



**GIZELI SOUZA SANTOS**

**PHYLOGENY, MORPHOLOGY AND PATHOGENICITY OF  
*Neopestalotiopsis* spp. AND *Quambalaria eucalypti* ON *Eucalyptus*  
sp.**

**LAVRAS - MG  
2019**

**GIZELI SOUZA SANTOS**

**PHYLOGENY, MORPHOLOGY AND PATHOGENICITY OF *Neopestalotiopsis* spp.  
AND *Quambalaria eucalypti* ON *Eucalyptus* sp.**

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

Prof(a). Dr(a). Maria Alves Ferreira  
Orientadora

**LAVRAS - MG  
2019**

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

Santos, Gizeli Souza.

Phylogeny, morphology and pathogenicity of  
*Neopestalotiopsis* spp. and *Quambalaria eucalypti* on *eucalyptus* sp.  
/ Gizeli Souza Santos. - 2019.

58 p. : il.

Orientador(a): Maria Alves Ferreira.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2019.  
Bibliografia.

1. Forest Pathology. 2. Eucalypti. 3. Molecular. I. Ferreira,  
Maria Alves. II. Título.

**GIZELI DE SOUZA SANTOS**

**PHYLOGENY, MORPHOLOGY AND PATHOGENICITY OF *Neopestalotiopsis* spp.  
AND *Quambalaria eucalypti* ON *Eucalyptus* sp.**

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

APROVADA em 15 de fevereiro de 2019.

Dr. Aurivan Soares de Freitas	UNINCOR
Dr. Flávio Augusto de Oliveira Garcia	UNICENTRO
Dr. Deila Magna dos Santos Botelho	UFLA
Dr. Silvino Intra Moreira	UFLA

Prof(a). Dr(a). Maria Alves Ferreira  
Orientadora

**LAVRAS - MG  
2019**

*À minha mãe e avó  
Aos meus irmãos e ao Michael  
Pelo apoio e incentivo,*

*Dedico*

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, pela fidelidade e por me dar força interior para superar as dificuldades.

A minha mãe, avó e irmãos por todas as orações, pelo amor, carinho e incentivo. Sem vocês eu nada seria!

Ao meu namorado Michael, pelo companheirismo, atenção e por todas as orações.

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Fitopatologia, pela estrutura e os conhecimentos obtidos durante o mestrado e doutorado.

Ao conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa de estudos.

À professora Maria Alves Ferreira, pela orientação, compreensão, confiança e pelos valiosos ensinamentos, que levarei comigo sempre!

Aos demais professores de Departamento de Fitopatologia-DFP/UFLA, em especial aos professores: Vicente Paulo Campos e Eduardo Alves por cederem seus laboratórios para realização dos experimentos.

Aos membros da banca, por aceitarem o convite.

Aos técnicos e demais funcionários do DFP, Ana Maria, Carzinho, Silvio, Tarlei, Ângela, Elenice, Adriana, Angélica, Luana, e Ariana.

Aos amigos do Laboratório de Patologia florestal, Thaissa, Mara, Gessica, Gabrielle, Iêda, Cesar (Ubi), Hallém, Júlia, Renata, Luiza (Técnica) e a Aline, pela contribuição nos experimentos.

As irmãs do coração Nayara e Natália pelo companheirismo e por todo o apoio quando mais precisei. E aos amigos parceiros do grupo Destelados Anônimos, pelos bons momentos compartilhados.

A todos que, de certa forma, contribuíram para que mais esta etapa fosse cumprida, obrigado!

## RESUMO

Espécies de *Neopestalotiopsis* e *Quambalaria* são fitopatogênicas e causam doenças em diversos hospedeiros. No Brasil, apesar de, relativamente, frequente em viveiros de produção de mudas, *Neopestalotiopsis* ainda não foi identificado ao nível de espécie e *Quambalaria* até o momento não relatado em condições de campo para eucalipto. Em vista da importância dessas doenças e do pouco conhecimento disponível sobre estes patossistemas, procurou-se, caracterizar molecular, morfologia, e comprovar a patogenicidade da doença inoculada com *Neopestalotiopsis* spp. e *Quambalaria eucalypti* em mudas de *Eucalyptus* sp. No primeiro estudo os isolados foram submetidos à análise multilocus utilizando duas regiões gênicas  $\beta$ -tubulina (TUB) e o fator de alongação (TEF). A análise das sequências das regiões genômicas confirmou a presença de *Neopestalotiopsis australis*, *N. rosae* como primeiro relato e a ocorrência de uma nova espécie como agente patogênico em *Eucalyptus* sp., no Brasil. A caracterização morfológica permitiu a identificação dos isolados das espécies *N. australis* e *N. rosae*, principalmente, com base em diferenças no tamanho e na forma dos conídios. Além disso, neste estudo, uma nova espécie chamada *Neopestalotiopsis brasiliensis* foi descrita. Os testes de patogenicidade demonstraram que os isolados foram patogênicos para clones de eucalipto. Os resultados obtidos podem contribuir para o conhecimento do gênero de *Neopestalotiopsis* causando doenças em plantas lenhosas. Além disso, este foi o primeiro relato das espécies *Neopestalotiopsis australis*, *N. rosae* como agentes patogênicos em *Eucalyptus* sp. no Brasil. No segundo estudo sequências de cinco isolados obtidos de folhas e cancos foram comparados a 21 sequências incluindo o *outgroup* depositadas no Genbank. Os isolados foram submetidos a análises multilocus utilizando as regiões ITS e LSU. A análise filogenética de Máxima Parcimônia e Inferência Bayesiana de sequências combinadas das duas regiões estudadas agruparam os isolados avaliados no clado de *Q. eucalypti* e as características morfológicas foram similares às descritas na literatura. A patogenicidade foi confirmada, e o patógeno foi novamente isolado das plantas inoculadas confirmando suas características morfológicas cumprindo os postulados de Koch. Esse é o primeiro relato de *Q. eucalypti* causando manchas foliares e cancro em eucalipto em condições de campo no Brasil. Estes resultados podem contribuir para o conhecimento de isolados de *Q. eucalypti* que ocorrem no Brasil em condições de campo e estabelecer protocolos para selecionar materiais resistentes ao patógeno.

**Palavras-chave:** Cancro, Anelamento da haste, Patologia Florestal e Molecular.

## ABSTRACT

Species of *Neopestalotiopsis* and *Quambalaria* sp. are phytopathogenic and cause diseases in several harbours. In Brazil, although relatively frequent in nurseries producing seedlings, *Neopestalotiopsis* hasn't identified at the species and *Quambalaria* level so far not reported under field conditions. In view of the importance of these diseases and the little knowledge available about these patossystems, it was sought to characterize molecular and morphologically as well as to prove the pathogenicity of the disease. In the first study, the isolates were submitted to multilocus analysis using two genetic regions  $\beta$ -tubulin (TUB) and elongation factor (TEF). The analysis of the sequences of genomic regions confirmed the presence of *Neopestalotiopsis australis*, *N. rosae* as the first report and the occurrence of a new species as a pathogen in *Eucalyptus* sp., Brazil. The morphological characterization allowed the identification of *N. australis* and *N. rosae* isolates, mainly based on differences in the size and shape of the conidia. Pathogenicity tests showed that the isolates were pathogenic for *eucalyptus* clones. The results obtained may contribute to the knowledge of the genus *Neopestalotiopsis* causing diseases in woody plants. In addition, this was the first report of the species *Neopestalotiopsis australis*, *N. rosae* as pathogens in *Eucalyptus* sp. in Brazil. In the second study sequences of five isolates obtained from leaves and cankers were compared to 21 sequences including the outgroup deposited at Genbank. The isolates were submitted to multilocus analysis using the ITS and LSU regions. The phylogenetic analysis of Maximum Parsimony and Bayesian Inference of combined sequences of the two studied regions grouped the isolates evaluated in the clade of *Q. eucalypti* and the morphological characteristics were similar to those described in the literature. The pathogenicity was confirmed, and the pathogen was again isolated from the inoculated plants confirming its morphological characteristics fulfilling Koch's postulates. This is the first report of *Q. eucalypti* causing leaf spot and cancer in *eucalyptus* under field conditions in Brazil. These results may contribute to the knowledge of isolates of *Q. eucalypti* that occur in Brazil under field conditions and establish protocols to select materials resistant to the pathogen.

**Keywords:** Canker, Stem Ringing, Forest Pathology and Molecular.



## SUMÁRIO

<b>PRIMEIRA PARTE</b> .....	12
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	13
2.1 Revisão taxonômica de <i>Neopestalotiopsis</i> .....	13
2.2 Revisão taxonômica de <i>Quambalaria eucalypti</i> .....	13
2.3 Importância dos patógenos ao eucalipto .....	14
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	16
<b>SEGUNDA PARTE</b> .....	18
<b>ARTIGO 1</b> .....	18
Introduction .....	20
Material and Methods .....	22
Molecular characterization.....	22
Morphological characterization .....	24
Pathogenicity test.....	24
Results.....	25
Molecular characterization.....	25
Morphological characterization .....	26
Taxonomy .....	28
Pathogenicity test.....	29
Discussion .....	29
<b>ACKNOWLEDGEMENTS</b> .....	32
<b>REFERENCES</b> .....	32
<b>ARTIGO 2</b> .....	45
Introdução .....	46
<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	48
Caracterização Molecular.....	48
Extração de DNA, amplificação e sequenciamento .....	48
Análises filogenéticas.....	49
Caracterização morfológica.....	49
Teste de patogenicidade .....	50
Resultados .....	50
Isolamento .....	50
Caracterização molecular .....	51
Caracterização morfológica.....	52
Teste de patogenicidade .....	52
Discussão .....	52
<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	54

## PRIMEIRA PARTE

### 1 INTRODUÇÃO

Entre todas as culturas exploradas no setor florestal, o destaque deve ser dado à cultura do eucalipto, considerada a árvore mais plantada no mundo. Essa espécie florestal é de grande importância para economia, por oferecer uma ampla gama de produtos como celulose, diversos tipos de papel, painéis de madeira, pisos laminados, painéis compensados, móveis, demais produtos sólidos de madeira, carvão vegetal e outras biomassas para fins energéticos (IBÁ, 2017).

Os plantios de eucalipto podem ser atacados por vários patógenos, principalmente por fungos, que podem estar presentes em diversas etapas do cultivo, no qual apresenta diferentes problemas sendo observados nas plantações, ocorrendo nos mais variados locais, espécies e épocas do ano reduzindo sua produção (ALFENAS et al., 2009). Entre esses patógenos que atacam eucalipto, *Neopestalotiopsis* e *Quambalaria* tem ocasionado danos no processo de estacas e miniestacas e em condições de campo.

Apesar da importância desses patógenos, pouco se conhece sobre sua classificação filogenética no Brasil. As espécies de *Neopestalotiopsis* segregadas recentemente do gênero *Pestalotiopsis* apesar de relativamente, frequente nos viveiros de produção de mudas, o patógeno ainda não foi identificado a nível de espécie no Brasil. *Quambalaria eucalypti* foi relatada baseada apenas em características morfológicas e de patogenicidade (ALFENAS et al., 2001). No entanto, não havia sido relatada em condições campo.

O presente trabalho foi dividido em dois artigos, que teve como objetivos caracterizar morfológica e filogeneticamente, bem como comprovar a patogenicidade dos isolados brasileiros de *Neopestalotiopsis* spp. e *Quambalaria* sp. em plantas de eucalipto.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Revisão taxonômica de *Neopestalotiopsis*

A posição taxonômica de *Pestalotiopsis* sp. foi problemática desde a sua descoberta, em 1949, onde nota-se o anamorfo de *Pestalosphaeria* M.E. Bar (1945). Pertencente ao reino Fungi; Filo Ascomycota; Classe Coelomycetes; Ordem Xylariales e a família Amphisphaeriaceae e estão amplamente distribuídos pelo mundo, existindo aproximadamente 253 espécies representadas na forma assexuada, e atualmente 13 formas sexuais descritas (JEEWON et al., 2004; MAHARACHCHIKUMBURA et al., 2011; REDDY et al., 2016).

*Pestalotiopsis* é um gênero anamórfico e monofilético caracterizado por conídios multicelulares septados com vários apêndices e coloração das células medianas. A septação conidial parece ser efetiva na colocação de táxons nos gêneros de *Amphisphaeriaceae* que são caracterizados por conídios de 4, 5 e 6 células. A morfologia dos conídios parece ser altamente informativa no nível de espécie, embora os conídios por si só não possam ser usados como um caracter para separação de gênero (MAHARACHCHIKUMBURA et al., 2011; CROUS et al., 2012; MAHARACHCHIKUMBURA et al., 2014) Além disso, algumas espécies também foram identificadas com base na ocorrência no hospedeiro em questão (EL-ARGAWY, 2015).

Recentemente esse gênero foi revisado e dois novos foram descritos, sendo eles *Neopestalotiopsis* e *Pseudopestalotiopsis*, propostos com base em características morfológicas e análises filogenéticas de regiões do DNA (MAHARACHCHIKUMBURA et al., 2014). As espécies de *Neopestalotiopsis* podem ser facilmente distinguidas dos outros dois gêneros por suas células medianas versicolor e conidióforos indistintos, que muitas vezes são reduzidos a células conidiogênicas.

Estas mudanças taxonômicas sucessivas de *Pestalotiopsis* spp. compete ao crescente uso de ferramentas moleculares para caracterizações associadas com análises biológicas e morfológicas que auxiliam na distinção e/ou classificação de novos taxa. Entretanto, mesmo que o gênero *Neopestalotiopsis* tenha sido taxonomicamente elucidado, estudos filogenéticos consecutivos são importantes para observar mudanças entre grupos taxonômicos.

