

CRISTIANE APARECIDA MILAGRES

**EPITIFIKAÇÃO E PROCESSO INFECCIOSO DE *Pseudobeltrania cedrelae*
EM FOLHAS DE CEDRO (*Cedrela fissilis*) E SUA INTERAÇÃO COM
*Phyllachora balansae***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, para obtenção do título de Magister Scientiae.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2017

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da
Universidade Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

M637e
2017
Milagres, Cristiane Aparecida, 1990-
Epitipificação e processo infeccioso de *Pseudobeltrania
cedrelae* em folhas de cedro (*Cedrela fissilis*) e sua interação
com *Phyllachora balansae* / Cristiane Aparecida Milagres. - Viçosa,
MG, 2017.

xi, 61f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Gleiber Quintão Furtado.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Fitopatologia. 2. Filogenia. 3. Microscopia eletrônica.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Fitopatologia.
Programa de Pós-graduação em Fitopatologia. II. Título.

CDD 22 ed. 632.3

CRISTIANE APARECIDA MILAGRES

**EPITIFIKAÇÃO E PROCESSO INFECCIOSO DE *Pseudobeltrania cedrelae*
EM FOLHAS DE CEDRO (*Cedrela fissilis*) E SUA INTERAÇÃO COM
*Phyllachora balansae***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, para obtenção do título de Magister Scientiae.

APROVADA: 21 de fevereiro de 2017.


Olinto Liparini Pereira


Fabrício de Ávila Rodrigues


Nelson Sidnei Massola Júnior


Gleiber Quintão Furtado
(Orientador)

“A persistência é o menor caminho do êxito.”

(Charles Chaplin)

A Deus,

minha mãe Mause,

meu pai José Eudes,

meus irmãos Elisângela e Leandro,

meu noivo Lívio.

Dedico.

ii

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela oportunidade e por sempre me guiar e me dar forças nos momentos difíceis;

Aos meus pais José Eudes e Mausa, por todo apoio, carinho, incentivo e compreensão;

Ao meu irmão Leandro, pelo carinho e paciência e a minha irmã Elisângela e o meu cunhado Mateus pelo apoio, carinho, incentivo e pelo melhor presente, a minha afilhada Maria Eduarda;

Ao meu noivo Lívio, por todo amor, compreensão, incentivo e momentos vividos;

Aos meus familiares por todo carinho e compreensão;

A todos os meus amigos conquistados no grupo JSC e na graduação, pelos ótimos momentos vividos e por todo conselho.

À Universidade Federal de Viçosa pela oportunidade e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos;

Aos funcionários da Universidade Federal de Viçosa pelos serviços prestados;

Ao Departamento de Fitopatologia e ao Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, pela oportunidade concedida;

Aos professores do Departamento de Fitopatologia pelos ensinamentos transmitidos;

Ao professor Gleiber Quintão Furtado pela orientação e conselhos;

Aos membros da banca de defesa, Prof. Olinto Liparini Pereira, Prof. Fabrício de Ávila Rodrigues e Prof. Nelson Sidnei Massola Júnior pela disponibilidade e conselhos.

Ao Núcleo de Microscopia e Microanálise - CCB/UFV e ao Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultraestrutural da Universidade Federal de Lavras pela ajuda nas análises microscópicas;

Ao professor Olinto Liparini Pereira e a toda equipe do Laboratório de Micologia e Etiologia de Doenças Fúngicas de Plantas pelo auxílio;

A toda equipe do Laboratório de Patologia Florestal, inclusive aos que já não estão, por toda amizade e ensinamentos;

Aos amigos do Departamento de Fitopatologia, por todos os momentos de estudos, dificuldades e alegrias compartilhados;

E a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito obrigada!

BIOGRAFIA

CRISTIANE APARECIDA MILAGRES, filha de José Eudes Milagres e Mause Aparecida Milagres, nasceu em 01 de agosto de 1990, em Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

Em 2009, iniciou o curso de Agronomia na Universidade Federal de Viçosa (UFV) em Viçosa- Minas Gerais.

Durante a graduação, foi estagiária remunerada por dois anos no laboratório da Interação Planta-Patógeno, sob orientação do professor Fabrício de Ávila Rodrigues.

Em março de 2015, iniciou o curso de Mestrado em Fitopatologia na Universidade Federal de Viçosa, sob a orientação do professor Gleiber Quintão Furtado, submetendo-se à defesa da dissertação em 21 de fevereiro de 2017.

SUMÁRIO

RESUMO	viii
ABSTRACT	x
INTRODUÇÃO GERAL	1
Referências	5
CAPÍTULO 1 – Aspectos taxonômicos e posicionamento filogenético de <i>Pseudobeltrania cedrelae</i>	8
Resumo.....	9
Introdução	10
Material e Métodos	13
Obtenção, isolamento e preservação dos isolados	13
Caracterização morfológica	13
Taxa de crescimento micelial e esporulação de <i>P. cedrelae</i>	14
Caracterização molecular	14
Testes de patogenicidade.....	16
Resultados	17
Isolamento de <i>P. cedrelae</i>	17
Caracterização morfológica	17
Taxa de crescimento micelial e esporulação de <i>P. cedrelae</i>	18
Análise filogenética.....	19
Testes de patogenicidade.....	19
Discussão	20
Agradecimento	23
Literatura citada	23
Tabelas e Figuras.....	29
CAPÍTULO 2 – Processo infeccioso de <i>Pseudobeltrania cedrelae</i> em folíolos de <i>Cedrela fissilis</i> e sua interação com <i>Phyllachora balansae</i>	38
Resumo.....	39
1. Introdução	40
2. Material e Métodos	42

2.1 Isolado e preparação do inóculo.....	42
2.2 Germinação de <i>P. cedrelae</i> in vitro.....	42
2.3 Avaliação do processo infeccioso <i>P. cedrelae</i>	43
2.4 Desenvolvimentos da mancha de pseudobeltrania.....	44
3. Resultados.....	45
3.1 Germinação e penetração de conídios.....	45
3.2 Colonização e esporulação de <i>P. cedrelae</i>	46
3.3 Desenvolvimento da mancha de pseudobeltrania.....	46
4. Discussão	47
Agradecimento	50
Referências	51
Tabelas e Figuras.....	56
CONCLUSÕES GERAIS	61

RESUMO

MILAGRES, Cristiane Aparecida, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2017. **Epitipificação e processo infeccioso de *Pseudobeltrania cedrelae* em folhas de cedro (*Cedrela fissilis*) e sua interação com *Phyllachora balansae*.** Orientador: Gleiber Quintão Furtado.

O cedro (*Cedrela fissilis*) é uma espécie arbórea utilizada em diferentes finalidades sendo por isso alvo de intenso extrativismo e exploração em seu habitat natural. O fungo *Pseudobeltrania cedrelae* é o agente causal de uma mancha foliar em mudas e plantas adultas de cedro e frequentemente é encontrado associado ao fungo *Phyllachora balansae*, ocasionando intensa desfolha. Os objetivos deste estudo foram epitipificar, caracterizar e gerar informação sobre o posicionamento filogenético de *P. cedrelae*, elucidar o processo infeccioso de *P. cedrelae* em folíolos de cedro e a possível relação entre *P. cedrelae* e *P. balansae* na germinação de conídios de *P. cedrelae* e no desenvolvimento da mancha de pseudobeltrania. Coletas foram realizadas em três locais no município de Viçosa, MG, Brasil, das quais foram obtidos 10 isolados de *P. cedrelae*. O epitipo será designado e caracterizado morfológica e molecularmente. As características morfológicas das estruturas fúngicas obtidas de folhas sintomáticas e da técnica de microcultura apresentaram variações. De acordo com a árvore filogenética obtida a partir das regiões ITS e 28S, os isolados se agruparam em um mesmo clado, porém em um clado distinto de *Pseudobeltrania ocoteae*, o que sugere que tal espécime não pertence ao gênero *Pseudobeltrania*, mas sim a *Hemibeltrania*. O processo infeccioso de *P. cedrelae* em folíolos de cedro foi estudado utilizando a microscopia eletrônica de varredura em amostras foliares obtidas entre 1 a 408 horas após inoculação (hai). A germinação de *P. cedrelae* ocorreu a partir de 3 hai com a emissão de 1 a 2 tubos germinativos a partir das extremidades e/ou da lateral dos conídios. Foi observada baixa germinação de conídios de *P. cedrelae* e formação de apressórios em todas as amostras de folíolos de cedro sadios e alta germinação e formação de apressórios sobre amostras contendo ascomas de *P. balansae*. A penetração ocorreu de forma direta e através dos estômatos. A colonização inter e intracelular de células do parênquima lacunoso foi observada a partir de 144 hai. A esporulação foi observada com 408 hai, em conidióforos que emergiam através da epiderme e dos estômatos. A porcentagem de germinação de conídios, in vitro, de *P. cedrelae* em água, em água + cortes de folíolos de cedros sadios e em água + cortes de folíolos contendo ascomas de *P. balansae* foi 2, 79 e 91%, respectivamente. A influência de *P. balansae* foi também observada sobre o

desenvolvimento da mancha de pseudobeltrania, a incidência da doença em folhas saudáveis inoculadas sem (2,08%) e com ferimento (8,33%) prévio foi significativamente diferente do que em folhas contendo ascósporas de *P. balansae* (87,5%). Além disso, em folhas contendo ascósporas de *P. balansae* o período de incubação da mancha de pseudobeltrania foi 2 dias e em folhas saudáveis 6 dias. Neste estudo, será proposto o epítipo do fungo *P. cedrelae* com base em análises morfológicas e moleculares, a fim de contribuir com a filogenia da família Beltraniaceae, além de ter gerado informações inéditas sobre o processo infeccioso de *P. cedrelae* e sobre o estímulo exercido pelo fungo *P. balansae* no desenvolvimento da mancha de pseudobeltrania em folhas de cedro.

ABSTRACT

MILAGRES, Cristiane Aparecida, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2017. **Epitypification and infection process of *Pseudobeltrania cedrelae* on cedar leaves (*Cedrela fissilis*) and its interaction with *Phyllachora balansae*.** Adviser: Gleiber Quintão Furtado.

Cedar (*Cedrela fissilis*) is a tree species used for different purposes and is therefore the target of intense extractivism and exploitation in its natural habitat. The fungus *Pseudobeltrania cedrelae* is the causal agent of a leaf spot in cedar seedlings and adult plants and is frequently found associated to the fungus *Phyllachora balansae*, causing intense defoliation. The objectives of this study were to epitypify, characterize and generate information about the phylogenetic positioning of *P. cedrelae*, elucidate the infectious process of *P. cedrelae* on cedar leaflets and the possible relationship between *P. cedrelae* and *P. balansae* on conidia germination of the former and on the development of the pseudobeltrania spot. Samples were collected in three places in Viçosa county, MG, Brazil, from which 10 isolates of *P. cedrelae* were obtained. The epitope will be designated and characterized morphologically and molecularly. The morphological characteristics of the fungal structures obtained from symptomatic leaves and the microculture technics presented variations. According to the phylogenetic tree obtained from the ITS and 28S regions, the isolates were grouped in the same clade but in a distinct clade of *Pseudobeltrania* ocoeteae, which suggests that such specimen does not belong to the genus *Pseudobeltrania* but to *Hemibeltrania*. The infectious process of *P. cedrelae* on cedar leaflets was studied by scanning electron microscopy in leaf samples obtained between 1 to 408 hours after inoculation (hai). The conidial germination of *P. cedrelae* occurred from 3 hai with the emission of 1 to 2 germinative tubes from the ends and/or the side of the conidia. Low germination of *P. cedrelae* and low appressory formation were observed in all samples of healthy cedar leaflets and high germination and formation of apressories on samples containing *P. balansae* ascomas. The penetration occurred directly and through the stomata. The inter and intracellular colonization of lacunar parenchyma cells were observed from 144 hai. Sporulation was observed at 408 hai in conidiophores that emerged through intact epidermis and stomata. The percentage of in vitro germination of *P. cedrelae* in water, in water + cuts of leaves of healthy cedars and in water + leaf sections containing *P. balansae* ascomas was 2, 79 and 91%, respectively. The effect of *P. balansae* was also observed on the development of the pseudobeltrania spot. The disease incidence in

healthy leaves inoculated without (2.08%) and with previous injury (8.33%) were statistically lower compared to leaves containing ascomas of *P. balansae* (87.5%). In addition, in leaves containing *P. balansae* ascomas the incubation period of the disease was 2 days and in healthy leaves was 6 days. In this study, it will be purposed the epitype of the fungus *P. cedrelae* based on morphological and molecular analyzes, in order to contribute with the phylogeny of the Beltraniaceae family, as well as generating new information about the infectious process of *P. cedrelae* and on the stimulus exerted by the fungus *P. balansae* in the development of the pseudobeltrania spot on cedar leaves.

INTRODUÇÃO GERAL

O cedro (*Cedrela fissilis* Vell.) é uma espécie florestal caducifólia pertencente à família Meliaceae que se desenvolve tanto no interior de florestas primárias quanto em vegetação secundária. Porém, mais frequentemente, ocorre em solos úmidos e profundos como os encontrados nos vales e planícies aluviais. No Brasil, o cedro ocorre em todo o território brasileiro, principalmente nas regiões sul, sudeste e centro-oeste (Lorenzi, 1992; CNCFlora, 2012).

O cedro é uma espécie que possui diversas utilidades, a madeira é largamente empregada em compensados, esculturas, molduras, móveis em geral, marcenaria, na construção civil, naval e aeronáutica, entre outras (Lorenzi, 1992). Além disso, é recomendada para arborização de praças públicas, recuperação de áreas degradadas e para reposição de matas ciliares devido ao seu rápido crescimento (Rioesba, 2017). Entretanto, o monocultivo de cedro pode ser inviável comercialmente devido ao ataque da broca-do-cedro (*Hypsipyla grandella*) que danifica a gema apical levando ao desenvolvimento arbustiforme ou mesmo matando a planta (Carvalho, 1994; IPEF, 2016).

Com a alta qualidade e alto valor comercial da sua madeira, o cedro possui um intenso extrativismo e exploração em seu habitat natural e, portanto, está incluído na Lista Vermelha da IUCN, sendo classificado como "em perigo" por esta organização (Dornelas & Rodriguez, 2006; IUCN, 2016).

Os patógenos relatados até o momento para o cedro são os fungos *Fulvifomes fastuosus*, *Fulvifomes rimosus*, *Botryosphaeria dothidea*, *Phellinus swieteniae*, *Phyllachora balansae* e *Pseudobeltrania cedrelae*. Destes, os patógenos foliares *B. dothidea*, *P. balansae* e *P. cedrelae* ocorrem no Brasil (Farr & Rossman, 2016; Mendes & Uben, 2016).

O gênero *Phyllachora*, pertencente à família *Phyllachoraceae*, possui um grande número de espécies nomeadas e todas são patógenos biotróficos de plantas. Além da presença de um clipeo bem desenvolvido de coloração marrom escura a negra, outras características como a formação de peritécio dentro dos tecidos das plantas e ascósporos hialinos, de paredes finas, lisos e asseptados, são típicas do gênero (Cannon, 1991).

O patógeno *P. balansae* é relatado em *Cedrela fissilis*, *Cedrela odorata* e *Toona ciliata* sendo a ocorrência da doença em *C. fissilis* observada apenas no Brasil (Zacaroni et al., 2013; Farr & Rossman, 2016). A doença provocada por esse fungo ocorre em folhas, pecíolos, ramos e terminais de hastes principais. Nas folhas são observadas pequenas áreas circulares com estromas negros, puntiformes, de 100-400 µm de diâmetro, que se distribuem circularmente. Além disso, pode acarretar intensa desfolha da planta (Ferreira et al., 1989). O controle mais eficaz para doença é a realização de podas e remoção de todas as folhas infectadas da área. Pulverizações com fungicidas ‘piraclostrobina + epoxiconazol’ também se tornam eficazes quando associadas aos métodos citados, mas esses fungicidas não estão registrados pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) para o cedro (Viana et al., 2012).

O gênero *Pseudobeltrania*, pertencente ao filo *Ascomycota* e à família *Beltraniaceae*, foi identificado pela primeira vez associado a lesões foliares em *C. fissilis* em São Paulo, SP, Brasil. Foi proposto por P. Hennings (1902) com a espécie-tipo *Pseudobeltrania cedrelae* (Gusmão & Grandi, 1996).

De acordo com o Mycobank (2017), o gênero *Pseudobeltrania* possui 11 espécies válidas: *P. angamosensis*, *P. cedrelae*, *P. chumrungensis*, *P. cristaspora*, *P. guerensis*, *P. havanensis*, *P. macrospora*, *P. ocoteae*, *P. penzigii*, *P. selenoides* e *P. summa*. Dentre essas, *P. ocoteae* é a única que possui sequência de DNA disponível no GenBank.

Para a família Beltraniaceae existem poucos estudos envolvendo filogenia molecular, mas, recentemente, Rajeshkumar et al. (2016) forneceram o posicionamento filogenético de alguns gêneros, entre eles, Beltrania, Beltraniella, Beltraniopsis, Hemibeltrania, Pseudobeltrania e Porobeltraniella. Shirouzu et al. (2010) relataram Beltraniella botryospora em folhas em decomposição de Quercus acuta e demonstraram em uma análise filogenética, com base em sequências da região 28S DNAr D1 / D2, que Beltraniaceae, localizada dentro de Xylariales, está estreitamente relacionada à família Amphisphaeriaceae. Crous et al. (2015) descreveram várias espécies novas de fungos na Austrália, dentre estas P. ocoteae, a qual foi considerada filogeneticamente próxima a Beltrania pseudorhombica.

