

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROECOLOGIA**  
**CURSO DE MESTRADO EM AGROECOLOGIA**

**LEONARDO DE JESUS MACHADO GOIS DE OLIVEIRA**

**ORGANIZAÇÃO, CONSERVAÇÃO E INFORMATIZAÇÃO DA MICOTECA  
“PROF.º GILSON SOARES DA SILVA” DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DO  
MARANHÃO.**

**São Luís – MA**

**2016**

**LEONARDO DE JESUS MACHADO GOIS DE OLIVEIRA**

**Engenheiro Agrônomo**

**ORGANIZAÇÃO, CONSERVAÇÃO E INFORMATIZAÇÃO DA MICOTECA  
“PROF.º GILSON SOARES DA SILVA” DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DO  
MARANHÃO.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agroecologia da Universidade Estadual do Maranhão, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Agroecologia.

Orientador(a): Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Antonia Alice Costa Rodrigues

**São Luís – MA**

**2016**

LEONARDO DE JESUS MACHADO GOIS DE OLIVEIRA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agroecologia da Universidade Estadual do Maranhão, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Agroecologia.

Orientador: Prof. Dr.<sup>a</sup> Antonia Alice Costa Rodrigues.

Aprovada em: 07 / 10 / 2016

Comissão Julgadora:

---

Profa. Dr.<sup>a</sup> Antonia Alice Costa Rodrigues - Universidade Estadual do Maranhão  
(Orientadora)

---

Prof. Dr. Gilson Soares da Silva - Universidade Estadual do Maranhão

---

Profa. Dr.<sup>a</sup> Maria Claudene Barros - Universidade Estadual do Maranhão

São Luís

2016

Ao Senhor Deus, alicerce de minhas atitudes aqui na Terra, Aos meus pais, Iris e Manoel pelo amor e esforço a mim dedicados, Aos meus irmãos Leonam, Débora e Diego e as irmãs de coração Bruna e Adriana.

**DEDICO!**

## AGRADECIMENTOS

Á **Deus**, por ter me guiado e removido todos os obstáculos do meu caminho.

Á Profª Dra. Antonia Alice Costa Rodrigues, pelos ensinamentos, incentivos e amizade, nesse processo tão importante da minha vida que foi o Mestrado.

A Universidade Estadual do Maranhão, por meio da Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Agroecologia, pela oportunidade e espaço concedido para a realização deste curso.

A CAPES pela concessão da bolsa de estudo e a FAPEMA pelo financiamento desta pesquisa.

Ao Profº. Dr. Gilson Soares da Silva pelos seus ensinamentos e contribuição para Fitopatologia Maranhense e Brasileira;

A Profª Drª. Maria Claudene Barros e equipe do Laboratório de Genética e Biologia Molecular da Universidade Estadual do Maranhão, Campus Caxias pelo sequenciamento de DNA dos isolados fúngicos;

A equipe do Laboratório de Genética - Labwick, da Universidade Estadual do Maranhão, Campus São Luís e ao Pablo Santos, do Centro de Processamento de Dados, na ajuda para a construção do site da Micoteca;

Aos meus pais, Manoel Gois de Oliveira e Íris de Jesus Machado de Oliveira, pelo carinho e amor incondicional.

A todos meus familiares pelo apoio e força. Aos meus irmãos, Diego, Débora e Leonam e irmãs de coração Adriana, Bruna e Raimunda, as minhas tias Terezinha, Conceição e Hilda pelo convívio.

Aos amigos do Laboratório de Fitopatologia Erlen, Elys Regina, Francisco, Gustavo, Elizabeth, Ivaneide, Neto, Mônica, Diogo, Letícia, Natália, Pedro, Rafael pelo convívio e ajuda para realização deste trabalho;

Aos professores de Graduação e Pós-graduação em Agroecologia da UEMA pelos ensinamentos, e incentivo a mim direcionados;

A todos os amigos dos cursos de Mestrado e Doutorado em Agroecologia da turma 2014.

Aos amigos em especial Elys Regina, Laura, Idayanne, Raimundo Nonato, Keneson, Joice, Elizabeth, Josilene, Erlen, Gustavo que sempre estiveram ao meu lado, pela amizade e momentos descontraídos que ficaram pra sempre em minha memória.

Aos funcionários do Programa de Pós-graduação em Agroecologia que sempre ajudam em especial, Neto e Rayanne. A todos aqueles que contribuíram de alguma forma para realização desta pesquisa. Enfim, reitero a todos a minha gratidão. Muito Obrigado!

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	VII
LISTA DE TABELAS.....	XII
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XIV
RESUMO.....	XV
ABSTRACT.....	XVI
1.0 <b>INTRODUÇÃO</b> .....	17
2.0 <b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	19
2.1 Convenção sobre a Diversidade Biológica (CDB).....	19
2.2 Coleções de Culturas Biológicas.....	19
2.3 Métodos de Conservação dos Fungos.....	21
2.3.1 Repicagem Contínua.....	23
2.3.2 Manutenção em Água Destilada Esterilizada ou Método de Castellani.....	24
2.3.3 Manutenção em Óleo Mineral.....	25
2.3.4 Manutenção em Congelamento Comum.....	26
2.3.5 Conservação em Solo Estéril.....	26
2.3.6 Liofilização.....	26
2.4 Caracterização Molecular dos Fungos.....	27
2.5 Informatização e acesso aos dados de coleções biológicas.....	29
3.0 <b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	33
3.1 Local do Experimento.....	33
3.2 Obtenção dos isolados fúngicos fitopatogênicos mantidos na Micoteca “Prof.º Gilson Soares da Silva”.....	33
3.3 Caracterização morfológica dos fungos fitopatogênicos da Micoteca “Prof.º Gilson Soares da Silva”.....	33
3.4 Recuperação dos isolados fúngicos mantidos na Micoteca “Prof.º Gilson Soares da Silva”.....	34
3.5 Cadastro dos isolados fitopatogênicos.....	34
3.6 Métodos de Preservação.....	34
3.6.1 Repicagem Continua.....	34
3.5.2 Castellani.....	35
3.5.3 Preservação em Solo.....	35

3.6.4	Óleo Mineral.....	35
3.6.5	Congelamento.....	35
3.6.6	Liofilização.....	36
3.7	Documentação e Informatização da Micoteca “Prof. Gilson Soares da Silva”	36
3.8	Identificação molecular de isolados dos principais gêneros de fungos.....	37
3.8.1	Extração de DNA.....	37
3.8.2	Amplificação da região ITS do rDNA.....	37
3.8.3	Análises filogenéticas e construção de Matriz de divergência genética dos fungos.....	53
4	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	53
4.1	Coleção de Culturas de Fungos Fitopatogênicos e Métodos de Conservação.	53
4.2	Recuperação dos isolados fúngicos mantidos na Micoteca“Prof. Gilson Soares da Silva”.....	60
4.3	Documentação e Informatização da Micoteca “Prof.º Gilson Soares da Silva”.....	64
4.4	Identificação morfológica dos fungos fitopatogênicos da Micoteca “Prof.º Gilson Soares da Silva”.....	74
4.5	Identificação molecular dos fungos fitopatogênicos da Micoteca “Prof.º Gilson Soares da Silva”.....	108
4.6	Amplificação e análise filogenética da região ITS do rDNA dos isolados fungicos da Micoteca “Prof.º Gilson Soares da Silva” .....	108
5	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	154
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	156
	<b>ANEXOS</b> .....	171

## LISTA DE FIGURAS

	Páginas
<b>Figura 1.</b> Representação esquemática do espaçador transcrito interno (ITS), a unidade repetitiva ribossomal nuclear utilizada para descrever os fungos ao nível da espécie e as setas indicam a posição dos iniciadores ( <i>primers</i> ) usados nas reações de PCR e a região amplificada.....	29
<b>Figura 2.</b> Projetos relacionados ao Centro de Referência em Informação Ambiental-CRIA (SpeciesLink e SICol) com representação da página do <i>SpeciesLink</i> e esquema de acesso aos dados do SICol.....	32
<b>Figura 3.</b> Métodos de preservação empregados na Micoteca Prof.º Gilson Soares da Silva.”.....	57
<b>Figura 4.</b> Representação dos métodos de preservação empregados na Micoteca “Prof. Gilson Soares da Silva”. A- Método do Repique Contínuo, B- Preservação em Solo, C- Congelamento, D- Preservação no método de Castelani, E- Método de Liofilização, F- Método de Preservação em Óleo Mineral.....	57
<b>Figura 5.</b> Colônias recuperadas de <i>Fusarium oxysporum</i> <b>A- MGSS 09:</b> <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> . Hospedeiro: Bananeira. Preservado desde 2011. <b>B-MGSS 14:</b> <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> . Hospedeiro: Helicônia.Preservado desde 2011. <b>C-MGSS 10:</b> <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>vasinfectum</i> . Hospedeiro: Quiabeiro. Preservado desde 2011. <b>D- MGSS 43.</b> <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> . <b>E-MGSS 103.</b> <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>passiflora</i> . Hospedeiro: Maracuja.....	61
<b>Figura 6-</b> Colônias de isolados recuperados do gênero <i>Fusarium</i> .....	61
<b>Figura 7.</b> Colônias de isolados recuperados do gênero <i>Aspergillus</i> .....	62
<b>Figura 8.</b> Colônias de isolados recuperados dos gêneros <i>Colletotrichum</i> e <i>Myrothecium</i> .....	62
<b>Figura 9.</b> Características das colônias de isolados recuperados dos gêneros <i>Penicillium</i> , <i>Curvularia</i> , <i>Phomopsis</i> , <i>Gliocladium</i> , <i>Chaetomium</i> , <i>Stemphylium</i> .....	63
<b>Figura 10.</b> Características das colônias de isolados recuperados do gênero <i>Trichoderma</i> .....	63
<b>Figura 11.</b> Características das colônias de isolados recuperados dos gêneros <i>Corynespora</i> e <i>Chalara</i> . .....	64
<b>Figura 12.</b> Características das colônias de isolados recuperados dos gêneros <i>Beauveria</i> e <i>Isaria</i> . <b>A- MGSS 87.</b> <i>Beauveria bassiana</i> .....	64
<b>Figura 13.</b> Características das colônias de isolados recuperados do gênero <i>Pestalotiopsis</i> .....	64
<b>Figura 14.</b> Página que mostra o Campo Institucional do site sobre o histórico, Missão e Direitos de Propriedade da Micoteca.....	66
<b>Figura 15.</b> Página dentro campo Institucional na seção Equipe que mostra nome e função de quem atua na Micoteca.....	67
<b>Figura 16.</b> Solicitações. Formulários (Pedido de Amostras, Pedido de Identificação e Pedido de Incorporação de Culturas fúngicas).....	67



<b>Figura 17.</b> Página que estabelece a busca ao acervo da Micoteca das espécies fúngicas a partir do gênero, nome de espécie, nome de doenças ou nome de hospedeiros.....	68
<b>Figura 18.</b> Página que mostra resultados da pesquisa realizada para o gênero <i>Alternaria</i> .....	69
<b>Figura 19.</b> Informações referentes à espécie escolhida com fotos da colônia, estruturas microscópicas e sintomas no hospedeiro.....	70
<b>Figura 20.</b> Página que mostra Título, fonte de Financiamento, Período, Aluno e descrição dos projetos relacionados à Micoteca.....	71
<b>Figura 21.</b> Página destinada à divulgação de Cursos e Eventos na área de Micologia, Microbiologia, Fitopatologia.....	72
<b>Figura 22.</b> Formas de contatos da Micoteca “Prof. Gilson Soares da Silva”.....	73
<b>Figura 23.</b> Colônia e estruturas micromorfológica do isolado MGSS 178. MGSS 178. A. Colônia, B.-C. esporos, D. conídios em cadeia.....	75
<b>Figura 24.</b> Colônia e estruturas micromorfológica do isolado MGSS 184 da espécie <i>Alternaria alternata</i> .....	75
<b>Figura 25.</b> MGSS 87. Características morfológicas de <i>Beauveria bassiana</i> .....	76
<b>Figura 26.</b> MGSS 83. Características morfológicas de <i>Chaetomium fuscum</i> . Características morfológicas de <i>Chaetomium</i> A. Colônia, b. ascósporos, C. Cabelos ascoma. D. Ascoma.....	77
<b>Figura 27.</b> MGSS 180. Características morfológicas de <i>Cladosporium cladosporioides</i> . Características morfológicas de <i>Cladosporium</i> . A. Colônia. B. Conídio unicelular. C-D. Conidióforos.....	78
<b>Figura 28.</b> Características morfológicas de <i>Colletotrichum musae</i> e <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> . MGSS 85. A. Colônia, B. Apressório. C-D. Conídios.....	79
<b>Figura 29.</b> Características morfológicas de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> de dois isolados.....	80
<b>Figura 30.</b> Características morfológicas de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> de dois siolados.....	80
<b>Figura 31.</b> MGSS 93. Características morfológicas de <i>Corynespora cassiicola</i> .....	81
<b>Figura 32.</b> MGSS 29. Características morfológicas de <i>Curvularia eragrostidis</i> .....	82
<b>Figura 33.</b> MGSS 115. Características morfológicas de <i>Curvularia</i> sp.....	82
<b>Figura 34.</b> MGSS 172. Características morfológicas de <i>Curvularia lunata</i> .....	82
<b>Figura 35.</b> Características morfológicas do isolado MGSS 54.....	84
<b>Figura 36.</b> Características morfológicas do isolado MGSS 61.....	84
<b>Figura 37.</b> Características morfológicas do isolado MGSS 68.....	84
<b>Figura 38.</b> Características morfológicas do isolado MGSS 157.....	85
<b>Figura 39.</b> Características morfológicas do isolado MGSS 194. ....	85
<b>Figura 40.</b> Características morfológicas do isolado MGSS 66.....	85
<b>Figura 41.</b> Características morfológicas do isolado MGSS 141. ....	86
<b>Figura 42.</b> . Características morfológicas do isolado MGSS 71.....	86
<b>Figura 43.</b> Características morfológicas do isolado MGSS 159.....	86