### 2.2 Revisão taxonômica de *Quambalaria eucalypti*

O primeiro registro de uma espécie de *Quambalaria*, causando danos em eucaliptos em mudas de viveiro de *Corymbia maculata* (então *Eucalyptus maculata*) foi em New South Wales, Austrália, na década de 1950 (WALKER e BERTUS, 1971). O patógeno foi descrito como *Ramularia pitereka*. Logo foi observada uma doença da queima das brotações em *Eucalyptus grandis* na África do Sul em 1987, e o fungo causal mais tarde descrito por Wingfield et al. (1993) como *Sporothrix eucalypti* e *S. pusilla* foi descrita alguns anos depois por Braun (1998) a partir de manchas foliares *E. camaldulensis* na Tailândia. Outra espécie isolada de eucalipto uma vez colocada no gênero *Sporothrix* é *S. cyanescens* de Beer et al. (2006). Após algumas mudanças taxonômicas surgiu um novo gênero *Quambalaria* descrito por Simpson (2000) para acomodar *R. pitereka*, *S. eucalypti* e *S. pusilla*, e *S. cyanescen*. Uma nova família, Quambalariaceae, desde então tem sido descrita para as espécies de *Quambalaria* que incluem um número de espécies de eucalipto (do gênero *Eucalyptus* e *Corymbia*) como agentes patogênicos.

Dentro do gênero *Quambalaria* já foram descritas seis espécies que ocorrem em espécies de eucaliptos e na família das mirtáceas. Elas incluem *Q. cyanescens*, *Q. eucalypti*, *Q. coryecup*, *Q. pitereka*, *Q. simpsonii* e *Q. pusilla* e todas parecem ser nativas da Austrália, onde seus hospedeiros ocorrem naturalmente. As espécies foram descritas baseados em análises filogenéticas das regiões gênicas ITS e LSU (WALKER e BERTUS, 1971; WINGFIELD et al., 1993).

### 2.3 Importância dos patógenos ao eucalipto

*Eucalyptus*, originário da Austrália e ilhas vizinhas e, atualmente, a espécie florestal mais plantada no mundo, sendo que o Brasil possui uma área plantada equivalente a 5,7 milhões de hectares, com acréscimo de 2,4% em comparação com o ano anterior (IBÁ, 2017). Tal crescimento é reduzido dependendo das condições de manejo e da época do ano, com o aparecimento de algumas doenças seja na fase de produção de mudas em casa de vegetação ou em campo (ALFENAS et al., 2009). Dentre essas, *Neopestalotiopsis* e *Quambalaria eucalypti* são conhecidos por causar danos em mudas de eucalipto em minijardim clonal além de árvores jovens no campo.

A enfermidade incitada, por *Quambalaria eucalypti*, causa danos em mudas de *Eucalyptus* spp. caracteriza-se por manchas foliares e pelo anelamento da haste de mudas e de brotações de minicepas, o que pode reduzir consequentemente a produção de miniestacas para

enraizamento especialmente em épocas mais quentes do ano (ALFENAS et al., 2009). Sobre as lesões de coloração marrom clara a marrom escura, forma-se uma massa esbranquiçada de estruturas do fungo na face abaxial do limbo foliar. Na face adaxial as lesões apresentam coloração palha (ALFENAS et al., 2009).

O patógeno *Quambalaria eucalypti* (WINGFIELD, CROUS e SWART) Simpson (= *Sporothrix eucalypti*) foi relatado pela primeira vez a partir de viveiros na África do Sul, onde causou lesões nas folhas de plantações comerciais de *Eucalyptus grandis* (WINGFIELD et al., 1993). Foi considerado de menor importância na África do Sul até 2005, quando foi observado causando sérios danos em troncos em plantios com 1 ano de idade (ROUX et al., 2006). Na América do Sul, o patógeno foi relatado pela primeira vez no Uruguai, infectando galhos de *E. globulus* spp. (BETTUCCI et al., 1999), mas danos graves não foram observados neste país. *Quambalaria eucalypti* foi encontrado pela primeira vez no Brasil em 2000, causando lesões de brotos e folhas em *Eucalyptus* spp. (ALFENAS et al., 2001). Atualmente é responsável por causar significativos problemas durante a propagação clonal de *Eucalyptus* (ANDRADE et al., 2005; ALFENAS et al., 2009).

As espécies patogênicas do gênero *Neopestalotiopsis* entram em contato com o hospedeiro inicialmente por meio do inóculo primário, através da germinação de conídios e penetração de tubos germinativos. Apresentam lesões necróticas em folhas e hastes de estacas e miniestacas infectadas. Encontra-se, geralmente, associado a hospedeiros debilitados e a injúrias ocasionadas no processo de preparo de estacas e miniestacas e é por isso considerado um patógeno oportunista. As lesões foliares são pequenas e escuras, em consequência da exsudação de conídios na forma de cirros (ALFENAS et al., 2009; MAHARACHCHIKUMBURA et al., 2014).

De maneira geral há relatos deste patógeno em uma grande diversidade de hospedeiros por todo o mundo, causando danos com diferentes sintomas em espécies florestais, ornamentais, coníferas e frutíferas (ROSA e CAVALCANTI, 2005; SILVERIO et al., 2016; PARK et al., 2016). Os relatos na literatura do gênero *Neopestalotiopsis* causando danos aos hospedeiros se deve porque os seus esporos são de fácil disseminação no meio ambiente e penetram nos tecidos por ferimentos ou aberturas naturais, infectando os mais diversos hospedeiros, principalmente o eucalipto (CARMO et al., 2013; MAHARACHCHIKUMBURA et al., 2014)

Apesar da importância desses patógenos pouco se conhece sobre esses patossistemas. No entanto o controle das doenças é fundamental para a preservação das plantações de

eucalipto no Brasil, entretanto até o presente momento não há maneiras efetivas de prevenção ou controle. O uso de plantas nutricionalmente equilibradas favorecem para a redução do patógeno.

## REFERÊNCIAS

- ALFENAS, A.C., ZAUZA, E. A. V., ROSA, O. P., ASSIS, T. F. *Sporothrix eucalypti*, um novo patógeno do eucalipto no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, v.26, p.221, 2001.
- ALFENAS, A. C. et al. **Clonagem e doenças do eucalipto**. 2. ed. Viçosa: Ed. UFV, 2009. 500 p.
- ANDRADE, G. C.G., ALFENAS, A. C., MAFIA, R. G., MAFFIA, L. A., GONÇALVES, R. C. Escala diagramática para avaliação da severidade da mancha foliar do eucalipto causada por *Quambalaria eucalypti*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, p:504-509, 2005.
- BETTUCCI, L., ALONSO, R. AND TISCORNIA, S. Endophytic mycobiota of healthy twigs and the assemblage of species associated with twig lesions of *Eucalyptus globulus* and *E. grandis* in Uruguay. **Mycological Research**, v. 103, p: 468-472, 1999.
- BRAUN, U. (1998). A monograph of *Ramularia*, *Cercospora* and allied genera (phytopathogenic hyphomycetes). IHW-Verlag, Eching.
- CARMO, A.L.M.; GARCIA, F.A.O.; PERES, F.S.B. Ocorrência de minicancro em *Eucalyptus viminalis* Labill. no Brasil. **Enciclopédia Biosfera**, v.9, n.16, p.1634, 2013.
- CROUS P. W., VERKLEY G. J. M., GROENEWALD J. Z., 2009. **Fungal biodiversity**. Vol. 1. Centraalbureau voor Schimmelcultures; Utrecht, Netherlands. 269p.
- DE BEER, Z.W., BEGEROW, D., BAUER, R., PEGG, G.S., CROUS, P.W. AND WINGFIELD, M.J. Phylogeny of Quambalariaceae fam. nov., including important *Eucalyptus* pathogens from South Africa and Australia. **Studies in Mycology**, v. 55, p: 289-298, 2006.
- EL-ARGAWY, E. Characterization and control of *Pestalotiopsis* spp. the causal fungus of guava scabby canker in el-beheira governorate, Egypt. **International Journal of Phytopathology**, v. 4, n. 3, p: 121-136, 2015.
- IBÁ - Indústria Brasileira de Árvores.  
[http://iba.org/images/shared/Biblioteca/IBA\\_RelatorioAnual2017.pdf](http://iba.org/images/shared/Biblioteca/IBA_RelatorioAnual2017.pdf). Acesso 03 janeiro 2017
- JEEWON, R. et al. Phylogenetic relations of *Pestalotiopsis* and allied genera Inferred from ribossomal DNA sequences and morphological characters. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.25, p:378-392, 2002.
- JEEWON, R.; LIEW, E.C.Y.; HYDE K.D. Phylogenetic evaluation of species nomenclature of *Pestalotiopsis* in relation to host association. **Fungal Diversity**, n.17, p.39-55, 2004.

- MAHARACHCHIKUMBURA S. S. N., GUO L. D., CHUKEATIROTE E., BAHKALI H. A., HYDE D. A. *Pestalotiopsis* - morphology, phylogeny, biochemistry and diversity. **Fungal Diversity**, v 50, p: 167–187, 2011.
- MAHARACHCHIKUMBURA S. S. N., HYDE K. D., GROENEWALD J. Z., CROUS P. W. *Pestalotiopsis* revisited. **Studies in Mycology**, v. 79, p: 121-186, 2014.
- PARK, S. et al. First Report of *Neopestalotiopsis australis* Isolated from Soil in Korea. **The Korean Society of Mycology**, v. 44, p:360-364, 2016.
- REDDY M. S., MURALI T. S., SURYANARAYANAN T. S., GOVINDARAJULU M. B., THIRUNAVUKKARASU N. *Pestalotiopsis* species occur as generalist endophytes in trees of Western Ghats forests of southern India. **Fungal Ecology**, v. 24, p: 70-75, 2016.
- ROSA, R.C.T. ; CAVALCANTE, V. A. L. B. Queda de folíolos em *Parkia pendula* causada por *Pestalotiopsis* sp. no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, n°6, p: 672, 2005.
- ROUX, J., MTHALANE, Z. L., DE BEER, Z. W., EISENBERG, B., WINGFIELD, M. J. *Quambalaria* leaf and shoot blight on *Eucalyptus nitens* in South Africa. **Australasian Plant Pathology**. v. 35, p:427-433, 2006.
- SILVÉRIO, M. L. et al. A new epifoliar species of *Neopestalotiopsis* from Brazil. **Agrotrópica**, v. 28, p:151-158, 2016.
- SIMPSON, J.A. *Quambalaria*, a new genus of eucalypt pathogens. **Australian Mycologist**, v. 19, p: 57-62, 2000.
- WALKER, J. AND BERTUS, A.L. Shoot blight of *Eucalyptus* spp. caused by an undescribed species of *Ramularia*. **Proceedings of the Linnean Society of New South Wales**, ser. v. 2, n°. 96, p: 108-115, 1971.
- WINGFIELD, M. J., CROUS, P. W., SWART, W. J. *Sporothrix eucalypti* (sp. nov.), a shoot and leaf pathogen of *Eucalyptus* in South Africa. **Mycopathologia**. v. 123, p:159–164. 1993.

**SEGUNDA PARTE****ARTIGO 1****Stem rot of eucalyptus cuttings caused by species of *Neopestalotiopsis* in Brazil****Running title: *Neopestalotiopsis* in eucalyptus**

REGINALDO G. MAFIA<sup>1</sup>, GIZELI S. SANTOS<sup>2</sup>, A.M. AGUIAR<sup>1</sup>, T.G. ZARPELON<sup>1</sup>,  
M.B. DAMACENA<sup>1</sup>, MARIA A. FERREIRA<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Fibria Celulose S.A. Centro de Tecnologia. Rod. Aracruz Barra do Riacho, Km 25. 29197-900, Aracruz, ES, Brazil; <sup>2</sup>Universidade Federal de Lavras - UFLA. Departamento de Fitopatologia

Corresponding author: Maria Alves Ferreira, +55 (35)-3829-1799, [ferreirama.ufla@gmail.com](mailto:ferreirama.ufla@gmail.com).

Article prepared in accordance with the standards of the Phytopathologia Mediterranea Journal

**Summary.** In Brazil, the fungus *Neopestalotiopsis* (= *Pestalotiopsis*) is known to cause disease in eucalyptus seedlings. However, although it occurs relatively frequently in seedling nurseries, the pathogenic species have yet to be identified. Thus, the aim of the present work was to perform a morphological and phylogenetic characterization to identify the aetiological agent. For this purpose, the isolates were subjected to a multilocus analysis using the two gene regions  $\beta$ -tubulin (TUB) and the translation elongation factor (TEF). Based on the genomic sequences, two known species and one new species of the pathogen were identified. After confirmation of their pathogenicity, *Neopestalotiopsis australis* and *Neopestalotiopsis rosae* were confirmed as new reports in eucalyptus. In addition, in this study, a new species called *Neopestalotiopsis brasiliensis* is described. Morphological



characterization allowed for the confirmation of the *N. australis* and *N. rosae* isolates, primarily based on differences in the size and shape of the conidia. For *N. brasiliensis*, no morphological marker was found that separated it from the other species within the genus. The results confirm the existence of at least three *Neopestalotiopsis* species as aetiological agents of leaf spot and stem rot in eucalyptus seedlings in Brazil.

**Key words:** Nursery diseases, eucalypti, forestry pathology, *Neopestalotiopsis brasiliensis*

## Introduction

In Brazil, the fungus *Neopestalotiopsis* (= *Pestalotiopsis*) causes leaf spot and stem rot in eucalyptus plants. Although it is relatively common in nurseries that produce seedlings, the pathogen has not been identified yet. The disease usually occurs in weakened seedlings, and pathogen infections start from injuries caused by the vegetative propagation process. The environmental conditions required for the vegetative propagation of eucalyptus also favour the occurrence of the disease. Due to the combination of these specific conditions for the establishment of the disease, the pathogen has been considered secondary and opportunistic, although no more specific studies on the aetiology of the disease have been performed (Alfenas et al., 2009).