Em relação às características morfológicas, *P. cedrelae* é caracterizado pela ausência de seta; conidióforos originados de células basais lobadas, lisos, castanhos; um a vários conidióforos por célula basal, simples ou ramificados, eretos ou recurvados, 1-3 septos ao longo do comprimento, lisos, castanhos-claros, $43,6-65,8 (73,7) \times 3,6-5,3 \mu\text{m}$; células conidiogênicas apicais, alongadas, lisas, castanho-claras, com crescimento simpodial e denticuladas, 3,4-6,1 larg. no ápice; dentículos 1-9, proeminentes, cilíndricos; células de separação inexistentes; conídios unicelulares, bicônicos, lisos, castanhos-claros, base truncada ou denticulada, ápice apiculado ou não, com uma banda hialina na região mediana, $19-25,6 \times 8,9-11,3 \mu\text{m}$ (Gusmão & Grandi, 1996).

Os sintomas causados por *P. cedrelae* em *C. odorata* são descritos como manchas marrons claras com pontuações negras, circulares a angulares, circundadas por halo clorótico, podendo coalescer originando extensas áreas necrosadas (Hanada et al., 2005). Além disso, em folhas de cedro (*C. fissilis*) oriundas de plantas no viveiro e de plantas adultas no campo, constantemente, ascomas negros do fungo *P. balansae* são observados associados a mancha de pseudobeltrania. Portanto, as pontuações negras

mencionadas por Hanada et al. (2005), ao descreverem os sintomas da mancha de pseudobeltrania em *C. odorata*, possivelmente se tratavam de estruturas reprodutivas de *P. balansae*. Portanto, estudos são necessários para elucidar a influência de *P. balansae* no desenvolvimento das manchas de pseudobeltrania em folhas de cedro.

Apesar de *P. cedrelae* ser relatada no Brasil há mais de 100 anos e da importância da mancha foliar causada por este patógeno em mudas de cedro, existe pouca informação fitopatológica sobre essa doença. As lacunas iniciam com o estado de preservação do material tipo. De acordo com Gusmão & Grandi (1996), as exsicatas do material tipo, depositadas no Herbário de São Paulo (Herbário Maria Eneyda Pacheco Kauffmann Fidalgo, Instituto de Botânica de São Paulo), estão em mau estado de conservação. Além disso, pouco se sabe sobre o processo infeccioso de *P. cedrelae* em folhas de cedro. Portanto, tornam-se importantes estudos para melhorar o entendimento atual sobre esse patossistema florestal.

Com base no exposto, os objetivos desse estudo foram epitipificar, caracterizar com base em análises morfológicas e moleculares, posicionar filogeneticamente e elucidar o processo infeccioso de *P. cedrelae* em folíolos de cedro e a sua interação com *P. balansae* no desenvolvimento da mancha de pseudobeltrania.

REFERÊNCIAS

- Americas Regional Workshop (Conservation & Sustainable Management of Trees, Costa Rica). *Cedrela fissilis*. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2016 -3. Disponível em: <www.iucnredlist.org>. Acesso em 20 de janeiro de 2017.
- Cannon, P. F. 1991. A revision of *Phyllachora* and some similar genera on the host family Leguminosae. Mycological Paper 163, 1–302.
- Crous P.W., Wingfield M. J., Le Roux J. J., Richardson D. M., Strasberg D., Shivas R. G., Alvarado P., Edwards J., Moreno G., Sharma R., Sonawane M. S., Tan Y. P., Altés A., Barasubiye T., Barnes C. W., Blanchette R. A., Boertmann D., Bogo A., Carlavilla J. R., Cheewangkoon R., Daniel R., de Beer Z. W., de Jesús Yáñez-Morales M., Duong T. A., Fernández-Vicente J., Geering A. D. W., Guest D. I., Held B. W., Heykoop M., Hubka V., Ismail A. M., Kajale S. C., Khemmuk W., Kolarik M., Kurli R., Lebeuf R., Lévesque C. A., Lombard L., Magista D., Manjón J. L., Marincowitz S., Mohedano J. M., Nováková A., Oberlies N. H., Otto E. C., Paguigan N. D., Pascoe I. G., Pérez-Butrón J. L., Perrone G., Rahi P., Raja H. A. , Rintoul T., Sanhueza R. M. V., Scarlett K., Shouche Y. S., Shuttleworth L. A., Taylor P. W. J., Thorn R. G., Vawdrey L. L., Vidal R. S., Voitk A., Wong P. T. W., Wood A. R., Zamora J. C. & Groenewald J. Z. 2015. Fungal Planet description sheets: 371–399. *Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 35, 264.
- Dornelas, M. C., & Rodriguez, A. P. M. 2006. The tropical cedar tree (*Cedrela fissilis* Vell., Meliaceae) homolog of the *Arabidopsis* LEAFY gene is expressed in reproductive tissues and can complement *Arabidopsis* leafy mutants. *Planta*, 223, 306-314.

- Farr, D. F., & Rossman, A. Y. Fungal Databases, Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS, USDA. Disponível em: <http://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/>. Acesso em 4 de dezembro de 2016.
- Ferreira, J. B., Abreu, M. S. D., Alves, E., Pereira, I. S., & Fernandes, K. D. 2009. Eventos do processo de infecção de *Colletotrichum gloeosporioides* inoculados em folhas de *Coffea arabica* L. *Summa Phytopathologica*, 35, 273-281.
- Gusmão, L. F. P., & Grandi, R. A. P. 1996. Espécies do grupo *Beltrania* (Hyphomycetes) associadas a folhas de *Cedrela fissilis* Veil. (Meliaceae), em Maringá, PR, Brasil. *Hoehnea*, 23, 91-102.
- Hanada, R. E., Gasparotto, L., & Ferreira, F. A. 2005. Primeiro relato de mancha foliar em *Cedrela odorata* causada por *Pseudobeltrania cedrelae*. *Fitopatologia Brasileira*, 30, 299-301.
- Hennings, P. C. 1902. Fungi S. Paulenses II. A cl. Puttemans collecti. In: *Hedwigia*, 41, 310.
- Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais (IPEF). Disponível em: <http://www.ipef.br/identificacao/cedrella.fissilis.asp> Acesso em 30 de maio de 2016.
- Lorenzi, H. 1992. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa: Editora Plantarum 352p.-col. illus. Por Geog, 4.
- Mendes, M. A. S., & Urban, A. F. Fungos relatados em plantas no Brasil, Laboratório de Quarentena Vegetal. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Disponível em: <http://pragawall.cenargen.embrapa.br/aiqweb/michtml/fgbanco01.asp>. Acesso em 10 de dezembro 2016.

- Mycobank. Disponível em: <<http://www.mycobank.org/BioloMICS.aspx?Table=Myco bank&Rec=151061&Fields=All>> Acesso em 11 de janeiro de 2017.
- Rajeshkumar, K. C., Crous, P. W., Groenewald, J. Z., & Seifert, K. A. 2016. Resolving the phylogenetic placement of *Porobeltraniella* and allied genera in the Beltraniaceae. *Mycological Progress*, 15, 1119-1136.
- Rede Mata Atlântica de Sementes Florestais (Rioesba). Disponível em: <<http://www.if.ufrj.br/rioesba/notas/cedrela%20fissilis%20vellozo.pdf>>. Acesso em 10 de janeiro de 2017.
- Shirouzu, T., Hirose, D., Tokumasu, S., To-Anun, C., & Maekawa, N. 2010. Host affinity and phylogenetic position of a new anamorphic fungus *Beltraniella botryospora* from living and fallen leaves of evergreen oaks. *Fungal Diversity*, 43, 85-92.
- Viana, F. M. P., Sousa, J. A., Araújo J. D. M, Freire F. C. O., Pieniz V., & Corrêa D. 2012. Ocorrência e Controle da Mancha-de-Phyllachora em Cedro no Estado do Ceará. Comunicado Técnico 186. Embrapa.
- Zacaroni, A. B., Pozza, E. A., Mansur, T. D. O. F., & Sussel, A. A. B. 2013. Occurrence of *Phyllachora balansae* in *Toona ciliata* in Southern Minas Gerais State, Brazil. *Summa Phytopathologica*, 39, 219-220.

CAPÍTULO 1

(De acordo com as normas da revista *Mycologia*)

Aspectos taxonômicos e Posicionamento Filogenético de *Pseudobeltrania cedrelae*

Aspectos taxonômicos e Posicionamento Filogenético de *Pseudobeltrania cedrelae*

Cristiane A. Milagres

Daiana M. Q. Azevedo

Olinto L. Pereira

Gleiber Q. Furtado¹

¹Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil, 36570-900.

Resumo: O fungo *Pseudobeltrania cedrelae* é o agente causal de uma importante mancha foliar em mudas e plantas adultas de cedro (*Cedrela fissilis*). Algumas informações sobre características do gênero *Pseudobeltrania* são contraditórias, o que dificulta o reconhecimento das espécies. Considerando a deterioração e a idade da coleção original, bem como a interpretação errônea do táxon representativo do gênero, um epítipo será proposto para *P. cedrelae*. Coletas foram realizadas no município de Viçosa, MG, Brasil e obtidos 10 isolados de *P. cedrelae* associados a lesões em folíolos de cedro. O epítipo será designado e caracterizado morfológica e molecularmente. Para a caracterização morfológica, 30 medições de conídios, conidióforos, células conidiogênicas, loci conidiogênicos e células basais foram realizadas tanto do fungo obtido em lesões foliares quanto em microcultura. A taxa de crescimento micelial e a esporulação foram avaliadas em seis diferentes meios de cultura. Para a filogenia molecular, análises de máxima parcimônia foram realizadas a partir das sequências de fragmentos das regiões ITS e 28S dos isolados. As características morfológicas das estruturas fúngicas obtidas de folhas sintomáticas e da técnica de microcultura apresentaram variações. Em microcultura, observaram-se conidióforos com maior

comprimento, conídios em cadeia, formação de conidióforo a partir de conídio e a formação de apressório. Nas lesões, os isolados apresentaram as mesmas características morfológicas do material tipo. Em relação à taxa de crescimento micelial e esporulação de *P. cedrelae*, observou-se que o meio extrato de malte-ágar e suco V8-ágar foram os mais apropriados para cultivar o fungo. O sintoma de *P. cedrelae* foi confirmada 6 dias após a inoculação (dai) e com 10 dai foi observada a esporulação do patógeno. De acordo com a árvore filogenética, os isolados se agruparam em um mesmo clado, porém em um clado distinto de *Pseudobeltrania ocoteae*, o que sugere que tal espécime não pertence a *Pseudobeltrania*, mas sim ao gênero *Hemibeltrania*. Com este estudo, novas informações sobre *P. cedrelae* foram obtidas contribuindo para esclarecer a filogenia da família *Beltraniaceae*.

Palavras-chave: *Beltraniaceae*, cedro, filogenia, hifomicetes, mancha de pseudobeltrania.

INTRODUÇÃO

O gênero *Pseudobeltrania*, identificado pela primeira vez associado a lesões foliares em plantas de cedro (*Cedrela fissilis*) no Brasil (São Paulo, SP), foi proposto com base na espécie-tipo *Pseudobeltrania cedrelae* por P. Hennings (1902) (Gusmão & Grandi, 1996). Esse gênero, pertencente ao filo *Ascomycota* e à família *Beltraniaceae*, é caracterizado pela presença de conidióforos com células basais lobadas, conídios com uma banda hialina transversal e pela ausência de setas e de células de separação (Zucconi, 1991; Rajeshkumar et al., 2016).

Alguns gêneros pertencentes à família *Beltraniaceae*, *Beltrania*, *Beltraniella*, *Beltraniopsis*, *Pseudobeltrania*, *Hemibeltrania* e *Rhombostilbella*, foram revisados taxonomicamente e a família considerada um grupo natural (Pirozynski, 1963). Em 1980, Kendrick estudando conceitos genéricos de hifomicetos propôs que os gêneros

pertencentes à família Beltraniaceae deveriam possuir, pelo menos, três destas cinco características em comum: setas escuras, setas ou conidióforos com células basais lobadas, células de separação, conídios bicônicos e conídios com uma banda hialina mediana. Deste modo, os gêneros *Hemibeltrania* e *Rhombostilbella* foram excluídos da família por possuírem apenas uma dessas características (Gusmão & Grandi 1996; Rajeshkumar et al., 2016).

Já os gêneros *Parapleurotheciopsis* e *Subramaniomyces* foram considerados membros da família por Maharachchikumbura et al. (2016). Entretanto, Rajeshkumar et al., (2016), ao realizarem uma análise filogenética (máxima parcimônia) com base na região 28S, observaram que *Parapleurotheciopsis* não se agrupou com os demais membros da família Beltraniaceae. Segundo os autores, o posicionamento deste gênero é incerto, podendo variar com as sequências e o método filogenético adotado.

Atualmente, levando em consideração análises moleculares, a família Beltraniaceae é composta por sete gêneros, sendo os cinco mencionados anteriormente com a inclusão de *Hemibeltrania* e *Porobeltraniella*. Os gêneros *Rhombostilbella* e *Beltraniomyces*, como até o momento não existem dados moleculares, ainda necessitam de novos esclarecimentos para serem incluídos na família (Rajeshkumar et al., 2016).

Há poucos estudos envolvendo análises moleculares de Beltraniaceae, mas recentemente um estudo realizado por Rajeshkumar et al. (2016) forneceu o posicionamento filogenético de alguns gêneros. No entanto, *Pseudobeltrania*, que de acordo com o Mycobank (2017) possui 11 espécies válidas (*P. angamosensis*, *P. cedrelae*, *P. chumrungensis*, *P. cristaspora*, *P. guerensis*, *P. havanensis*, *P. macrospora*, *P. ocoteae*, *P. penzigii*, *P. selenoides* e *P. summa*), foi representado apenas pela espécie *P. ocoteae*, pois é a única que possui sequência de DNA disponível no GenBank.

O fungo *P. cedrelae* foi relatado apenas no Brasil, em folhas de *C. fissilis* vivas e em decomposição e também em folhas de *C. odorata* (Hennings, 1902; Gusmão & Grandi, 1996; Batista et al., 1964; Hanada et al., 2005). Os sintomas da doença descritos em *C. odorata* são manchas marrons claras, circulares a angulares, circundadas por halo clorótico, podendo coalescer originando extensas áreas necrosadas, acarretando intensa desfolha (Hanada et al., 2005).

Pseudobeltrania cedrelae foi relatada no Brasil há mais de 100 anos e, atualmente, o material tipo está depositado no Herbário Maria Eneyda Pacheco Kauffmann Fidalgo, Instituto de Botânica de São Paulo, Brasil (SP 32718) e possui uma duplicata no Herbário Berolinense, B, Berlim, Alemanha (B 14155). Entretanto, torna-se importante a epitipificação de *P. cedrelae* devido ao fato de não haver depósito de espécimes em uma coleção de culturas (ex-tipo) e de sequências do genoma do fungo disponíveis no Genbank. Além disso, ao analisar o material tipo depositado no Brasil (SP 32718), observou-se que os folíolos estavam em um avançado estado de deterioração e com ausência de estruturas fúngicas.

A epitipificação pode ser recomendada em casos onde se tem uma interpretação errônea do táxon representativo do gênero e não existe uma maneira de adquirir a sequência do genoma da espécie tipo. Porém, é salientado que o epitipo deve ser morfologicamente idêntico ao tipo (Hyde & Zhang, 2008; Ariyawansa et al., 2014). Ariyawansa et al. (2014) propuseram algumas diretrizes para melhor designar um epitipo. Dentre elas, realizar a coleta no mesmo hospedeiro, quando possível no mesmo local de obtenção do tipo, observar todas as características do tipo e, em casos de fungos patogênicos, o epitipo deve causar os mesmos sintomas no hospedeiro relatado e depositá-lo em uma coleção pública no país de origem.

Com base nisso, os objetivos deste estudo foram epitipificar, caracterizar e gerar informação sobre o posicionamento filogenético de *P. cedrelae*.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção, isolamento e preservação dos isolados.— Os isolados foram obtidos de folhas de cedro, coletadas no município de Viçosa-MG no viveiro SIF/UFV (20.774°S, 42.876°W), Comunidade do Sapé (20.767°S, 42.835°W) e Rua nova-Rodovia MG-280 (20.779°S, 42.964°W). Para obtenção dos isolados, conídios foram transferidos, em condições assépticas, para placas de Petri contendo meio de cultura batata-dextrose-ágar. Folhas sintomáticas (FIG 1 A, B) foram colhidas e secas em prensa botânica. As culturas monospóricas foram obtidas em meio extrato de malte-ágar e preservadas em água destilada esterilizada, em glicerol (15%) e em sílica-gel (Zauza et al., 2007). O isolado representativo foi depositado no Herbário da Universidade Federal de Viçosa (VIC) e na Coleção Octávio de Almeida Drumond (COAD) da mesma instituição.