<b>Figura 44.</b> Características morfológicas do isolado MGSS 01.....	87
<b>Figura 45.</b> Características morfológicas do isolado MGSS 14.....	87
<b>Figura 46.</b> Características morfológicas do isolado MGSS 65.....	87
<b>Figura 47.</b> Características morfológicas do isolado MGSS 118.....	88
<b>Figura 48.</b> Características morfológicas do isolado MGSS 155.....	88
<b>Figura 49.</b> Características morfológicas do isolado MGSS 182. ....	89
<b>Figura 50.</b> Características morfológicas do isolado MGSS 117.....	89
<b>Figura 51.</b> Características morfológicas do isolado MGSS 138.....	89
<b>Figura 52.</b> Características morfológicas do isolado MGSS 149.....	90
<b>Figura 53.</b> . Características morfológicas do isolado MGSS 123.....	91
<b>Figura 54.</b> Características morfológicas do isolado MGSS 176.....	92
<b>Figura 55.</b> . Características morfológicas do isolado MGSS 192.....	93
<b>Figura 56.</b> Características morfológicas do isolado MGSS 143.....	94
<b>Figura 57</b> Características morfológicas do isolado MGSS 106.....	95
<b>Figura 58.</b> Características morfológicas do isolado MGSS 62.....	96
<b>Figura 59.</b> Características morfológicas do isolado MGSS 80.....	97
<b>Figura 60.</b> Características morfológicas do isolado MGSS 152.....	98
<b>Figura 61.</b> Árvore filogenética dos isolados <i>Alternaria</i> spp. derivados de sequências do gene de ITS de acordo com o método estatístico Máxima Verossimilhança (ML) e com base em 1000 réplicas de bootstrap. Distâncias evolutivas foram calculados utilizando o modelo Jukes-Cantor (JC).....	112
<b>Figura 62.</b> Árvore filogenética de isolado MGSS 87 do gênero <i>Beauveria</i> derivados de sequências do gene de ITS de acordo com o método estatístico Máxima Verossimilhança (ML) e com base em 1000 réplicas de bootstrap. Distâncias evolutivas foram calculados utilizando o modelo Jukes-Cantor (JC).....	114
<b>Figura 63.</b> Árvore filogenética do isolado MGSS 83 <i>Chaetomium fuscum</i> derivado de sequências do gene de ITS de acordo com o método estatístico Máxima Verossimilhança (ML) e com base em 1000 réplicas de bootstrapping. Distâncias evolutivas foram calculados utilizando o modelo Jukes-Cantor (JC).....	116
<b>Figura 64.</b> Árvore filogenética de Máxima Verossimilhança (ML) do gênero <i>Cladosporium</i> baseado no modelo Jukes-Cantor. A árvore de consenso de bootstrap inferida a partir de 1000 repetições. Valores menores que 50 % de bootstrap foram colapsados. Análises foram realizadas no MEGA 6. <i>Cercospora beticola</i> CPC11557- (nº de acesso no Genbank: AY840527 – para ITS) foi utilizado como outgroup. ....	118
<b>Figura 65.</b> Árvore filogenética pelo Método de Máxima Verossimilhança com base no modelo Jukes-Cantor para o gênero <i>Colletotrichum</i> . A árvore consenso de bootstrap inferida a partir de 1000 repetições. Ramos correspondentes às partições reproduzidas em menos de 50 % de bootstrap estão colapsadas.....	122
<b>Figura 66.</b> Árvore filogenética de Máxima Verossimilhança (ML) do gênero <i>Cladosporium</i> baseado no modelo Jukes-Cantor. A árvore de consenso de bootstrap inferida a partir de 1000 repetições. Valores menores que 50 % de bootstrap foram colapsados. Análises foram realizadas no MEGA 6. <i>Corynespora leucadendri</i>	

- KF251150 – para ITS), *Corynespora endiandrae* KP004450, *Corynespora olivacea* (FJ852595) foram utilizados como outgroup. .... 125
- Figura 67.** Árvore filogenética pelo Método de Máxima Verossimilhança (ML) com base no modelo Jukes-Cantor derivadas do gene ITS para o gênero *Curvularia*. A árvore consenso de bootstrap inferida a partir de 1000 repetições. *Bipolaris heveae* (AB179835) foi utilizado como outgroup..... 127
- Figura 68.** Árvore filogenética pelo Método de Máxima Verossimilhança (ML) com base no modelo Jukes-Cantor derivadas do gene ITS para o gênero *Fusarium*. A árvore consenso de bootstrap inferida a partir de 1000 repetições. *Microdochium nivale* JN642711 e *Fusarium dimerum* EU926284 foram utilizados como outgroup..... 130
- Figura 69.** Árvore filogenética de Máxima Verossimilhança (ML) do gênero *Lasiodiplodia* baseado no modelo Kimura 2 parâmetros. A árvore de consenso de bootstrap inferida a partir de 1000 repetições. Análises foram realizadas no MEGA 6. *Neoscytalidium dimidiatum* GU251106 – para ITS), *Tiarosporella urbis-rosarum* JQ239408) foram utilizados como outgroup. .... 135
- Figura 70.** Árvore filogenética de Máxima Verossimilhança (ML) do gênero *Metarhizium* baseado no modelo Jukes-Cantor. A árvore de consenso de bootstrap inferida a partir de 1000 repetições. Análises foram realizadas no MEGA 6. *Aschersonia placenta* (DQ365845) – para ITS foi utilizado como outgroup. .... 138
- Figura 71.** Árvore filogenética de Máxima Verossimilhança (ML) do gênero *Myrothecium* baseado no modelo Kimura 2 parâmetros para o gene ITS. A árvore de consenso de bootstrap inferida a partir de 1000 repetições. Análises foram realizadas no MEGA 6. *Bionectria ochroleuca* KF055399 foi utilizado como outgroup..... 140
- Figura 72.** Árvore filogenética de Máxima Verossimilhança (ML) do gênero *Neoscytalidium* baseado no modelo Jukes-Cantor para o gene ITS. A árvore de consenso de bootstrap inferida a partir de 1000 repetições. Análises foram realizadas no MEGA 6. *Lasiodiplodia parva* (KF766192) foi utilizado como outgroup. .... 142
- Figura 73.** Árvore filogenética de Máxima Verossimilhança (ML) do gênero *Nigrospora* baseado no modelo Jukes-Cantor para o gene ITS. A árvore de consenso de bootstrap inferida a partir de 1000 repetições. Análises foram realizadas no MEGA 6. *Gelasinospora udagawae* (AB640864) foi utilizado como outgroup. .... 145
- Figura 74.** Árvore filogenética de Máxima Verossimilhança (ML) do gênero *Phoma* baseado no modelo Kimura 2 parâmetros para o gene ITS. A árvore de consenso de bootstrap inferida a partir de 1000 repetições. Análises foram realizadas no MEGA 6. *Aschochyta hordei* var. *hordei* (GU237887) foi utilizado como outgroup. *Didymella – fase sexuada* (Teleomorfo), *Phoma - fase assexuada* (Anamorfo)..... 147
- Figura 75.** Árvore filogenética de Máxima Verossimilhança (ML) do gênero *Phomopsis* baseado no modelo Kimura 2 parâmetros para o gene ITS. A árvore de

consenso de bootstrap inferida a partir de 1000 repetições. Análises foram realizadas no MEGA 6. <i>Valsa mali</i> var. <i>pyri</i> (GU174589) foi utilizado como outgroup. <i>Diaporthe</i> - fase sexuada (Teleomorfo), <i>Phomopsis</i> - fase assexuada (Anamorfo).....	150
<b>Figura 76.</b> Árvore filogenética de Máxima Verossimilhança (ML) do gênero <i>Gongronella</i> baseado no modelo Tamura 3 parâmetros (T92) para o gene ITS. A árvore de consenso de bootstrap inferida a partir de 1000 repetições. Análises foram realizadas no MEGA 6. <i>Absidia anomala</i> (JN205815) foi utilizado como outgroup.....	152
<b>Figura 77.</b> Observação macro e micromorfológica de <i>Gongronella butleri</i> e do isolado MGSS 123 A – Colônia de <i>Gongronella butleri</i> . B. Esporângio. C) colônia do isolado MGSS 123; D) Conídios do isolado MGSS 123.; E) Concentração de Conídios de <i>Trichoderma</i> sp.....	153

**LISTA DE TABELAS**

	Páginas
TABELA 1 - Distribuição das Coleções de Culturas Microbianas no Continente Americano no WDCM, 2016.	20
TABELA 2 - Sequências utilizadas para análise de filogenia e geração da matriz de divergência genética.	39
TABELA 3 - Quantificação da coleção de fungos fitopatogênicos da Micoteca “Prof.º Gilson Soares da Silva” - Laboratório de Fitopatologia/UEMA preservados em seis métodos. São Luis, 2013.	55
TABELA 4 - Resumo das características morfológicas de isolados do gênero <i>Fusarium</i> .	99
TABELA 5 - Resumo das características morfológicas de 15 gêneros de fungos fitopatogênicos.	103
TABELA 6 - Comparação das sequências dos isolados da Micoteca “Prof. Gilson Soares da Silva” e de sequências depositadas no Genbank.	109
TABELA 7 - Matriz de divergência genética através do gene ITS para as espécies do gênero <i>Alternaria</i> .	112
TABELA 8 - Matriz de divergência genética através do gene ITS para as espécies do gênero <i>Beauveria</i> .	115
TABELA 9 - Matriz de divergência genética através do gene ITS para as espécies do gênero <i>Chaetomium</i> .	117
TABELA 10 - Matriz de divergência genética através do gene ITS para as espécies do gênero <i>Cladosporium</i> .	119
TABELA 11 - Matriz de divergência genética através do gene ITS para as espécies do gênero <i>Colletotrichum</i> .	124
TABELA 12 - Matriz de divergência genética através do gene ITS para as espécies do gênero <i>Corynespora</i> .	126
TABELA 13 - Matriz de divergência genética através do gene ITS para as espécies do gênero <i>Curvularia</i> .	128
TABELA 14 - Matriz de divergência genética através do gene ITS para as espécies do gênero <i>Fusarium</i> .	132
TABELA 15 - Matriz de divergência genética através do gene ITS para as espécies do gênero <i>Lasiodiplodia</i> .	136
TABELA 16 - Matriz de divergência genética através do gene ITS para as	138

espécies do gênero *Metarhizium*.

TABELA 17 -	Matriz de divergência genética através do gene ITS para as espécies do gênero <i>Myrothecium</i> .	140
TABELA 18 -	Matriz de divergência genética através do gene ITS para as espécies do gênero <i>Neoscytalidium</i> .	144
TABELA 19 -	Matriz de divergência genética através do gene ITS para as espécies do gênero <i>Nigrospora</i> .	146
TABELA 20 -	Matriz de divergência genética através do gene ITS para as espécies do gênero <i>Phoma</i> .	148
TABELA 21 -	Matriz de divergência genética através do gene ITS para as espécies do gênero <i>Phomopsis</i> .	150
TABELA 22 -	Matriz de divergência genética através do gene ITS para as espécies do gênero <i>Gongronella</i> .	152

**LISTA DE ABREVIATURAS**

ARSEF—Agriculture Research Service of Entomopathogenic Fungi, USDA, Ithaca, NY.

UAMH—University of Alberta Microfungus Collection and Herbarium, Edmonton, Alberta, Canada.

CBS - Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, Netherlands;

CMM - Culture Collection of Phytopathogenic Fungi “Prof. Maria Menezes”, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Brazil;

UCD- Phaff Yeast Culture Collection, Department of Food Science and Technology, University of California, Davis, USA

IRAN- Culture Collection of the Iranian Research Institute of Plant Protection, Tehran, Iran

ITS – espaçador transcrito interno, do inglês *Internal Transcribed Spacer*

PCR - *Polymerase Chain Reaction*

NCBI - National Center for Biotechnology Information

## RESUMO

A preservação de microrganismos assegura a viabilidade, morfologia, fisiologia e genética, mantendo a cultura por longo tempo. O objetivo deste trabalho foi consolidar, ampliar e informatizar a coleção de fungos fitopatogênicos (Micoteca “Prof. Gilson Soares da Silva”) do Laboratório de Fitopatologia da UEMA. Para a incorporação dos isolados fúngicos fitopatogênicos na Micoteca foram realizados isolamentos de partes doentes das plantas em meio de cultura, após crescimento, os fungos foram caracterizados morfológicamente através da visualização, em microscópio óptico de suas estruturas, sendo classificados pelas chaves de identificação de fungos, seguido do cadastro e deposição na Micoteca em seis diferentes métodos dependendo das características do fungo. Foram empregados os métodos de Repique Contínuo, Conservação em Solo, Método de Castellani, Preservação em Óleo Mineral, Congelamento e Liofilização. Foi realizada a caracterização molecular de 51 isolados pela técnica de PCR através da utilização dos genes ITS rDNA e identificados a espécie através da análise filogenética Máxima Verossimilhança e construção da Matriz de divergência genética ajustado ao melhor modelo de substituição nucleotídica com 1000 repetições. A Micoteca foi cadastrada junto ao Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade sob registro nº 5991355. Atualmente conta com um acervo de 212 isolados de fungos fitopatogênicos divididos em 32 gêneros e 45 espécies fúngicas. Foram recuperados os isolados de 15 gêneros *Fusarium*, *Colletotrichum*, *Pestalotiopsis*, *Curvularia*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Phomopsis*, *Gliocladium*, *Chaetomium*, *Trichoderma*, *Stemphylium*, *Corynespora*, *Chalara*, *Beauveria*, e *Isaria*. Houve amplificação da região de interesse do DNA de 16 gêneros de fungos fitopatogênicos. Foi possível observar que a combinação da caracterização morfológica e molecular (análise filogenética e matriz de divergência genética) identificou espécies dentro de 16 gêneros. Dentre essas espécies estão novos relatos de associação com hospedeiros, como por exemplo, *Alternaria ochroleuca* em tomate (*Solanum lycopersicon*), *Chaetomium fuscum* em sementes de Vinagreira (*Hibiscus sabdariffa*), *Fusarium oxysporum* em Abacaxi (*Ananas comosus*), *Neoscytalidium dimidiatum* em Abacaxi (*A. comosus*), *Phoma multirostrata* em Alface (*Lactuca sativa*) no Brasil e *Phomopsis pseudomangiferae* em roseiras (*Rosa* sp.). Por isso a importância em manter, estocar e preservar coleções de fungos significa assegurar um patrimônio de culturas para tomada de decisões.

**Palavras-chave:** Fungos fitopatogênicos, Métodos de preservação, Caracterização morfológica, Caracterização molecular.