*Pestalotiopsis* species are phytopathogenic, causing various diseases such as canker lesions, shoot dieback, needle blight, tip blight, scabby canker, leaf spots, grey blights, leaf blights, and fruit rot as well as post-harvest damage, sometimes resulting in considerable economic loss. *Pestalotiopsis* species are common pathogens that cause a variety of diseases, reduce production and cause economic losses in apple, blueberry, coconut, chestnut, ginger, grapevine, guava, hazelnut, lychee, mango, orchid, peach, tea and wax apple due to disease. They also commonly occur as saprotrophs in the leaf litter of many plant species. *Pestalotiopsis* species have been recovered from soil, polluted stream water, wood, paper, fabrics, and wool (Reddy et al., 2016; Maharachchikumbura et al., 2014). Recent studies have shown that several species of *Pestalotiopsis* cause symptomless infections in plant tissues (Debbab et al., 2013) including the bark of trees (Murali et al., 2013). Some species have been associated with human and animal infections, and others have also been isolated from extreme environments (Maharachchikumbura et al., 2014).

*Pestalotiopsis* is an anamorphic and monophyletic genus characterized by multicellular conidia bearing appendages, and it is widely distributed throughout tropical and temperate regions. The *Pestalotiopsis* genus has numerous species, with at least 253 represented as the asexual form. To date, only 13 sexual morphs have been recorded in the literature, and they were previously treated as species of *Pestalosphaeria* (Maharachchikumbura et al., 2011; Reddy et al., 2016). Recently, the *Pestalotiopsis* genus was reviewed, and two novel genera from *Pestalotiopsis*, namely, *Neopestalotiopsis* and *Pseudopestalotiopsis*, were proposed on the basis of morphological and DNA data (Maharachchikumbura et al., 2014).

Recently, the occurrence of rot in eucalyptus grafted plants with typical symptoms of the disease caused by *Pestalotiopsis* sp. was observed. The symptoms were observed in young plants at four months of age, which were used for grafting. Infections by the pathogen began at the sites where the lateral branches were pruned, and they progressed towards the primary stem of the plant, which often resulted in deterioration and death. Considering the conditions in which the disease occurred, which were less favourable than those normally observed during the clonal propagation of eucalyptus, the aim of this work was to study the disease aetiology.

## **Material and Methods**

### **Isolation**

The disease was observed in 6-month-old eucalyptus plants used as rootstock, in July 2016, in a research area in Jacareí, state of São Paulo (SP), Brazil. The climate of the region is Cfa according to the Köppen classification, which is characterized as a humid climate with a hot summer, with an average annual temperature of 19.3 °C, an altitude of 634 m and an annual rainfall of 1396 mm (Alvares et al., 2013). Samples of diseased seedlings exhibiting acervuli and conidia were used to obtain the pathogen isolates. The fungus was isolated directly by diluting the conidia in 2% PDA (potato, dextrose and agar) culture medium to obtain monosporic cultures (Crous et al., 2009)

### **Molecular characterization**

Nine pure cultures (PA1 to PA7, PA9 and PA10) were grown on PDA medium at 25 °C for 10 days to obtain sufficient fungal biomass for DNA extraction. Mycelium was scraped from the surfaces of actively growing cultures, placed in a frozen mortar and pestle containing liquid nitrogen and ground into a fine powder. DNA extractions were performed using the Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI, USA) according to the manufacturer's instructions. The DNA quality and quantity were checked using a NanoDrop® (Thermo Fisher Scientific). DNA samples were diluted to 50 ng/μl, and 1 μl was used in each PCR reaction.

The β-tubulin gene was amplified using the primers BT1 and BT-2b (TUB) (Glass and Donaldson, 1995; O'Donnell et al., 1998). The elongation factor gene (TEF) was amplified using the primers EFE1-728F and EF2 1-alfa (TEF) (O'Donnell et al., 1998; Carbone and Kohn, 1999). All PCR reactions were prepared in a final volume of 25 μl using 2,5 μl of 10X

Reaction Buffer, 2,5 µl of MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 0.5µL of dNTPs (10 mM), 0.5 µL of each primer (10 µM), 1µL of DNA solution and 0.3 µL of Taq polymerase using the GoTaq® DNA Polymerase (Promega, Madison, WI, USA), 18.1 µL of MiliQ water, and were performed in a thermocycler (My Cycler™ BIO-RAD), and the conditions were adjusted for each gene as previously described (Glass and Donaldson, 1995; O'Donnell et al., 1998; Carbone and Kohn, 1999). The consistency index (CI), retention index (RI) and composite index (CR) were calculated.

The purification of the PCR products and sequencing were performed by Macrogen Company (Korea). The generated electropherograms were edited using SeqAssem Software (Hepperle, 2004). Sequences from previous studies and sequences that were publically available in GenBank (Table 1) for species in the *Pestalotiopsis* and *Neopestalotiopsis* genera were used for the phylogenetic analysis. The sequences generated in this study were deposited in the NCBI GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

Multiple alignments of nucleotide sequences were constructed using the CLUSTALW Program (Thompson et al., 1994) and MEGA 6.0 software (Tamura et al., 2013). The sequences were manually edited when needed. Phylogenetic trees were constructed using PAUP\* software version 4.0 (Swofford, 2002) using Maximum parsimony (MP) and MRBAYES 3.2.1 (Ronquist et al., 2012). A bootstrap analysis (1000 replicates) was also performed on the dataset to determine the confidence levels of the branches. Bayesian inference was used to generate posterior probabilities (PP) for the consensus nodes using MRBAYES (Huelsenbeck, 2001). The Monte Carlo Markov Chain (MCMC) (Larget and Simon, 1999) was run for 1,000,000 generations using the appropriate substitution evolution model determined by jModelTest. The trees were viewed and edited in FigTree 1.3.1. (<http://tree.bio.ac.uk/software>). The combination of the two genes was determined with a partition homogeneity test (PHT) (Farris et al., 1995).

The trees were constructed using 74 aligned sequences, including the nine sequences of *Eucalyptus* hybrid isolates and the *Xylaria hypoxylon* outgroup, according to Maharachchikumbura et al. (2014).

### **Morphological characterization**

The fungal structures and fruiting bodies that originated from herbarium material and plates containing the isolates were selected based on the phylogenetic analysis and used for the morphological characterization. Morphological descriptions were made for isolates cultured in PDA medium at 25 °C with a photoperiod of 12 hours. Eucalyptus stems containing acervuli were used to analyse these structures. The predominant colour of the colony grown on PDA was determined by comparing it with Rayner's colour chart (1970). Microscopic preparations were made in distilled water, with 30 measurements per structure, and were observed under an LX400 microscope with Capture Pro software V2.8.8.5. Measurements of the conidiomata, conidiogenous cells, the conidial cells including the basal cell, three median cells, apical cell and apical and basal appendages were taken. The photos were captured on a Nikon Eclipse E-200 LED binocular microscope.

### **Pathogenicity test**

To test for pathogenicity, five isolates (PA1, PA2, PA3, PA4, and PA5) were inoculated in ten plants aged 90 days each. For the inoculations, mycelial discs were inoculated on the stem. For this purpose, the isolates used here were cultured in Petri dishes containing PDA medium and maintained for 7 days at 25 °C, with a photoperiod of 12 hours. After incubation, 5-mm-diameter mycelial discs were placed at the site of injury of each plant, which also measured 5 mm in diameter. The fragment was covered with plastic film to

maintain moisture and to protect the lesion from desiccation. The controls received only one disc containing PDA, without the fungus. After 18 days of inoculation, the lengths of the external and internal lesions caused by the pathogen were measured. The experiment was performed in a completely randomized design consisting of six treatments (five isolates and one control). The data were subjected to an analysis of variance, and the means were compared by Tukey's test ( $p < 0.05$ ). After the pathogenicity was confirmed, the pathogen was again isolated from the inoculated plants and the morphological characteristics of the fungus were compared to fulfil Koch's postulates.

## **Results**

### **Isolation**

Ten isolates were obtained from the acervuli and conidia associated with diseased *Eucalyptus* spp. seedlings. Only the asexual phase was found, and the primary symptoms were observed in young plants at four months of age, which were used for grafting. Pathogen infections began at sites where the lateral branches were pruned and then progressed towards the primary stem of the plant, often resulting in plant death.

### **Molecular characterization**

Phylogenetic trees were generated using maximum parsimony (MP) and Bayesian inference (BI) for the amplified regions (TUB and TEF). The phylogenetic analysis included 56 additional sequences of *Neopestalotiopsis* spp. and eight *Pestalotiopsis* spp., including the *Xylaria hypoxylon* outgroup, as obtained from GenBank. Trees generated for the two gene regions presented similar topologies based on both parsimony and Bayesian methods. The partition homogeneity test ( $P = 0.01$ ) showed that the data sets (TUB and TEF) had the same

topology and could be combined. The concatenated DNA sequences of the two regions contain 1403 characters of the 74 isolates resulting in 476 constant, 575 parsimony uninformative and 352 parsimony informative characters. One hundred trees with 1448 steps were generated, with CI of 0.84, RI of 0.92 and CR of 0.76 for all the parsimony informative and uninformative sites.

The combined tree showed that the isolates sequenced in this study were grouped into different clades. It was possible to classify the PA1 and PA5 isolates as *Neopestalotiopsis australis* and the PA2 and PA9 isolates as *Neopestalotiopsis rosae* (Figure 1). The branch was supported by high bootstrap values (95% and 83%, respectively) and posterior probability (0.92 and 0.99, respectively). Isolates PA3, PA4, PA6, PA7 and PA10 were grouped into a new clade supported by high bootstrap and posterior probability values, at 86% and 0.97, respectively (Figure1).

### **Morphological characterization**

Isolates PA1 (*N. australis*) and PA2 (*N. rosae*) were selected for morphological characterization based on the results of the phylogenetic analyses. There was no variation in the colour between the isolates when they were grown in PDA medium. The spores were characterized by conidia with five cells, three coloured medial cells (equally pigmented), hyaline terminal cells and appendages originating from the apex of the apical cell.

*Neopestalotiopsis australis* (Figure 2). Conidiomata in PDA, globose or clavate, aggregate or dispersed, semi or fully immersed, black, 200-500  $\mu\text{m}$  in length; exuding globose conidial masses, dark brown to black; indistinct conidiophores, often reduced to conidiogenous cells. Discrete, hyaline, rough-walled conidiogenous cells, single, 2.5-4.0  $\mu\text{m}$  in height and 8.5-14.0  $\mu\text{m}$  in length. Conidium fusoid, ellipsoid, straight to slightly curved, 4



septa. Conical to obconical basal cell with a truncated, hyaline, highly verruculose and thin-walled base, 2.0-3.5 x 3.0-5.0  $\mu\text{m}$  in length; three medial cells, brown, with one septum darker than the rest of the cell (second basal cell: 3.0-4.0 x 3.0-6.0  $\mu\text{m}$  in length; third cell: 4.0-5.0 x 3.5-6.82  $\mu\text{m}$  in length, fourth cell 3.5-5.0 x 5.0-5.5  $\mu\text{m}$  in length); apical cell 2.0 -3.0 x 3.0-5.00  $\mu\text{m}$  in length, hyaline, cylindrical to sub-cylindrical, thin-walled, with 2-3 apical tubular appendages (mainly 3), arising from the apical crest, unbranched, filiform, 20 to 27  $\mu\text{m}$  in length. Basal appendix single, tubular, unbranched, centred, 3.0-6.5  $\mu\text{m}$  in length. Colonies on PDA reaching 55-60 mm in diameter after 10 days at 25 °C, white, with dense aerial mycelium on the surface with black and concentric conidiomata, and reverse of similar colour.

*Neopestalotiopsis rosae* (Figure 3). Conidiomata, globose, solitary, semi-immersed, black, exuding masses of conidia and dark brown to black; indistinct conidiophores, often reduced to conidiogenous cells; discrete, cylindrical, hyaline, smooth-walled conidiogenous cells, single, with truncated apex with visible periclinal thickening, 2-5 X 5-18  $\mu\text{m}$  in length; conidium fusoid, ellipsoid, straight to slightly curved, 4 septa; conical to obconical basal cell with a truncated base, hyaline, rough and thin-walled, 3.5 to 6.0  $\mu\text{m}$  in length, often with a small basal appendix; three medial cells with light brown to dark pigmentation with a rough wall, and one septum darker than the rest of the cell (second cell from the base pale brown, 3.5-3.0 x 4.5-5.6  $\mu\text{m}$  in length; third cell golden brown 3.5-5.0 x 4.5-7.0  $\mu\text{m}$  in length; fourth cell brown, 3.5-4.5 x 4.5 to 7.0  $\mu\text{m}$  in length); apical cell of 3.5- 3.0 x 4.5-5.5  $\mu\text{m}$  in length, hyaline, cylindrical, thin and smooth-walled with 3-5 apical tubular appendages, not arising from the apical crest, but each inserted at a different locus in the upper half of the apical cell, unbranched, filiform, 20-31 mm in length; single basal appendix, tubular, unbranched, centred, 4.5-7.5  $\mu\text{m}$  in length. A colony of the pathogen in the PDA culture medium showed light mycelium staining (50-60 mm / day) after 10 days at 25 °C.

## Taxonomy

Based on the results of the TUB and TEF sequence analyses together with an evaluation of the literature and morphology, a new species (PA3, PA4, PA6, PA7 and PA10) was proposed using the branch supported by high bootstrap (86%) and high posterior probability values. This result confirms the occurrence of this species in Brazil.

*Neopestalotiopsis brasiliensis* R. G. Mafia, G. S. Santos, & M. A. Ferreira, **sp. nov.** Figure 5

**Etymology:** Related to the country where it was collected, Brazil.

**Asexual Morphology:** Conidiomata acervular or picnidial in culture in PDA, globose, solitary or aggregate, semi or partially immersed and totally immersed, black, 100-500  $\mu\text{m}$  in diameter; exuding globose, viscous and black conidial masses; indistinct conidiophores, often reduced to conidiogenous cells; conidiogenous cells discrete, hyaline, rough-walled, single, 1.5-4.5  $\times$  9.0-20.5  $\mu\text{m}$ ; conidium fusoid, ellipsoid, straight to slightly curved, 5 cells (4 septa); basal cell with a truncated base, hyaline, rough and thin-walled, 2.0-3.5  $\times$  1.5-6.0  $\mu\text{m}$  in length; three medial cells light brown, septum darker than the rest of the cell (second cell from the base, 3.0-5.0  $\times$  3.5-5.5  $\mu\text{m}$  in length; third cell: 3.5-5.5  $\times$  3.0-4.6  $\mu\text{m}$  in length, fourth cell: 3.0-5.0  $\times$  3.0-5.0  $\mu\text{m}$  in length); apical cell 6.0-3.0  $\times$  3.0-5.5  $\mu\text{m}$  in length, hyaline, sub-cylindrical to obconical, thin-walled; with 2-4 apical tubular appendages, arising from the apical crest, unbranched, filiform, flexuose, 12-27  $\mu\text{m}$  in length; basal appendix single, tubular, unbranched, centred, 3-7  $\mu\text{m}$  in length.