Caracterização morfológica.— As lâminas foram preparadas com estruturas fúngicas obtidas em lesões em folíolos de cedro e em microcultura. Para a obtenção da microcultura, um pequeno fragmento de meio de cultura de MEA foi colocado sobre uma lâmina de vidro esterilizada e suspensa em um bastão de vidro, no interior de uma placa de Petri contendo papel filtro umedecido. Um fragmento do micélio do isolado foi transferido para a borda do meio de cultura e coberto com uma lamínula. As placas contendo as lâminas de microcultura foram incubadas a 25 C e fotoperíodo de 12 h. Após 10 dias, a lamínula foi removida e colocada sobre uma lâmina de vidro contendo uma gota de ácido láctico. Foram dimensionadas as estruturas fúngicas (conídios, conidióforos, células conidiogênicas e loci conidiogênicos) com 30 medições de cada estrutura, em microscópio de luz (OLYMPUS BX 53) equipado com uma câmera digital (OLYMPUS Q-COLOR5).

Taxa de crescimento micelial e esporulação de *P. cedrelae*.– Um disco de micélio de aproximadamente 1 cm de diâmetro foi transferido para seis diferentes meios de cultura: suco V8-ágar, extrato de malte-ágar, aveia-ágar, batata-dextrose-ágar, cenoura-ágar e “corn meal agar” (Zauza et al., 2007), e mantidos em câmara de crescimento sob temperatura de 25 C e fotoperíodo de 12 h.

As avaliações foram realizadas diariamente por meio da medição do diâmetro das colônias em duas posições perpendiculares até que o micélio de *P. cedrelae*, de pelo menos uma das placas, atingisse a borda. Posteriormente, foi calculada a taxa de crescimento micelial diário do fungo segundo a fórmula descrita por Oliveira (1991). A esporulação foi avaliada por meio da contagem de conídios em câmara de Neubauer, após 15 dias do cultivo do isolado, com a lavagem das placas com 10 mL de água destilada. Para determinar a produção de conídios em cada meio, o número de conídios obtidos foi dividido pela área da colônia em cada meio.

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, com 4 repetições, sendo que cada repetição consistiu de uma placa de Petri ($\varnothing= 90$ mm). Para comparação das médias foi utilizado teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software R Studio[®] v3.1.1. Caracterização molecular.– Para a extração de DNA, culturas monospóricas foram cultivadas em meio BDA, sobre o papel celofane umedecido e esterilizado, a 25 C por 7 dias. O micélio foi raspado com auxílio de um palito de madeira esterilizado e depositado em um tubo de microcentrífuga (1,5 mL). A extração foi realizada por meio da ruptura mecânica de células utilizando-se microesferas. O DNA total foi extraído utilizando o Kit Wizard[®] Genomic DNA Purification (Promega Corporation, WI, EUA), seguindo o protocolo descrito por Pinho et al. (2013).

Para cada reação de PCR, foram utilizados os seguintes reagentes: 12,5 µL de Dream Taq™ PCR Master Mix 2X (MBI Fermentas, Vilnius, Lithuania), 1 µL de cada primer (forward e reverse) sintetizados pela Invitrogen (Carlsbad, U.S.A), 1 µL de dimetil sulfoxido (DMSO, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A.), 5 µL de 100× (10 mg/mL) Bovine Serum Albumin (BSA, Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, U.S.A.), 2 µL do DNA genômico (25 ng/µL) e 2,5 µL de água livre de nuclease para completar o volume total (25 µL).

As regiões nuc rDNA ITS1–5.8S–ITS2 (ITS) e nuc 28S rDNA (28S) dos isolados foram amplificadas e sequenciadas utilizando os primers ITS-1 e ITS-4 (White et al., 1990) e LROR e LR5 (Vilgalys & Hester, 1990), respectivamente. A reação de PCR foi realizada no termociclador C1000™ Thermal Cycler (BIO-RAD) com o seguinte programa: desnaturação inicial a 95 C durante 5 min, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 94 C durante 1 min, anelamento a 52 C (ITS) durante 1min ou 53 C por 45s (28S), e uma extensão a 72 C por 1 minuto. A extensão final consistiu de um ciclo a 72 C por 5 minutos. Os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em géis com 2% de agarose, corados com GelRed™ (Biotium Inc., Hayward, CA, EUA) em tampão TAE (1×), e visualizados sob luz UV para verificar o tamanho e qualidade das amplificações. Os produtos de PCR foram purificados e sequenciados pela Macrogen Inc., Coréia do Sul (<http://www.macrogen.com>).

Para as análises filogenéticas, as sequências de nucleotídeos foram montadas em contigs e editadas utilizando o software DNADragon (<http://www.dna-dragon.com>). Todas as sequências foram verificadas manualmente e os nucleotídeos com posições ambíguas foram corrigidas analisando as sequências de ambos os primers.

As sequências de isolados de Beltraniaceae para utilização nas análises filogenéticas foram obtidas em Rajeshkumar et al. (2016) e através do Megablast do

NCBI GenBank nucleotide (Tabela I). Estas foram obtidas em formato FASTA e alinhadas com as sequências dos isolados deste estudo usando o programa de alinhamento de sequências múltiplas Muscle[®] (Edgar, 2004), implementado no software MEGA 6 (Tamura et al., 2013). Os alinhamentos foram verificados manualmente e os reajustes foram feitos quando necessário.

Análises de máxima parcimônia (MP) foram realizadas para cada gene/loco (ITS e 28S) utilizando o MEGA 6 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis). As árvores de MP foram inferidas com base no método TBR (Tree Bisection Renonnection). A robustez das árvores mais parcimoniosas foi avaliada por 1.000 repetições de bootstrap resultantes da análise de MP, cada uma com 10 repetições de adição de taxa aleatória (Felsenstein 1985). As estatísticas foram calculadas para o comprimento da árvore (TL), o índice de consistência (IC), o índice de retenção (RI) e o índice de consistência ajustado (RC). As árvores foram visualizadas no software FigTree (Rambaut, 2009) e editadas no programa gráfico CorelDRAW X7 (64-Bit). A árvore foi enraizada com *Subramaniomyces fusisaprophyticus* (CBS418.95).

Testes de patogenicidade.– Para o preparo da suspensão de conídios, placas de Petri contendo o fungo *P. cedrelae* cultivado por 15 dias foram lavadas com água destilada esterilizada (ADE) e a suspensão foi transferida para um béquer contendo Tween 80 (0,05% v/v). Após agitação por 1 minuto, a suspensão foi filtrada em dupla camada de gaze e a concentração ajustada para 4×10^5 conídios/mL, com auxílio de uma câmara de Neubauer. A inoculação foi realizada pela atomização da suspensão de conídios em cinco plantas de cedro e duas plantas controle foram atomizadas apenas com ADE. Após a inoculação, as plantas foram acondicionadas em câmara úmida e no escuro por 48h. Posteriormente, o fotoperíodo foi ajustado para 12h e as plantas permaneceram em câmara úmida até o surgimento dos sintomas. As avaliações foram realizadas

diariamente até o aparecimento dos sintomas e sinais. O patógeno foi reisolado a partir das lesões esporulantes e as culturas obtidas foram comparadas com as originais.

RESULTADOS

Isolamento de *P. cedrelae*.– Foram obtidos dez isolados de *P. cedrelae* (TABELA I) na face abaxial de folíolos de cedro. As colônias em BDA apresentaram coloração marrom clara com micélio predominantemente imerso no meio.

Caracterização morfológica.– O isolado que será designado como epítipo apresentou características morfológicas semelhantes às descritas por Hennings (1902), Hanada et al. (2005) e Gusmão & Grandi (1996). Setas ausentes com conidióforos eretos ramificados, células basais lobadas, conídios bicônicos com uma banda hialina transversal e ausência de células de separação indicaram que o isolado em questão pertence ao gênero *Pseudobeltrania*.

Pseudobeltrania cedrelae P. Hennings, Hedwigia 41:310, 1902 (FIG. 1).

Lesões circulares, de coloração marrom, distribuídas ao longo do limbo foliar apresentando diâmetro entre 7 e 14 mm. Micélio interno ramificado, septado, marrom escuro. Micélio externo ausente. Conidióforos eretos, com 1 a 2 septos, ramificados, $35\text{--}48 \times 3\text{--}5 \mu\text{m}$, marrons claros e originados de células basais lobadas (FIG. 1C). Células conidiogênicas terminais, holoblásticas, mono ou poliblásticas, proliferação simpodial, marrons claras, cilíndricas, $19\text{--}28 \times 3\text{--}7 \mu\text{m}$. Loci conidiogênicos conspícuos, denticulados, possuindo 1-9 por célula, $1,0\text{--}2,5 \times 0,8\text{--}2,5 \mu\text{m}$ (FIG. 1D). Células de separação ausentes. Conídios bicônicos, holoblásticos, $19\text{--}29 \times 8\text{--}11 \mu\text{m}$, lisos, isolados, marrons claros, com uma banda hialina na região mediana, cicatriz conidial espessa com diâmetro variando de $0,83\text{--}2,08 \mu\text{m}$ (FIG. 1E, F).

Material examinado: Brasil, Minas Gerais, Viçosa, sobre folhas de *Cedrela fissilis* (VIC 44134, a ser proposto como epitipo), 15 de abril de 2015, COAD2098, a ser proposto como ex-epitipo. Coletores: Furtado GQ e Milagres CA.

Brasil, São Paulo, São Paulo, Jardim Publico, folhas de *Cedrela fissilis*, Abril, 1901, P. Hennings. N. SP32718 e B14155 (holótipo).

Em meio de cultura extrato de malte-ágar, a colônia atingiu 84 mm de diâmetro em nove dias. O micélio apresentou aspecto cotonoso com coloração esbranquiçada que se tornou acinzentada a partir de 15 dias de cultivo, quando foi observada esporulação abundante (FIG. 2G). Em microcultura foi possível observar hifas ramificadas (FIG. 2A) e algumas diferenças em relação às que foram obtidas em lesões foliares. Células basais lobadas não foram observadas. Conidióforos eretos, com 6 a 13 septos, ramificados, $95,5\text{--}229,5 \times 3,0\text{--}5,0 \mu\text{m}$, marrons claros (FIG 2B). Células conidiogênicas terminais, holoblásticas, proliferação simpodial, marrons claras, cilíndricas, $9,64\text{--}32,28 \times 2,96\text{--}4,87 \mu\text{m}$ (FIG 2C). Loci conidiogênicos denticulados, $1,0\text{--}3,5 \times 0,7\text{--}2,0 \mu\text{m}$. Células de separação ausentes. Conídios bicônicos, holoblásticos, $15,5\text{--}26,0 \times 6,5\text{--}10,0 \mu\text{m}$, lisos, marrons claros, com uma banda hialina na região mediana, cicatriz conidial espessa com diâmetro variando de $0,8\text{--}1,9 \mu\text{m}$, isolados ou em cadeia (FIG. 2D). Também foi observada a formação de conidióforo a partir do conídio e a formação de apressório (FIG. 2E, F).

Taxa de crescimento micelial e esporulação de *P. cedrelae*.— A avaliação do crescimento micelial foi realizada até o nono dia de cultivo e a mensuração da esporulação no 15^o dia. Para o crescimento micelial, os meios que proporcionaram maiores taxas de crescimento foram extrato de malte-ágar ($8,54 \text{ mm dia}^{-1}$) e suco V8-

ágar (7.04 mm dia^{-1}). Todos os meios testados permitiram a esporulação, exceto cenoura-ágar (TABELA II).

Análise filogenética.— A análise filogenética utilizando a região ITS consistiu de 57 taxas, incluindo o outgroup (FIG. 3). O alinhamento foi composto por 601 caracteres, sendo que 75 caracteres foram parcimônia informativos, 119 caracteres foram variáveis, 44 caracteres foram não informativos e 477 caracteres foram constantes. Foi obtida uma árvore mais parcimoniosa que é mostrada na Fig. 3 (TL= 169, CI= 0.568, RI= 0.859 e RCI = 0.489). A espécie *Pseudobeltrania ocoteae*, descrita por Crous & Wingfield (2015), se agrupou com o gênero *Hemibeltrania* em um clado com suporte estatístico de 77% no qual também está presente o gênero *Porobeltraniella*. Os dez isolados obtidos neste estudo formaram um grupo separado dentro do clado de *Beltrania* com um nó bem suportado (99%).

A região 28S consistiu de 35 taxas, incluindo o outgroup (FIG. 4). O alinhamento foi composto por 553 caracteres, sendo que 31 caracteres foram parcimônia informativos, 23 foram variáveis não informativos e 492 caracteres foram constantes. Foram obtidas duas árvores mais parcimoniosas, uma das quais é mostrada na Fig. 4 (TL=78, CI =0,667, RI= 0,894 e RCI = 0,596). Com base nessa região, os isolados ficaram em um clado separado e bem suportado, mostrando tratar de um novo gênero. A espécie *P. ocoteae* também se posicionou em um clado separado dos isolados de *P. cedrelae*.

Testes de patogenicidade.— O fungo *P. cedrelae* foi patogênico quando inoculado em plantas de cedro sadias. Os primeiros sintomas foram observados aos 6 dias após a inoculação (dai) com a observação de área clorótica, manchas marrons difundidas pelo limbo foliar (FIG. 2H) e queda prematura das folhas. Esporulação abundante ocorreu

aos 10 dias e os controles permaneceram assintomáticos. O fungo foi reisolado e as características da cultura pura e dos conídios foram idênticas às da original.

DISCUSSÃO

A caracterização morfológica, a análise filogenética e o teste de patogenicidade confirmam a identidade de *P. cedrelae*. De acordo com as árvores filogenéticas obtidas, os isolados de *P. cedrelae* não se posicionaram no mesmo clado de *P. ocoteae*, descrita por Crous & Wingfield (2015). As características descritas para *P. ocoteae* são conidióforo não ramificado, com célula basal lobada, ausência de setas e células de separação e conídios bicônicos a piriformes com uma banda hialina transversal indistinta in vivo e ausente quando estudado in vitro (Crous & Wingfield, 2015). No caso do isolado em estudo, a banda foi observada tanto in vivo quanto in vitro. Essa é uma das características importantes para separar o gênero *Pseudobeltrania* dos demais gêneros da família, sendo a forma e a cor dos conídios mais utilizados para diferenciação de espécies (Zucconi, 1991).

Além disso, as características relatadas por Crous & Wingfield (2015) também podem ser observadas no gênero *Hemibeltrania*. A espécie *Hemibeltrania urbanodendrii*, por exemplo, é descrita com conidióforo não ramificado proveniente de células basais com conídio isolado oval, obovoide, bicônico a limoniforme e ausência de setas e células de separação (Fernandes et al., 2007). Portanto, com base nas características morfológicas e nas análises filogenéticas deste estudo, a espécie *P. ocoteae* possivelmente pertence ao gênero *Hemibeltrania*.

Além de *P. ocoteae*, a identidade das espécies *P. chumrungensis* B. Sutton (1970), *P. selenoides* Hoog (1977) e *P. cristaspora* (Matsush.) de Hoog (1977), devem ser revistas por apresentarem características que divergem do gênero *Pseudobeltrania*. Segundo Heredia et al. (2002), essas espécies não possuem conídios com banda hialina

transversal e os conídios e células conidiogênicas de *P. selenoides* são selenoides com extremidades agudas. Ainda de acordo com esses autores, as características morfológicas de *P. chumrungensis* e *P. cristaspora* se assemelham mais ao gênero *Hemibeltrania*, e apenas não alteraram o nome das duas espécies devido ao fato dos materiais não estarem disponíveis para reexame. Neste estudo também foi proposta uma chave de identificação de *Pseudobeltrania* spp., onde consideram que *P. cedrelae* apresenta conidióforo simples. Porém, de acordo com as características aqui observadas, *P. cedrelae* possui conidióforos ramificados.

As diferentes dimensões de conidióforos encontradas nas lesões foliares e em microcultura possivelmente ocorreram devido à diferença na composição de nutrientes encontrados nesses substratos. A plasticidade fenotípica observada em alguns fungos ocorre em resposta aos sinais ambientais. O fungo *Aureobasidium pullulans*, por exemplo, forma diferentes tipos de colônias dependendo da temperatura e do substrato em que é cultivado. Outro exemplo é *Arthrobotrys oligospora* que produz diferentes estruturas para infectar e parasitar nematoides ou fungos em resposta a sinais ambientais (Slepecky, 2009).

Em relação ao meio de cultura, os maiores valores de taxas de crescimento micelial de *P. cedrelae* ocorreram em meio extrato de malte-ágar e suco V8-ágar. Bogo et al. (2008) também relataram maior desenvolvimento das colônias nesses dois meios de cultura para *Cryptosporiopsis perennans*. A composição e a concentração de nutrientes no substrato, o requerimento nutricional e a variabilidade fisiológica do isolado, além das condições ambientais, podem influenciar o crescimento de fungos fitopatogênicos (Cruz et al., 2009).

As análises filogenéticas das regiões 28S e ITS apresentaram algumas divergências. Com base na região 28S, que é mais conservada, os isolados deste estudo

se agruparam em um mesmo clado bem suportado e diferente dos demais gêneros em um grupo irmão de *Beltrania* (FIG.4). Ao compararmos sequências da região ITS, os isolados não ficaram em um clado separado, mas formaram um grupo com um nó bem suportado dentro do clado de *Beltrania* (FIG.3).

As espécies *Beltrania rhombica* e *Beltrania querna* ficaram interligadas. Isso também foi observado por Rajeshkumar et al. (2016), os quais propuseram que estudos usando sequências obtidas de material tipo devem ser realizados para determinar se representam um complexo com numerosas espécies crípticas ou apenas uma espécie com variação significativa da sequência. Em relação ao gênero *Beltraniella*, as espécies de *B. portoricensis* também devem ser sequenciadas para melhor designar a espécie, uma vez que essa ocorreu em diferentes posições na árvore filogenética, o que também foi observado e proposto por Rajeshkumar et al. (2016).