## ABSTRACT

The preservation of microorganisms ensures the viability, morphology, physiology and genetics, maintaining the culture for a long time. The objective was to consolidate, expand and computerize the collection of plant pathogenic fungi (Micoteca "Professor Gilson Soares da Silva") of Phytopathology Laboratory of UEMA. For the incorporation of fungal pathogenic isolates in Micoteca were performed insulation diseased parts of the plants in the culture medium after growth, the fungi were characterized morphologically by viewing optical microscope their structures and classified the fungus identification keys, followed by registration and deposition Micoteca in six different methods depending on the fungus characteristics. Were employed methods Repique Continuous Conservation in Solo, Castellani method, preservation Mineral Oil, Freeze and Freeze. the molecular characterization of 51 isolates by PCR using the ITS rDNA genes and identified the species by phylogenetic analysis Maximum Likelihood and construction of genetic dissimilarity matrix adjusted to best nucleotide substitution model with 1000 repetitions was conducted. The Micoteca was registered by the Authorization and Information System Biodiversity under registration number 5991355, currently has a collection of 212 isolates of pathogenic fungi divided into 32 genera and 45 fungal species. isolates were recovered from 15 genera *Fusarium*, *Colletotrichum*, *Pestalotiopsis*, *Curvularia*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Phomopsis*, *Gliocladium*, *Chaetomium*, *Trichoderma*, *Stemphylium*, *Corynespora*, *Chalara*, *Beauveria*, and *Isaria*. There was amplification of the DNA of interest to the region of 16 genera of plant pathogenic fungi. It was observed that the combination of morphological and molecular characterization (phylogenetic analysis and genetic divergence matrix) identified species in 16 genera. Among these species are new reports of an association with host, such as *Alternaria ochroleuca* in tomato (*Solanum lycopersicon*), *Chaetomium fuscum* in vinegar seeds (*Hibiscus sabdariffa*), *Fusarium oxysporum* in pineapple (*Ananas comosus*) in Brazil, *Neoscytalidium dimidiatum* in Pineapple (*A. comosus*), *Phoma multirostrata* in Lettuce (*Lactuca sativa*) in Brazil and *Phomopsis pseudomangiferae* of rose (*Rosa* sp.). Hence the importance of maintaining, storing and preserving fungi collections means ensuring equity of cultures for decision-making.

**Keywords:** Fungi pathogenic, Preservation methods, Morphological characterization, Molecular characterization.

## 1 - INTRODUÇÃO

O Brasil está definindo mecanismos para cumprir com as obrigações da Convenção sobre a Biodiversidade Biológica (BRASIL, 2000) desta forma coleções de culturas que são centros de conservação, tem a função de coletar organismos relevantes para estudos científicos e aplicações tecnológicas, tornando-os disponíveis para outros usuários.

Segundo a Instrução Normativa nº 160, do Ministério do Meio Ambiente, coleção biológica científica é a coleção de material biológico devidamente tratado, conservado e documentado de acordo com normas e padrões que garantam a segurança, acessibilidade, qualidade, longevidade, integridade e interoperabilidade dos dados da coleção, pertencente à instituição científica com objetivo de subsidiar pesquisa científica ou tecnológica e a conservação *ex situ* (BRASIL, 2007).

Coleções de referência de microorganismos têm sido apontadas como recursos importantes para o desenvolvimento de pesquisas em biodiversidade e sistemática. Um ponto crítico citado como limitante ao desenvolvimento da microbiologia ambiental no Brasil refere-se à falta de apoio às coleções de referência de microorganismos no país (MANFIO, 2003).

Os métodos de preservação de microrganismos asseguram a viabilidade, morfologia, fisiologia e genética, mantendo a cultura por longo tempo e todos com o mesmo princípio: retardar ou paralisar o metabolismo celular. Dentre estes métodos, podem ser citados o método de óleo mineral, água destilada, liofilização, solo e repiques seriados (SMITH; ONIONS, 1994; LACAZ et al., 2002; NAKASONE et al., 2004).

A conservação de microrganismos fitopatogênicos, como recursos genéticos, é importante para atender as necessidades e demandas da pesquisa agrícola. Os isolados de fitopatógenos são importantes como referências para quarentena, para serem utilizados no desenvolvimento de “kits” diagnósticos de doenças, estudos de variabilidade e posterior uso na seleção de plantas resistentes às doenças (EMBRAPA, 2007).

Nas últimas décadas, pesquisas referentes à análise de DNA e mapeamento genético enfatizam ainda mais a importância de coleções vivas para estudos filogenéticos (LEAL-BERTOLI, 1998; LIMA et al., 2013).

Sobre a informatização das coleções biológicas, a Convenção da Diversidade Biológica (CDB) encorajou as instituições depositárias de dados direta ou indiretamente relacionados à biodiversidade a disseminá-los pública e gratuitamente. No Brasil e no mundo,

diversos provedores iniciaram projetos independentes de informatização de acervos que hoje estão amplamente disponíveis via internet (GONZALEZ, 2009).

As culturas fúngicas fitopatogênicas preservadas em laboratório devem manter suas características originais (capacidade de esporulação e patogenicidade), por longos períodos de tempo, necessitando de estudos constantes desses dois parâmetros que são de extrema importância para trabalhos e pesquisas de micólogos e fitopatologistas (PASSADOR et al., 2010). Desta forma as atividades desenvolvidas possibilitam disponibilizar para a sociedade científica, recursos genéticos de microrganismos em quantidade e qualidade para suprir a demanda da pesquisa no desenvolvimento de processos e produtos biotecnológicos para o país.

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi consolidar, ampliar e informatizar a coleção de fungos fitopatogênicos (Micoteca “Prof. Gilson Soares da Silva”) através da preservação de fungos fitopatogênicos e a identificação morfológica e molecular, disponibilizando isolados que subsidie pesquisa científica, de forma a contribuir com o ensino, pesquisa e extensão, bem como difundir informações sobre o acervo de cultura e métodos de preservação de fungos.

## 2 - REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 - Convenção sobre a Diversidade Biológica (CDB)

A Convenção sobre a diversidade Biológica - CDB é um tratado internacional assinado durante a Cimeira da Terra que ocorreu no Rio de Janeiro, Brasil, entre 3 e 14 de Junho de 1992 e, entrou em vigor em 29 de Dezembro de 1993, sendo visto como documento chave no desenvolvimento sustentável. A CDB foi ratificada por 188 países passando a ser dinamizadora e contemporânea de importantes desenvolvimentos e tendências das coleções de culturas de microrganismos com as suas inseparáveis parcerias com a biotecnologia. CBD compreende três grandes objetivos (Artigo 1<sup>o</sup>): (i) conservação da diversidade biológica (biodiversidade); (ii) uso sustentável dos seus componentes; (iii) partilha dos benefícios provenientes dos recursos genéticos (SMITH, 2003; LIMA, 2007).

### 2.2 - Coleções de Culturas Biológicas

O estabelecimento de depósitos de material biológico e o desenvolvimento de técnicas para a sua preservação e manutenção têm correspondido ao interesse crescente na investigação em ciências da vida de uma forma geral, e em particular devido ao grande potencial biotecnológico que se pode obter a partir dos materiais biológicos. A disponibilidade e qualidade do material biológico contribuem decisivamente para a qualidade da investigação. É neste âmbito que surgem as coleções de culturas (HALLUIN, 1996).

Coleções de culturas de microrganismos são centros de conservação de recursos genéticos *ex-situ*, que tem como função principal, a aquisição, caracterização, manutenção e distribuição de microrganismos e células autenticadas e reagentes biológicos certificados. Estas coleções *ex-situ* atuam também como provedores de serviços especializados e centros de informação. Os diferentes tipos de coleções de culturas, incluindo coleções de trabalho, coleções institucionais e principalmente as coleções de serviço, têm uma importância destacada na conservação e exploração da diversidade genética e metabólica (VAZOLLER; CANHOS, 2005).

Para Spencer-Martins (1994) e Uruburu (2003) as coleções de culturas são infraestruturas de apoio a uma grande variedade de trabalho biológico. A sua função primária é de obter, manter e distribuir culturas biológicas para ensino, investigação, ensaios, biotecnologia, etc. E também são, ainda, um meio de preservação da diversidade biológica *ex situ*. As primeiras coleções de culturas foram as de estirpes celulares microbianas e

originaram-se quando a escola de Koch introduziu o conceito de culturas puras em bacteriologia. A primeira coleção de serviço estruturada com a finalidade de fornecer culturas puras para estudos comparativos e identificação de bactérias foi a coleção criada pelo Dr. Frantisek Král na Universidade Alemã de Praga, provavelmente em 1890, destinada a conservar e distribuir microrganismos para o diagnóstico, ensino, investigação e indústria (SPENCER-MARTINS, 1994; URUBURU, 2003).

O Centro Mundial de Dados de Microorganismos (WDCM – World Data Center for Microorganisms [www.wfcc.info/ccinfo/statistics/](http://www.wfcc.info/ccinfo/statistics/)) há registros de cerca de 704 coleções de culturas, distribuídas por 72 países. Este número, no entanto, não reflete a luta contínua que a grande maioria das coleções (listadas ou não) tem para obtenção de fundos, a quantidade e/ou diversidade de investigação realizada pelas coleções, assim como a falta de apoio das instituições de acolhimento ou países. O Brasil possui quase a metade do número de registros de coleções de culturas do continente Americano na WDCM (Tabela 1) com 76 registros (WDCM, 2016).

**Tabela 1.** Distribuição das Coleções de Culturas Microbianas no Continente Americano no WDCM, 2016.

America		
Países	Coleções de Culturas	Nº de estirpes
Argentina	14	9878
Brasil	76	113130
Canadá	18	82315
Chile	4	2777
Colômbia	2	4474
Cuba	10	6372
Equador	1	2700
México	18	9369
E.U.A.	28	261627
Uruguai	1	20
Venezuela	3	3476
Total	175	496138

Fonte: WDCM, 2016.

As coleções de culturas ativas encontram-se numa posição privilegiada, especialmente com a experiência que detêm em técnicas de taxonomia molecular, para participarem na avaliação *in situ* e manutenção *ex situ* dos recursos genéticos, de que dependem futuras aplicações em saúde, agricultura, produção alimentar, biotecnologia, farmacologia, etc (SPENCER-MARTINS, 1994).

Com objetivo de catalogar e integrar os dados dos acervos existentes em coleções nacionais, o Ministério da Ciência e Tecnologia está apoiando o desenvolvimento e a implementação do Sistema de Informação de Coleções de Interesse Biotecnológico (SICol). Lançado em 2002, o SICol reúne informações de 30 coleções de culturas em um sistema de informação *on line* através do qual o usuário pode localizar linhagens de microrganismos, e cruzar dados taxonômicos (Species), dados de literatura científica (Scielo e PubMed) e informações de genomas (GenBank), agregando valor ao material biológico das coleções brasileiras (SICOL, 2014).

Com relação ao apoio e modernização às coleções biológicas o Ministério do Meio Ambiente através da Deliberação da Comissão Nacional de Biodiversidade (CONABIO) n.º 53, de 26 de agosto de 2008 dispõe sobre as diretrizes e estratégias para a modernização das coleções biológicas brasileiras e a consolidação de sistemas integrados de informações sobre biodiversidade. Considerando essencial a criação de uma política inter-setorial, envolvendo diferentes ministérios e agências federais e estaduais de Ciência, Tecnologia e Informação articulada com as instituições detentoras das coleções biológicas para a garantia de recursos necessários e suficientes, no curto, médio e longo prazo (BRASIL, 2008).

No Brasil, existem poucas coleções de fungos, frente à diversidade e quantidade desses organismos que ocorrem na natureza, e estão muito longe de serem consideradas adequadas. Muitas delas se encontram em condições precárias em decorrência de infraestrutura física inadequada e/ou da falta de recursos humanos especializados. Segundo Le Goff (1996), as coleções científicas são cruciais, no sentido etimológico da palavra, *crucis*, pois nelas entrecruzam patrimônio genético, informações, memória de coletas e materialidade de pesquisas científicas.

### **2.3 Métodos de Conservação dos Fungos.**

Os processos de isolamento, identificação, conservação e utilização de microrganismos vêm sendo considerados como rotina para o desenvolvimento de pesquisas e obtenção de produtos de interesse econômico (ABREU; TUTUNJI, 2004).

A importância da manutenção e principalmente preservação de microrganismos caracteriza-se como reflexo da necessidade de utilização de organismos ou espécimes a qualquer momento, quer para fins experimentais, didáticos, industriais ou estudos comparativos. Desta forma, conhecer a melhor maneira de preservar culturas e dispor de técnicas simples e eficiente é de grande valia aos laboratórios de microbiologia. Para tanto, a

sobrevivência do agente não se constitui o único objetivo. Torna-se necessário considerar a viabilidade e principalmente a escolha de métodos que não promovam em maior ou menor grau a ocorrência de mutações ou variabilidades. Também com reflexo na patogenicidade, virulência ou em características básicas da cultura original, atentando-se para a conservação de microrganismos (SOLA et al., 2012).

A escolha do método de armazenamento depende da infraestrutura e dos equipamentos disponíveis no laboratório, do microrganismo em estudo, dos objetivos do trabalho e até mesmo, da preferência do pesquisador. Todo trabalho envolvendo a conservação e o armazenamento de microrganismos deve ser realizado envolvendo absoluta assepsia (GONÇALVES; ALFENAS; MAFIA, 2016). A escolha para a manutenção mais adequada deve ser baseada também pelas características do agente em estudo, assim como pelas vantagens e desvantagens de cada técnica disponível. Para o estudo com células, tecidos e microrganismos, há o anseio pelo desenvolvimento de metodologias mais adequadas à sua conservação, porém, observa-se uma lacuna entre as publicações científicas pertinentes, verificando-se um número reduzido de estudos abordando a problemática da seleção e validação de protocolos principalmente na manutenção de microrganismos (SOLA et al., 2012).

Para a manutenção das culturas em laboratório existe ampla variedade de métodos recomendados e descritos na literatura nacional e internacional, não havendo, porém, um único que seja eficiente e recomendado para os diferentes grupos de fungos, porém será mais adequado aquele que mantiver, mesmo após longos períodos, as características originais da cultura, ou seja, viabilidade, esporulação e patogenicidade (FINNATI; APARECIDO, 2009).

De acordo Costa; Ferreira (1991), os métodos de manutenção de microrganismos podem ser classificados de acordo com tempo máximo de preservação: Métodos de curto prazo: repique contínuo; Métodos de médio prazo: preservação em óleo mineral, preservação em água esterilizada, congelamento a  $-20^{\circ}\text{C}$ , preservação em solo estéril; Métodos de longo prazo: liofilização e criopreservação. Já Nakasone et. al. (2004) classificaram os métodos de conservação de microrganismos em dois tempos de preservação: curto (repique contínuo) e ampliou o número de métodos classificados como a longo prazo (Sclerotização, Camada de óleo mineral, água destilada, substrato orgânico, solo, sílica gel, congelamento  $-20^{\circ}\text{C}$  e  $-80^{\circ}\text{C}$ , nitrogênio líquido, liofilização).

### 2.3.1 Repicagem Contínua

A repicagem contínua é um dos métodos mais antigos, e ainda muito utilizado, e consiste na transferência periódica do microorganismo em estudo para novos tubos de ensaio contendo meio de cultura fresco ( GONÇALVES, ALFENAS; MÁFIA, 2016). A técnica também chamada de subcultivo ou repicagem periódica é um método simples e tradicional de manutenção de culturas em laboratório. Por ser uma das mais antigas técnicas de conservação, tem sido bastante utilizada na preservação da viabilidade de microrganismos, principalmente de bactérias (COSTA; FERREIRA, 1991; ROMEIRO, 2006).

Os tubos são mantidos na temperatura que favorece o crescimento do patógeno até que se coloniza toda a superfície do meio de cultura, após a colonização, devem ser mantidos em refrigerador a baixa temperatura (10°C) (GONÇALVES, ALFENAS; MÁFIA, 2016).