**Culture Characteristics:** Colonies on PDA reaching 50-70 mm in diameter after 10 days at 25 °C, mycelium white, odourless, exudate-free, with dense aerial mycelium on the surface with concentric and black conidiomata; Reverse smooth, pale cream. Mycelium hyaline, septate, neutral and smooth hyphae.

**Habitat:** *Eucalyptus* sp.

**Distribution:** Brazil.

**Material examined:** Brazil, July 2016, in a research area in the Jacareí region, in the Ribeira River valley-SP, 23°18'10" S and 45°17'31" W, observed in six-month-old rootstocks in July 2016.

**Notes:** The proposed new species, *N. brasiliensis*, differs from other species in terms of size, number of appendages and colour of medial cells. In this study, both the conidiomata and conidia that developed in PDA presented similar characters relative to the other described species. According to Maharachchikumbura et al. (2014), the conidia obtained from nature are generally more uniform in size and morphology than those obtained from artificial media.

### **Pathogenicity test**

The inoculations with the fungal isolates led to disease development in all plants. However, there was variation in the disease intensity according to the chosen isolate. The PA3 isolate caused greater disease severity, as expressed in terms of lesion length. The isolate PA5 showed intermediate severity, and the other isolates (PA1, PA2 and PA4) presented the lowest disease severity. Plants inoculated with a PDA disc without the fungus showed no disease (Figure 5). Koch's postulates were fulfilled through the isolation of the same fungus from the inoculated plants.

### **Discussion**

Based on the phylogenetic analyses of the combined TUB and TEF gene regions as well as the morphological characteristics, two species of *Neopestalotiopsis* (*N. australis* and *N. rosae*) were reported for the first time as aetiological agents of leaf spot and stem rot in

eucalyptus seedlings. In addition, a new species, *N. brasiliensis*, was described in the same host in Brazil. *Neopestalotiopsis rosae* was first reported in lesions in rose stems and *Paeonia suffruticosa*, whereas *N. australis* was first observed on the leaves and stem of *Vitis vinifera* and *Achras sapota* (Maharachchikumbura et al., 2014).

In Brazil, it was believed that these diseases in eucalyptus were caused by only one species belonging to the genus *Pestalotiopsis* (Alfenas et al., 2009). However, according to the results of this study, there is a complex of at least three species of this pathogen belonging to the genus *Neopestalotiopsis*. Maharachchikumbura et al. (2014) performed a phylogenetic reconstruction of the *Amphisphaeriaceae* family based on the morphology and phylogenetic analysis of rDNA (ITS) and 28S rRNA (LSU) sequences and of  $\beta$ -tubulin (BT) and elongation factor 1-alpha (TEF) genes. The alignment of the LSU region was used to determine where to place the genera of the *Pestalotiopsis* isolates within the family Amphisphaeriaceae. In a 2012 study, Maharachchikumbura et al. analysed ten genomic regions and found that the combined TUB and TEF regions have better resolution for species description. In 2014, Maharachchikumbura et al. used the ITS, TUB, and TEF regions in combination to define the species. The authors proposed two new genera segregated from *Pestalotiopsis*, *Neopestalotiopsis* and *Pseudopestalotiopsis*. In the present study, the ITS region did not present sufficient resolution to define the species; in addition, it did not present the same topology for the TUB and TEF trees. Therefore, it was removed from the study.

In this study, the sequences that clustered with clade 22 showed morphology similar to that of *N. australis*. As described in Maharachchikumbura et al. (2014), even though the species were separated phylogenetically and ecologically, they are morphologically similar. The morphology of *Neopestalotiopsis* sp. (clade 22) described in this study corroborates those observed by Maharachchikumbura et al. (2014) and Sangkyu Park et al. (2016). However, the morphological characters may vary based on the host and the environment.

The sequences of the isolates that clustered within the *N. rosae* clade described in this study presented one of the primary characteristics that differentiate it from other species, namely, the number of apical tubular appendages (3 to 5) that arise not from the apical crest but from different sites in the upper half of the apical cell. These results are consistent with those described by Maharachchikumbura et al. (2014).

The new species described in this study was named *N. brasiliensis*. Phylogenetic analyses of the TUB and TEF sequences showed that *N. brasiliensis* forms a distinct clade with bootstrap support of 86%. The versicolour morphology of the conidia, which is characteristic of the genus *Neopestalotiopsis*, corroborates the results of the molecular analyses. In this study, both the conidiomata and conidia developed in PDA presented similar characteristics compared to the other described species. However, no morphological marker was found that could differentiate it from the other species within the genus.

The species *N. australis*, *N. rosae* and *N. brasiliensis* were pathogenic to eucalyptus. However, the (PA3) isolate of *N. brasiliensis* was more aggressive in the pathogenicity tests. Due to this result, it would be interesting to conduct a more comprehensive evaluation of the pathogen population to determine if there are more pathogenic species and to evaluate the variability in virulence within this complex of species.

The symptoms observed in diseased plants were typical of diseases caused by opportunistic fungi. Lesions started in the sites where the lateral branches had been pruned, demonstrating that the penetration of the pathogen occurred indirectly through these injuries. This pattern of infection is similar to that observed in eucalyptus mini-cutting rot (Alfenas et al., 2009). However, in the present study, the disease was observed in older seedlings after the clonal propagation process and under environment conditions less favourable to the pathogen. Thus, it is believed that this pathogen, which was initially considered opportunistic, should be further studied, together with the epidemiology of the disease.

The results obtained and presented in this study will help increase our knowledge about diseases caused by species in the *Neopestalotiopsis* genus in woody plants. In addition, there may be many more cryptic species within the family *Amphisphaeriaceae*. For eucalyptus, the disease has been shown to be caused by a complex of at least three species, and *N. australis* and *N. rosae* as well as a new species named *N. brasiliensis* have been reported for the first time.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank the Federal Agency for Support and Evaluation of Graduate Education (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES), National Council for Scientific and Technological Development (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq), Minas Gerais State Research Foundation (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais - FAPEMIG), and the company Fibria Celulose SA for funding.

## REFERENCES

- Alfenas, A.C., Zauza, E.A.V., Mafia, R.G., Assis, T. F., 2009. *Clonagem e doenças do eucalipto*. 2. ed. UFV: Viçosa, 500p.
- Alvares C. A. Stape, José L, Sentelhas P. C., de Moraes G., José L. Sparovek, Gerd. (2013). "Köppen's climate classification map for Brazil" (em inglês). *Meteorologische Zeitschrift* 22 (6): 711–728. doi: 10.1127/0941-2948/2013/0507
- Carbone I., Kohn L. M., 1999. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia* 91: 553–556.

- Crous P. W., Verkley G. J. M., Groenewald J. Z., 2009. *Fungal biodiversity*. Vol. 1. Centraalbureau voor Schimmelcultures; Utrecht, Netherlands. 269p.
- Debbab A., Aly A. H., Proksch P., 2013. Mangrove derived fungal endophytes e a chemical and biological perception. *Fungal Diversity*. 61: 1-27.
- Farris J. S., Kallersj M., Kluge A. G., Bult C., 1994. Testing significance of incongruence. *Cladistics* 10: 315–319.
- Glass N. L., Donaldson G. C., 1995. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Applied and Environmental Microbiology* 61: 1323–133.
- Hepperle D., 2004. SeqAssem©. A sequence analysis tool, contig assembler and trace data visualization tool for molecular sequences. <http://www.sequentix.de>.
- Huelsenbeck J. P., Ronquist F. Mrbayes., 2001. Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17: 754–755.
- Larget B., Simon D, 1999. "Markov Chain Monte Carlo Algorithms for the Bayesian Analysis of Phylogenetic Trees." *Molecular Biology and Evolution* 16: 750-759.
- Maharachchikumbura SSN, Guo LD, Cai L, et al. 2012. A multi-locus backbone tree for *Pestalotiopsis*, with a polyphasic characterization of 14 new species. *Fungal Diversity* 56: 95–129.
- Maharachchikumbura S. S. N., Guo L. D., Chukeatirote E., Bahkali H. A., Hyde D. A, 2011. *Pestalotiopsis* - morphology, phylogeny, biochemistry and diversity. *Fungal Diversity* 50: 167–187.
- Maharachchikumbura S. S. N., Hyde K. D., Groenewald J. Z., Crous P. W, 2014. *Pestalotiopsis* revisited. *Studies in Mycology* 79: 121-186.
- Murali T. S., Thirunavukkarasu N., Govindarajulu M. B., Suryanarayanan T. S, 2013. Fungal communities of symptomless barks of tropical trees. *Mycosphere* 4: 627-637.
- O'donnell K., Kistler H. C., Cigelnik E, 19998. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene

- genealogies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America* 95: 2044–2049.
- Rayner R.W, 1970. *A mycological colour chart*. CMI and British Mycological Society; Kew, UK. 34p.
- Reddy M. S., Murali T. S., Suryanarayanan T. S., Govindarajulu M. B., Thirunavukkarasu N, 2016. *Pestalotiopsis* species occur as generalist endophytes in trees of Western Ghats forests of southern India. *Fungal Ecology* 24: 70-75.
- Ronquist F., Teslenko M., Mark P. Van Der, 2012. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology*. 61: 539–542.
- Sangkyu Park., Seung-Yeol Lee., Jae-Jin Lee., Chang-Gi Back., Ten Leonid., Hyang Burm, Lee., Hee-Young Jung, 2016. First Report of *Neopestalotiopsis australis* Isolated from Soil in Korea. *Journal of Mycology*. 44: 360-364.
- Shara J. K. C. M., E. J. M. Florence, 1990. "Diseases of forest trees in Kerala. 6. Leaf diseases of eucalypts in plantations." *Evergreen (Trichur)* 25: 12-15.
- Swofford, D.L, 2002. *Paup: Phylogenetic analysis using parsimony*, version 4.0b10. Sinauer, Sunderland.
- Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S, 2011. Mega5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*. 28: 2731–2739.
- White T. J., Bruns T., Lee S, 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis M. A., Gelfand D. H., Sninsky J. J., White T. J. editors. PCR protocols: a guide to methods and applications. *Academic Press*; San Diego, California: 315–322p.



Table 1. Species, number of cultures, host/substrate, location, and Genbank accession number of *Neopestalotiopsis* e *Pestalotiopsis* and outgroups sequences included in this study.

SPECIES	N° CULTURES ACCESSION. <sup>a</sup>	HOST/ SUBSTRATE	LOCATION	GenBank accession number	
				TEF	TUB
<i>Neopestalotiopsi</i>					
<i>s australis</i>	PA1	<i>Eucalyptus</i> sp.	Brazil	X	X
<i>N. rosae</i>	PA2	<i>Eucalyptus</i> sp.	Brazil	X	X
<i>N. brasiliensis</i>	PA3	<i>Eucalyptus</i> sp.	Brazil	X	X
<i>N. brasiliensis</i>	PA4	<i>Eucalyptus</i> sp.	Brazil	X	X
<i>N. australis</i>	PA5	<i>Eucalyptus</i> sp.	Brazil	X	X
<i>N. brasiliensis</i>	PA6	<i>Eucalyptus</i> sp.	Brazil	X	X
<i>N. brasiliensis</i>	PA7	<i>Eucalyptus</i> sp.	Brazil	X	X
<i>N. rosae</i>	PA9	<i>Eucalyptus</i> sp.	Brazil	X	X
<i>N. brasiliensis</i>	PA10	<i>Eucalyptus</i> sp.	Brazil	X	X
<i>N. aotearoa</i>	CBS36754	Canvas	New Zealand	KM199526	KM199454
<i>N. asiática</i>	MFLUCC 12- 0286	Unidentified tree	China	JX399049	JX399018
<i>N. australis</i>	CBS 114159	<i>Telopea</i> sp.	Australia: New South Wales	KM199537	KM199432
<i>N. chrysea</i>	MFLUCC12026 1	Dead leaves	China	JX399051	JX399020

<i>N. chrysea</i>	MFLUCC12026 2	Dead plant	China	JX399052	JX399021
<i>N. clavispora</i>	CBS44773	Decaying wood	Sri Lanka	KM199539	KM199443
<i>N. clavispora</i>	MFLUCC12028 0	<i>Magnolia</i> sp.	China	JX399044	JX399013
<i>N. clavispora</i>	MFLUCC12028 1	<i>Magnolia</i> sp.	China	JX399045	JX399014
<i>N. cubana</i>	CBS60096	Leaf litter	Cuba	KM199521	KM199438
<i>N. ellipospora</i>	CBS115113	<i>Ardisia crenata</i>	Hong Kong	KM199544	KM199450
<i>N. ellipospora</i>	MFLUCC12028 3	Dead plant materials	China	JX399047	JX399016
<i>N. ellipospora</i>	MFLUCC12028 4	Dead plant materials	Thailand	JX399046	JX399015
<i>N. eucalypticola</i>	CBS26437	<i>Eucalyptus globulus</i>	*	KM199551	KM199431
<i>N. foedans</i>	CGMCC39123	Mangrove plant	China	JX399053	JX399022
<i>N. foedans</i>	CGMCC39178	<i>Neodypsis decaryi</i>	China	JX399055	JX399024
<i>N. foedans</i>	CGMCC39202	<i>Calliandra haematocephala</i>	China	JX399054	JX399023
<i>N. formicarum</i>	CBS11583	Plant debris	Cuba	KM199519	KM199444
<i>N. formicarum</i>	CBS36272	Dead Formicidae (ant)	Ghana	KM199517	KM199455