Os sintomas observados em mudas de cedro inoculadas com *P. cedrelae* que consistiram em uma única e extensa lesão marrom ao longo do limbo foliar não é observada em folhas doentes decorrentes de infecção natural do patógeno que apresentam maior número de lesões circulares distribuídas ao longo da folha (FIG. 1A). Além disso, em todas as folhas sintomáticas coletadas para obtenção dos isolados, foi observada a presença de pontuações negras no centro das lesões. De acordo com a literatura, estas pontuações correspondem a outro patógeno foliar de cedro, denominado *Phyllachora balansae*, que são formadas em ascomas puntiformes que se distribuem circularmente nos folíolos (Ferreira et al., 1989). Hanada et al. (2005), ao descreverem os sintomas da lesão foliar causada por *P. cedrelae* em *C. odorata*, também mencionaram a presença de pontuações negras nas lesões. De acordo com estas observações, novos estudos são necessários para elucidar o papel de *P. balansae* no desenvolvimento da mancha de pseudobeltrania em folhas de cedro.

No estudo realizado por Hanada et al. (2005), plantas de *C. odorata* inoculadas com *P. cedrelae* apresentaram maior período de incubação e período latente em relação ao encontrado neste trabalho, com uma diferença de dois e seis dias, respectivamente. Essa diferença no período latente, em relação ao observado neste estudo, pode ter ocorrido por se tratarem de espécies hospedeiras distintas e devido às diferentes condições de incubação que as plantas inoculadas foram submetidas.

De acordo com este estudo, as características morfológicas do gênero *Pseudobeltrania* ainda são confusas e há necessidade de novos depósitos de seqüências de DNA para gerar árvores filogenéticas mais robustas para este grupo de fungos.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem pelo apoio financeiro à Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

LITERATURA CITADA

- Ariyawansa HA, Hawksworth D L, Hyde KD, Jones EG, Maharachchikumbura SS, Manamgoda DS, Thambugala KM, Udayanga D, Camporesi E, Daranagama A, Jayawardena R, Liu JK, McKenzie EHC, Phookamsak R, Senanayake IC, Shivas RG, Tian Q & Xu JC. 2014. Epitypification and neotypification: guidelines with appropriate and inappropriate examples. *Fungal Diversity* 69:57–91.
- Batista AC, Matta EAF & Bezerra JL. 1964. Hyphomycetes comuns e algumas novas espécies. In: Anais do XIII Congresso Nacional da Sociedade Botânica do Brasil pp. 389–403.

- Bogo A, Maffioletti MA, Valdebenito-Sanhueza RM & Casa RT. 2008. Caracterização morfológica de isolados de *Cryptosporiopsis perennans* em diferentes meios de cultura. *Tropical Plant Pathology* 33:248–251.
- Cooper JA. 2005. New Zealand hyphomycete fungi: additional records, new species, and notes on interesting collections. *New Zealand Journal of Botany* 43:323–349.
- Crous PW, Braun U, Schubert K & Groenewald JZ. 2007. Delimiting *Cladosporium* from morphologically similar genera. *Studies Mycology* 58:33–56.
- , Shivas RG, Quaedvlieg W, Van der Bank M, Zhang Y, Summerell BA, Guarro J, Wingfield MJ, Wood AR, Alfenas AC & Braun U. 2014. Fungal Planet description sheets: 214–280. *Persoonia* 32:184–306.
- , Wingfield MJ, Le Roux JJ, Richardson DM, Strasberg D, Shivas RG, Alvarado P, Edwards J, Moreno G, Sharma R, Sonawane MS, Tan YP, Altés A, Barasubiye T, Barnes CW, Blanchette RA, Boertmann D, Bogo A, Carlavilla JR, Cheewangkoon R, Daniel R, de Beer ZW, de Jesús Yá-ez-Morales M, Duong TA, Fernández-Vicente J, Geering ADW, Guest DI, Held BW, Heykoop M, Hubka V, Ismail AM, Kajale SC, Khemmuk W, Kolarik M, Kurli R, Lebeuf R, Lévesque CA, Lombard L, Magista D, Manjón JL, Marincowitz S, Mohedano JM, Nováková A, Oberlies NH, Otto EC, Paguigan ND, Pascoe IG, Pérez-Butrón JL, Perrone G, Rahi P, Raja HA, Rintoul T, Sanhueza RMV, Scarlett K, Shouche YS, Shuttleworth LA, Taylor PWJ, Thorn RG, Vawdrey LL, Vidal RS, Voitk A, Wong PTW, Wood AR, Zamora JC & Groenewald JZ. 2015. Fungal Planet description sheets: 371–399. *Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi* 35:264.

- Cruz MFA, Prestes AM & Maciel JLN. 2009. Esporulação de *Pyricularia grisea* em diferentes meios de cultura e regimes de luz. *Ciência Rural*, 39:1562–1564.
- Edgar RC. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res* 32:1792–1797.
- Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783–791.
- Fernandes RDC, Lustosa DC, Barreto RW & Bezerra JL. 2007. *Hemibeltrania urbanodendrii* sp. nov. and *Pseudobeltrania angamosensis*: new fungal records from the brazilian tropical seasonal semi-deciduous montane forest. *Brazilian Journal of Microbiology* 38:756-758.
- Ferreira FA. 1989. *Patologia Florestal, principais doenças florestais no Brasil*. Viçosa, Sociedade de Investigações Florestais, 570p.
- García-Laviña CX, Bettucci L & Tiscornia S. 2016. Fungal communities associated with *Eugenia uruguayensis* (Myrtaceae) leaf litter in early stages of decomposition in Uruguay. *Sydowia* 68:139–150.
- GenBank. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/?term=pseudobeltrania>>. Acesso em 25 de junho de 2016.
- Gusmão LFP & Grandi RAP. 1996. Espécies do grupo *Beltrania* (Hyphomycetes) associadas a folhas de *Cedrela fissilis* Veil. (Meliaceae), em Maringá, PR, Brasil. *Hoehnea* 23:91–102.
- Hanada RE, Gasparotto L & Ferreira FA. 2005. Primeiro relato de mancha foliar em *Cedrela odorata* causada por *Pseudobeltrania cedrelae*. *Fitopatologia Brasileira* 30:299-301.
- Hennings PC. 1902. Fungi S. Paulenses II. A cl. Puttemans collecti. In: *Hedwigia* 41: 310.

- Heredia G, Arias RM, Reyes M & Castañeda-Ruíz RF. 2002. New anamorph fungi with rhombic conidia from Mexican tropical forest litter. *Fungal Diversity* 11:99–107.
- Hyde KD & Zhang Y. 2008. Epitypification: should we epitypify? *Journal of Zhejiang University Science B* 9:842–846.
- Kendrick B. 1980. The generic concept in Hyphomycetes, a reappraisal. *Mycotaxon* 11:339–364.
- Maharachchikumbura SS, Hyde KD, Jones EG, McKenzie EHC, Bhat JD, Dayarathne MC, Huang SK, Norphanphoun C, Senanayake IC, Perera RH, Shang QJ, Xiao Y, D’Souza MJ, Hongsanan S, Jayawardena RS, Daranagama DA, Konta S, Goonasekara ID, Zhuang WY, Jeewon R, Phillips AJL, Abdel-Wahab MA, Al-Sadi AM, Bahkali AH, Boonmee S, Boonyuen N, Cheewangkoon R, Dissanayake AJ, Kang J, Li QR, Liu JK, Liu XZ, Liu ZY, Luangsa-ard JJ, Pang KL, Phookamsak R, Promputtha I, Suetrong S, Stadler M, Wen T & Wijayawardene NN. 2016. Families of Sordariomycetes. *Fungal Diversity* 79:1–317.
- Mycobank. Disponível em: <<http://www.mycobank.org/BioloMICS.aspx?Table=Myco bank&Rec=151061&Fields=All>> Acesso em 11 de janeiro de 2017.
- Oliveira JA. 1991. Efeito do tratamento fungicida em sementes no controle de tombamento de plântulas de pepino (*Cucumis sativus* L.) e pimentão (*Capsicum annuum* L.). Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) – Escola Superior de Agricultura de Lavras, Lavras, 111p.
- Pereira JS, Costa RR, Nagamoto NS, Forti LC, Pagnocca FC & Rodrigues A. 2016. Comparative analysis of fungal communities in colonies of two leaf-cutting ant species with different substratum preferences. *Fungal Ecology* 21:68–75.

- Pinho DB, Firmino AL, Ferreira-Junior WG & Pereira OL. 2013. An efficient protocol for DNA extraction from Meliolales and the description of *Meliola centellae* sp. nov. *Mycotaxon* 122:333–345.
- Rajeshkumar KC, Crous PW, Groenewald JZ & Seifert KA. 2016. Resolving the phylogenetic placement of *Porobeltraniella* and allied genera in the Beltraniaceae. *Mycological Progress* 15:1119–1136.
- Rambaut A. 2009. FigTree 1.2.2. Disponível em: <<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>>. Acesso em junho de 2016.
- Shirouzu T, Hirose D, Tokumasu S, To-Anun C & Maekawa N. 2010. Host affinity and phylogenetic position of a new anamorphic fungus *Beltraniella botryospora* from living and fallen leaves of evergreen oaks. *Fungal Diversity* 43:85–92.
- Slepecky RA & Starmer WT. 2009. Plasticidade fenotípica em fungos: uma revisão com observações sobre *Aureobasidium pullulans*. *Mycologia* 101:823-832.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A & Kumar S. 2013. MEGA 6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30:2725-2729.
- Thomas DC, Vandegrift R, Ludden A, Carroll GC & Roy BA. 2016. Spatial ecology of the fungal genus *Xylaria* in a tropical cloud forest. *Biotropica* 48:381–393.
- Vilgalys R & Hester M. 1990. Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. *Journal of Bacteriology* 172:4238– 4246.
- White TJ, Bruns T, Lee S & Taylor JW. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* 18:315-322.

Zauza EAV, Alfenas AC & Mafia RG. 2007. Esterilização, preparo de meios de cultura e fatores associados ao cultivo de fitopatógenos. In: AlfenasAC, Mafia RG, editores. Métodos em fitopatologia. Viçosa: UFV, 23-51.

Zucconi L. 1991. *Pseudobeltrania guerensis* sp. nov. from Ivory Coast forest litter. Mycological research 95:1017–1018.

Tabela I. Sequências dos isolados de fungos da família Beltraniaceae utilizados na análise filogenética, incluindo os isolados de *Pseudobeltrania cedrelae*

Espécies	Isolados	Número de acesso do		Hospedeiro	Localização	Coletor/Referência
		Genbank ITS	28 S			
<i>Beltraniella portoricensis</i>	CX1	KU212349	–	<i>Eugenia uruguayensis</i> (Myrtaceae)	Canelones, Uruguay	Garcia-Lavina,C.X., et al.,2016
<i>Beltraniella portoricensis</i>	BCRC 34590	GU905993	–	Unknown	Taiwan	Chen 2010 unpubl.
<i>Beltraniella portoricensis</i>	NFCCI 3993	KX519516	KX519522	<i>Mangifera indica</i> fallen leaves	Kerala, India	Rajeshkumar,K.C., et al., 2016
<i>Beltraniella portoricensis</i>	NBRC 9079	907901	907901	Unknown	Unknown	–
<i>Beltraniella endiandrae</i>	CPC 22193	KJ869128	KJ869185	<i>Endiandra introrsa</i>	Australia: New South Wales	Crous,P.W., et al., 2014
<i>Beltraniella botryospora</i>	TMQa1A18	–	AB496426	<i>Quercus acuta</i> fallen leaves	Japan: Tokyo, Meiji Jingu Shrine	Shirouzu,T., et al., 2010.
<i>Beltraniella carolinensis</i>	NBRC 9502	950202	–	<i>Persea borbonia</i> leaf	Unknown	–
<i>Beltraniella carolinensis</i>	9502IFO	–	DQ810233	<i>Persea borbonia</i> leaf	Southeastern Forest Exp. Sta., USDA	Bahl 2006 unpubl.
<i>Beltraniella japonica</i>	NBRC 30443	3044301	3044301	<i>Quercus phillyraeoides</i> litter	Kagoshima, Japan	–
<i>Beltraniella odinae</i>	NBRC 6774	677401	677401	Unknown	Unknown	–
<i>Beltraniella</i> sp.	37.1.1	KP133183	–	<i>Persea pseudofasciculata</i>	Ecuador: Reserva Los Cedros, Imbabura	Thomas,D.C., et al., 2016.
<i>Beltraniella</i> sp.	37.2.1	KP133182	–	<i>Persea pseudofasciculata</i>	Ecuador: Reserva Los Cedros, Imbabura	Thomas,D.C., et al., 2016.
<i>Beltraniella</i> sp.	37.2.2	KP133176	–	<i>Persea pseudofasciculata</i>	Ecuador: Reserva Los Cedros, Imbabura	Thomas,D.C., et al., 2016.
<i>Beltraniella</i> sp.	37.3.1	KP133175	–	<i>Persea pseudofasciculata</i>	Ecuador: Reserva Los Cedros, Imbabura	Thomas,D.C., et al., 2016.
<i>Beltraniella</i> sp.	37.3.2	KP133178	–	<i>Persea pseudofasciculata</i>	Ecuador: Reserva Los Cedros, Imbabura	Thomas,D.C., et al., 2016.

Tabela I. Continuação

Beltraniella sp.	37.4.1	KP133180	–	Persea pseudofasciculata	Ecuador: Reserva Los Cedros, Imbabura	Thomas,D.C., et al., 2016.
Beltraniella carolinensis	111.1.2	KP133177	–	Nectandra lineatifolia	Ecuador: Reserva Los Cedros, Imbabura	Thomas,D.C., et al., 2016.
Beltraniella carolinensis	111.3.3	KP133179	–	Nectandra lineatifolia	Ecuador: Reserva Los Cedros, Imbabura	Thomas,D.C., et al., 2016.
Beltraniella carolinensis	111.4.1	KP133173	–	Nectandra lineatifolia	Ecuador: Reserva Los Cedros, Imbabura	Thomas,D.C., et al., 2016.
Beltrania sp.	RV-2015 isolate 114.2.1	KP133187	–	Myrcia fallax	Ecuador: Reserva Los Cedros, Imbabura	Thomas,D.C., et al., 2016.
Beltrania sp.	RV-2015 isolate 114.1.1	KP133186	–	Myrcia fallax	Ecuador: Reserva Los Cedros, Imbabura	Thomas,D.C., et al., 2016.
Beltrania sp.	RV-2015 isolate 114.3.1	KP133189	–	Myrcia fallax	Ecuador: Reserva Los Cedros, Imbabura	Thomas,D.C., et al., 2016.
Beltrania sp.	RV-2015 isolate 38.1.1	KP133188	–	Myrcia fallax	Ecuador: Reserva Los Cedros, Imbabura	Thomas,D.C., et al., 2016.
Beltrania sp.	RV-2015 isolate 38.2.1	KP133185	–	Myrcia fallax	Ecuador: Reserva Los Cedros, Imbabura	Thomas,D.C., et al., 2016.
Beltrania sp.	RV-2015 isolate 37.4.2	KP133184	–	Persea pseudofasciculata	Ecuador: Reserva Los Cedros, Imbabura	Thomas,D.C., et al., 2016.
Beltrania pseudorhombica	CPC 23656	KJ869158	KJ869215	Pinus tabulaeformis	China: Beijing	Crous,P.W., et al., 2014
Beltrania pseudorhombica	JSP 01-10 A 1.2	KR093912	–	Atta capiguara	Brazil: Botucatu, Sao Paulo	Pereira,J.S., et al., 2016
Beltrania querna	ICMP 15825	EF029240	–	Quercus ilex	New Zealand	Cooper,J.A.,2005.
Beltrania querna	BCRC 34620	GU905994	–	Unknown	Taiwan	Chen 2010 unpubl.
Beltrania querna	NBRC 32637	3263701	3263701	Quercus dead leaf	Spain	–
Beltrania querna	NBRC 6884	688401	688401	Unknown	Unknown	–
Beltrania querna	NBRC 7543	754301	754301	Unknown	Unknown	–
Beltrania rhombica	DWM34	KM357317	–	Plant	Yunnan,China	Zhou 2014 unpubl