Tal procedimento deve ser realizado a cada três ou quatro meses, a fim de que seja evitado o consumo completo de substrato e, também, o acúmulo excessivo de produtos de excreção, provenientes do metabolismo fúngico, uma vez que tais substâncias se comportam como agentes mutagênicos (PASSADOR et al., 2010).

As vantagens deste método são o baixo custo, não requer equipamentos especializados e o manuseio é simples (CEFAR, 2006).

Como desvantagens desse método, as repicagens de rotina dos fungos fitopatogênicos podem provocar mudanças na virulência, nas características das culturas e decréscimo da esporulação, espaço relativamente grande para o armazenamento, riscos de contaminação e possível perda da linhagem (CEFAR, 2006; PIRES et al., 2012). A fim de minimizar esses problemas, na repicagem devem-se transferir apenas as porções jovens e com esporulação da colônia e para evitar a contaminação das culturas dentro da geladeira, recomenda-se usar tampões de algodão hidrófobo (GONÇALVES, ALFENAS; MÁFIA, 2016).

Segundo Costa et al. (2009) a composição do meio de cultura pode interferir na resistência das células, no entanto, existem dois conceitos que se opõem sobre qual a composição ideal de meio de cultivo na manutenção de microrganismos: meios com boa composição de nutrientes ou meios menos elaborados, do ponto de vista nutricional.



### **2.3.2 Manutenção em Água Destilada Esterilizada ou Método de Castellani.**

O método de Castellani consiste na transferência de uma suspensão de células ou a inclusão de blocos de ágar contendo os microrganismos para um frasco, com a posterior adição de uma solução de água esterilizada (PIMENTEL; FIGUEIREDO, 1989; NEUFELD; OLIVEIRA, 2008), ou em solução aquosa de NaCl 0,85 % (GONÇALVES, ALFENAS; MÁFIA, 2016).

Normalmente, são colocados cinco discos por frascos de (10 mL) contendo água destilada esterilizada até a metade de sua capacidade e os mantém em temperatura ambiente ou em torno de 10 °C (GONÇALVES, ALFENAS; MÁFIA, 2016).

Dentre as vantagens desse método a preservação por longos períodos das características originais da cultura, nenhuma contaminação por ácaros micófagos, baixo custo do processo por utilizar somente água destilada e necessidade de pequeno espaço físico para acondicionar os frascos, além de poder ser empregado para grande número de gêneros e espécies de fungos (PIRES et al., 2012).

Apesar do baixo custo e reprodutibilidade, nota-se como desvantagens desse método os riscos de contaminação das culturas por bactérias e um possível comprometimento na estabilidade genética de alguns microrganismos. Quanto à utilização dos blocos de ágar em água, sua aplicação é restrita a microrganismos que tenham grande aderência ao ágar como bolores e algumas leveduras (COSTA; FERREIRA, 1991; ROMEIRO, 2006).

Deve-se utilizar esta técnica preferencialmente com culturas jovens, com cerca de 10 a 15 dias, e buscando redução do metabolismo, com conseqüente latência das células diante da restrição de fontes nutritivas (COSTA; FERREIRA, 1991; ABREU; TUTUNJI, 2004).

Passador et al., (2010) comparando a viabilidade, a patogenicidade de fungos fitopatogênicos preservados pelos métodos de Castellani (água destilada) e repicagens periódicas, mantidos por longos períodos de tempo concluíram que o método de Castellani foi mais eficiente na preservação das características morfo-fisiológicas e da patogenicidade das culturas estudadas em relação ao método de repicagens contínuas. Isto porque segundo o autor devido ao menor número de vezes em que as culturas são manuseadas, permanece o micélio em estado de latência, o que reduz a probabilidade de mutações.

### 2.3.3 Manutenção em Óleo Mineral

Este método de conservação é uma alternativa simples que consiste na aplicação de uma camada de óleo mineral esterilizado sobre uma cultura, a fim de limitar a quantidade de oxigênio disponível, causando assim uma redução no metabolismo e conseqüentemente, na taxa de multiplicação do agente e armazenada sob baixa temperatura (4°C) (RHODES, 1957; COSTA; FERREIRA, 1991; ROMEIRO, 2006; GONÇALVES, ALFENAS; MÁFIA, 2016).

A manutenção de culturas submersas em óleo mineral promove a redução do consumo de oxigênio em torno de 10 % em poucas horas. Costa; Ferreira (1991) e Romeiro (2006) afirmaram que camadas de óleo superiores a 1,0 cm não devem ser utilizadas visto a redução da viabilidade dos microrganismos em condições de total exaustão de oxigênio. Caso a conservação de culturas seja feita em tubo inclinado, todo o meio deve ser recoberto pelo óleo, pois o contato dos microrganismos com o ar promove desidratação total da cultura visto a evaporação da água (MEDEIROS, 2008).

Os óleos utilizados para a conservação de microrganismos devem ser de boa qualidade e pureza, apresentar alta viscosidade, densidade relativa entre 0,8 e 0,9 à temperatura de 20 °C e, além disso, não devem conter produtos tóxicos, sendo a parafina e a vaselina, os mais recomendados para a manutenção de microrganismos em curto prazo (BARKER, 2002; ROMEIRO, 2006).

Quanto ao processo de esterilização Gherna (1981) relatou a existência de duas metodologias possíveis para a esterilização do óleo mineral, autoclavagem a 1 atm por 30 minutos seguida de secagem a 150 °C, ou aquecimento à 170 °C por 1 hora.

Costa et al. (2009) afirmaram que esta técnica proporciona uma maior longevidade às estirpes, quando comparada à repicagem periódica, bem como redução da velocidade de desidratação do meio de cultura, visto a diminuição de oxigênio para a cultura e posterior multiplicação. Porém, apresenta desvantagens equivalentes à técnica de subcultivo, como a possibilidade de contaminações, instabilidade genética e dificuldades com a utilização do óleo (esterilização e manuseio).

Pesquisadores relatam que as bactérias podem ser conservadas por períodos de um a sete anos, dependendo da espécie, enquanto fungos sobrevivem por um a cinco anos, e leveduras até sete anos (COSTA; FERREIRA, 1991; ABREU; TUTUNJI, 2003; COSTA et al., 2009).

### 2.3.4 Manutenção em Congelamento Comum

O congelamento comum consiste na conservação de agentes em temperaturas relativamente baixas entre 4 e -20 °C. Apresenta-se como um dos métodos de manutenção mais simples e baratos, além de oferecer boa segurança para o armazenamento de diversos microrganismos por períodos de 3 meses a 2 anos (TORTORA et al., 2011).

Como desvantagem, verifica-se possível redução da viabilidade de alguns microrganismos, em função dos danos causados às células decorrentes da formação de cristais de gelo e da variação eletrolítica na faixa de temperatura utilizada (ROMEIRO, 2006; MEDEIROS, 2008).

### 2.3.5 Conservação em Solo Estéril

O armazenamento em solo é técnica de fácil execução, requer pouco espaço, possibilita a obtenção de grande quantidade de propágulos de microrganismos e garante sua viabilidade por muito tempo (GONÇALVES, ALFENAS; MÁFIA, 2016).

Há duas técnicas de preservação de culturas de fungo no método em solo. A primeira consiste em utilizar solo estéril infestado com inóculo do patógeno. Este solo deve ser imediatamente seco após a infestação e armazenado em temperatura de refrigerador. Na segunda técnica, o solo previamente infestado com o microrganismo é incubado, permitindo assim, o crescimento do fungo (BUENO, 2006).

Este método é indicado para fungos habitantes do solo como *Rhizoctonia* spp., *Sclerotium* spp., *Alternaria* spp., *Cochliobolus* sp., *Calonectria* spp., *Cylindrocladiella*, *Falcocladium*, *Fusarium* spp., *Trichoderma* spp. e *Gliocladium* spp. Grandes coleções podem ser armazenadas por este método numa sala com baixas temperaturas (4–5 °C) (GONÇALVES, ALFENAS; MÁFIA, 2016).

### 2.3.6 Liofilização

A liofilização é um método que envolve o congelamento rápido da cultura seguido da sua posterior secagem por sublimação do gelo com pressão reduzida. A técnica se baseia na remoção da água intracelular de materiais biológicos congelados, por sublimação, evitando a formação de cristais de gelo, capazes de provocar danos às estruturas celulares, além da

degradação de enzimas presentes no citosol, levando à morte dos agentes (COSTA; FERREIRA, 1991; MORGAN et al., 2006).

Esta técnica pode ser usada apenas para fungos esporulantes e desde que os esporos sejam resistentes, pois estruturas demasiadamente delicadas não suportam esse procedimento, sendo esta a principal desvantagem da técnica (FIGUEIREDO; PIMENTEL, 1977; PITTOMBO, 1989; PASSADOR et al., 2010). Finatti; Aparecido (2009) preservando as culturas de *Verticillium* nesse método, observaram que nenhuma cultura foi viável concluindo que as espécies pertencentes ao gênero *Verticillium* apresentam esporos extremamente delicados, incapazes de resistirem ao processo de liofilização.

A eficiência do método pode ser aumentada adotando-se procedimentos inerentes a um ou outro patógeno (GONÇALVES, ALFENAS; MÁFIA, 2016). Na tentativa de contornar os danos celulares, substâncias protetoras podem ser adicionadas durante o preparo de microrganismos, antes do congelamento ou da secagem. Vale destacar que a escolha destas substâncias varia com o microrganismo alvo da liofilização, porém, compostos como o soro bovino, leite desnatado, glicerol, betaína, adonitol, sacarose, glicose, lactose, trealose e alguns polímeros como dextran e polietilenoglicol podem oferecer proteção para muitas espécies (HUBÁLEK, 2003; PAOLI, 2005; COSTA et al., 2009). Para a maioria dos fungos fitopatogênicos a solução protetora é aconselhável, contudo, urediniósporos de fungos causadores de ferrugens devem ser liofilizados puros, pois não sobrevivem em suspensão (GONÇALVES, ALFENAS; MÁFIA, 2016)

As desvantagens da liofilização é que este requer infraestrutura de elevado valor e constitui o processo de maior dificuldade para execução, em comparação com outros métodos mencionados. Além disso, requer conhecimento e domínio completo da técnica (GONÇALVES, ALFENAS; MÁFIA, 2016).

Com relação às vantagens, o método evita a contaminação por ácaros, diminui a variação de linhagens devido ao raro manuseio e necessita de espaço bastante reduzido para o acondicionamento das ampolas (PIRES et al., 2012). A grande maioria dos fungos e bactérias pode ser armazenada com sucesso por este método por períodos superiores aos 20 anos (GONÇALVES, ALFENAS; MÁFIA, 2016).

## **2.4 Caracterização Molecular dos Fungos**

Os métodos baseados em técnicas moleculares constituem as principais estratégias utilizadas para identificação de fungos fitopatogênicos. Esses métodos são altamente

sensíveis, apresentam alta especificidade e permitem detecção rápida e acurada de diversos fungos fitopatogênicos (PINHO; MACHADO; FIRMINO, 2016).

Há diversos marcadores moleculares em estudos de sistemática para diferentes níveis taxonômicos, o DNA ribossomal (rDNA) destaca-se no estudo de fungos (SILVA, 1997; FOULY et al., 1997; FUNGARO, 2000; ARRUDA et al., 2003). Essa região tem sido proposta como um marcador potencial de “código de barras” para fungos (BELLEMAIN et al., 2010; PORTER; GOLDING, 2011; SCHOCH et al., 2012).

Nos eucariotos o rDNA, contido nas regiões organizadoras do nucléolo, tem sido objeto de um grande número de estudos devido à estrutura desta região, o qual se apresenta como um cluster gênico dos genes 18S, 5,8S e 28S (Figura 1). A função do rDNA, ao contrário de outras sequências repetitivas que aparentemente não tem função conhecida no genoma, é a codificação de subunidades do RNA ribossômico (rRNA), implicado no processo de tradução de proteínas. Em geral, as regiões 28S, 18S e 5,8S das unidades de repetição são muito conservadas e podem ser utilizadas nos estudos de ecologia e filogenia de fungos, porém, são mais adequadas para discriminação ao nível de reino a gênero (BERBEE; TAYLOR, 1995; GARGAS; DEPRIEST, 1996; GUARRO et. al., 1999; FUNGARO, 2000; MITCHELL; ZUCCARO, 2006).

Por outro lado, as regiões espaçadoras internas (ITS) acumulam mais variabilidade, sendo mais utilizadas na diferenciação de espécies ou entre linhagens da mesma espécie (CARBONE; KOHN, 1997; RISTAINO et al., 1998; ESTEVE-ZARZOSO et al., 1999). Para fungos de forma geral, o marcador que obteve maior aceitação entre os micologistas para funcionar como código de barras foi a região do espaçador interno transcrito (“Internal Transcribed Spacer” – ITS) do DNA ribossômico devido: (i) a facilidade de amplificação, (ii) variação interespecífica considerável, (iii) maior quantidade e representatividade de sequências nos bancos de dados, (iv) possibilitar a comparação de uma ampla diversidade de espécies fúngicas, e (v) aplicável como “código de barras” para outros organismos eucariotos (PINHO; MACHADO; FIRMINO, 2016).

Basicamente, a identificação de fungos baseando-se na abordagem do “Código de Barras” pode ser realizado através de sites como o “FungalBarcoding” (<http://www.fungalbarcoding.org>) ou outros bancos de dados importantes como AFTOL (Assembling the Fungal Tree of Life), NCBI, UNITE, EBI, DDJB, Q-bankFungi etc.) em que são inseridas sequências da região ITS do fungo a ser identificado e realizado o alinhamento em programas específicos destas sequências e utilizadas em análises filogenéticas para reconhecimento de espécies (McLAUGHLIN et al., 2009; ABARENKOV et al., 2010;

PINHO; MACHADO; FIRMINO, 2016). Muitas das sequências desses bancos de dados estão depositadas no GenBank, sendo a fonte mais utilizada para classificação de sequências da região ITS (PORTER; GOLDING, 2011).

As regiões ITS são relativamente curtas (500-800 pb) e aparecem em grande número de cópias no genoma. Em consequência disto, é grande o número de sequências ITS de diferentes fungos que estão disponíveis nos bancos de dados de sequências de nucleotídeos (MARTINS, 2005).

**Figura 1** - Representação esquemática do espaçador transcrito interno (ITS), a unidade repetitiva ribossomal nuclear utilizada para descrever os fungos ao nível da espécie e as setas indicam a posição dos iniciadores (*primers*) usados nas reações de PCR e a região amplificada (Adaptado de Bellemain, 2010).