<i>N. honoluluana</i>	CBS111535	<i>Telopea</i> sp.	USA: Hawaii	KM199546	KM199461
<i>N. honoluluana</i>	CBS114495	<i>Telopea</i> sp.	USA: Hawaii	KM199548	KM199457
<i>N. javaensis</i>	CBS 257.31	<i>Cocos nucifera</i>	Indonesia: Java	KM199543	KM199437
<i>N. magna</i>	MFLUCC12652	<i>Pteridium</i> sp.	France	KF582791	KF582793
<i>N. mesopotamica</i>	CBS29974	<i>Eucalyptus</i> sp.	Turkey	KM199541	KM199435
<i>N. mesopotamica</i>	CBS33686	<i>Pinus brutia</i>	Iraq	KM199555	KM199441
<i>N. mesopotamica</i>	CBS46469	<i>Achras sapota</i>	India	*	KM199436
<i>N. macadamiae</i>	BRIP63736a	*	NSW	KX186623	KX186651
<i>N. macadamiae</i>	BRIP63737b	*	NSW	KX186626	KX186653
<i>N. macadamiae</i>	BRIP63740a	*	NSW	KX186628	KX186656
<i>N. natalensis</i>	CBS13841	<i>Acacia mollissima</i>	South Africa	KM199552	KM199466
<i>N. piceana</i>	CBS22530	<i>Mangifera indica</i>	*	KM199535	KM199451
<i>N. piceana</i>	CBS25432	<i>Cocos nucifera</i>	Indonesia	KM199529	KM199452
<i>N. piceana</i>	CBS39448	<i>Picea</i> sp.	UK	KM199527	KM199453
<i>N. protearum</i>	CBS 114178	<i>Leucospermum cuneiforme</i> cv. 'Sunbird'	Zimbabwe	KM199542	KM199463
<i>N. rosae</i>	CBS101057	<i>Rosa</i> sp.	New Zealand	KM199523	KM199429

<i>N. rosae</i>	CBS124745	<i>Paeonia suffruticosa</i>	USA	KM199524	KM199430
<i>N. samarangensis</i>	CBS115451	Unidentified tree	Hong Kong	KM199556	KM199447
<i>N. samarangensis</i>	MFLUCC12023 3	<i>Syzygium samarangense</i>	Thailand	JQ968611	JQ968610
<i>N. saprophytica</i>	CBS115452	<i>Litsea rotundifolia</i>	Hong Kong	KM199538	KM199433
<i>N. saprophytica</i>	MFLUCC12028 2	<i>Magnolia</i> sp.	China	JX399048	JX399017
<i>Neopestaoliopsis</i> sp. clade 4	CBS23379	<i>Crotalaria juncea</i>	India	KM199528	KM199464
<i>Neopestalotiopsis</i> sp. Clade 10	CBS11020	*	*	KM199540	KM199442
<i>Neopestalotiopsis</i> sp. clade 15	CBS17725	<i>Dalbergia</i> sp.	*	KM199533	KM199445
<i>Neopestalotiopsis</i> sp. clade 15	CBS27429	<i>Cocos nucifera</i>	Indonesia: Java	KM199534	KM199448
<i>Neopestalotiopsis</i> sp. clade 15	CBS66494	<i>Cocos nucifera</i>	Netherlands	KM199525	KM199449
<i>Neopestalotiopsis</i> sp. clade 15	CBS32276	<i>Camellia</i> sp.	France	KM199536	KM199446
<i>Neopestalotiopsis</i>	CBS16442	Dune sand	France	KM199520	KM199434

<i>s</i> sp. clade 20					
<i>Neopestalotiopsi</i>	CBS36061	<i>Cinchona</i> sp.	Guinea	KM199522	KM199440
<i>s</i> sp. clade 20					
<i>Neopestalotiopsi</i>	CBS11975	<i>Achras sapota</i>	India	KM199531	KM199439
<i>s</i> sp. clade 22					
<i>Neopestalotiopsi</i>	CBS26637	<i>Erica</i> sp.	Germany	KM199547	KM199459
<i>s</i> sp. clade 26					
<i>Neopestalotiopsi</i>	CBS32376	<i>Erica gracilis</i>	France	KM199550	KM199458
<i>s</i> sp. clade 26					
<i>Neopestalotiopsi</i>	CBS36161	<i>Cissus</i> sp.	Netherlands	KM199549	KM199460
<i>s</i> sp. clade 26					
<i>N. steyaertii</i>	IMI192475	<i>Eucalyptus viminalis</i>	Australia	KF582792	KF582794
<i>N. surinamensis</i>	CBS45074	Soil under <i>Elaeis</i> <i>guineenses</i>	Suriname	KM199518	KM199465
<i>N. surinamensis</i>	CBS111494	<i>Protea eximia</i>	Zimbabwe	KM199530	KM199462
<i>N. umbrinospora</i>	MFLUCC12028 5	Unidentified plant	China	JX399050	JX399019
<i>N. zimbabweana</i>	CBS111495	<i>Leucospermum</i> <i>cunciforme</i> cv. 'Sunbird'	Zimbabwe	KM199545	KM199456
<i>Pestalotiopsis</i>	CBS17126	*	Italy	KM199494	KM199397

*oryzae*

<i>P.oryzae</i>	CBS111522	<i>Telopea</i> sp.	USA: Hawaii	KM199493	KM199394
<i>P. biciliata</i>	CBS23638	<i>Paeonia</i> sp.	Italy	KM199506	KM199401
<i>P. biciliata</i>	CBS124463	<i>Platanus</i> × <i>hispânica</i>	Slovakia	KM199505	KM199399
<i>P. australis</i>	CBS111503	<i>Protea neriifolia</i> × <i>susannae</i> cv. ‘ <i>Pink Ice</i> ’	South Africa	KM199557	KM199382
<i>P. australis</i>	CBS114474	<i>Protea neriifolia</i> × <i>susannae</i> cv. ‘ <i>Pink Ice</i> ’	South Africa	KM199477	KM199385
<i>P. australasiae</i>	CBS114141	<i>Protea</i> sp	Australia	KM199501	KM199410
<i>P. australasiae</i>	CBS114126	<i>Knightsia</i> sp.	New Zealand	KM199499	KM199409

---

Abbreviations: <sup>a</sup> CBS: Culture collection of the Centraalbureau voor Schimmelcultures, Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, The Netherlands; MFLUCC: Mae Fah Luang University Culture Collection, Chiang Rai, Thailand; CGMCC: China General Microbiological Culture Collection Center, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing, China; IMI:

Culture collection of CABI Europe UK Centre, Egham, UK. <sup>b</sup> translation

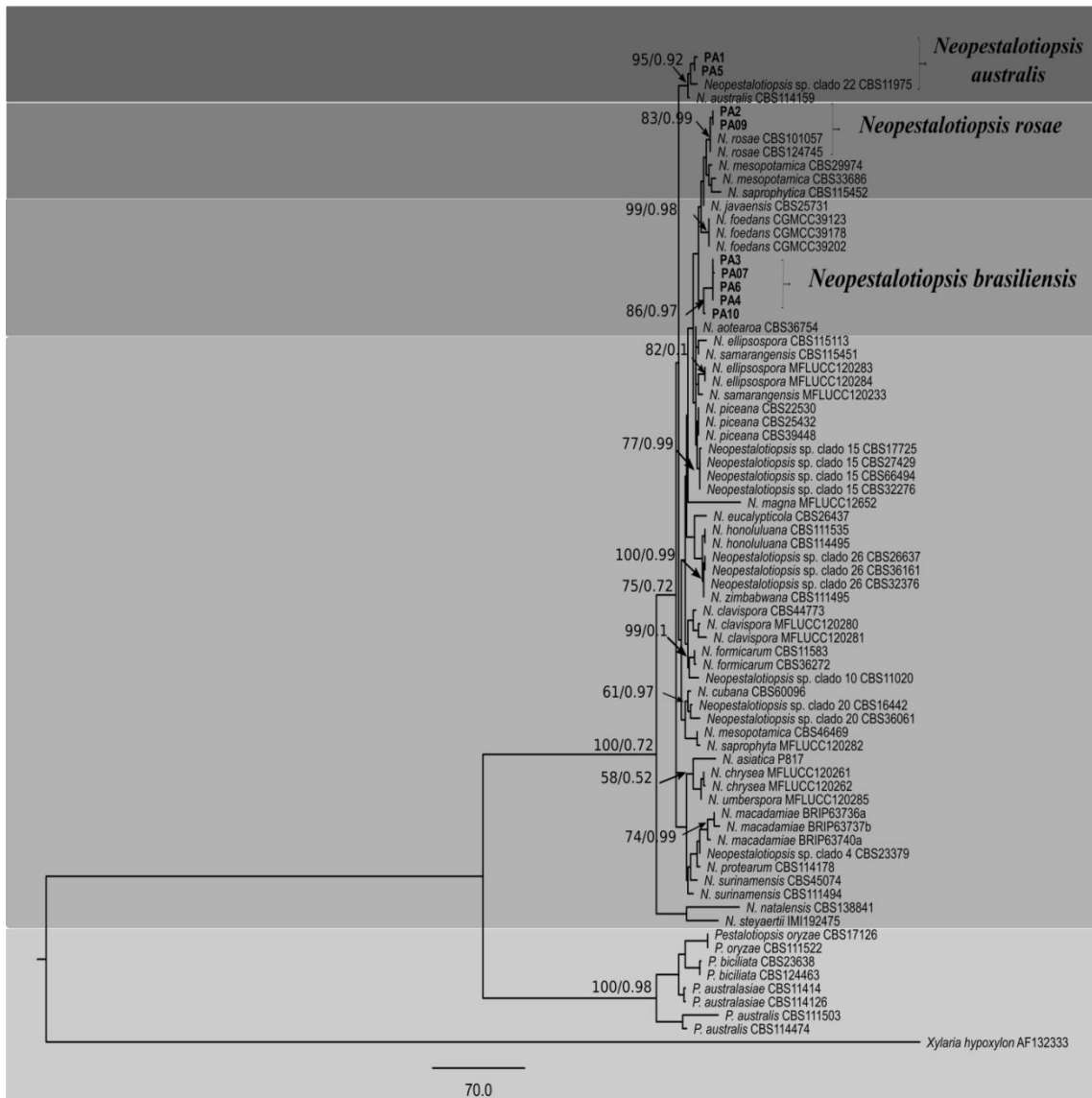


Figure 1. Bayesian phylogenetic tree of the combined alignment (TUB + TEF) for the analysed sequences of *Neopestalotiopsis* spp. and *Pestalotiopsis* spp. Bayesian posterior probabilities (PP) above 50%. The maximum parsimony bootstrap proportions are provided on the nodes (MP/PP). The tree was rooted with *Xylaria hypoxylon*.

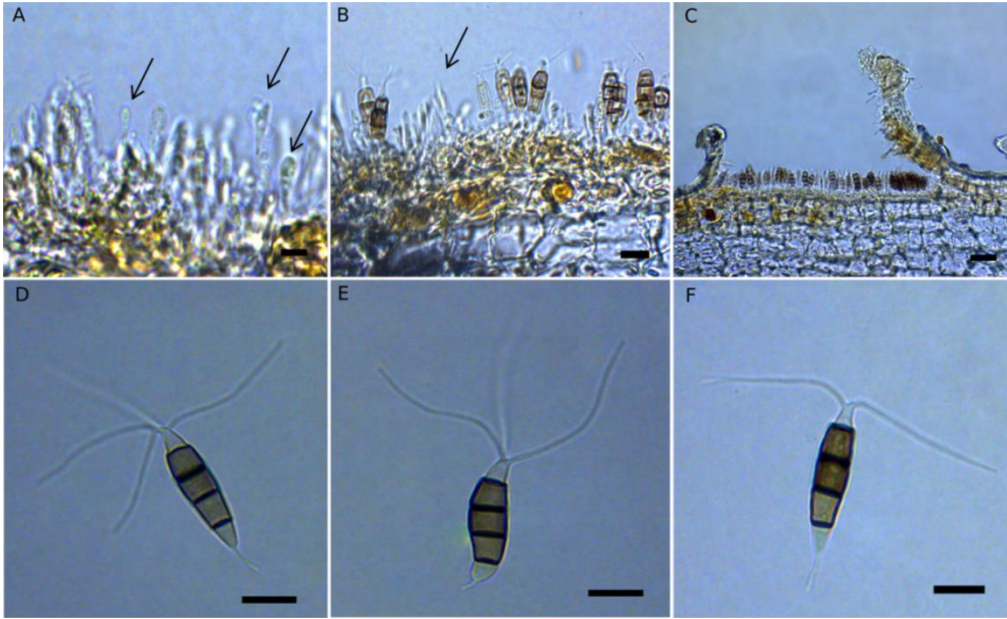


Figure 2. *Neopestalotiopsis australis*. A, B- Conidiogenous cells (indicated by the arrows). C- Acervuli. D, E, F- Conidia. Scale bars = 10  $\mu$ m.