Tabela I. Continuação

<i>Beltrania rhombica</i>	10353	–	AB496423	<i>Quercus myrsinaefolia</i> fallen leaves	Japan	Shirouzu,T., 2010.
<i>Beltrania rhombica</i>	CPC 27482	KX519515	KX519521	<i>Acacia crassipes</i> leaves	Malaysia	Rajeshkumar,K.C., et al., 2016
<i>Beltrania rhombica</i>	NBRC 8857	885701	885701	Unknown	Unknown	–
<i>Beltrania rhombica</i>	NBRC 100226	10022601	10022601	Litter	Chiba, Japan	–
<i>Beltrania rhombica</i>	NBRC 100558	11055001	11055001	<i>Abies firma</i> needles	Ishikawa, Japan	–
<i>Beltraniopsis</i> sp.	KaTaQsal10LF3	–	AB496424	<i>Quercus salicina</i> fallen leaves	Japan	Shirouzu,T., 2010.
<i>Beltraniopsis neolitsea</i>	CPC 22168	KJ869126	KJ869183	<i>Neolitsea australiensis</i>	Australia: New South Wales	Crous,P.W., et al., 2014
<i>Beltraniopsis</i> sp.	RV-2015 isolate 27.3.1	KP133171	–	<i>Myrcia fallax</i>	Ecuador: Reserva Los Cedros, Imbabura	Thomas,D.C., et al., 2016.
<i>Beltraniopsis</i> sp.	RV-2015 isolate 37.3.3	KP133172	–	<i>Persea pseudofasciculata</i>	Ecuador: Reserva Los Cedros, Imbabura	Thomas,D.C., et al., 2016.
<i>Pseudobeltrania ocoteae</i>	CPC 26219	KT950856	KT950870	<i>Ocotea obtusata</i> leaves	France: La Reunion	Crous,P.W., et al.,2015
<i>Subramaniomyces fusisaprophyticus</i>	CBS 418.95	EU040241	EU040241	Leaf litter	Cuba	Crous,P.W., et al.,2007.
<i>Hemibeltrania</i> sp.	CL12WA	JQ621881	–	<i>Cinnamomum iners</i>	Malaysia	Refaei and Santhanam unpubl.
<i>Hemibeltrania cinnamomi</i>	NFCCI 3695	KT119564	KT119565	<i>Cinnamomum malabathrum</i>	Kerala, India	Rajeshkumar,K.C., et al., 2016
<i>Hemibeltrania cinnamomi</i>	NFCCI 3997	KX519517	KX519523	<i>Cinnamomum malabathrum</i> leaves	Kerala, India	Rajeshkumar,K.C., et al., 2016
<i>Porobeltraniella porosa</i>	NFCCI 3994	KX519518	KX519524	<i>Gnetum ula</i> leaf litter	Mulshi, Maharashtra, India	Rajeshkumar,K.C., et al., 2016
<i>Porobeltraniella porosa</i>	NFCCI 3995	KX519519	KX519525	<i>Gnetum ula</i> leaf litter	Mulshi, Maharashtra, India	Rajeshkumar,K.C., et al., 2016
<i>Porobeltraniella porosa</i>	NFCCI 3996	KX519520	KX519526	<i>Gnetum ula</i> leaf litter	Mulshi, Maharashtra, India	Rajeshkumar,K.C., et al., 2016

Tabela I. Continuação

Pseudobeltrania cedrelae	PF1	X	X	<i>Cedrela fissilis</i>	Paraíso, Brazil - Viçosa-MG	This paper
Pseudobeltrania cedrelae	PF2	X	X	<i>Cedrela fissilis</i>	Paraíso, Brazil - Viçosa-MG	This paper
Pseudobeltrania cedrelae	PF3	X	X	<i>Cedrela fissilis</i>	Paraíso, Brazil - Viçosa-MG	This paper
Pseudobeltrania cedrelae	PF4	X	X	<i>Cedrela fissilis</i>	Paraíso, Brazil - Viçosa-MG	This paper
Pseudobeltrania cedrelae	PF5	X	X	<i>Cedrela fissilis</i>	SIF, Brazil - Viçosa-MG	This paper
Pseudobeltrania cedrelae	COAD 2098*	X	X	<i>Cedrela fissilis</i>	SIF, Brazil - Viçosa-MG	This paper
Pseudobeltrania cedrelae	PF6	X	X	<i>Cedrela fissilis</i>	SIF, Brazil - Viçosa-MG	This paper
Pseudobeltrania cedrelae	PF7	X	X	<i>Cedrela fissilis</i>	Comunidades do Sapé, Brazil - Viçosa-MG	This paper
Pseudobeltrania cedrelae	PF8	X	X	<i>Cedrela fissilis</i>	Comunidades do Sapé, Brazil - Viçosa-MG	This paper
Pseudobeltrania cedrelae	PF9	X	X	<i>Cedrela fissilis</i>	Comunidades do Sapé, Brazil - Viçosa-MG	This paper

ITS= internal transcribed spacer regions 1 and 2, including the 5.8S ribosomal RNA gene; and 28S= large-subunit ribosomal RNA gene. Isolados obtidos neste estudo estão em negrito. COAD= Coleção Octávio Almeida Drummond da Universidade Federal de Viçosa. *Proposto como ex- epitipo

Tabela II. Taxa de crescimento micelial (mm dia^{-1}) e esporulação (conídios/ cm^2 de meio de cultura) de *Pseudobeltrania cedrelae* em diferentes meios de cultura.

Meios de cultura	Taxas de	
	crescimento micelial	Esporulação
Extrato de malte-ágar	8.54 a	4.13×10^4 a
Suco V8-ágar	7.04 ab	0.51×10^4 ab
Corn meal agar	6.55 bc	0.36×10^4 ab
Batata-dextrose-ágar	6.09 bcd	2.66×10^4 ab
Aveia-ágar	5.03 cd	3.35×10^4 ab
Cenoura-ágar	4.67 d	0 b
CV(%)	24	122

Médias seguidas pela mesma letra em cada coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

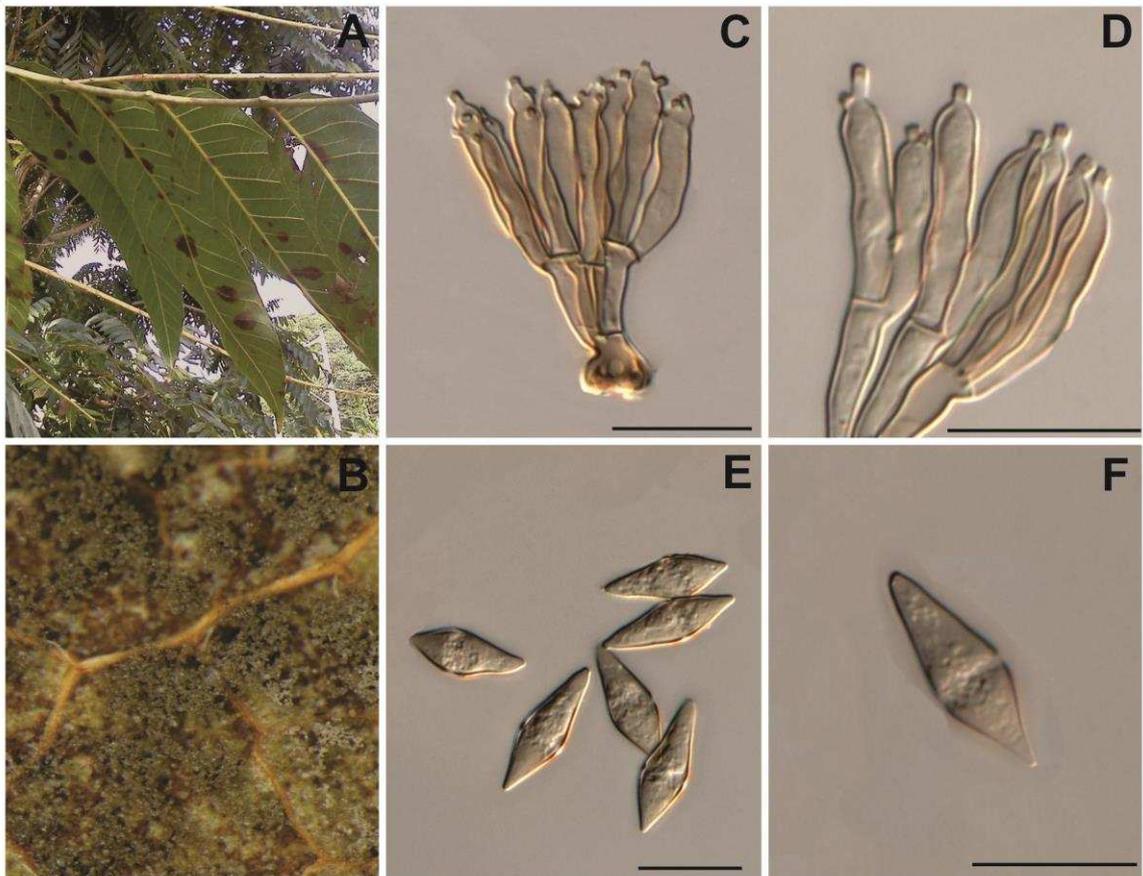


FIG. 1. *Pseudobeltrania cedrelae* em folíolos de *Cedrela fissilis* **A.** Sintomas da mancha foliar no campo; **B.** Sinais do patógeno na parte abaxial; **C.** Conidióforo ramificado originados de células basais lobadas; **D.** Detalhe do loci conidiogênico denticulado; **E.** Conídios bicônicos; **F.** Detalhe do conídio com uma banda hialina na região mediana e uma cicatriz conidial espessa. Barras = 20 μ m

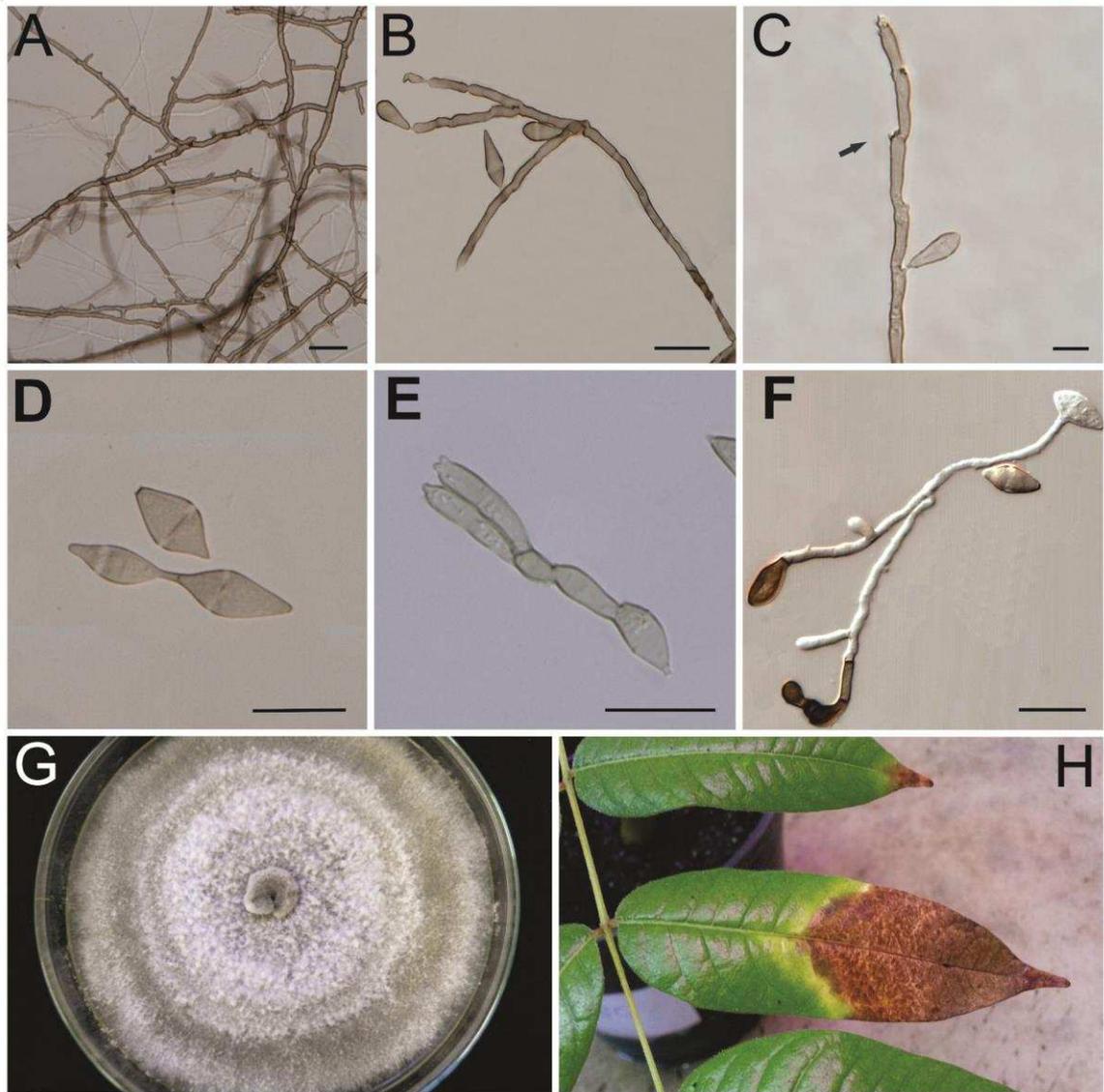


FIG. 2. Aspecto de *Psedobeltrania cedrelae* em microcultura, em colônia e do sintoma em folhas de cedro **A.** Hifas ramificadas; **B.** Conidióforo ramificado com 6 a 13 septos; **C.** Células conidiogênicas com proliferação simpodial. Setas indicando loci conidiogênicos; **D.** Conídios bicônicos com banda hialina mediana em cadeia; **E.** Conídio formando conidióforo; **F.** Conídio com tubo germinativo e apressório; **G.** Cultura em extrato de malte-água com 9 dias de crescimento; **H.** Sintoma da mancha foliar aos 10 dias após inoculação. Barras = 20 μ m

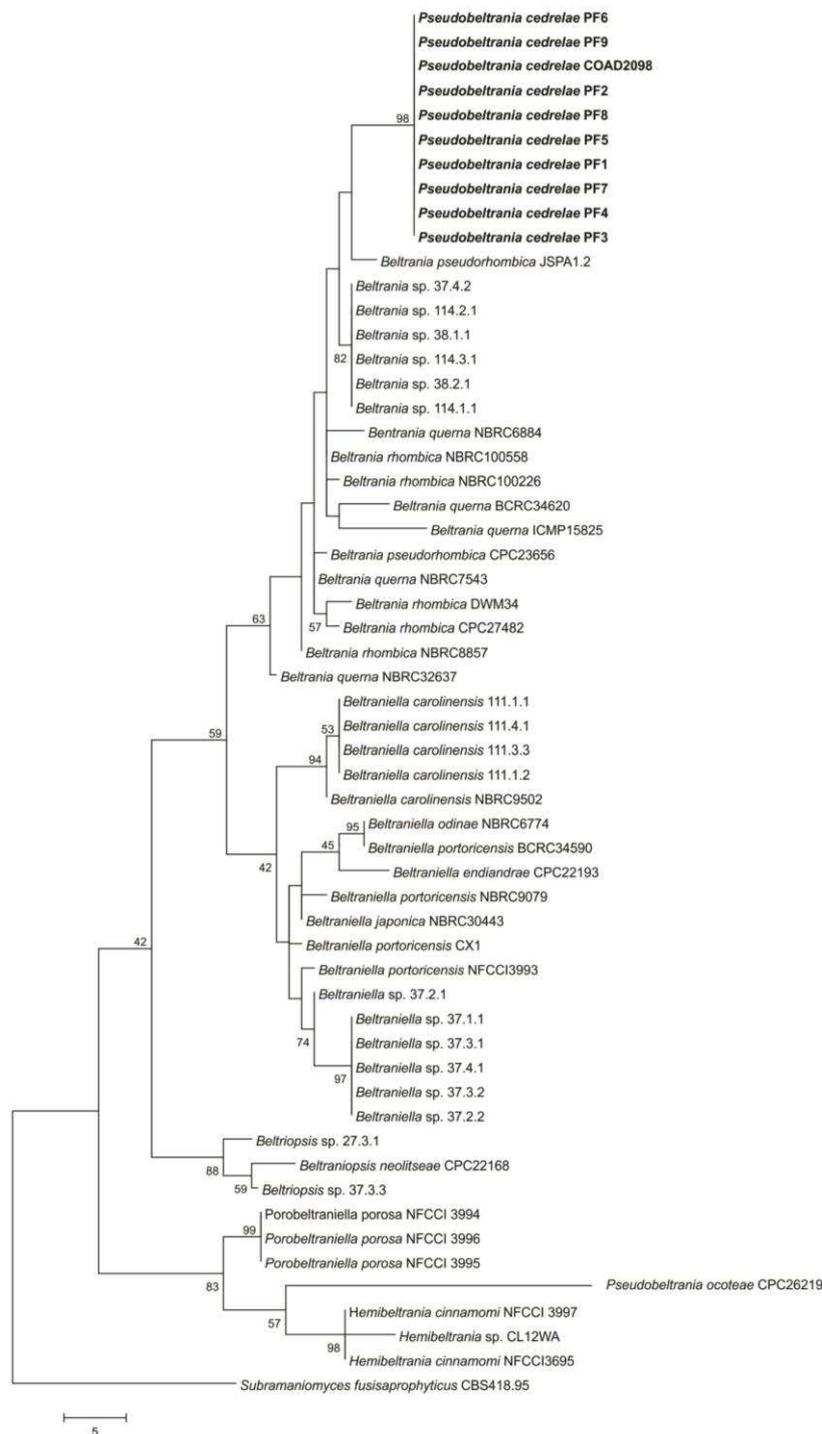


FIG. 3. Árvore de máxima parcimônia (MP) resultante da análise de sequência ITS para espécies da família Beltraniaceae. Valores de bootstrap são indicados próximos aos nós. O comprimento dos ramos é indicado na escala abaixo da árvore. Espécies em estudo estão em negrito. A árvore foi enraizada com *Subramaniomyces fusisaprophyticus* CBS418.95.