## 2.5 Informatização e acesso aos dados de coleções biológicas.

Ao longo da história, coleções biológicas (zoológicas, botânicas, microbianas) têm sido repositórios estáticos de informação, catalogando espécimes e realizando atividades de análise sistemática. Com a evolução da ciência e com a demanda por dados sobre espécies e espécimes por diferentes disciplinas e áreas de conhecimento, as coleções não podem mais ser uma mera constatação da existência de determinados organismos no passado. Sua missão deve ser a de documentar, compreender e educar o mundo sobre a vida em nosso planeta, no passado e no presente. Devem ser centros pró-ativos na pesquisa, na educação e na conservação da biodiversidade (CANHOS et al., 2006).

No período que antecedeu a Web, os usuários precisavam de um determinado grau de competência e conhecimento em computação para acessar diferentes sistemas de dados. Graças ao desenvolvimento de padrões e protocolos, hoje, através de apenas um software (web browser) os usuários podem acessar praticamente qualquer sistema de informação disponível na Internet, facilitando sobremaneira o acesso a sistemas verdadeiramente complexos de disseminação de dados e informações. A complexidade passa a estar quase que exclusivamente no desenvolvimento dos sistemas e não no acesso aos dados e informações (CANHOS et al., 2005).

A Conferência das Nações Unidas sobre o Meio Ambiente Humano, realizado em Estocolmo no ano de 1972, representa o nascimento do direito ambiental internacional com olhar ao direito à informação ambiental (GONZALEZ, 2010).

A Convenção da Diversidade Biológica (CDB) encorajou as instituições depositárias de dados direta ou indiretamente relacionados à biodiversidade a disseminá-los pública e gratuitamente, e, no final do século XX, no Brasil e no mundo, diversos provedores iniciaram projetos independentes de informatização de acervos que hoje estão amplamente disponíveis via internet (GONZALEZ, 2009).

No artigo 17 da CDB sobre o intercâmbio de informações diz: “As Partes Contratantes devem proporcionar o intercâmbio de Informações, de todas as fontes disponíveis do público, pertinentes à conservação e à utilização sustentável da diversidade biológica, levando em conta as necessidades especiais dos países em desenvolvimento” (BRASIL, 2000).

Já o artigo 18 indica que a Conferência das Partes deve determinar a forma de estabelecimento de um mecanismo de intermediação para promover e facilitar as cooperações técnica e científica. Tendo como base esses dois artigos, foi criado o Clearing-House Mechanism (CHM)<sup>1</sup>, um mecanismo para intermediação da informação e para a promoção de cooperação (CANHOS et al., 2006).

No Brasil, as ações para intercâmbio das informações ambientais originou o CRIA - Centro de Referência em Informação Ambiental que tem como meta e estratégia a disseminação de informação eletrônica, como ferramenta na organização da comunidade científica e tecnológica do país. Atua especificamente na área de informação biológica, de interesse industrial e ambiental, e pretende, através de sua atuação, contribuir diretamente para a conservação e utilização racional da biodiversidade no Brasil. Uma sociedade sustentável pressupõe uma sociedade informada, na qual os vários segmentos produzem e têm acesso à informação qualificada, utilizando-a nos processos de formulação e decisão política (CRIA, 2015). O Centro CRIA têm alguns projetos dentre eles: a rede SpeciesLink e Sicol.

A rede *speciesLink* tem por princípio promover o acesso livre e aberto aos dados, informações, e ferramentas disponíveis a qualquer indivíduo ou grupo. Os participantes da rede manifestaram o seu compromisso de tornarem seus dados disponíveis para promover a pesquisa e o desenvolvimento científico no país e no exterior e para estimular o uso público da informação científica (SPECIESLINK, 2016).

O Ministério da Ciência e Tecnologia - MCT apoiou o desenvolvimento e a implementação do *Sistema de Informação de Coleções de Interesse Biotecnológico (Sicol)* com objetivo de catalogar e integrar os dados dos acervos existentes em coleções nacionais.

Lançado em 2002, o Sicol reúne informações sobre coleções de culturas de microrganismos, em um sistema de informação *online* através do qual o usuário pode de forma dinâmica, integrar dados de linhagens de microrganismos disponíveis nas coleções nacionais, e cruzar estes dados com informações de diretórios taxonômicos (Species 2000), literatura científica (SciELO e PubMed) e bancos de dados genômicos (GenBank), agregando valor ao material biológico disponível nas coleções brasileiras (VAZOLLER; CANHOS, 2005).

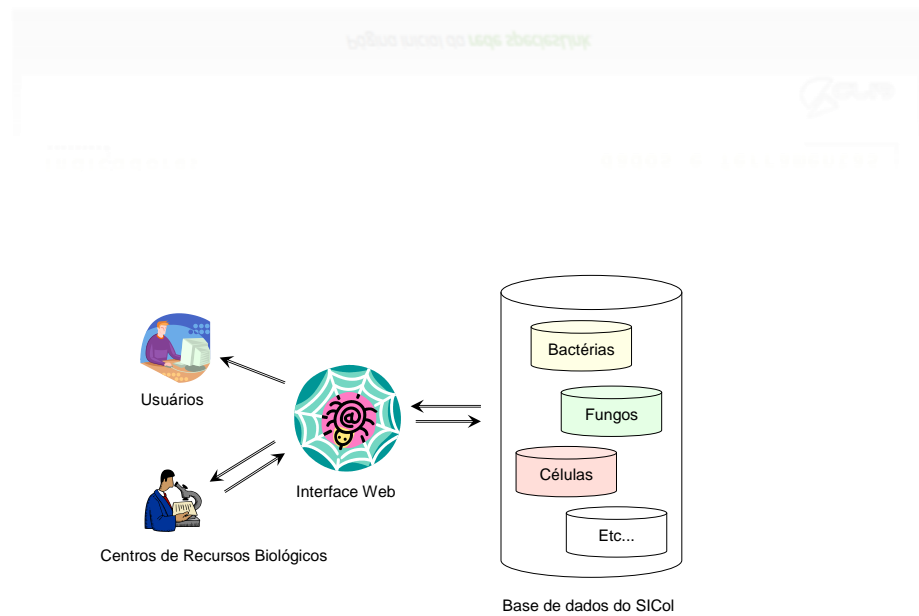
No SICol os dados são enviados em grandes blocos, já organizados e mantidos pelas coleções participantes, através de arquivos pré-formatados. O SICol adotou o padrão CABRI (*Common Access to Biological Resources and Information*)<sup>1</sup>, com pequenas modificações, como o modelo de dados. Cada um dos provedores deve produzir e formatar uma planilha de dados de acordo com o modelo definido pelo SICol antes de alimentar o sistema central. Para o envio dos dados, foi criada uma página web através da qual, mediante a utilização de senhas de acesso, as coleções podem periodicamente submeter (enviar) seus dados atualizados. A figura 2 apresenta o esquema adotado pela rede SICol (CANHOS et al., 2005).

---

<sup>1</sup> <http://www.cabri.org>



**Figura 2.** Projetos relacionados ao Centro de Referência em Informação Ambiental- CRIA (SpeciesLink e SICol) com representação da página do *SpeciesLink* e esquema de acesso aos dados do SICol.



**Fonte:** Canhos et al., 2005.

### **3 – MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Local do Experimento**

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Fitopatologia do Núcleo de Biotecnologia Agrônômica, Laboratório de Genética - Labwick e Laboratório de Genética e Biologia Molecular da Universidade Estadual do Maranhão – UEMA, São Luís – MA e Caxias –MA.

#### **3.2 Obtenção dos isolados fúngicos fitopatogênicos mantidos na Micoteca “Prof.º Gilson Soares da Silva”**

Foram coletadas amostras de material vegetal com sintomas característicos de doenças em áreas produtoras, na ilha de São Luís e demais municípios do Estado do Maranhão, atentando-se para algumas informações como, local de procedência, hospedeiro e data de isolamento.

Para o isolamento dos fitopatógenos foram utilizados fragmentos da parte intermediária das lesões, em seguida, foram submetidos à assepsia com álcool 50 %, solução aquosa de hipoclorito de sódio na proporção 3:1 e duas lavagens com água destilada, para retirar o excesso da solução de hipoclorito. Os fragmentos foram colocados em placas de Petri contendo meio BDA (Batata-Dextrose-Ágar), em quatro pontos equidistantes e mantidas em temperatura ambiente  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$  para o crescimento do fungo. A identificação dos isolados procedeu-se na observação dos aspectos morfológicos e com auxílio de microculturas (MENEZES; ASSIS, 2004).

Além do isolamento de novos isolados fúngicos foi efetuado um levantamento dos fungos fitopatogênicos depositados no Laboratório de Fitopatologia e em qual método encontravam-se preservados. Estes isolados fúngicos passaram por um processo de confirmação da identificação e verificação de pureza, principalmente, com base na análise de características micro-morfológicas.

#### **3.3 Caracterização morfológica dos fungos fitopatogênicos da Micoteca “Prof.º Gilson Soares da Silva”**

Para identificação dos isolados, após os isolamentos, os patógenos foram colocados para crescimento de culturas monospóricas realizando a classificação das colônias quanto à

cor, produção de corpos de frutificação e houve também a confecção de microculturas para observação das estruturas dos fungos em microscópio óptico, para posterior registro fotográfico em câmera AxioCam modelo ERc 5s (ZEISS®). Esta técnica consiste no crescimento do fungo em uma pequena quantidade de BDA o que permite o desenvolvimento e classificação através de chaves de identificação. Algumas chaves utilizados durante a identificação dos isolados fúngicos foram: Dematiaceous Hiphomycetes (ELLIS, 1971); The genera *Beauveria*, *Isaria*, *Tritirachium* and *Acrodontium* gen. nov (HOOG, 1972), Phylogenetic lineages in the *Botryosphaeriaceae* (CROUS et al., 2006), The *Fusarium* Laboratory Manual (LESLIE; SUMMERELL, 2006); *Colletotrichum*: Biology, Pathology and Control (BAILEY; et al., 1992); The Genus *Fusarium* (BOOTH, 1971); Illustred genera of imperfect fungi (BARNETT; HUNTER , 1998), dentre outros.

### **3.4 Recuperação dos isolados fúngicos mantidos na Micoteca “Prof.ºGilson Soares da Silva”.**

A recuperação dos isolados fúngicos foi feita com a repicagem apropriada aos métodos de preservação. No método de Repique Continuo pequeno fragmento das culturas fúngicas foram transferidos para o centro de placas de Petri contendo meio de BDA, e mantidos a temperatura ambiente ( $25\pm 2$  °C). Após o crescimento dos isolados fúngicos, a identificação foi confirmada através da observação das características micro-morfológica específicas, observando também o estado de pureza em que se encontravam os isolados.

### **3.5 Cadastro dos isolados fitopatogênicos**

Após a identificação, cada isolado foi cadastrado em fichas contendo o timbre da Micoteca e receberam o código MGSS, seguido de uma numeração crescente, de acordo com a ordem de obtenção da cultura fúngica. No registro foram preenchidos os dados do método de preservação em que os isolados eram mantidos, além de gênero e espécie, número da linhagem, data de isolamento, local de origem, hospedeiro de origem ou substrato de origem.

### **3.6 - Métodos de Preservação**

#### **3.6.1 - Repicagem Contínua.**

Foram efetuadas transferências de fragmentos de micélio de um meio de cultura, para um novo meio de cultura BDA, em tubos de ensaio, visando o desenvolvimento máximo vegetativo, estruturas de resistência e de propagação dos isolados fúngicos. As culturas foram

estocadas a baixas temperaturas (10 °C). A repicagem contínua foi feita antes do consumo total do meio de cultivo, a fim de evitar alterações morfológicas e fisiológicas nas culturas.

### **3.6.2 - Castellani**

Este método consistiu no armazenamento de discos de meio de cultura de BDA, contendo micélio jovem, em frascos de vidro previamente esterilizados, contendo aproximadamente, 4 ml de água destilada esterilizada, após a transferência, os frascos foram lacrados com tampa de borracha passado filme plástico e identificados. A conservação foi efetuada em baixas temperaturas, podendo também ser feita em temperatura ambiente. Com isso o fungo teve a diminuição do metabolismo e formação do estado latente devido à falta de fontes nutritivas.

### **3.6.3 - Preservação em Solo**

Tubos de ensaio contendo 5g de solo foi esterilizado por pelo menos duas vezes a 121° C por 1 hora, seco em temperatura ambiente. Após secagem uma suspensão de conídios foi preparada com adição de água destilada em placas de vidro de 9 cm com crescimento do isolado fúngico e dentro de câmara de fluxo laminar realizado a raspagem dessas colônias fúngicas para posterior transferências de 2 mL da suspensão para os tubos de ensaio contendo solo estéril e as amostras foram vedadas e estocadas em freezer a 5° C.

### **3.6.4 - Óleo Mineral**

Foram retirados fragmentos de cultura de fungos fitopatogênicos com o meio de cultivo, acondicionados em tubos de ensaio, e foi adicionada uma camada de óleo mineral esterilizado recobrando até aproximadamente 1 cm da superfície superior do meio de cultura, sendo logo após, devidamente fechado com filme plástico. O óleo mineral para preservação de fungos fitopatogênicos utilizado possui grande viscosidade. Os fungos preservados neste método foram mantidos à temperatura de 5 °C em refrigerador Frost Free.

### **3.6.5 - Congelamento**

Os fungos fitopatogênicos foram depositados em tubos tipo *Eppendorf* de 2 mL contendo meio de cultura BDA e armazenados em freezer Electrolux® Frost Free com uma faixa de temperatura de 0 a -20° C o que resultou na redução do metabolismo induzindo um estado de latência artificial.

### **3.6.6 –Liofilização**

Para liofilização, os isolados foram transferidos para meio BD (Batata-Dextrose) e incubados por sete dias a 25 °C. Após esse período, a massa micelial de cada isolado foi filtrada e seca por duas horas em câmara de fluxo laminar transferidos para vidros estéreis e adicionados solução de glicose 10 % e posteriormente guardados em freezer -80 °C. Após, no mínimo, 12 horas foram levados ao Liofilizador L101- Liobras<sup>®</sup> onde passaram pelo processo que consiste na conservação de culturas pela dessecação rápida em estado de congelamento permanecendo no aparelho por 24 horas e por fim armazenados em freezer Fros Free Electrolux<sup>®</sup> a 4 °C.

### **3.7 Documentação e Informatização da Micoteca “Prof.º Gilson Soares da Silva”.**

O registro de entrada dos isolados foi feito mediante preenchimento de formulário, após identificação morfológica do fungo com o número de registro, data de depósito, métodos de preservação que os isolados encontravam-se conservados, gênero e espécie do isolado, número da linhagem, data de isolamento, local de origem, substrato de origem do fungo, conforme orientações do Specieslink. Este formulário encontra-se em uma versão impressa e outra digital com cópias.

Foram fotografados os hospedeiros com sintomas da doença, a colônia pura do fungo associada ao sintoma e as estruturas microscópicas do fungo. Além disso, foi realizado um resumo a respeito da classificação taxonômica, hospedeiro, métodos de conservação do isolado, substrato de isolamento, sobre a doença, danos, referências bibliográficas e imagens.