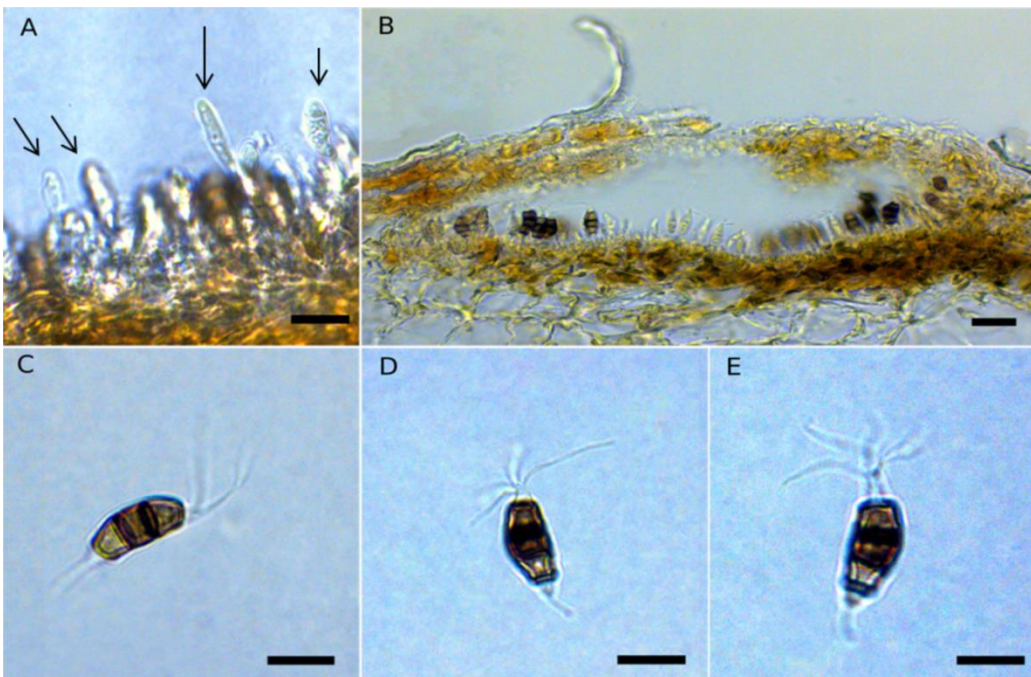


Figure 3. *Neopestalotiopsis rosae*. A- Conidiogenous cells (indicated by the arrows). B- Acervuli. C, D, E- Conidia. Scale bars = 10  $\mu$ m.



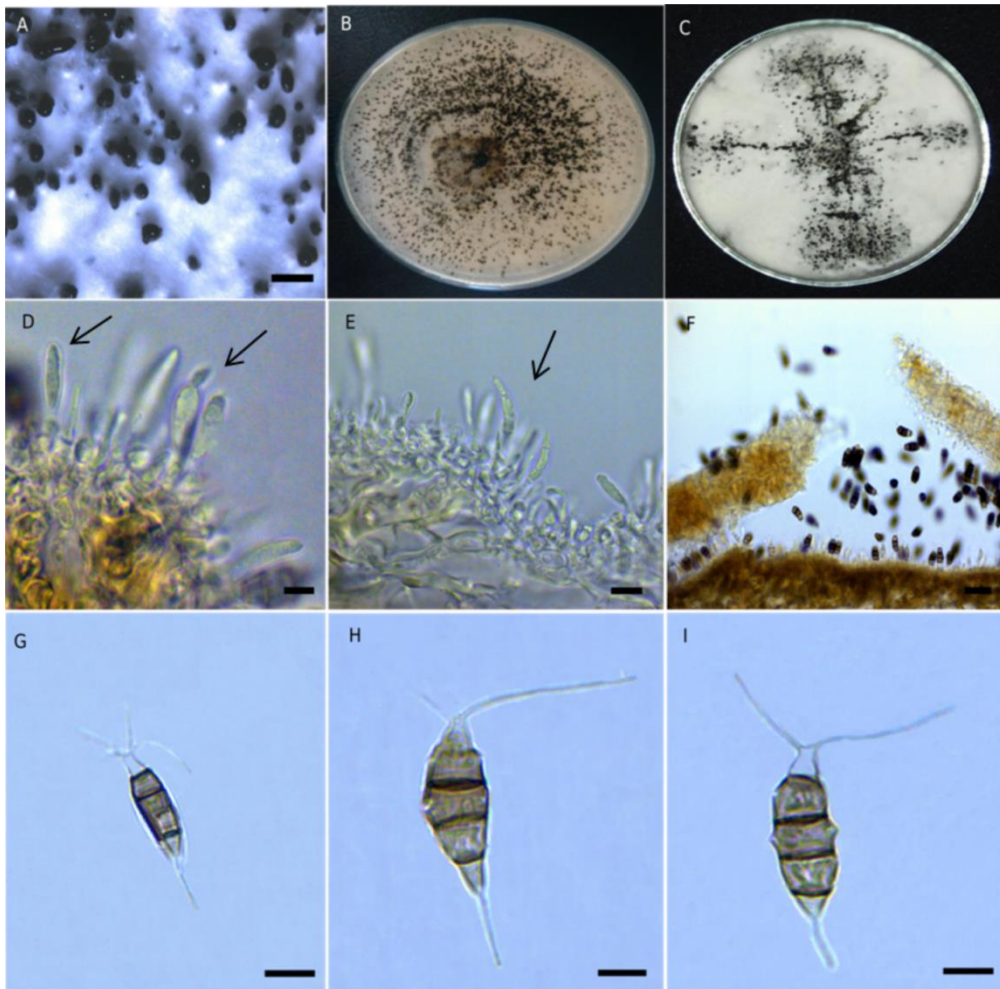


Figure 4. *Neopestalotiopsis braziliensis*, A-Conidiomata in PDA. B, C- Sporulation in Petri dishes containing Potato Dextrose Agar (front and back respectively) D, E- conidiogenous cells (indicated by the arrows). F- Acervuli. G, H, I- Conidia. Scale bars = 10 μm.

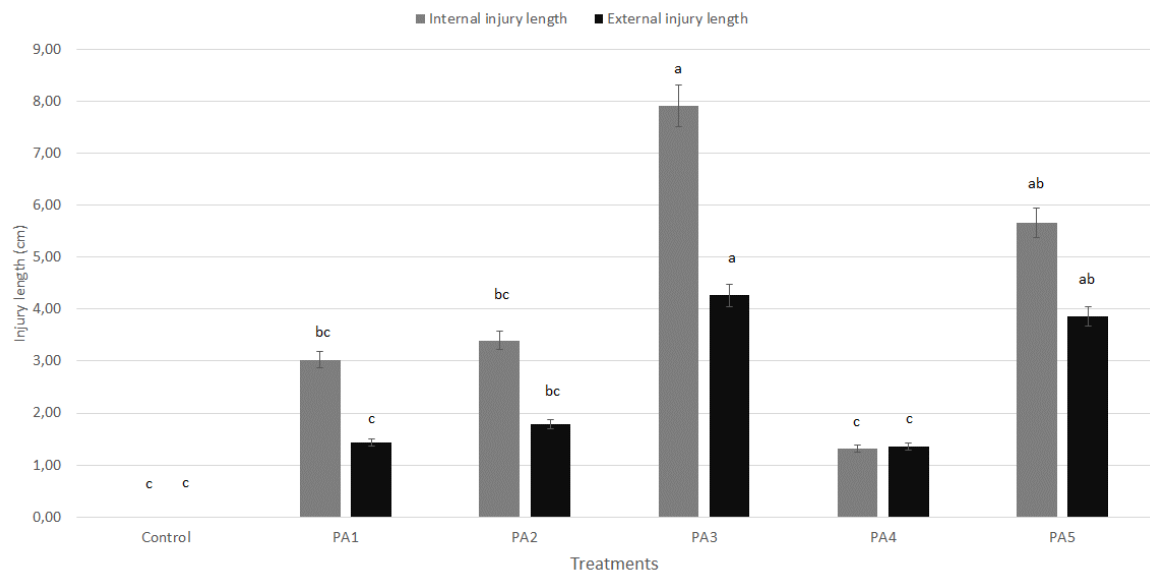


Figure 5 - Lengths of lesions caused by *Neopetalotripsi* spp. in *eucalyptus* seedlings. Bars of the same colour and with the same letter do not differ according to Tukey's test ( $p < 0.05$ ).

## ARTIGO 2

**Caracterização molecular, morfológica e comprovação da patogenicidade de *Quambalaria eucalypti* em mudas de *eucalyptus* sp.**GIZELI S. SANTOS<sup>1</sup>, REGINALDO G. MAFIA<sup>2</sup>, MARIA A. FERREIRA\*<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Lavras - UFLA. Departamento de Fitopatologia. E-mail: <sup>2</sup>Fibria Celulose S.A. Centro de Tecnologia. Rod. Aracruz Barra do Riacho, Km 25. 29197-900, Aracruz, ES, Brasil.

Article prepared in accordance with the standards of the Phytopathologia Mediterranea Journal

**Summary.** *Quambalaria eucalypti* é conhecido por causar manchas foliares e anelamento das hastes em mudas de eucalipto em minijardim clonal. Em condições de campo, também pode causar manchas foliares e cancro em árvores. No Brasil não há relatos da ocorrência desse patógeno causando doenças a campo, apenas um estudo relatando a ocorrência em viveiro baseado em análises morfológicas e patogenicidade. Em vista da importância da doença que está em constante monitoramento em viveiros clonais e o pouco conhecimento disponível sobre este patossistema, procurou-se, neste trabalho, caracterizar molecular e morfológicamente isolados que ocorrem em casa de vegetação e a campo no Brasil e comprovar a patogenicidade. Sequências de cinco isolados obtidos de folhas e cancos foram comparados a 21 sequências incluindo o isolado *Entyloma calendulae* como *outgroup* depositadas no Genbank. Os isolados foram submetidos a análises multilocus utilizando as regiões ITS e LSU. A análise filogenética de Máxima Parcimônia e Inferência Bayesiana de sequências combinadas das duas regiões estudadas agruparam os isolados avaliados no clado de *Q. eucalypti* e as características morfológicas foram similares às descritas na literatura. A patogenicidade foi confirmada, e o patógeno foi novamente isolado das plantas inoculadas confirmando suas características morfológicas cumprindo os postulados de Koch. Esse é o primeiro relato de *Q. eucalypti* causando manchas foliares e cancro em eucalipto em condições de campo no Brasil. Estes resultados podem contribuir para o conhecimento de

isolados de *Q. eucalypti* que ocorrem no Brasil em condições de campo e estabelecer protocolos para selecionar materiais resistentes ao patógeno.

**Palavras chave:** Cancro, filogenia, patologia florestal, campo.

## **Introdução**

O *Eucalyptus* é originário da Austrália e ilhas vizinhas, e atualmente a espécie florestal mais plantada no mundo. No Brasil existe uma área plantada equivalente a 5,7 milhões de hectares, com acréscimo de 2,4% em comparação com o ano anterior (IBÁ 2017). Tal crescimento é obtido principalmente pelo uso de clones-elite resistentes a doenças e de elevada produtividade (Alfenas et al., 2009). Dependendo das condições de manejo e da época do ano, tem-se registrado o aparecimento de algumas doenças seja na fase de produção de mudas em casa de vegetação ou em campo (Alfenas et al., 2009). Dentre essas, *Quambalaria eucalypti* é conhecido por causar manchas foliares e anelamento da haste em mudas de eucalipto em minijardim clonal.

Apesar da importância desse patógeno, só foram descritas seis espécies que ocorrem em *Eucalyptus* spp., sendo *Q. cyanescens*, *Q. eucalypti*, *Q. coryecup*, *Q. pitereka*, *Q. simpsonii* e *Q. pusilla* e todas podem ser nativas da Austrália, onde seus hospedeiros ocorrem naturalmente. As espécies foram descritas baseadas em análises filogenéticas das regiões gênicas ITS e LSU (Walker e Bertus, 1971; Wingfield et al., 1993).

O fungo *Q. eucalypti* foi constatado no Brasil, pela primeira vez em 2000, na região de Barra do Ribeiro – RS (Alfenas et al., 2001). Atualmente, encontra-se disseminado nas principais regiões eucaliptocultoras do país, podendo causar perdas significativas na produção de mudas clonais de eucalipto (*Eucalyptus* spp.) (Alfenas et al., 2004). A enfermidade caracteriza-se por manchas foliares e pelo anelamento da haste de mudas e de brotações de

minicepas, o que pode reduzir, conseqüentemente, a produção de miniestacas para enraizamento especialmente em épocas mais quentes do ano. Sobre as lesões de coloração marrom clara a marrom escura, forma-se uma massa esbranquiçada de estruturas do fungo na face abaxial do limbo foliar. Na face adaxial as lesões apresentam coloração palha (Alfenas et al., 2009).

No campo, além de manchas foliares, o fungo causa também cancro em hospedeiros altamente suscetíveis, como *E. globulus* Labill., seus híbridos e espécies afins (Alfenas et al., 2001). Há, contudo, ampla variabilidade genética intraespecífica, o que permite a seleção e a clonagem de genótipos resistentes para o plantio comercial. Essa enfermidade está associada às plantações de eucalipto em regiões tropicais e subtropicais do leste da Austrália e causa impacto significativo na produção florestal. Além do seu local de origem também tem sido relatado causando danos em *Corymbia maculata* no oeste da Austrália (Pegg et al., 2008), em plantações de *C. citriodora* na China (Zhou et al., 2007) em árvores jovens (Roux et al., 2006) e restrita a viveiros na África do Sul (Wingfield et al., 1993) e Brasil, até o momento. À medida que as plantações de *Eucalyptus* spp. se expandem mundialmente, é provável que este fungo ganhe importância econômica. Entretanto, no Brasil não há relatos da ocorrência desse patógeno causando doenças em campo, apenas um estudo relatando a ocorrência em viveiro baseado em análises morfológicas e patogenicidade (Alfenas et al., 2001).

Diante do exposto, com este trabalho, pretende-se estudar a etiologia da doença utilizando as regiões genômicas do rDNA, ITS ( Internal transcribed spacer) e LSU (Large subunit), caracterizar morfológicamente e descrever a primeira ocorrência em campo bem como comprovar a patogenicidade nos tecidos de folhas de eucalipto inoculados com *Quambalaria* sp.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **Isolamento**

O isolamento do fungo foi realizado diretamente através da retirada e transferência de massa de conídios para placa de Petri, contendo meio Batata Dextrose Agar 2% (BDA) e incubados a  $\pm 28^{\circ}\text{C}$  por 7-14 dias, com fotoperíodo de 12h (Crous et al., 2009). Os isolados foram armazenados em microtubos contendo NaCl 0,85% e mantidos em temperatura ambiente (Castellani, 1939) e em microtubos com glicerol 15% e conservados a  $-80^{\circ}\text{C}$ . O método de Castellani foi utilizado para manutenção dos isolados durante a realização dos experimentos. Os isolados obtidos foram utilizados para testes de patogenicidade e para a caracterização molecular.