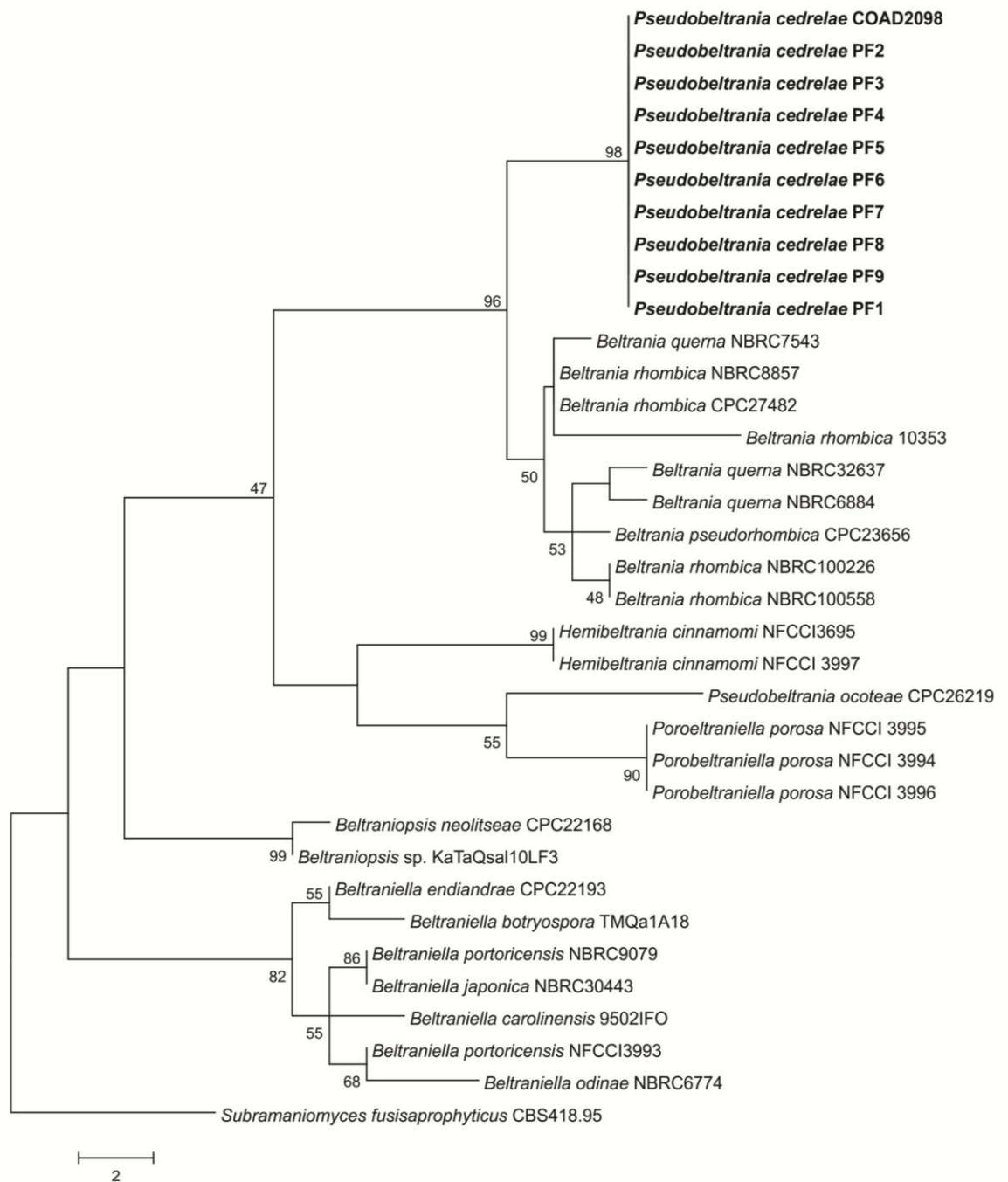


FIG. 4. Árvore de máxima parcimônia (MP) resultante da análise de sequência 28S para espécies da família Beltraniaceae. Valores de bootstrap são indicados próximos aos nós. O comprimento dos ramos é indicado na escala abaixo da árvore. Espécies em estudo estão em negrito. A árvore foi enraizada com *Subramaniomyces fusisaprophyticus* CBS418.95.

Capítulo 2

(De acordo com a norma da revista Forest Pathology)

Processo Infeccioso de *Pseudobeltrania cedrelae* em Folíolos de *Cedrela fissilis* e sua Interação com *Phyllachora balansae*

Processo Infeccioso de *Pseudobeltrania cedrelae* em Folíolos de *Cedrela fissilis* e sua Interação com *Phyllachora balansae*

Milagres, C. A., Azevedo, D. M. Q., Furtado, G. Q¹.

Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil; ¹E-mail: gfurtado@ufv.br (para correspondência)

RESUMO Os patógenos foliares *Pseudobeltrania cedrelae* (Pc) e *Phyllachora balansae* (Pb) são frequentemente encontrados em associação com manchas de pseudobeltrania, ocasionando intensa desfolha em mudas e em plantas adultas de cedro. Os objetivos deste estudo foram elucidar o processo infeccioso de Pc em folíolos de cedro e a influência de Pb no desenvolvimento da mancha de pseudobeltrania. Amostras foram coletadas entre 1 a 408 horas após inoculação (hai) e analisadas em microscópio eletrônico de varredura. Foi observada baixa germinação de Pc e formação de apressórios em amostras de folíolos de cedro sadios e alta germinação e formação de apressórios em amostras contendo ascomas de Pb. A germinação foi observada primeiramente com 3 hai, com a emissão de 1 a 2 tubos germinativos a partir das extremidades e/ou da lateral dos conídios. A penetração de Pc ocorreu de forma direta e através dos estômatos. As 144 hai foi observada colonização inter e intracelular do fungo nas células do parênquima. A esporulação de Pc foi observada aos 408 hai, com conidióforos emergindo através da epiderme e dos estômatos. In vitro, houve diferença significativa da porcentagem de germinação de conídios de Pc entre os tratamentos água (2%), água + cortes de folíolos de cedros sadias (79%) e água + cortes de folíolos contendo ascomas de Pb (91%). A incidência da mancha de pseudobeltrania em folíolos de cedro sadios inoculados com e sem ferimento prévio foi, respectivamente, 42 e 10 vezes menor do que em folíolos inoculados sobre ascomas decorrentes de infecção natural de Pb. Os resultados deste estudo fornecem informações inéditas sobre o

processo infeccioso de Pc e sobre o estímulo exercido pelo fungo Pb no desenvolvimento da mancha de pseudobeltrania em folhas de cedro.

Palavras-chave: cedro, infecção por fungos, mancha foliar, microscopia eletrônica de varredura

1 Introdução

O cedro (*Cedrela fissilis*) é uma espécie florestal pertencente à família Meliaceae com uma ampla ocorrência no Brasil, podendo também ser encontrada na Argentina, Bolívia, Colômbia, Costa Rica, Equador, Panamá, Paraguai, Peru e Venezuela (GBIF, 2016).

No Brasil, o cedro ocorre em todo o território brasileiro, principalmente nas regiões sul, sudeste e centro-oeste (Lorenzi, 1992; CNCFlora, 2012). Em relação à ecologia, desenvolve-se tanto no interior de florestas primárias quanto em vegetação secundária. Porém, mais frequentemente, ocorre em solos úmidos e profundos como os encontrados nos vales e planícies aluviais (Lorenzi, 1992). Atualmente, o cedro está ameaçado de extinção pela perda de habitat, compondo a Lista Vermelha da IUCN, sendo classificado por esta organização como “em perigo” (IUCN, 2016).

Os patógenos relatados em cedro são os fungos *Fulvifomes fastuosus*, *Fulvifomes rimosus*, *Botryosphaeria dothidea*, *Phellinus swieteniae*, *Phyllachora balansae* e *Pseudobeltrania cedrelae*. Destes, apenas os patógenos foliares *B. dothidea*, *P. balansae* e *P. cedrelae* ocorrem no Brasil (Farr & Rossman, 2016; Mendes & Uben, 2016).

O fungo *P. balansae* foi relatada no Brasil associado as espécies de *C. fissilis*, *Cedrela odorata* e *Toona ciliata* (Zacaroni et al., 2013; Farr & Rossman, 2016).

Pertencente à família Phyllachoraceae, *P. balansae* possui nutrição predominantemente biotrófica (Cannon, 1997). A doença ocorre em folhas, pecíolos, ramos e terminais das hastes principais. Nos órgãos afetados, são observadas pequenas áreas circulares com frutificações negras puntiformes de 100-400 µm de diâmetro, as quais se distribuem circularmente (Ferreira et al., 1989).

O patógeno *P. cedrelae* pertence ao filo Ascomycota e à família Beltraniaceae é caracterizado por apresentar conidióforos ramificados com células basais lobadas; loci conidiogênicos conspícuos e denticulados; conídios bicônicos contendo uma banda hialina transversal mediana; e pela ausência de setas e de células de separação (Hanada et al., 2005; Zucconi, 1991; Rajeshkumar et al., 2016). O fungo *P. cedrelae* foi relatado apenas no Brasil, em folhas de *C. fissilis* vivas e em decomposição e também em folhas de *C. odorata* (Hennings, 1902; Gusmão & Grandi, 1996; Batista et al., 1964; Hanada et al., 2005). Os sintomas da mancha de pseudobeltrania descrita em *C. odorata* são manchas marrons claras com pontuações negras, circulares a angulares, circundadas por halo clorótico, podendo coalescer originando extensas áreas necrosadas, acarretando intensa desfolha do cedro (Hanada et al., 2005).

Atualmente, a família Beltraniaceae é composta por sete gêneros, *Beltrania*, *Beltraniella*, *Beltraniopsis*, *Pseudobeltrania*, *Hemibeltrania*, *Porobeltraniella* e *Subramaniomyces*. Estes gêneros possuem algumas características como, setas escuras, setas ou conidióforos com células basais lobadas, células de separação, conídios bicônicos ou liminiformes e conídios com uma banda hialina mediana (Kendrick, 1980).

Em folhas de cedro oriundas de plantas no viveiro e de plantas adultas no campo, constantemente, ascomas negros do fungo *P. balansae* são observados associados à mancha de pseudobeltrania (Fig. 1). De acordo com estas observações, as pontuações negras mencionadas por Hanada et al. (2005), ao descreverem os sintomas da mancha

de pseudobeltrania em *C. odorata*, possivelmente, se tratavam de estruturas reprodutivas de *P. balansae*. Portanto, não existem estudos sobre o papel exercido por *P. balansae* sobre *P. cedrelae*. Os objetivos deste estudo foram elucidar o processo infeccioso de *P. cedrelae* em folíolos de cedro e a avaliar a influência de *P. balansae* na infecção de *P. cedrelae* e no desenvolvimento da mancha de pseudobeltrania.

2 Material e métodos

2.1 Isolado e preparação do inóculo

O isolado de *P. cedrelae* (COAD 2098) foi obtido em folhas de cedro coletadas no viveiro de espécies florestais da SIF (Sociedade de Investigações Florestais) na Universidade Federal de Viçosa (UFV), município de Viçosa, Minas Gerais, Brasil. O fungo foi isolado diretamente de lesões para placas de Petri contendo meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA). Para obter maior esporulação, um disco de micélio de *P. cedrelae* (1 cm de diâmetro) foi transferido para placas de Petri contendo meio extrato de malte-ágar (MEA). Para o preparo do inóculo, 10 mL água destilada esterilizada (ADE) foi adicionada em cada placa de Petri para cobrir a colônia de 15 dias. A suspensão foi agitada e filtrada em dupla camada de gaze. Para todos os ensaios, a concentração de inóculo foi ajustada para 4×10^5 conídios/mL, após contagem em câmara de Neubauer.

2.2 Germinação de *P. cedrelae* in vitro

A germinação dos conídios foi avaliada em lâminas de vidro contendo apenas a suspensão de conídios em água, suspensão + 3 cortes finos de folíolos de cedro sadio e suspensão + 3 cortes finos de folíolos de cedro contendo ascomas decorrentes de infecção natural de *P. balansae*. As lâminas, contendo duas gotas de 20 μ L da

suspensão, foram acondicionadas sobre isopor no interior de uma bandeja plástica contendo 200 mL de ADE e mantida em câmara de crescimento na temperatura de 25°C, no escuro. A porcentagem de germinação foi avaliada após 24 h de molhamento em microscópio de luz (Olympus CX31). Para interrupção do processo de germinação, foram adicionados 10 µL de lactoglicerol à gota da suspensão de conídios. Foi avaliada a porcentagem de germinação de 100 conídios, os quais foram considerados germinados quando apresentavam comprimento do tubo germinativo igual ou superior ao seu diâmetro.

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, com dez repetições. Cada repetição consistiu em uma gota da suspensão de conídios. A análise estatística foi realizada através da análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, utilizando o software R Studio[®] v3.1.1.

2.3 Avaliação do processo infeccioso de *P. cedrelae*

Para elucidar o processo infeccioso de *P. cedrelae* em cedro, folíolos foram obtidos de mudas com cerca de seis meses cultivadas em casa de vegetação. Os folíolos destacados foram desinfestados superficialmente em álcool (70%), solução de hipoclorito de sódio (1%) e, posteriormente, lavados três vezes em ADE. Em seguida, os folíolos foram depositados sobre isopores em caixas de acrílico de 121 cm² por 3,2 cm de profundidade, contendo 100 mL de ADE.

A inoculação foi realizada na face abaxial dos folíolos por meio da deposição contendo 6 gotas de 30 µL da suspensão de conídios de *P. cedrelae*. Os folíolos inoculados foram incubados em câmara de crescimento a 25°C e fotoperíodo de 12 h (165,3 µmol/s/m²). As amostras foliares, de aproximadamente 1 cm², foram coletadas às 1, 3, 6, 8, 12, 24, 36, 48, 72, 144 e 408 horas após inoculação (hai). Para avaliar a

influência de *P. balansae* na pré-penetração de *P. cedrelae*, folíolos contendo ascomas de *P. balansae* foram coletados em viveiro, desinfestados conforme mencionado anteriormente, e inoculados com gotas da suspensão de conídios de *P. cedrelae* sobre os ascomas. As amostras foram coletadas às 6, 8 e 12 hai. Posteriormente, as amostras foram transferidas para microtubos plásticos contendo 1 ml de fixativo (2,5% de glutaraldeído em tampão cacodilato de sódio 0,05 M, pH 7,2) e mantidas a 8°C. Após duas semanas, os fragmentos foram lavados três vezes por 10 minutos em tampão cacodilato de sódio 0,05 M, pH 7,2 e desidratados em uma série alcoólica de 30, 50, 60, 70, 80, 95 e 100% de etanol com intervalos de 15 minutos entre as trocas sendo que, na última concentração, foram realizadas duas passagens. Após a desidratação, o material foi submetido à secagem em ponto crítico em CO₂ utilizando o aparelho "Critical Point Dryer" (Bal-tec, modelo CPD 030) e montados sobre suportes metálicos de alumínio. A epiderme dos fragmentos coletados às 144 e 408 hai foi removida com auxílio de uma fita adesiva. Em seguida, as amostras foram metalizadas com ouro no aparelho "Sputter Coater" acoplado ao "Freezing Drying Unit" (Bal-tec, modelo FDU010) e observadas e fotografadas em microscópio eletrônico de varredura (LEO, modelo 1430VP) operando a 20 Kv (Torres et al., 2015).

2.4 Desenvolvimento da mancha de pseudobeltrania

Para a realização dos ensaios in vivo, foram utilizados folíolos de cedro sadios e com ascomas de *P. balansae*, os quais foram obtidos em mudas de cedro cultivadas em casa de vegetação e em mudas de cedro sintomáticas em condições de viveiro, respectivamente. Os folíolos foram lavados e acondicionados conforme mencionado anteriormente em uma bandeja plástica contendo 200 mL de ADE. Os seguintes tratamentos foram utilizados para avaliar o desenvolvimento da mancha de pseudobeltrania: folíolos sadios, com e sem fermento, inoculadas com suspensão de

conídios de *P. cedrelae*; folíolos sadios, com e sem ferimento, pulverizadas com ADE; folíolos com ascomas de *P. balansae* inoculados com suspensão de conídios de *P. cedrelae*; e folíolos com ascomas de *P. balansae* pulverizadas com ADE. Os ferimentos foram realizados, superficialmente, utilizando um tubo metálico de 10 mm de diâmetro, contendo um conjunto de agulhas em uma das extremidades.

A inoculação foi realizada na face abaxial dos folíolos com a deposição de seis gotas contendo 30 µL da suspensão de conídios. Em folíolos sintomáticos, as inoculações foram realizadas sobre os ascomas de *P. balansae*. A bandeja plástica contendo os folíolos foi acondicionada em câmara de crescimento a 25°C e fotoperíodo de 12 h. Foi avaliado o período de incubação, o período latente e a incidência. A incidência foi avaliada aos 7 dai. O desenvolvimento dos sintomas e a esporulação do fungo foram avaliada diariamente até aos 7 dai.

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições. Cada repetição consistiu em um folíolo. A análise estatística foi realizada através da análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, utilizando o software R Studio[®] v3.1.1. O experimento foi repetido.

3 Resultados

3.1 Penetração e germinação de conídios

Houve diferença significativa ($P \leq 0,05$) entre as médias da porcentagem de germinação de conídios de *P. cedrelae* em água, em água + cortes de folíolos de cedro sadios e em água + cortes de folíolos contendo ascomas de *P. balansae* (Fig. 2). A maior germinação (91%) ocorreu quando foi adicionado à suspensão de conídios cortes de folíolos com *P. balansae*, seguido da germinação na presença de cortes de folíolos sadios (79%) e apenas os conídios em água (2%).