Como parte dos serviços da Micoteca de incorporação de cultura fúngica, identificação e envio de culturas fúngicas foram criados e dispostos formulários que o interessado deve preencher, como por exemplo, para incorporação de cultura fúngica, o depositante deve informar o código do isolado, gênero e espécie, nome de quem determinou, data da determinação, identificação molecular dentre outras informações. Já para a identificação e envio de culturas fúngicas devem ser preenchidos os formulários com o nome do solicitante, Instituição ou coleção destinatária, nome do representante da instituição ou coleção destinaria dentre outros quesitos.

Todas as informações a respeito dos isolados fúngicos estão dispostos no site da Micoteca ou poderão ser solicitados via e-mail ou ofício.

### 3.8 Identificação molecular de isolados dos principais gêneros de fungos.

#### 3.8.1 Extração de DNA

Após a identificação morfológica e incorporação dos isolados na Micoteca, iniciou-se a identificação molecular dos mesmos.

A extração foi realizada através da utilização de KIT HiPura™ para extração de DNA genômico de fungos sp. O preparo das amostras para extração consistiu no cultivo dos isolados em meio sólido ou líquido, de acordo com a espécie, sendo que as espécies que possuem a característica de produzirem micélio abundante foram colocados para crescer em meio sólido e posteriormente raspado, já os que produziram pouco micélio foram colocados para crescer em meio líquido, com posterior filtragem e secagem. Após a obtenção das amostras, cerca de 100 mg de tecido fúngico foram macerados na presença de nitrogênio líquido até formar um pó fino e o DNA extraído de acordo com o protocolo de extração fornecido junto com o Kit.

Das amostras de DNA extraídas foi retirada uma alíquota para verificação da qualidade e concentração do DNA, através de análise comparativa em gel de agarose a 0,9 % contendo brometo de etídeo a 0,01 % (v/v). Após este processo as amostras foram armazenadas a -80 °C até o momento do uso.

#### 3.8.2 Amplificação da região ITS do rDNA

A amplificação das regiões ITS1-5.8S-ITS2 do DNA ribossomal (rDNA) foi realizada conforme metodologia descrita por White et al. (1990), utilizando-se os *primers* ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') em termociclador programado para as seguintes condições: 94 °C por 12 minutos (desnaturação e ativação enzimática), 35 ciclos – 94 °C por 30 segundos (desnaturação), 55 °C por 30 segundos (anelamento) e 72 °C por 30 segundos (extensão) - 72 °C por 10 minutos (extensão final). Para a reação de PCR foram utilizados 20 ng de DNA molde, 10 mM de cada *primer*, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,08 mM de cada dNTP, 0,2 U/μL de *Taq* DNA polimerase, 50 mM de Tris-HCl (pH 8,4) e 20 mM de KCl em 50 μL de volume final. Uma alíquota do produto da reação de amplificação (10 μL) foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1,5 % (p/v) em tampão TBE 1X contendo brometo de etídeo a uma concentração de 0,01 % (v/v), a uma voltagem de 90 V por 1 hora. O *Scada 100bp DNA Ladder* (Sinapse inc.) foi utilizado como marcador de peso molecular. Decorrido o tempo de eletroforese, o gel foi retirado da cuba e visualizado

sob luz UV e posteriormente fotografado.

Os produtos da reação de PCR foram purificados com auxílio de Kits de purificação comercial por coluna (Purelink® – Thermo Fisher Scientific, Inc.), e em seguida encaminhados para sequenciamento no Laboratório de Genética e Biologia Molecular da Universidade Estadual do Maranhão (Campus Caxias).

As sequências de DNA obtidas foram avaliadas quanto à qualidade de sequenciamento, com base nos respectivos eletroferogramas, alinhadas par-a-par e editadas manualmente, para obtenção de uma sequência consenso para cada um dos isolados. As sequências consenso geradas foram comparadas com aquelas depositadas no banco de dados NCBI (*National Center for Biotechnology Information website* - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), por meio da ferramenta *do BLAST search*, para confirmação do gênero de cada um dos isolados. A verificação da identidade das espécies causadoras de doenças em plantas e entomopatógenos foi realizada a partir de análises filogenéticas de *Máxima verossimilhança*, e por meio de 1000 repetições de bootstrap, em comparação às demais sequências depositadas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), e/ou de espécies-tipo presentes (Tabela 2).

**Tabela 2.** Sequências utilizadas para análise de filogenia e geração da matriz de divergência genética.

ESPÉCIE	Nº DA ESTIRPE	HOSPEDEIRO/ SUBSTRATO	CIDADE/UF/PAÍS	CÓDIGO NO GENBANK ITS
<i>Absidia anomala</i>	CBS_125.68	-	-	JN205815
<i>Achaetomium strumarium</i>	CBS 333.67	-	-	AY681204
<i>Allophoma zantedeschiae</i>	CBS 131.93	<i>Calla</i> sp.	Netherlands/Holanda	FJ427084
<i>Aschersonia placenta</i>	AL69	-	-	DQ365845
<i>Ascochyta hordei</i> var. <i>hordei</i>	CBS 544.74	<i>Triticum aestivum</i> (Gramineae)	South Africa/ÁFRICA DO SUL	GU237887 -
<i>Alternaria alternata</i>	MGSS 184	Melância/folha	Guimarães- MA/Brasil	Deste estudo
<i>Alternaria alternata</i>	YJYM01.	<i>Tectona grandis</i>	China	KM374667
<i>Alternaria alternata</i>	CBS 106.24	<i>Malus domestica</i>	EUA	KP124298
<i>Alternaria carthami</i>	COAD 1782.1	<i>Carthamus tinctorius</i>	Brasil	KP231871
<i>Alternaria compacta</i>	-	<i>Hydrangea anomala</i> subsp. <i>petiolaris</i>	Itália	EU128529
<i>Alternaria ochroleuca</i>	MGSS 178	Tomate -Fruto	São Luís – MA/Brasil	Deste estudo
<i>Alternaria ochroleuca</i>	FCBP:1529	Money Plant	Paquistão	KT835048
<i>Alternaria porri</i>	ASU2	Onion	Egito	Kr811362
<i>Alternaria solani</i>	CBS 106.21	-	-	KJ718236
<i>Alternaria tenuissima</i>	X1	<i>Aloe barbadensis</i>	Grécia	KU162948
<i>Beauveria asiatica</i>	ARSEF 4580	-	Coréia do Sul	HQ880787
<i>Beauveria australis</i>	ARSEF 4580	-	Austrália	HQ880788
<i>Beauveria bassiana</i>	MGSS 87	-	Recife- PE/Brasil	AY532012
<i>Beauveria bassiana</i>	2922	-	-	AY532012



ESPÉCIE	Nº DA ESTIRPE	HOSPEDEIRO/ SUBSTRATO	CIDADE/UF/PAÍS	CÓDIGO NO GENBANK ITS
<i>Beauveria bassiana</i>	MTCC 4516	Coleoptera	India	JQ266184
<i>Beauveria bassiana</i>	2641	Hymenoptera	Brasil	AY532008
<i>Beauveria bassiana</i>	4474	-	-	AY532027
<i>Beauveria brongniartii</i>	SASRI HH112	Larva não identificada	África do Sul	JX110377
<i>Beauveria brongniartii</i>	SASRI SCHA2	Schizonycha affinis beetle	África do Sul	JX110388
<i>Beauveria cf. caledonica</i>	ARSEF 2251	Coleoptera	Escócia	AY532003
<i>Beauveria kipukae</i>	ARSEF 7032	-	EUA	HQ880803
<i>Beauveria lii</i>	RCEF5500	-	China	JN689372
<i>Beauveria varroae</i>	ARSEF8257	<i>Varroa destructor</i>	França	HQ880800
<i>Bionectria ochroleuca</i>	Sin80	-	-	KF055399
<i>Bipolaris heveae</i>	Cyn-1	<i>Cynodon dactylon</i>	Japão	AB179835
<i>Botryosphaeria rhodina</i>	CBS 164.96	Recife de corais	Nova Guiné	
<i>Cercospora beticola</i>	CPC 11557	-	-	AY840527
<i>Chaetomium fuscum</i>	MGSS 83	Vinagreira- sementes	São Luís – MA/Brasil	Deste estudo
<i>Chaetomium ancistrocladum</i>	IRAN 1276C, C105	Sementes de <i>Triticum aestivum</i> ,	Hadishahr, IRÃ	HM365241
<i>Chaetomium fuscum</i>	CBS 140.50 [T]	Pano de juta úmido	Índia	JX280787
<i>C. coarctatum</i>	CBS 162.62 C72	Semente de Campanula medium	RÚSSIA	HM365260
<i>C. globosum</i>	CBS 148.51, C63	Algodão armazenado	EUA	HM365254
<i>C. elatum</i>	IRAN 1654C, C29	Sementes de trigo	Sarab, Irã	HM365236

ESPÉCIE	Nº DA ESTIRPE	HOSPEDEIRO/ SUBSTRATO	CIDADE/UF/PAÍS	CÓDIGO NO GENBANK ITS
<i>Cladosporium asperulatum</i>	CBS 113744	<i>Alloxylon wickhamii</i>	Austrália	HM147996
<i>C. asperulatum</i>	CBS 126339	<i>Eucalyptus</i> sp.	Índia	HM147997
<i>Cladosporium bruhnei</i>	CBS 134.31	-	Alemanha	EF679335
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	MGSS 180	Alface - folha	São Luís – MA/Brasil	Deste estudo
<i>C. cladosporioides</i>	CSPF6	Planta desconhecida	Índia	KU508798
<i>C. cladosporioides</i>	CBS 145.35	<i>Psidium sativum</i>	Alemanha	HM148013
<i>C. cladosporioides</i>	CBS 144.35	<i>Psidium sativum</i>	África do Sul	HM148012
<i>C. perangustum</i>	CPC 11046	Margarina	Austrália	HM148125
<i>C. tenellum</i>	CBS 1216634	água hiper salina de salinas - Hypersaline water from salterns	Israel	EF79401
<i>C. silenes</i>	CBS 109082	<i>Silene marítima</i>	Reino Unido	EF679354
<i>C. subtilissimum</i>	CBS 113754	Baga da uva	USA/EUA	EF679397
<i>C. spiulosum</i>	CBS 119907	água hiper salina de salinas - Hypersaline water from salterns	ESLOVENIA	EF679388
<i>C. ramotenellum</i>	CPC 12047	Ar condicionado	ESLOVENIA	EF679385
<i>C. ramotenellum</i>	CBS 121628	água hiper salina de salinas	ESLOVENIA	EF679384
<i>C. ossifragi</i>	CBS 843.91	<i>Nathercium ossifragum</i>	Noruega	EF679401
<i>C. iridis</i>	CBS 138.40	<i>Iris</i> sp.	Holanda	EF679370
<i>C. iridis</i>	CBS 107.20	<i>Iris</i> SP	-	EF679369
<i>C. herbarum</i>	CBS 289.49	<i>Allium schoenoprasum</i>	Suíça	AY152552
<i>C. herbarum</i>	CPC 11604	<i>Delphinium barbeyi</i>	USA/EUA	EF679362
<i>C. herbarum</i>	CBS 300.49	<i>Biscutella laevigata</i>	Suíça	EF679358

ESPÉCIE	Nº DA ESTIRPE	HOSPEDEIRO/ SUBSTRATO	CIDADE/UF/PAÍS	CÓDIGO NO GENBANK ITS
<i>Colletotrichum aenigma</i>	-	<i>Hylocereus undatus</i>	Tailândia	LC052322
<i>Colletotrichum aenigma</i>	C1253.4/ICMP18608	<i>Persea americana</i>	Israel	JX010244
<i>Colletotrichum aeshynomenes</i>	UFMGCV9682	<i>Velozia gigantea</i> (endofítico)	Brasil	KU727689
<i>Colletotrichum aeshynomenes</i>	3-1-3	<i>Aeshynomene virginica</i>	EUA	JX010176
<i>C. aotearoa</i>	CBS 111971	<i>Knightia sp.</i>	Nova Zelândia	KC297068
<i>C. alienum</i>	ICMP 12071	<i>Malus domestica</i>	Nova Zelândia	NR_120141
<i>C. alienum</i>	-	<i>Capsicum annuum</i>	Tailândia	LC052315
<i>C. asianum</i>	CBS 129825	<i>Mangifera sp.</i>	Colômbia	KC566734
<i>Colletotrichum boninense</i>	CSSN1	<i>Crinum asiaticum</i>	China	GQ485597
<i>C. cordylinicola</i>	BCC 38872	-	-	NR_119859
<i>C. fructicola</i>	CPC20896	<i>Psidium guajava</i>	Brasil	KC566776
<i>C. fructicola</i>	CMM4069	<i>Mangifera indica</i>	Brasil	KC329780
<i>C. fructicola</i>	S1	<i>Dendrobium officinale</i>	China	KT224779
<i>C. fructicola</i>	C1275.7	<i>Ficus habrophylla</i>	Alemanha	JX010181
<i>C. fructicola</i>	BPDI18	<i>Coffea arábica</i>	Tailândia	FJ972602
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	MGSS 144	<i>Capsicum annum</i>	São Luís – MA/Brasil	Deste estudo
<i>C. gloeosporioides</i>	MGSS 119	<i>Psidium guajava</i>	São Luís – MA/Brasil	Deste estudo
<i>C. gloeosporioides</i>	MGSS 113	Família das Orchidaceae	São Luís – MA/Brasil	Deste estudo
<i>C. gloeosporioides</i>	MGSS 174	Planta ornamental	São Luís – MA/Brasil	Deste estudo
<i>C. gloeosporioides</i>	MGSS 198	<i>Theobroma grandiflorum</i>	São Luís – MA/Brasil	Deste estudo
<i>C. gloeosporioides</i>	CBS 112999	<i>Citrus sinensis</i>	Itália	JQ005152
<i>C. gloeosporioides</i>	OR-20	-	-	HM052822

