Pathology 62: 642–648.

White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications*, 18: 315-322.

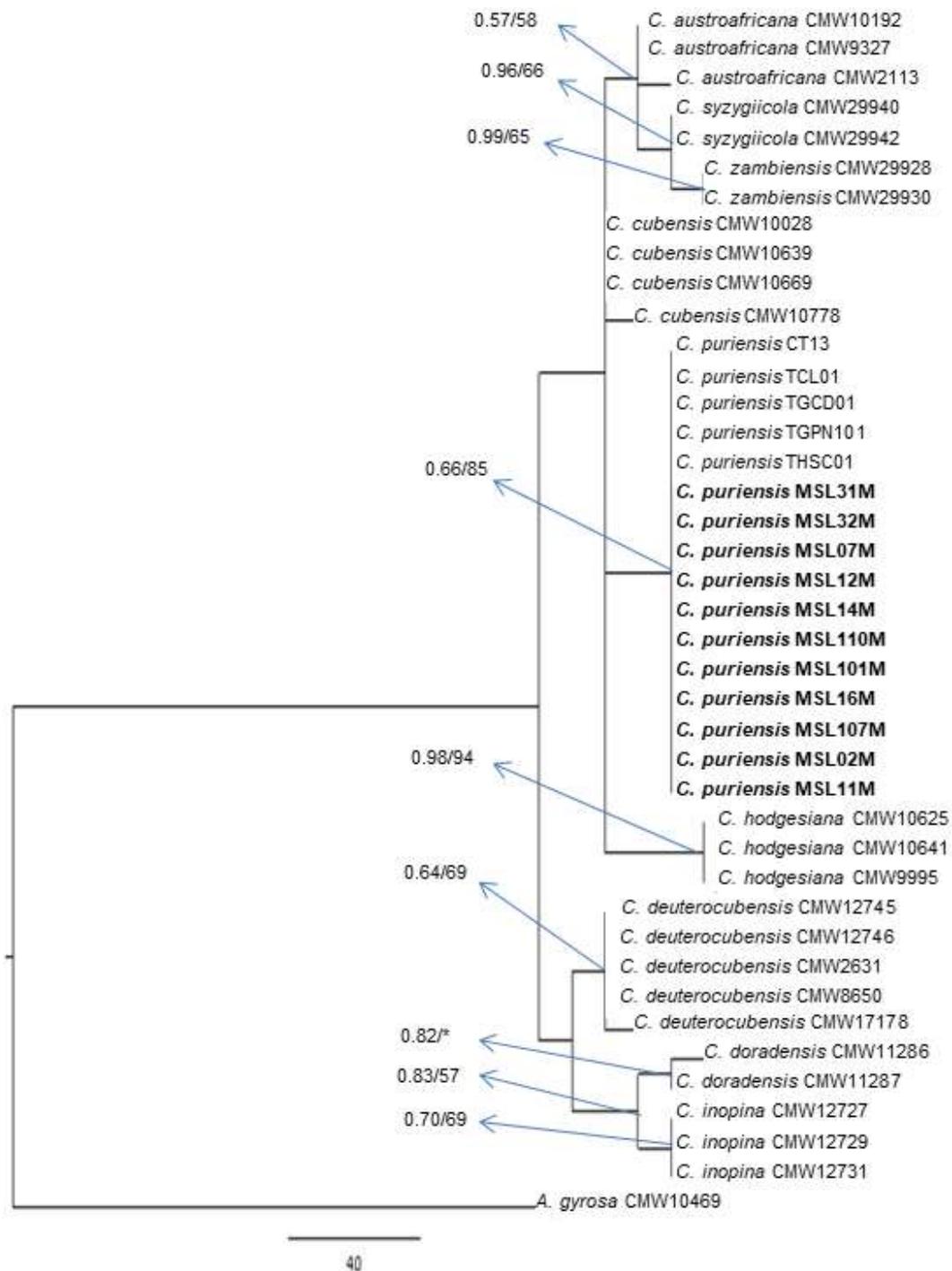
ANEXOS



Anexo A. Árvore filogenética baseada na análise de máxima parcimônia das sequências dos dados da região ITS gerada pela Inferência Bayesiana e Máxima Parcimônia. Isolados de *Chrysosporthe puriensis* em negrito foram sequenciados nesse estudo. Os valores de probabilidade posterior (> 0.80) e *bootstrap* ($>56\%$) dos clados são mostrados acima de cada ramo (PP/MP). A espécie *Amphilogia gyrosa* foi definido como *outgroup*.



Anexo B. Árvore filogenética baseada na análise de máxima parcimônia das sequências dos dados da região β -tubulina-1 gerada pela Inferência Bayesiana e Máxima Parcimônia. Isolados de *Chrysosporthe puriensis* em negrito foram sequenciados nesse estudo. Os valores de probabilidade posterior (> 0.54) e *bootstrap* ($> 61\%$) dos clados são mostrados acima de cada ramo (PP/MP). A espécie *Amphilogia gyrosa* foi definido como *outgroup*.



Anexo C. Árvore filogenética baseada na análise de máxima parcimônia das sequências dos dados da região β -tubulina-2 gerada pela Inferência Bayesiana e Máxima Parcimônia. Isolados de *Chrysosporthe puriensis* em negrito foram sequenciados nesse estudo. Os valores de probabilidade posterior (> 0.57) e *bootstrap* ($>65\%$) dos clados são mostrados acima de cada ramo (PP/MP). A espécie *Amphilogia gyrosa* foi definido como *outgroup*.