Na microscopia eletrônica de varredura, também foi observado pouca germinação de conídios e de formação de apressórios em folíolos sadios. A germinação ocorreu a partir dos 3 hai com a emissão de 1 a 2 tubos germinativos das extremidades e/ou da lateral dos conídios, com ou sem ramificação (Fig. 3, a-d). Foi observado maior número de conídios germinados e de apressórios formados em amostras contendo ascomas de *P. balansae* (Fig. 3j). Os apressórios apresentaram diferentes formatos, como irregulares e ovalados a globosos (Fig. 3 e, g). A penetração ocorreu tanto de forma direta (Fig. 3f) quanto através dos estômatos (Fig. 3h). Alguns conídios formaram tubos germinativos que interceptaram estômatos, mas não os penetraram (Fig. 3c, f).

3.2 Colonização e esporulação de *P. cedrelae*

Em amostras obtidas às 144 hai, com sintomas da mancha de pseudobeltrania, foi observado colonização inter e intracelular das hifas de *P. cedrelae* no tecido do parênquima lacunoso (Fig. 4 a, b).

A esporulação do patógeno foi observada às 408 hai, em conidióforos que emergiram tanto através da epiderme quanto dos estômatos (Fig. 4d, e). Os conidióforos observados apresentaram-se eretos, com células basais lobadas, ramificados, solitários ou em pequenos grupos e com loci conidiogênicos conspícuos e denticulados (Figura 4 c, f e g).

3.3 Desenvolvimento da mancha de pseudobeltrania

Houve diferença significativa entre os tratamentos para o período de incubação e o período latente. Em folíolos com ascomas de *P. balansae*, os sintomas iniciaram aos 2 dias após a inoculação (dai) e a esporulação aos 4 dai. Em folíolos sadios, com ferimento e sem ferimento, os sintomas iniciaram aos 6 dai em apenas uma das repetições e a esporulação não ocorreu até os 7 dai. Houve diferença significativa do

tratamento de folíolos com *P. balansae* em relação aos demais tratamentos para a incidência da mancha de pseudobeltrania (Tabela 1). A incidência da mancha de pseudobeltrania em folíolos de cedro sadios inoculados com e sem ferimento prévio foi, respectivamente, 42 e 10 vezes menor do que folíolos inoculados sobre ascomas decorrentes de infecção natural de *P. balansae*. Os folíolos sadios, com e sem ferimento, e folíolos com *P. balansae* que foram inoculados com ADE não apresentaram sintomas da mancha de pseudobeltrania.

4 Discussão

Foi observada baixa germinação de conídios do fungo *P. cedrelae* em água, tanto em lâminas quanto na superfície de amostras de folíolos sadios examinadas em microscópio eletrônico de varredura. Possivelmente, o fungo *P. cedrelae* possui um autoinibidor da germinação, o tornando dependente de um fator exógeno para germinar. Esta hipótese foi reforçada ao obter 79 e 91% de germinação quando foi adicionado à suspensão de conídios cortes de folíolos sadios e de folíolos contendo ascomas de *P. balansae*, respectivamente. O fato de ter apresentado alta porcentagem de germinação em ambas as condições é questionável se este estímulo da germinação dos conídios *P. cedrelae* é desencadeado por alguma substância pré-formada em folíolos de cedro que se torna potencializada na presença do fungo *P. balansae*. Um exemplo de uma substância produzida por planta, com ação sobre fungo, é o hidrocarboneto denominado hentriacontano. Esta substância, produzida por folhas de jambeiro (*Syzygium jambos*), atua contra autoinibidores da germinação presentes em urediniósporos de *Puccinia psidii*, permitindo a germinação em água (Tessmann e Dianese, 2002).

A influência de *P. balansae* na germinação de conídios de *P. cedrelae* foi também evidenciada nas análises de microscopia eletrônica de varredura, as amostras de folíolos de cedro com ascomas de *P. balansae* apresentaram intensa germinação de conídios e de formação de apressórios de *P. cedrelae*.

A germinação de *P. cedrelae* ocorreu a partir dos polos e, principalmente, a partir da lateral dos conídios. De acordo com Pirozynski (1963), a germinação lateral está relacionada com a presença de uma banda hialina na região central dos conídios de *P. cedrelae* (Gusmão e Grandi 1996). Foi também observada, em relação à germinação, a presença de mais de um tubo germinativo por conídio. Esta característica foi observada também nas interações *Botrytis cinerea*-eucalipto (Caires et al. 2014), *Curvularia gladioli*-gladíolo (Torres et al. 2015) e *Cercospora coffeicola*-café (Souza et al. 2011). O desenvolvimento de mais de um tubo germinativo pode ser considerado uma forma de aumentar agressividade do fungo, uma vez que aumenta o sítio de penetração (Babu et al. 2009).

Em relação aos apressórios, este foi o primeiro relato de formação dessa estrutura por *P. cedrelae* e para o gênero *Pseudobeltrania*. Entretanto, na ausência de *P. balansae* nas amostras de folíolos, sua formação foi pouco observada. Em amostras com *P. balansae*, foi possível observar diferentes formatos de apressórios. Apressórios com morfologia variada foi também observado para *Colletotrichum gloeosporioides* em *Coffea arabica* (Ferreira et al. 2009) e *Curvularia gladioli* em gladíolo (Torres et al. 2015). O fato de ter sido observado penetração através dos estômatos sem a formação de apressório, possivelmente, esta estrutura não é essencial para infecção de *P. cedrelae* em cedro. Na interação *Puccinia psidii*-eucalipto, a formação de apressório também foi facultativa. Foi observado menor porcentagem de germinação e de formação de apressórios em folhas de eucalipto mais velhas (Xavier et al. 2015). Para o fungo *B.*

cinerea, também não existe obrigatoriedade na formação de apressório, sendo observada sua formação em cenoura e feijão-fava, mas não em eucalipto e gérbera (McKeen 1974, Sharman e Heale 1977, Salina e Verhoell 1995, Caires et al. 2014).

A penetração de *P. cedrelae* ocorreu tanto de forma direta quanto através dos estômatos. Foi também observado crescimento de tubo germinativo sobre estômatos sem penetrá-los. Apesar de ser frequente a penetração de fungos pelos estômatos, é também comum tubos germinativos interceptarem esta abertura natural e não penetrarem. Isto foi observado nas interações *C. coffeicola*-café, *Calonectria pterides-eucalipto*, *Ramularia areola*-algodão (Graças et al. 2009, Curvelo et al. 2010, Souza et al. 2011).

Em relação à colonização, o hábito necrotrófico de *P. cedrelae* foi confirmado ao observar hifas inter e intracelularmente no parênquima lacunoso de folíolos de cedro. O que comprova que *P. cedrelae*, embora seja influenciado por *P. balansae* na pré-penetração em folíolos de cedro, é capaz de colonizar e de reproduzir no tecido do hospedeiro. A colonização inter e intracelular também foi vista para *Cercospora coffeicola* em folhas de café, *Botrytis cinerea* em eucalipto, *Curvularia gladioli* em gladiolo e *Pestalotiopsis longisetula* em morango (Souza et al. 2011, Caires et al. 2014, Rodrigues et al. 2014, Torres et al. 2015).

A esporulação ocorreu na superfície abaxial em conidióforos que emergiram através da epiderme e dos estômatos. De forma semelhante ao observado por meio de microscopia eletrônica de varredura para *C. gladioli* em folhas de gladiolo (Torres et al. 2015). A emissão de conidióforo apenas através do rompimento da epiderme de folha foi observada para *B. cinerea* em eucalipto (Caires et al. 2014). Já a emissão de conidióforos através de estômatos foi demonstrado para *C. coffeicola* em folhas de café (Souza et al. 2011).

A influência de *P. balansae* foi também evidenciada no desenvolvimento da mancha de pseudobeltrania. O surgimento da doença foi mais rápido e a sua incidência em folíolos inoculados 42 vezes maior na presença de *P. balansae*. Por outro lado, a realização de ferimentos em folíolos antes da inoculação não mostrou efeito significativo no desenvolvimento da mancha de pseudobeltrania quando comparado às inoculações sem ferimento. Portanto, especula-se que essa possível substância química pré-formada atua tanto na superfície da planta favorecendo a germinação dos conídios de *P. cedrelae* quanto estimulando a colonização dos tecidos pelas hifas do fungo. Porém, parece que essa substância química em folíolos, sem *P. balansae*, não atua na superfície desses órgãos e que os níveis pré-existentes não são suficientes para favorecer a colonização de *P. cedrelae*.

Este foi o primeiro estudo que elucidou a patogênese de *P. cedrelae* em folíolos de cedro e evidenciou o importante papel exercido pelo fungo *P. balansae* no desenvolvimento da doença. Entretanto, novos estudos são necessários a fim de comprovar a natureza da substância química e o seu papel no desenvolvimento da mancha de pseudobeltrania em folíolos de cedro.

Agradecimentos

Os autores gostariam de agradecer ao “Núcleo de Microscopia e Microanálise - CCB/UFV” e ao “Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultraestrutural” da UFPA, pelo uso do microscópio eletrônico de varredura e outros equipamentos. Este estudo foi suportado por recursos do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), da Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e da Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Referências

- Americas Regional Workshop (Conservation & Sustainable Management of Trees, Costa Rica). *Cedrela fissilis*. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2016 -3. Disponível em: <www.iucnredlist.org>. Acesso em 20 de janeiro de 2017.
- Babu, A. M.; Philip, T.; Kariappa, B. K.; Kamble, C. K. 2009: Scanning electron microscopy of the infection process of *Cercospora henningsii* on cassava leaves. *Journal of Phytopathology* **157**, 57-62.
- Caires, N. P.; Rodrigues, F. A.; Furtado, G. Q., 2015: Infection process of *Botrytis cinerea* on Eucalypt leaves. *Journal of Phytopathology* **163**, 604-611.
- Cannon, P. F., 1991: A revision of *Phyllachora* and some similar genera on the host family Leguminosae. *Mycological Paper* **163**, 1–302.
- CNCFlora. *Cedrela fissilis* in Lista Vermelha da flora brasileira versão 2012.2 Centro Nacional de Conservação da Flora. Disponível em <http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Cedrela_fissilis>. Acesso em 9 fevereiro 2017.
- Chatterjee, S.; Kuang, Y.; Splivallo, R.; Chatterjee, P.; Karlovsky, P., 2016: Interactions among filamentous fungi *Aspergillus niger*, *Fusarium verticillioides* and *Clonostachys rosea*: fungal biomass, diversity of secreted metabolites and fumonisin production. *BMC Microbiology* **16**, 1-13.
- Curvelo, C. R. S.; Rodrigues, F. A.; Berger, P. G.; Rezende, D., 2010: Microscopia eletrônica de varredura do processo infeccioso de *Ramularia areola* em folhas de algodoeiro. *Tropical Plant Pathology* **35**, 108-113.
- Dornelas, M. C.; Rodriguez, A. P. M., 2006: The tropical cedar tree (*Cedrela fissilis* Vell., Meliaceae) homolog of the *Arabidopsis* LEAFY gene is expressed in

- reproductive tissues and can complement Arabidopsis leafy mutants. *Planta* **223**, 306-314.
- Emmett, R. W.; Parbery, D. G., 1975: Appressoria. *Annual Review of Phytopathology* **13**, 147-165.
- Estrada, A. E. R.; Hegeman, A.; Kistler, H. C.; May, G., 2011: In vitro interactions between *Fusarium verticillioides* and *Ustilago maydis* through real-time PCR and metabolic profiling. *Fungal Genetics and Biology* **48**, 874-885.
- Farr, D. F.; Rossman, A. Y. *Fungal Databases, Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS, USDA*. Disponível em: <http://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/>. Acesso em 4 de dezembro de 2016.
- Ferreira, F. A., 1989: *Patologia Florestal, principais doenças florestais no Brasil*. Viçosa, Sociedade de Investigações Florestais, 570p.
- Ferreira, J. B.; Abreu, M. S. D.; Alves, E.; Pereira, I. S.; Fernandes, K. D., 2009: Eventos do processo de infecção de *Colletotrichum gloeosporioides* inoculados em folhas de *Coffea arabica* L. *Summa Phytopathologica* **35**, 273-281.
- GBIF Secretariat: GBIF Backbone Taxonomy. Disponível em: <doi:10.15468/39omei <http://www.gbif.org/dataset/d7ddd4-2cf0-4f39-9b2a-bb099caae36c> >. Acesso em 5 de dezembro de 2016.
- Graça, R. N.; Alfenas, A. C.; Maffia, L. A.; Titon, M.; Alfenas, R. F.; Lau, D.; Rocabado, J. M. A., 2009: Factors influencing infection of eucalyptus by *Cylindrocladium pteridis*. *Plant Pathology* **58**, 974-981.
- Gusmão, L. F. P.; Grandi, R. A. P., 1996: Espécies do grupo *Beltrania* (Hyphomycetes) associadas a folhas de *Cedrela fissilis* Veil. (Meliaceae), em Maringá, PR, Brasil. *Hoehnea* **23**, 91-102.

- Hanada, R. E.; Gasparotto, L.; Ferreira, F. A., 2005: Primeiro relato de mancha foliar em *Cedrela odorata* causada por *Pseudobeltrania cedrelae*. *Fitopatologia Brasileira* **30**, 299-301.
- Hennings, P. C., 1902: Fungi S. Paulenses II. A cl. Puttemans collecti. In: *Hedwigia* **41**, 310.
- Kendrick B. 1980. The generic concept in Hyphomycetes, a reappraisal. *Mycotaxon* **11**:339–364.
- Lorenzi, H., 1992: Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa: Editora Plantarum, pp. 352
- Mckeen, W. E., 1974: Mode of penetration of epidermal cell walls of *Vicia faba* by *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* **64**, 461-467.
- Mendes, M. A. S., & Urben, A. F. Fungos relatados em plantas no Brasil, Laboratório de Quarentena Vegetal. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Disponível em: <http://pragawall.cenargen.embrapa.br/aiqweb/michtml/fgbanco01.asp>. Acesso em 10 de dezembro 2016.
- Rajeshkumar, K. C.; Crous, P. W.; Groenewald, J. Z.; Seifert, K. A., 2016: Resolving the phylogenetic placement of *Porobeltraniella* and allied genera in the Beltraniaceae. *Mycological Progress* **15**, 1119-1136.
- Rodrigues, F. A.; Silva, I. T.; Cruz, M. F. A.; Carré-Missio, V., 2014: The infection process of *Pestalotiopsis longisetula* leaf spot on Strawberry Leaves. *Journal of Phytopathology* **162**, 690-692.
- Salinas, J.; Verhoeff, K., 1995: Microscopical studies of the infection of gerbera flowers by *Botrytis cinerea*. *European Journal of Plant Pathology* **101**, 377-386.

- Sharman, S.; Heale, J.B., 1979: Germination studies on *Botrytis cinerea* infecting intact carrot (*Daucus carota*) roots. *Transactions of the British Mycological Society* **73**, 147-154.
- Soares, A. R.; Lourenço, S. A.; Amorim, L., 2008: Infecção de goiabas por *Colletotrichum gloeosporioides* e *Colletotrichum acutatum* sob diferentes temperaturas e períodos de molhamento. *Tropical Plant Pathology* **33**, 265-272.
- Souza, A. G. C.; Rodrigues, F.A.; Maffia, L. A.; Mizubuti, E. S. G., 2011: Infection process of *Cercospora coffeicola* on coffee leaf. *Journal of Phytopathology* **159**, 6-11.
- Tessmann, D. J.; Dianese, J. C., 2002: Hentriacontane: a leaf hydrocarbon from *Syzygium jambos* with stimulatory effects on the germination of urediniospores of *Puccinia psidii*. *Fitopatologia Brasileira* **27**, 538-542.
- Torres, D. P.; Silva, M. A.; Furtado, G. Q., 2015: Infection process of *Curvularia gladioli* on gladiolus leaves. *Tropical Plant Pathology* **40**, 382-387.
- Viana, F. M. P.; Sousa, J. A.; Araújo J. D. M; Freire F. C. O.; Pieniz V.; Corrêa D., 2012: Ocorrência e Controle da Mancha-de-Phyllachora em Cedro no Estado do Ceará. Comunicado Técnico 186. Embrapa.
- Weber, R. W.; Webster, J., 1998: Stimulation of growth and reproduction of *Sphaeronaemella fimicola* by other coprophilous fungi. *Mycological Research* **102**, 1055-1061.
- Williamson, B.; Tudzynski, B.; Tudzynski, P.; van Kan, J. A., 2007: *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. *Molecular Plant Pathology* **8**, 561-580.
- Wong, M. H.; Henderson, J., Aitken E. A.; Drenth, A., 2013: Mode of infection of *Phyllosticta maculata* on banana as revealed by scanning electron microscopy. *Journal of Phytopathology* **161**, 135-141.

- Xavier, A. A.; Silva, A. C.; Guimarães, L. M. S.; Matsuoka, K.; Hodges, C. S.; Alfenas, A. C., 2015: Infection process of *Puccinia psidii* in *Eucalyptus grandis* leaves of diferente ages. *Tropical Plant Pathology* **40**, 318-325.
- Zacaroni, A. B.; Pozza, E. A.; Mansur, T. D. O. F.; Sussel, A. A. B., 2013: Occurrence of *Phyllachora balansae* in *Toona ciliata* in Southern Minas Gerais State, Brazil. *Summa Phytopathologica* **39**, 219-220.
- Zucconi, L., 1991: *Pseudobeltrania guerensis* sp. nov. from Ivory Coast forest litter. *Mycological Research* **95**, 1017-1018.