ESPÉCIE	Nº DA ESTIRPE	HOSPEDEIRO/ SUBSTRATO	CIDADE/UF/PAÍS	CÓDIGO NO GENBANK ITS
<i>C. gloeosporioides</i>	G-20	<i>Psidium guajava</i>	-	KC958883
<i>C. gloeosporioides</i>	CPC20904	<i>Psidium guajava</i>	Brasil	KC566707
<i>C. horii</i>	CPC 20992	<i>Diospyros kaki</i>	Brasil	KC566801
<i>C. hymenocallidis</i>	CSSN2	<i>Hymenocallis americana</i>	China	GQ485600
<i>C. ignotum</i>	CBS 125397	<i>Tetragastris panamensis</i>	Panamá	NR_137154
<i>C. kahawae</i>	CK-1	<i>Eruca sativa</i>	Itália	KT259854
<i>C. lindemuthianum</i>	CBS 130841	<i>Phaseolus vulgaris</i>	EUA	JX546819
<i>Colletotrichum musae</i>	B7	<i>Musa sp.</i>	Índia	KC790968
<i>C. musae</i>	CBS116870	<i>Musa sp.</i>	EUA	JX010146
<i>C. musae</i>	MDU	<i>Musa sp.</i>	Índia	GU810513
<i>C. musae</i>	CBS 207.80	<i>Musa sp.</i>	Colômbia	KC566790
<i>Colletotrichum musae</i>	MGSS 85	Banana - Fruto	São Luís – MA/Brasil	Deste estudo
<i>C. queenslandicum</i>	ICMP1778	<i>Carica papaya</i>	Austrália	JX010276
<i>C. queenslandicum</i>	OTTR528	<i>Ottoschulzia rhodoxylon</i>	Porto Rico	KT966511
<i>C. siamense</i>	C1263.11	<i>Malus domestica</i>	EUA	JX010162
<i>C. siamense</i>	C1315.2	<i>Coffea arábica</i>	Tailândia	JX010171
<i>C. siamense</i>	IMI 96858	<i>Annona sp.</i>	Índia	KC566825
<i>C. siamense</i>	CPC 20954	<i>Psidium sp.</i>	Brasil	KC566831
<i>C. ti</i>	TRIT356	<i>Trichilia triacanthae</i>	Porto Rico	KT966508
<i>C. torulosum</i>	CBS 102667	<i>Passiflora edulis</i>	Nova Zelândia	JQ005165
<i>C. torulosum</i>	CBS 128544	<i>Solaum melogena</i>	Nova Zelândia	JQ005164
<i>C. tropicale</i>	CMM 4071	<i>Mangifera indica</i>	BRASIL	KC329785
<i>C. tropicale</i>	CBS 124946	<i>Persia sp.</i>	Panamá	KC566806
<i>Cordyceps miliaris</i>	ARSEF 5050	-	EUA	HQ880829
<i>Corynespora cassiicola</i>	MGSS 93	<i>Carica papaya</i> (Mamão – Folha)	São Luís – MA/Brasil	Deste estudo
<i>Corynespora cassiicola</i>	CATAS008	<i>Carica papaya</i>	China	EU735062
<i>Corynespora cassiicola</i>	CABI 1335303	<i>Carica papaya</i>	Jamaica	KF810894

ESPÉCIE	Nº DA ESTIRPE	HOSPEDEIRO/ SUBSTRATO	CIDADE/UF/PAÍS	CÓDIGO NO GENBANK ITS
<i>Corynespora cassiicola</i>	E78	<i>Hevea brasiliensis</i>	Brasil	JQ814329
<i>Corynespora cassiicola</i>	CATAS009	<i>Carica papaya</i>	China	EU735064
<i>Corynespora cassiicola</i>	CATAS016	<i>Hevea brasiliensis</i>	China	EU822309
<i>Corynespora cassiicola</i>	-	<i>Solanum lycopersicum</i>	Brasil	KF266787
<i>Corynespora endiandrae</i>	CBS 138902	<i>Endiandra introrsa</i>	-	KP004450
<i>Corynespora leucadendri</i>	CBS 135133	<i>Carpentaria acuminata</i>	Austrália	KF251150
<i>Corynespora olivaceae</i>	CBS 291.74	<i>Tilia spp.</i>	Holanda	FJ852595
<i>Corynespora smithii</i>	CABI 5649b	<i>Fagus sylvatica</i>	Inglaterra	FJ852597
<i>Corynespora smithii</i>	-	<i>Taxus chinensis</i> var. <i>mairei</i>	China	JN198487
<i>Corynespora torulosa</i>	CPC 15989	<i>Musa acuminata</i>	México	KF777154
<i>Cochilobolus hawaiiensis</i>	BRIP 10971	<i>Chloris gayana</i>	Austrália	JN601030
<i>Cochilobolus kusanoi</i>	NBRC 100196	-	Japão	JN943395
<i>Curvularia eragrostidis</i>	MGSS 29	Helicônia - Folha	Paço do Lumiar – MA/Brasil	Deste estudo
<i>Curvularia eragrostidis</i>	698	<i>Ananas comosus</i>	Brasil	KJ541818
<i>Curvularia eragrostidis</i>	1167	<i>Oryza sativa</i>	-	KT933675
<i>Curvularia lunata</i>	MGSS 115	<i>Zea mays</i> - Milho – folha	São Luís – MA/Brasil	Deste estudo
<i>Curvularia lunata</i>	MGSS 172	Gramma- folha	Santa Rita- MA/Brasil	Deste estudo
<i>Curvularia lunata</i>	AH-1	<i>Zea mays</i>	China	KR633133
<i>Curvularia lunata</i>	SXL-21	<i>Zea mays</i>	China	KR633122

ESPÉCIE	Nº DA ESTIRPE	HOSPEDEIRO/ SUBSTRATO	CIDADE/UF/PAÍS	CÓDIGO NO GENBANK ITS
<i>Curvularia lunata</i>	CX-3	<i>Zea mays</i>	China	KR633084
<i>Curvularia lunata</i>	PSU-ES195	<i>Enhalus acoroides</i>	India	JN116704
<i>Curvularia spicifera</i>	EML-KWD01	<i>Triticum aestivum</i>	Coréia	KT351794
<i>Diaporthe ambigua</i>	CBS114015	<i>Pyrus communis</i>	África do Sul	KC343010
<i>Diaporthe amygdali</i>	CBS 115620	<i>Prunus pérsia</i>	EUA	KC343020
<i>Diaporthe phaseolorum</i>	CBS113425	<i>Olearia rani</i>	Nova Zelândia	KC343174
<i>Diaporthe pseudomangifera</i>	MGSS 80	<i>Rosa sp.</i>	São Luís/MA- Brail	Deste estudo
<i>Diaporthe pseudomangifera</i>	CBS 101339	<i>Mangifera indica</i>	Republica Dominicana	KC343181
<i>Diaporthe rudis</i>	CBS 266.85	<i>Rosa rugosa</i>	Holanda	KC343237
<i>Diaporthe sp.</i>	LGMF925	<i>Aspidosperma tomentosum</i>	Brasil	KC343211
<i>Fusarium circinatum</i>	6DTJF01	Raiz de planta aquática/ root of aquatic plant	-	KT184799
<i>Fusarium dimerum</i>	CBS 116527	-	-	EU926284
<i>Fusarium equiseti</i>	MGSS 149	Alface - Folha	Raposa – MA/Brasil	Deste estudo
<i>Fusarium equiseti</i>	C12	-	-	AY147368
<i>Fusarium equiseti</i>	D	Solo	Suíça	KT634075
<i>Fusarium equiseti</i>	FE9	<i>Oryza sativa</i>	Índia	HQ995668
<i>Fusarium equiseti</i>	MGSS 191	Vinagreira - Caule	Raposa- MA/Brasil	Deste estudo
<i>Fusarium equiseti</i>	MGSS 138	Mamão - Fruto	São Luís – MA/Brasil	Deste estudo
<i>Fusarium equiseti</i>	MGSS 117	Feijão-Caupi- Caule	São Luís – MA/Brasil	Deste estudo
<i>Fusarium equiseti</i>	MGSS 122	Pimentão Var. All Big - semente	São Luís – MA/Brasil	Deste estudo
<i>F. guttiforme</i>	NRRL 22945	-	-	U34562

ESPÉCIE	Nº DA ESTIRPE	HOSPEDEIRO/ SUBSTRATO	CIDADE/UF/PAÍS	CÓDIGO NO GENBANK ITS
<i>Fusarium hostae</i>	DAOMC235655	-	-	KR909426
<i>Fusarium longipes</i>	MGSS 169	Gramma - raiz	Santa Rita- MA/Brasil	Deste estudo
<i>Fusarium longipes</i>	DEB13	Solo	Malásia	KF918597
<i>Fusarium longipes</i>	BCCM/IHEM 18093	Solo	Guiana Francesa	KJ125587
<i>Fusarium oxysporum</i>	-	Solo	Itália	EF017214
<i>Fusarium oxysporum</i>	KP10	<i>Pynus sylvestris</i>	Lituânia	DQ093759
<i>Fusarium oxysporum</i>	PARC682c	<i>Prunus avium</i>	Canadá	KT455376
<i>Fusarium oxysporum</i>	MGSS 155	Pimentão - Fruto	São Luís – MA/Brasil	Deste estudo
<i>Fusarium oxysporum</i>	MGSS 42	Tomate- Caule	São Luís – MA/Brasil	Deste estudo
<i>Fusarium oxysporum</i>	MGSS 14	Helicônia – Caule	São Luís – MA/Brasil	Deste estudo
<i>Fusarium oxysporum</i>	MGSS 10	Quiabo – Caule	São Luís – MA/Brasil	Deste estudo
<i>Fusarium oxysporum</i>	MGSS 182	Tomate – Caule	Brasília-DF/Brasil	Deste estudo
<i>Fusarium oxysporum</i>	MGSS 01	Tomate – Caule	São Luís – MA/Brasil	Deste estudo
<i>Fusarium oxysporum</i>	MGSS 183	Tomate – Caule	Brasília-DF/Brasil	Deste estudo
<i>Fusarium oxysporum</i>	MGSS 67	Abacaxi - Fruto	Turiaçu – MA/Brasil	Deste estudo
<i>Fusarium oxysporum</i>	MGSS 65	Abacaxi – Fruto	Pombos-PE/Brasil	Deste estudo
<i>Fusarium oxysporum</i>	MGSS 15	<i>Ananas comosus</i> Abacaxi - Fruto	São Luís – MA/Brasil	Deste estudo
<i>Fusarium oxysporum</i>	MGSS 09	Banana – sistema vascular	São Luís – MA/Brasil	Deste estudo
<i>Fusarium oxysporum</i>	MGSS 118	Coentro – Sistema vascular	São Luís – MA/Brasil	Deste estudo

ESPÉCIE	Nº DA ESTIRPE	HOSPEDEIRO/ SUBSTRATO	CIDADE/UF/PAÍS	CÓDIGO NO GENBANK ITS
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>	115HT	-	China	EF155534
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	FO29	<i>Solanum lycopersicum</i>	India	KF914468
<i>Fusarium</i> sp.( <i>Gibberella fujikuroi</i> complex)	MGSS 68	<i>Ananas comosus</i> Abacaxi -Fruto	Pombos-PE-Brasil	Deste estudo
<i>Fusarium</i> sp.( <i>Gibberella fujikuroi</i> complex)	MGSS 54	<i>Ananas comosus</i> Abacaxi -Fruto	Chapadinha-MA- Brasil	Deste estudo
<i>Fusarium</i> sp.( <i>Gibberella fujikuroi</i> complex)	MGSS 159	<i>Hibiscus sabdariffa</i>	São Luís-MA-Brasil	Deste estudo
<i>Fusarium</i> sp.( <i>Gibberella fujikuroi</i> complex)	MGSS 194	<i>Tibraca limbativentris</i>	Vitória do Mearim- MA/Brasil	Deste estudo
<i>Fusarium</i> sp.( <i>Gibberella fujikuroi</i> complex)	MGSS 61	<i>Aleurocanthus woglumi</i>	São Luís/MA- Brasil	Deste estudo
<i>Fusarium</i> sp.( <i>Gibberella fujikuroi</i> complex)	MGSS 141	<i>Hibiscus sabdariffa</i>	São Luís/MA- Brasil	Deste estudo
<i>Fusarium</i> sp.( <i>Gibberella fujikuroi</i> complex)	MGSS 157	<i>Hibiscus sabdariffa</i>	São Luís/MA- Brasil	Deste estudo
<i>Fusarium proliferatum</i>	NRRL 31071	<i>Triticum aestivum</i>	-	AF291061
<i>Fusarium proliferatum</i>	UTcp8	<i>Vigna unguiculata</i>	EUA	KT376487
<i>Fusarium proliferatum</i>	D2	<i>Zea mays</i>	Itália	EU151485
<i>Fusarium phyllophilum</i>	PEN6	Parreira		KR909206



ESPÉCIE	Nº DA ESTIRPE	HOSPEDEIRO/ SUBSTRATO	CIDADE/UF/PAÍS	CÓDIGO NO GENBANK ITS
<i>Fusarium pseudocircinatum</i>	ATCC MYA-4835	-	EUA	JQ070125
<i>F. sterilihyposum</i>	MRC7602	-	-	AF430130
<i>F. subglutinans</i>	-	<i>Zea mays</i>	-	X94167
<i>F. sacchari</i>	MGSS 66	<i>Zea mays</i>	Pernambuco- Brasil	Deste estudo
<i>F. sacchari</i>	MGSS 71	<i>Ananas comosus</i>	Pombos-PE-Brasil	Deste estudo
<i>Fusarium</i> sp.	MC-23-F NRRL125184	Monarda citriodora	India	KU527804
<i>F. lateritium</i>	-	Rosa sp.		AY904057
<i>Fusarium verticilloides</i>	-	<i>Zea mays</i>	-	X94166
<i>Fusarium verticilloides</i>	JJTKCL	Cana-de-açúcar	-	KJ544799
<i>Fusarium sacchari</i>	NRRL 43543	-	-	EF453121
<i>Fusarium sacchari</i>	ATCC 201263	-	-	KR909411
<i>Gelasinospora udagawae</i>	-	<i>Isodon rubescens</i>	China	AB640864
<i>Glomerella cingulata</i>	ZJ2	<i>Litchi</i> sp.	China	EU196744
<i>Glomerella cingulata</i> f. sp. <i>camelliae</i>	C1291	<i>Camellia sasanque</i>	EUA	JX010223
<i>Gongronella bluteri</i>	MGSS 123	<i>Rosa</i> sp.	São Luís/MA- Brasil	Deste estudo
<i>Gongronella bluteri</i>	MM23	<i>Melastoma malabathricum</i>	India	KM405649
<i>Gongronella bluteri</i>	CBS 102.44	-	Itália	JN206284