### **Caracterização Molecular**

#### **Extração de DNA, amplificação e sequenciamento**

Foram cultivados cinco isolados fúngicos, Q1, Q2, Q3, Q4 e Q5, em meio de cultura 2% de BDA mantidos a  $25^{\circ}\text{C}$  durante 7 dias. Em seguida, o micélio foi macerado em nitrogênio líquido, e a extração de DNA foi realizada utilizando o Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. A amplificação por PCR foi realizada de duas regiões genicas: o espaço interno transcrito (ITS) e a subunidade maior (LSU) utilizando os primers ITS1 (5' TTCCGTAGGTGAACCTGCGG 3') e ITS4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3') (White et al., 1990), LROR (5'-ACCCGCTGAACTTAAGC-3') e LR5 (5'-TCCTGAGGGAACTTCG-3') (White et al., 1990) (LSU). Todas as reações de amplificação foram realizadas em um volume de reação de 25  $\mu\text{l}$ . As condições de PCR para os genes foram:  $94^{\circ}\text{C}$  durante 2 min; 35 ciclos de  $94^{\circ}\text{C}$

durante 50 s, 55 ° C durante 1 min, 72 ° C durante 1 min e 72 ° C durante 5 min. O produto da PCR foi submetido a eletroforese em 0,8% de géis de agarose corados com GelRed (Biotium®) e visualizados no fotodocumentador MiniBis Pro (Uniscience), e submetidos à purificação e sequenciamento na empresa Macrogen (Coréia do Sul).

### **Análises filogenéticas**

As sequencias das duas regiões foram alinhadas com sequências depositadas no GenBank (Tabela 1) usando a ferramenta de busca BLAST. As sequências das duas regiões de genes foram editadas usando o Programa SeqAssem (Hepperle, 2004) e alinhadas no MEGA 6.0 (Tamura et al., 2011). As árvores filogenéticas foram construídas no software PAUP\* (Swofford, 2002) e MRBAYES v. 3.2.1 (Ronquist et al., 2012) usando máxima parcimônia (MP) e Inferência Bayesiana (BI), respectivamente. Uma análise de *bootstrap* (1000 repetições) também foi feita no conjunto de dados para determinar os níveis de confiança dos ramos. A análise bayesiana foi utilizada para gerar probabilidades posteriores (PP) para nós de consenso usando MRBAYES (Huelsenbeck, 2001). As árvores foram construídas com o conjunto de dados alinhados de 26 sequências, incluindo as cinco sequências de isolados de híbridos de *Eucalyptus* e o *outgroup* *Entyloma calendulae*. A Cadeia de Monte Carlo Markov (MCMC) (Larget; Simon 1999) foi executada com 1.000.000 de gerações usando o modelo de evolução de substituição apropriado determinado pelo jModelTest. As árvores foram visualizadas e editadas no Fig Tree 1.3.1. A combinação das regiões genicas ITS e LSU foi determinada com um teste de homogeneidade de partição (qq1PHT, Farris et al., 1994).

### **Caracterização morfológica**

As estruturas fúngicas e os corpos de frutificação foram selecionados com base nos resultados obtidos da análise filogenética e utilizados para a caracterização morfológica. As descrições morfológicas foram feitas com os isolados cultivados em meio BDA a 25 ° C com fotoperíodo de 12 horas. As preparações microscópicas foram feitas em água destilada, com 50 medições por estrutura e observadas ao microscópio LX400 com software CapturePro V2.8.8.5. Foram analisados o micélio, conidióforos e conídios e as fotos foram capturadas em microscópio binocular Nikon Eclipse E-200 LED.

### **Teste de patogenicidade**

Para confirmar a patogenicidade dos isolados de *Q. eucalypti*, plântulas de eucaliptos com 120 dias de idade foram inoculadas. Para confirmar os postulados de Koch, o fungo foi re-isolado de plantas sintomáticas seguindo os métodos descritos acima.

Para testar a patogenicidade, um isolado Q3 foi inoculado em plantas com 120 dias de idade utilizando um borrifador manual com uma suspensão de  $10^5$  conídios/mL, obtida a partir de colônias do fungo com cinco dias de idade. Após a inoculação, as plantas foram mantidas em câmara úmida por 48h, sob fotoperíodo de 12 h. Os controles receberam apenas água. A avaliação foi realizada aos 15 dias após a inoculação. Após a produção dos primeiros sintomas, a patogenicidade foi confirmada, o patógeno foi novamente isolado das plantas inoculadas e as características morfológicas do fungo foram comparadas para cumprir os postulados de Koch.

## **Resultados**

### **Isolamento**



Foram obtidos 5 isolados de *Quambalaria* associados a eucalipto no Brasil. Destes, 4 foram coletados de plantas de eucalipto em plantações comerciais no estado do Espírito Santo e um isolado proveniente de casa de vegetação no estado de Minas Gerais. As plantas provenientes do campo apresentaram lesões de coloração marrom clara a marrom escura, com uma massa esbranquiçada de estruturas do fungo nos ramos e brotações laterais provocando deformação dos órgãos infectados (Figura 1-A, B).

### **Caracterização molecular**

Vinte e uma sequências adicionais de *Quambalaria* spp. incluindo o *outgroup* *Entyloma calendulae* obtidos do GenBank foram incluídos nas análises filogenéticas que foram realizadas de forma individual com as regiões genômicas de ITS (627b), LSU (611pb) e posteriormente foram combinadas (1238pb).

As árvores geradas nas análises individuais de MP e MB foram altamente similares em suas topologias. Com o teste de Homogeneidade de Partição ( $P = 0,93$ ) mostrou que os conjuntos de dados (ITS e LSU) não diferiram entre si podendo ser combinados. As sequências de DNA concatenadas da região ITS e LSU contêm 1239 caracteres dos 21 isolados resultou em 723 caracteres constantes, 463 parcimônia não informativos e 53 parcimônia informativa.

A árvore combinada das duas regiões estudadas mostrou que os isolados sequenciados, neste estudo, foram agrupados em um único clado (Figura 2). Todos os isolados foram identificados como *Quambalaria eucalypti*. O ramo foi suportado por altos valores de *bootstrap* e probabilidade posterior, sendo 100% e 0,99 respectivamente.

## **Caracterização morfológica**

O isolado Q4 foi selecionado para caracterização morfológica com base nos resultados das análises filogenéticas. As colônias das culturas puras obtidas das folhas foram semelhantes às descritas para *Q. eucalypti*. Não houve variação na cor e na morfologia das colônias entre os isolados quando cultivados em meio MEA. As colônias em MEA apresentaram-se brancas com aspecto cotonoso ou aveludado com até um mm de altura, coloração branca, esporulantes, odor característico e ausência de exsudação (Figura 2-A,B). As hifas aéreas são hialinas, lisas, livremente agregadas, irregulares com um a dois  $\mu\text{m}$  de largura com células conidiogênicas de forma e tamanho variáveis, normalmente uniformes ou com o ápice inflado, raramente afilado (Figura 2-D e F). Os conidióforos são denticulados e surgem diretamente do micélio com um grupo de conídios. Os conídios são hialinos, unicelulares, globosos a ovoides sendo primários (4–8– 2–3  $\mu\text{m}$ ) e secundários (2–4–1–2  $\mu\text{m}$ ), também foram observados (Figura 3-C e E).

## **Teste de patogenicidade**

A inoculação realizada mostrou desenvolvimento e produção de estruturas fúngicas nas lesões das folhas e no caule do eucalipto onde havia ferimentos (Figura 4). Os postulados de Koch foram cumpridos através do isolamento do mesmo fungo das plantas inoculadas.

## **Discussão**

Análises filogenéticas utilizando os métodos de Máxima Parcimônia e Inferência Bayesiana das sequências parciais combinadas dos genes ITS e LSU confirmaram a presença

de *Q. eucalypti* causando cancro em plantas no campo e em casa de vegetação no Brasil. Neste estudo, *Q. eucalypti* foi isolado de árvores jovens de plantações comerciais e de mudas de eucalipto produzidas em viveiro.

*Quambalaria eucalypti* foi primeiramente descrito na África do Sul em 1993 (Wingfield et al., 1993) como agente etiológico do anelamento de hastes e brotações e de manchas foliares em mudas de *Eucalyptus* spp. No Brasil, foi encontrado pela primeira vez em 2000, causando a mesma enfermidade em minicepas clonais e mudas de *E. globulus* e seus híbridos em viveiro (Alfenas et al., 2001b). Desde então, no Brasil, a doença tem sido constatada em intensidades variáveis em viveiros. No entanto até o momento não havia sido relatado a doença em campo através de análises filogenéticas, morfológicas e de patogenicidade.

Todos os isolados deste estudo agruparam juntamente com a espécie *Q. eucalypti* com alto valor de *bootstrap* (100 e 0,99%), confirmando a ocorrência desta espécie no Brasil, até o momento, relatada apenas através de análise morfológica e de patogenicidade. Nas suas lesões de coloração marrom-clara a marrom-escura, forma-se uma massa esbranquiçada de estruturas do fungo na face abaxial do limbo foliar, lembrando pústulas de ferrugem branca (Alfenas et al., 2009).

O patógeno, atualmente, é controlado pela utilização de medidas de limpeza de minicepas, aplicação de produtos químicos e resistência genética. Esse é o primeiro estudo da ocorrência do patógeno em condições de campo. Dessa maneira é importante que se verifique a qualidade das mudas antes do plantio, já que o patógeno é capaz de sobreviver nessas condições e provocar danos aos plantios jovens.

Entre as alternativas disponíveis para reduzir a aplicação de defensivos químicos, pode-se aprimorar o equilíbrio nutricional das plantas. Dessa forma, é favorecida a formação

de barreiras de resistência, inibindo a penetração e colonização de patógenos, além de incrementar outras barreiras de defesa, como as químicas (Zieger, 2013).

Os resultados desse trabalho podem contribuir para o conhecimento de isolados de *Q. eucalypti* que ocorrem no Brasil em condições de campo e estabelecer protocolos para selecionar materiais resistentes ao patógeno e permitir realizar uma diagnose e o monitoramento do patógeno de forma consistente e confiável visando tornar a produção eucaliptocultora cada vez mais competitiva.

## **AGRADECIMENTOS**

Os autores agradecem à Agência Federal de Apoio e Avaliação da Formação de Pós-Graduação (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais - FAPEMIG e a empresa Fibria Celulose AS pelo financiamento.

## REFERÊNCIAS

- ALFENAS, A.C., ZAUZA, E. A. V., ROSA, O. P., ASSIS, T. F. 2001, *Sporothrix eucalypti*, um novo patógeno do eucalipto no Brasil. *Fitopatologia Brasileira*, v.26, p.221.
- ALFENAS, A. C., ZAUZA, E. A. V., MAFIA, R. G., ASSIS, T. F. 2004, *Clonagem e doenças do eucalipto*. Viçosa: Editora UFV. 442p.
- ANDRADE, G. C.G., ALFENAS, A. C., MAFIA, R. G., MAFFIA, L. A., GONÇALVES, R. C. Escala diagramática para avaliação da severidade da mancha foliar do eucalipto causada por *Quambalaria eucalypti*. 2005, *Fitopatologia Brasileira*, v. 30, p:504-509.
- BELAN, L L et al. 2014, Nutrients distribution in diseased coffee leaf tissue. *Australasian Plant Pathology*, v. 44 p: 105-111.
- CROUS P. W., VERKLEY G. J. M., GROENEWALD J. Z., 2009. Centraalbureau voor Schimmelcultures; Utrecht, Netherlands. *Fungal biodiversity*. v.1, 269p.
- CASTELLANI, A. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. 1939, *Journal of Tropical Medicine & Hygiene*, Austin, v. 24, p. 270-276.
- FAO. Global forest resources assessment 2000 – Main report. FAO Forestry paper. INSS 0258-6150, 2000. 479p. Disponível em [www.fao.org/forestrv/fo/fra/main/index.jps](http://www.fao.org/forestrv/fo/fra/main/index.jps).
- HEPPERLE D., 2004. SeqAssem©. A sequence analysis tool, contig assembler and trace data visualization tool for molecular sequences. <http://www.sequentix.de>.
- HUELSENBECK J. P., RONQUIST F. MRBAYES., 2001. Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics*, v. 17, p: 754–755.
- LARGET B., SIMON D, 1999. "Markov Chain Monte Carlo Algorithms for the Bayesian Analysis of Phylogenetic Trees." *Molecular Biology and Evolution*, v. 16, p: 750-759.
- PEGG, G. S., O'DWYER, C., CARNEGIE, A. J., BURGESS, T.I., WINGFIELD, M. J., DRENTH, A. 2008, *Quambalaria* species associated with plantation and native eucalypts in Australia. *Plant Pathology*. v. 57, p.702-714.
- ROUX, J., MTHALANE, Z. L., DE BEER, Z. W., EISENBERG, B., WINGFIELD, M. J. 2006, *Quambalaria* leaf and shoot blight on *Eucalyptus nitens* in South Africa. *Australasian Plant Pathology*. v. 35 p:427-433.
- RONQUIST F., TESLENKO M., MARK P. VAN DER, 2012. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology*. v. 61, p: 539–542.
- SWOFFORD, D.L, 2002. *Paup: Phylogenetic analysis using parsimony*, version 4.0b10. Sinauer, Sunderland.

TAMURA K., PETERSON D., PETERSON N., STECHER G., NEI M., KUMAR S, 2011. Mega5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*. v. 28, p: 2731–2739.

ZHOU, X. DE BEER, W., XIE, Y., PEGG, G. S., WINGFIELD, M. J. Dna-based identification of *Quambalaria pitereka* causing severe leaf blight of *Corymbia citriodora* in china. *Fungal Diversity*. v.25, p:245-254. 2007.