Tabelas e Figuras

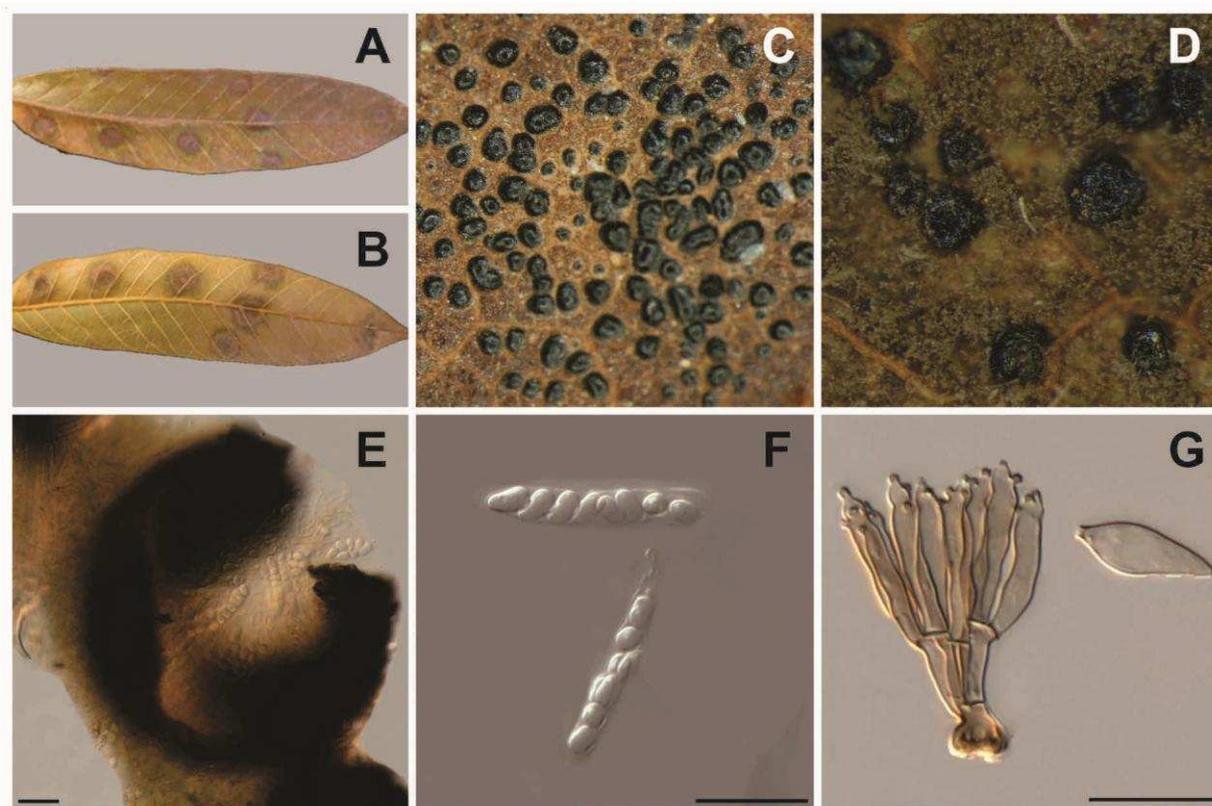


Figura 1. Interação entre *Pseudobeltrania cedrelae* e *Phyllachora balansae* em folhas de *Cedrela fissilis*. (A) Sintomas na face adaxial *P. balansae* (B) Sintomas na face abaxial de *P. cedrelae* e *P. balansae*. (C) Ascomas de *P. balansae* na face adaxial. (D) Sinais de *P. cedrelae* e *P. balansae* na face abaxial. (E) Corte transversal de peritécio de *P. balansae*. (F) Ascus com ascósporos de *P. balansae*. (G) Conidióforo e conídio de *P. cedrelae*. Barra = 20 μm

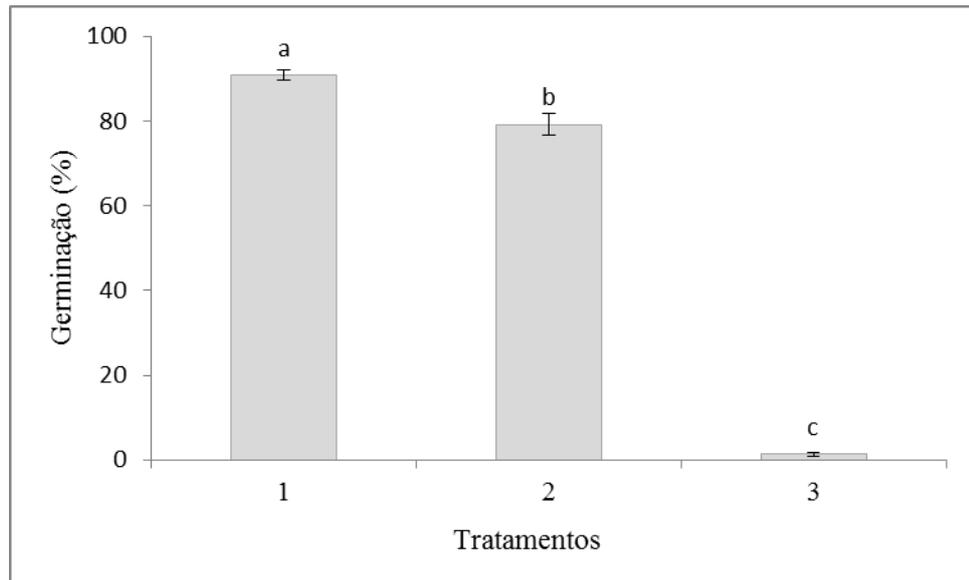


Figura 2. Germinação de conídios de *Pseudobeltrania cedrelae* in vitro em função de diferentes tratamentos: Suspensão de conídios de *P. cedrelae* na presença de 3 cortes finos de folíolos de cedro contendo ascomas de *Phyllachora balansae* (1), suspensão + 3 cortes finos de folíolos de cedro saudáveis (2) e apenas a suspensão de conídios em água (3). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

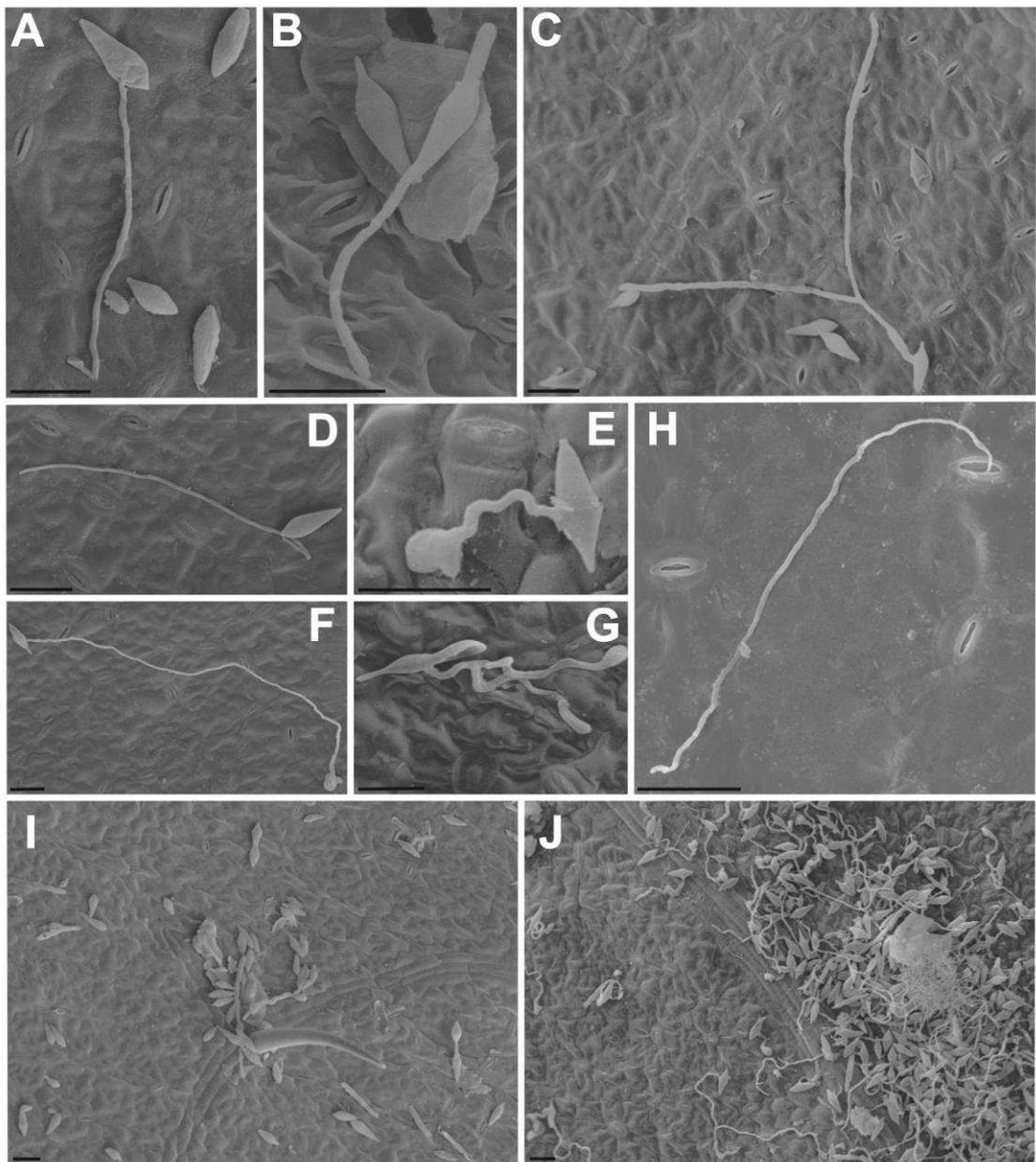


Figura 3. Eletromicrografias de varredura da germinação de conídios e da penetração de *Pseudobeltrania cedrelae* em folíolos de cedro. (A) Germinação lateral dos conídios às 3 horas após a inoculação (hai). (B) Germinação bipolar de conídios às 36 hai. (C) Conídio com tubo germinativo bifurcado às 48 hai. (D) Germinação polar de conídio às 12 hai. (E), (F) Formação de apressórios, com diferentes formatos, sobre a epiderme intacta às 6 hai na presença de *Phyllachora* às 48 hai, respectivamente. (G) Bifurcação do tubo germinativo e formação de apressórios nas extremidades às 6 hai na presença de *Phyllachora*. (H) Penetração via estômato sem formação de apressório às 408 hai. (I) Conídios não germinados de *P. cedrelae* na ausência de *P. balansae*. (J) Conídios germinados e com apressórios na presença de *P. balansae*. Barras = 20 μ m

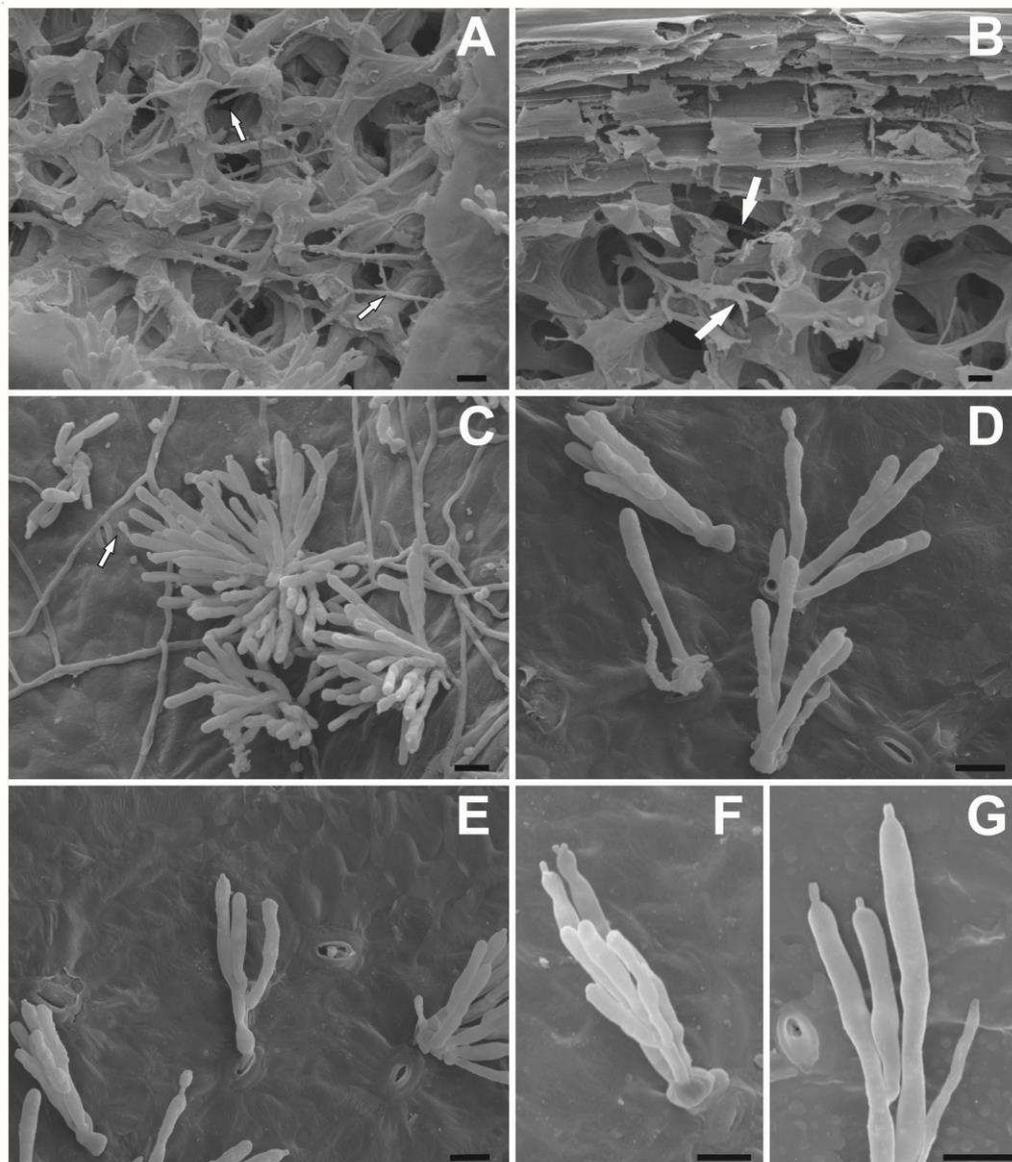


Figura 4. Eletromicrografias de varredura da colonização e da esporulação de *Pseudobeltrania cedrelae* em folíolos de cedro. (A), (B) Hifas (setas) colonizando inter e intracelularmente o parênquima às 144 horas após a inoculação (hai). (C) Desenvolvimento de hifas, conidióforos e conídios (seta) na superfície abaxial às 408 hai. (D), (E) Conidióforos emergindo através da epiderme intacta e dos estômatos às 408 hai. (F) Aspecto da base lobada dos conidióforos às 408 hai. (G) Formação de denticulos nas extremidades dos conidióforos às 408 hai. Barras = 10 μ m

Tabela 1. Incidência da mancha de *Pseudobeltrania cedrelae* na ausência ou presença de *Phyllachora balansae* aos sete dias após inoculação das plantas.

Tratamento	Incidência (%)
1	87.5 a
2	8.33 b
3	2.08 b
4	0 b
5	0 b
6	0 b

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Tratamentos: (1) Folíolos com ascomas de *P. balansae* inoculados com *P. cedrelae*, (2) Folíolos sadios com ferimentos inoculados com *P. cedrelae*, (3) Folíolos sadios sem ferimentos e inoculados com *P. cedrelae*, (4) Folíolos com ascomas de *P. balansae* pulverizados com água destilada esterilizada (ADE), (5) Folíolos sadios sem ferimentos e pulverizados com ADE e (6) Folíolos sadios com ferimentos pulverizados com ADE.

CONCLUSÕES GERAIS

Os resultados do presente estudo permitem concluir que:

- Os meios de cultura suco V8-ágar e extrato de malte-ágar proporciona maior crescimento da colônia de *P. cedrelae*;
- *Pseudobeltrania cedrelae* apresenta características morfológicas em meio de cultura diferentes das obtidas quando em associação as manchas foliares, principalmente em relação ao conidióforo;
- A porcentagem de germinação de *P. cedrelae* é baixa em água e na superfície de amostras de folíolos sadios de cedro;
- A germinação de *P. cedrelae*, na presença de *P. balansae*, é alta tanto na superfície de amostras de folíolos de cedro quanto *in vitro*;
- *Pseudobeltrania cedrelae* possui diferentes formatos de apressórios;
- A penetração de *P. cedrelae* em folhas de cedro ocorre de forma direta e através dos estômatos;
- A colonização de *P. cedrelae* ocorre de forma inter e intracelular em parênquima lacunoso dos folíolos de cedro;
- Conidióforos de *P. cedrelae* emerge tanto através da epiderme intacta quanto dos estômatos;
- O fungo *P. balansae* estimula o desenvolvimento da mancha de *pseudobeltrania* em folíolos de cedro.