WHITE T. J., BRUNS T., LEE S, 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis M. A., Gelfand D. H., Sninsky J. J., White T. J. editors. PCR protocols: a guide to methods and applications. *Academic Press*, 315–322p.

WINGFIELD, M. J., CROUS, P. W., SWART, W. J. *Sporothrix eucalypti* (sp. nov.), a shoot and leaf pathogen of *Eucalyptus* in South Africa. *Mycopathologia*. v. 123, p:159–164. 1993.



Figura 1. Sintomas de *Quambalaria eucalypti* em eucalipto. A e B- Massa esbranquiçada das estruturas do fungo no caule e em folhas (Indicado nas setas).

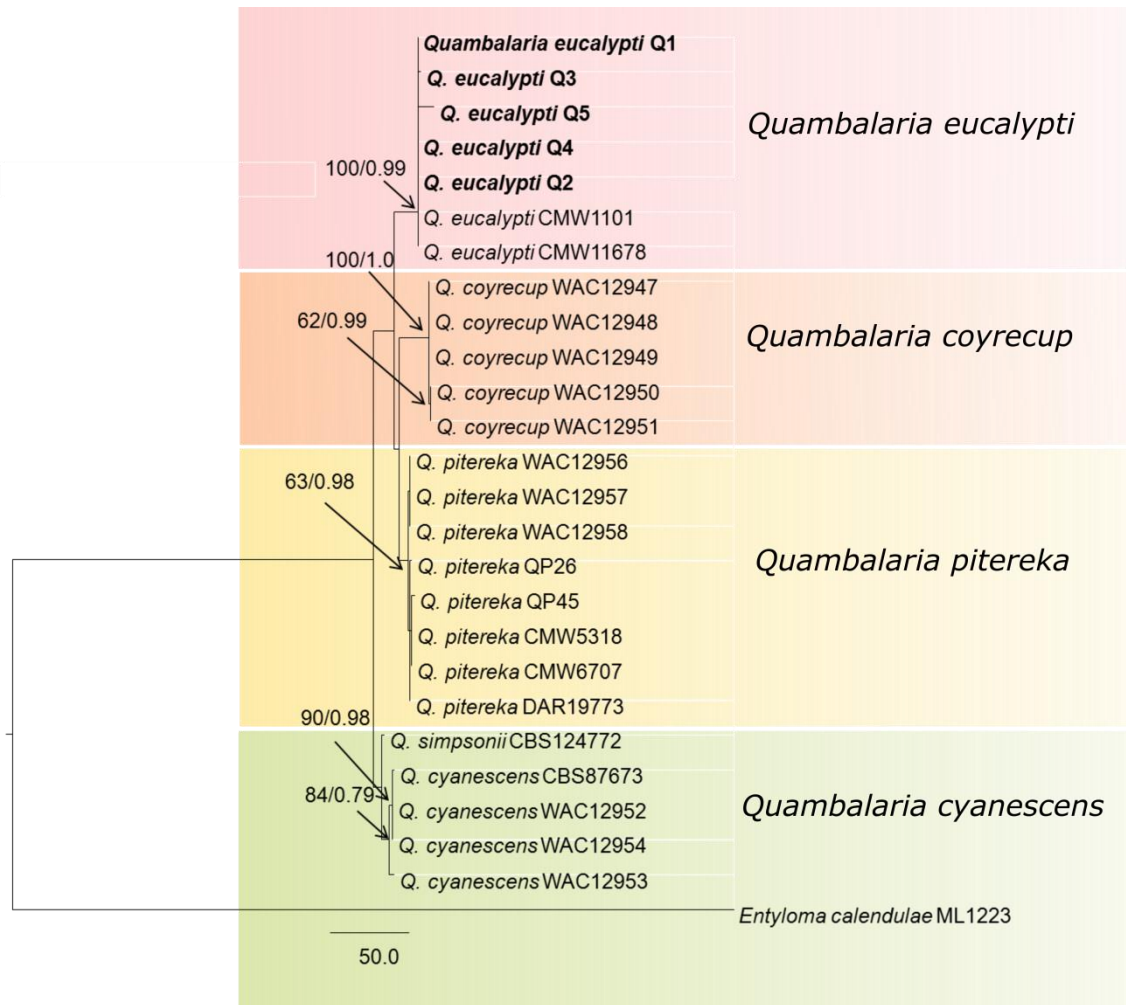


Figura 2. Árvore filogenética de análise bayesiana dos dados combinados (ITS + LSU) das sequências analisadas de *Quambalaria* spp.. Probabilidades posteriores de Bayesiana (PP) acima de 50%. Os valores de *bootstrap* de máxima de parcimônia são fornecidos nos nós (MPB / PP). *Entyloma calendulae* foi inserido como *outgroup*. (GenBank-AF132333).

Tabela 1. Isolados de *Quambalaria*, hospedeiro, local e números de acesso GenBank para sequências de DNA utilizadas neste estudo.

ESPECIES	N°CULTURA ACESSO. <sup>a</sup>	HOSPEDEIRO/ SUBSTRATO	LOCAL		
				ITS	LSU
<i>Quambalaria eucalypti</i>	CMW 1101	<i>Eucalyptus grandis</i>	Kwambonambi, South Africa	DQ317625	DQ317618
<i>Q. eucalypti</i>	CMW 11678	<i>E. grandis</i>	Kwambonambi, South Africa	DQ317626	DQ317619
<i>Q. coyrecup</i>	WAC12947	<i>Corymbia calophylla</i>	Western Australia	DQ823431	DQ823444
<i>Q. coyrecup</i>	WAC12948	<i>C. calophylla</i>	Western Australia	DQ823433	DQ823446
<i>Q. coyrecup</i>	WAC12949	<i>C. calophylla</i>	Western Australia	DQ823432	DQ823445
<i>Q. coyrecup</i>	WAC12950	<i>C. ficifolia</i>	Western Australia	DQ823429	DQ823447
<i>Q. coyrecup</i>	WAC12951	<i>C. ficifolia</i>	Western Australia	DQ823430	DQ823448
<i>Q. pitereka</i>	WAC12956	<i>C. ficifolia</i>	Western Australia	DQ823428	DQ823435
<i>Q. pitereka</i>	WAC12957	<i>C. ficifolia</i>	Western Australia	DQ823426	DQ823437
<i>Q. pitereka</i>	WAC12958	<i>C. calophylla</i>	Western Australia	DQ823427	DQ823436
<i>Q. pitereka</i>	QP26	<i>C. citriodora subsp. variegata</i>	Queensland	DQ823424	DQ823434
<i>Q. pitereka</i>	QP45	<i>C. citriodora subsp. variegata</i>	Queensland	DQ823425	DQ823439
<i>Q. pitereka</i>	CMW 5318	<i>C. citriodora subsp. variegata</i>	Queensland	DQ317628	DQ317621
<i>Q. pitereka</i>	CMW6707	<i>Corymbia maculata</i>	New South Wales, Australia	DQ317627	DQ317620
<i>Q. pitereka</i>	DAR19773	<i>C. exima</i>	NSW, Australia	DQ823423	
<i>Q. simpsonii</i>	CBS124772		Australia	GQ303290	
<i>Q. cyanescens</i>	CBS 876.73	<i>Eucalyptus pauciflora</i>	New South Wales	DQ317623	DQ317616
<i>Q. cyanescens</i>	WAC12952	<i>Corymbia calophylla</i>	Western Australia	DQ823419	DQ823440
<i>Q. cyanescens</i>	WAC12954	<i>C. calophylla</i>	Western Australia	DQ823420	DQ823442
<i>Q. cyanescens</i>	WAC12953	<i>C. ficifolia</i>	Western Australia	DQ823422	DQ823443



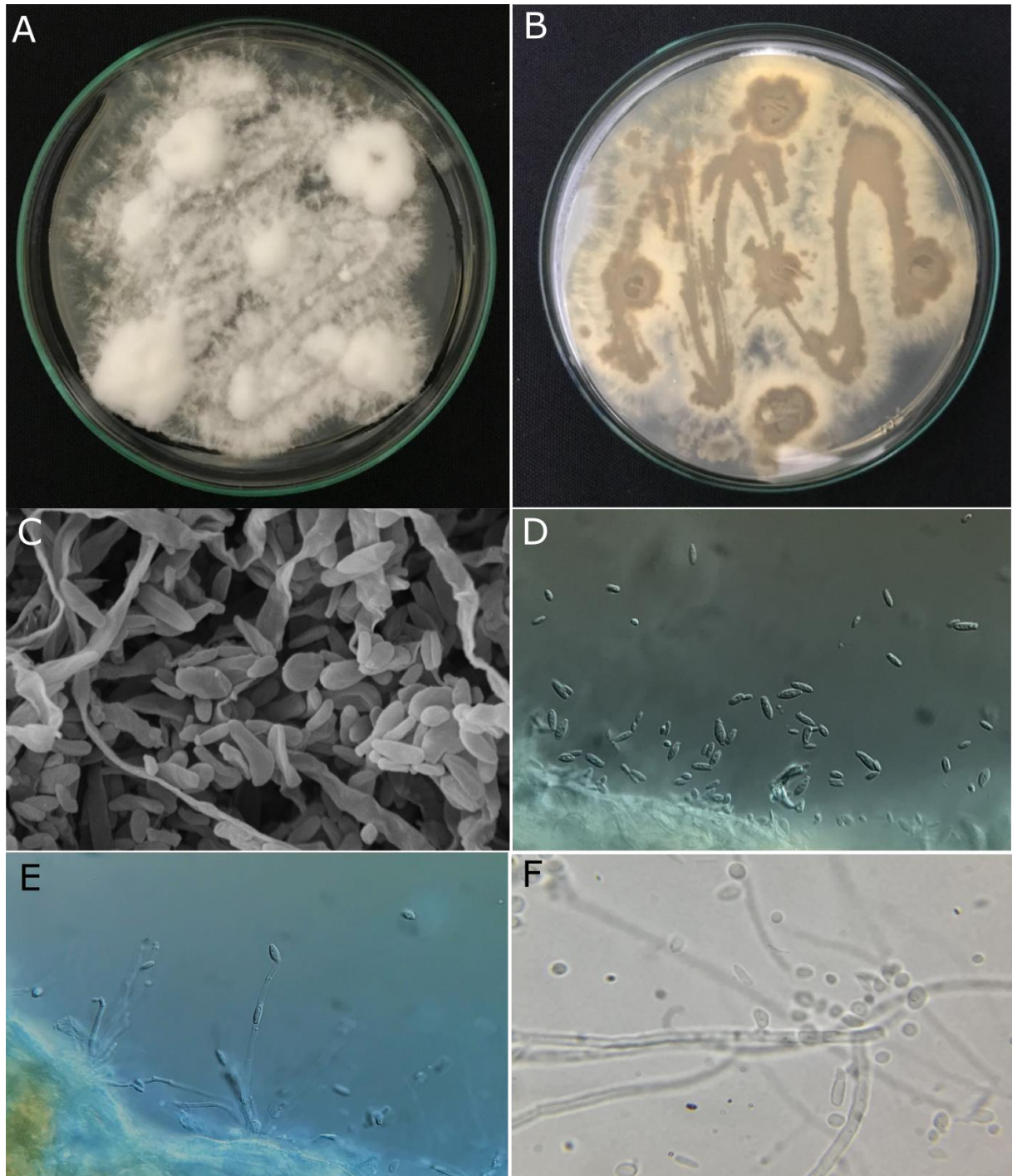


Figura 3. *Quambalaria eucalypti*. A, B- Colônia do fungo esporulando em BDA a 25°C (frente e verso respectivamente). C- Macro e microconídios (Microscopia de varredura). D- Conídios. Barra de escala - E- Conídio inserido na hifa vegetativa = 10 μm.

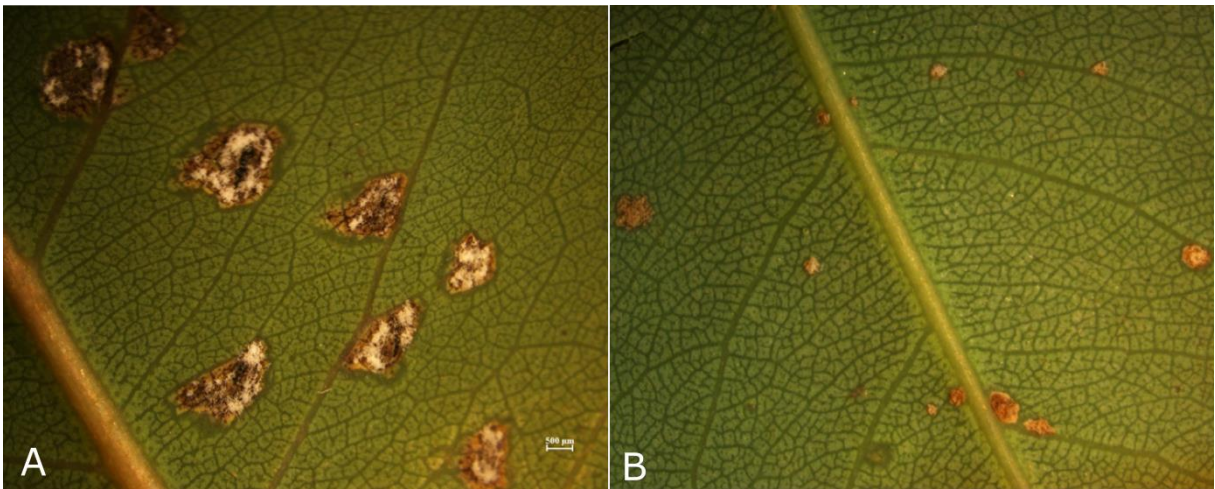


Figura 4. Sintomas de lesões de *Quambalaria eucalypti* em folhas inoculadas com eucalipto. A- Massa esbranquiçada com estruturas do patógeno. B-Testemunha (Reproduzido as mesmas condições que em A, feito fermentos e aplicação de água).