ESPÉCIE	Nº DA ESTIRPE	HOSPEDEIRO/ SUBSTRATO	CIDADE/UF/PAÍS	CÓDIGO NO GENBANK ITS
<i>Gongronella bluteri</i>	ATCC8989	Solo	-	GU244499
<i>Gongronella lacrispora</i>	ATCC_24412	Solo	-	GU244498
<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	MGSS 176	<i>Citrullus lanatus</i>	Igarapé do Meio- MA/Brasil	Deste estudo
<i>Lasiodiplodia brasiliense</i>	CMM4015	<i>Mangifera indica</i>	Brasil	JX464063
<i>Lasiodiplodia brasiliense</i>	CMM2248	<i>Carica papaya</i>	Brasil	KC484794
<i>Lasiodiplodia egyptiaca</i>	CMW41223	<i>Barringtonia racemosa</i>	África do Sul	KP860837
<i>Lasiodiplodia hormozganensis</i>	IRAN1500C	<i>Olea</i> sp.	Irã	GU945355
<i>Lasiodiplodia hormozganensis</i>	CMM3987	<i>Mangifera indica</i>	Brasil	JX464094
<i>Lasiodiplodia rubropurpurea</i>	WAC12538	<i>Eucaliptus grandis</i>	Austrália	DQ103556
<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	CMM2168	<i>Carica papaya</i>	Brasil	KC484817
<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	Maz111	<i>Melia azedarach</i>	Quênia	FJ904842
<i>Lasiodiplodia viticola</i>	UCD2553AR	<i>Vitis vinifera</i>	EUA	HQ288227
<i>Lasiodiplodia viticola</i>	CMM4014	<i>Mangifera indica</i>	Brasil	JX464098
<i>Lasiodiplodia parva</i>	CBS 456.78.	-	África do Sul	KF766192
<i>Macrophomina phaseolina</i>	PD112	<i>Prunus dulcis</i>	EUA	GU251105
<i>Metarhizium anisopliae</i>	MGSS 192	<i>Tibraca limbativentris</i>	Matões do Norte- MA – Brasil	Deste estudo
<i>Metarhizium anisopliae</i>	NORDESTE	<i>Mahanarva posticata</i>	Brasil	EF051708
<i>Metarhizium brunneum</i>	WA27848	Larva <i>Tipulidae</i>	Polônia/Poland	JX438652

ESPÉCIE	Nº DA ESTIRPE	HOSPEDEIRO/ SUBSTRATO	CIDADE/UF/PAÍS	CÓDIGO NO GENBANK ITS
<i>Metacordyceps taii</i>	RCEF0772	--	-	AF348394
<i>Metarhizium flavoviride</i>	TVV44A3	Solo	-	KT759669
<i>M. globosum</i>	ARSEF 2596	-	India	HQ331459
<i>Metarhizium lepidiotae</i>	ARSEF 7412	-	Australia	HQ331455
<i>Metarhizium majus</i>	ARSEF 1015	-	Japão/Japan	HQ331444
<i>Metarhizium flavoviride</i> var. <i>pemphigi</i>	100512-8-1	-	-	JF495778
<i>Microdochium nivale</i>	MTCC 6580	-	-	JN642711
<i>Monilochaetes infuscans</i>	CBS 869.96	<i>Ipomoea batatas</i>	África do Sul	JQ005780
<i>Myrothecium graminearum</i>	MGSS 148	<i>Abelmoschus esculentus</i> – folha	Raposa- MA- Brasil	Deste estudo
<i>Myrothecium graminearum</i>	WS11720	<i>Salvia miltiorrhiza</i>	China	JX406554
<i>Myrothecium graminearum</i>	CBS 324.54	-	Espanha	AY254151
<i>Myrothecium graminearum</i>	XF36	-	-	KJ780796
<i>Myrothecium verrucaria</i>	MGSS 143	Alface –folha	São Luís –MA - Brasil	Deste estudo
<i>Myrothecium verrucaria</i>	I-5	Solo	China	KT305924
<i>Myrothecium verrucaria</i>	-	Solo	Itália	EF017211
<i>Myrothecium roridum</i>			Germany	Aj301995
<i>Myrothecium tongaense</i>	CBS 873.85	-	SPAIN	AY254157

ESPÉCIE	Nº DA ESTIRPE	HOSPEDEIRO/ SUBSTRATO	CIDADE/UF/PAÍS	CÓDIGO NO GENBANK ITS
<i>Myrothecium carmichaelii</i>	IMI 199044	-	SPAIN	AY25415
<i>Myrothecium inundatum</i>	77F	"human corneal scraping"	VIETNÃ	AB704784
<i>Neoscytalidium dimidiatum</i>	CIH	<i>Fluido de toracocentese</i>	-	FJ648577
<i>Neoscytalidium dimidiatum</i>	PD103	<i>Ficus</i> sp.	EUA	GU251106
<i>Neoscytalidium hialinum</i>	CBS 145.78	-	-	KF531816
<i>Neoscytalidium hialinum</i>	MGSS 106	<i>Ananas comosus</i>	São Luís-MA/Brasil	Deste estudo
<i>Neoscytalidium hialinum</i>	CBPPR1014	<i>Manihot esculenta</i>	Brasil	KT211562
<i>Neoscytalidium hialinum</i>	CBPPR1015	<i>Manihot esculenta</i>	Brasil	KT211563
<i>Neoscytalidium hialinum</i>	HUPE0090154840	<i>Homo sapiens</i>	Brasil	KR075526
<i>Neoscytalidium novaehollandiae</i>	CBS 122071	-	África do Sul	KF766207
<i>Neoscytalidium novaehollandiae</i>	CBS122610	<i>Acacia synchronicia</i>	Austrália	EF585536
<i>Neoscytalidium novaehollandiae</i>	CBS122072	<i>Andansonia gibbosa</i>	Austrália	EF585535
<i>Neoscytalidium novaehollandiae</i>	WAC12688	<i>Mangífera indica</i>	Austrália	EF585542
<i>Nigrospora oryzae</i>	MGSS 62	Arroz ( <i>Oryza sativa</i> )	Arari-MA	Deste estudo
<i>Nigrospora oryzae</i>	HBN	Grãos de Arroz ( <i>Oryza sativa</i> )	China	KU254608

ESPÉCIE	Nº DA ESTIRPE	HOSPEDEIRO/ SUBSTRATO	CIDADE/UF/PAÍS	CÓDIGO NO GENBANK ITS
<i>Nigrospora oryzae</i>	HN-21	Arroz ( <i>Oryza sativa</i> )	China	KT266531
<i>Nigrospora oryzae</i>	CBS 113884	<i>Arundo donax</i>	França	DQ219433
<i>Nigrospora oryzae</i>	F12-F	<i>Dendrobium candidum</i>	China	KF516962
<i>Nigrospora oryzae</i>	SMCD.043.	Trigo ( <i>Triticum aestivum</i> L.)	Canadá	EU579800
<i>N. sphaerica</i>	788-3-3-1	Macadamia	China	KX214528
<i>N. sphaerica</i>	CY108	<i>Cyphomyrmex wheeleri</i>	USA/EUA	HQ607961
<i>Phoma multirostrata</i>	MGSS 152	Alface ( <i>Lactuca sativa</i> )	São Luís-MA/Brasil	Deste estudo
<i>Phoma americana</i>	CBS 568.97	<i>Glycine max</i>	USA/EUA	FJ426974
<i>Phoma calidophila</i>	PD84/109	<i>Cucumis sativus</i>	Europe	FJ427060
<i>Phoma coffeae arabicae</i>	CBS 123380	<i>Coffea arabica</i>	Ethiopia- Etiopia	FJ426993
<i>P. gardeniae</i>	CBS 302.79	Air sample/amostra de ar	Netherlands/Holanda	FJ427002
<i>P. gardeniae</i>	CBS 626.68	<i>Gardenia jasminoides</i>	India	FJ427003
<i>P. herbarum</i>		Rhizosphere of Picea Mariana	Canada	DQ132841
<i>P. maydis</i>	CBS 588.69	<i>Zea mays</i>	USA/EUA	FJ427086
<i>P. maydis</i>	MA 0027	<i>Zea mays</i>	USA/EUA	FJ427087
<i>P. multirostrata</i>	CBS 110.79	<i>Cucumis sativus</i>	Netherlands	FJ427030
<i>P. multirostrata</i>	-	Crucifera	-	AF046019
<i>P. multirostrata</i>	PD 77/508	<i>Philodendron</i> sp.	Netherlands	FJ427036
<i>Tolypocladium inflatum</i>	MTCC 557	-	-	JQ266196
<i>Tiarosporella urbis-rosarum</i> OUTGROUP	CMW 36478	<i>Acacia karroo</i>	África do Sul	JQ239408
<i>Valsa mali</i> var. <i>pyri</i>	GSZY113	<i>Malus pumila</i>	China	GU174589

### 3.8.3 Análises filogenéticas e construção de Matriz de divergência genética dos fungos.

As análises filogenéticas foram realizadas utilizando o programa MEGA 6 (TAMURA et al., 2013). As sequências foram alinhadas usando o CLUSTALW implementado no MEGA 6 e ajustadas ao melhor modelo de substituição de nucleotídeos. As árvores filogenéticas de Máxima Verossimilhança e a Matriz de divergência genética foram construídas para cada um dos 16 gêneros e a significância dos agrupamentos das árvores filogenéticas foi estimada pela análise de *bootstrap*.

## 4– RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1- Coleção de Culturas de Fungos Fitopatogênicos e Métodos de Conservação.

Recentemente a Micoteca “Prof.º Gilson Soares da Silva” foi cadastrada junto ao Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade sob registro nº 5991355. O Comitê de Assessoramento Técnico do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (CAT-Sisbio) é composto pelas seguintes instituições: Ibama, Ministério do Meio Ambiente, Ministério da Ciência e Tecnologia, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Agência Brasileira de Vigilância Sanitária, Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência, Sociedade Botânica do Brasil, Sociedade Brasileira de Zoologia, Sociedade Brasileira de Microbiologia, Sociedade Brasileira de Genética e Associação Memoria Naturalis.

O resultado do isolamento, identificação dos fungos pela observação em microscópio óptico e confirmação do taxa pela literatura através de chaves de identificação e posterior cadastro na coleção e recuperação dos isolados que estavam em meios de cultura já desidratados chegou-se a um acervo de 212 isolados de fungos fitopatogênicos divididos em 33 gêneros, 46 espécies fúngicas, isolados de materiais vegetais coletados na Ilha de São Luis e outros municípios do Estado do Maranhão, assim como isolados obtidos de outros centros de pesquisa do país (Tabela 03). Os gêneros que se destacam são *Fusarium*, *Colletotrichum*, *Trichoderma*, *Corynespora* e *Curvularia* correspondendo a 74,51 % dos isolados preservados.

Espécies fitopatogênicas distribuídas dentro do gênero *Fusarium*, dentre as quais o *F. oxysporum*, tem sua fase telomórfica desconhecida, sendo uma espécie grupo composta de dezenas de espécies que necessitam ser claramente definidas e separadas de maneira adequada (LESLIE; SUMMERELL, 2006).

Dentro do gênero *Fusarium* estão às espécies que causam murchas vasculares

todas classificadas como *Fusarium oxysporum* dentro da seção *Elegans*, e as espécies que ataca frutos, folhas, raízes normalmente estão classificadas dentro das seções *Liseola* e *Gibbosum* (AGRIOS, 2005). A espécie *Fusarium oxysporum* sendo comumente agrupadas dentro as *formae speciales* que é patogênico a uma espécie ou a um grupo de plantas em particular, demonstrando o elevado grau de especificidade de hospedeiro (LESLIE; SUMMERELL, 2006).

Observando-se a especificidade das *formae speciales*, com o respectivo hospedeiro, algumas doenças de importância econômica podem ser citadas: murcha-do-algodoeiro (*Fusarium oxysporum* Schlecht. f. sp. *vasinfectum* (Atk.) W.C. Snyder & H.N. Hans.), murcha-de-fusarium-do-tomateiro (*Fusarium oxysporum* Schlecht. f. sp. *lycopersici* Snyder & Hansen), murcha-da-bananeira (*Fusarium oxysporum* Schlecht. f. sp. *cubense* (E.F.Sm.) W.C. Snyder & Hansen) e murcha-de-fusarium-do-feijoeiro (*Fusarium oxysporum* Schlecht. f. sp. *phaseoli* Kendrick & Snyder) (BEDENDO, 2011).

Já as espécies de *Colletotrichum* estão entre os mais bem sucedidos fungos patogênicos de plantas, atacando uma gama extremamente ampla de plantas que crescem em ambientes tanto de climas temperados como tropicais. Estes patógenos podem causar danos à maioria das partes de plantas, incluindo raízes, caules, folhas, flores e frutos, mas muitas vezes são altamente específicos em relação a indivíduos. Para a maioria das espécies de *Colletotrichum*, especialmente aqueles que atacam tecidos vegetativos jovens, a sua capacidade de penetrar cutículas é da maior importância devida a formação de uma estrutura denominada apressório atacando o hospedeiro em nível celular (BAILEY et al., 1992).

A maioria dos isolados da Micoteca classificados no gênero *Colletotrichum* pertencem à espécie *Colletotrichum gloeosporioides*. Este fungo pode ser encontrado nas formas saprofíticas ou patogênicas, sendo estas últimas, responsáveis por doenças economicamente importantes, comumente denominadas de antracnoses. As plantas estão sujeitas a essa doença em todas as fases de desenvolvimento, e o patógeno pode ser disseminado de uma planta para outra por meio de vários agentes do ambiente aéreo (MENEZES, 2006).

No gênero *Trichoderma* os conidióforos, que produzem os esporos, são altamente ramificados, irregularmente verticilados, muitas vezes irregularmente dobrados, com alongamentos de hifas estéreis, fiálides em forma de balão, obovóide, em cachos terminais pequenos, facilmente reorganizado pelo seu rápido crescimento, as colônias podem apresentar tons de verde ou amarelo ou branco com menos frequência (SAMUELS et al., 2015).

Fungos do gênero *Trichoderma* apresentam potencial para o controle de fitopatógenos e para a promoção do crescimento vegetal. Pesquisas com diferentes culturas comprovam essa capacidade e agregam informações sobre os mecanismos de ação desses bioagentes, contudo, ainda são pouco conhecidos os mecanismos de ação na promoção do crescimento em ausência de fitopatógenos (MACHADO et al., 2012).

**Tabela 3.** Quantificação da coleção de fungos fitopatogênicos da Micoteca “Prof.º Gilson Soares da Silva” - Laboratório de Fitopatologia/UEMA mantidos em seis métodos de preservação. São Luis, 2013.

<b>Gêneros</b>	<b>Número de Espécies</b>	<b>Número de Isolados</b>	<b>Número de Hospedeiros</b>
<i>Alternaria</i>	2	2	2
<i>Aschersonia</i>	1	2	1
<i>Aspergillus</i>	3	3	3
<i>Asperisporum</i>	1	1	1
<i>Beauveria</i>	1	3	2
<i>Bipolaris</i>	1	1	1
<i>Chaetomium</i>	1	2	2
<i>Chalara</i>	1	4	1
<i>Cladosporium</i>	1	3	3
<i>Colletotrichum</i>	2	29	20
<i>Corynespora</i>	1	11	3
<i>Curvularia</i>	2	10	6
<i>Cylindrocladium</i>	1	1	1
<i>Sclerotium</i>	1	3	1
<i>Fusarium</i>	9	64	12
<i>Gongronella</i>	1	1	1
<i>Gliocladium</i>	1	4	2
<i>Isaria</i>	1	4	2
<i>Lasiodiplodia</i>	1	2	2
<i>Lecanicillium</i>	1	1	1
<i>Metharhizium</i>	1	8	2
<i>Monographella</i>	1	1	1
<i>Myrothecium</i>	2	2	2

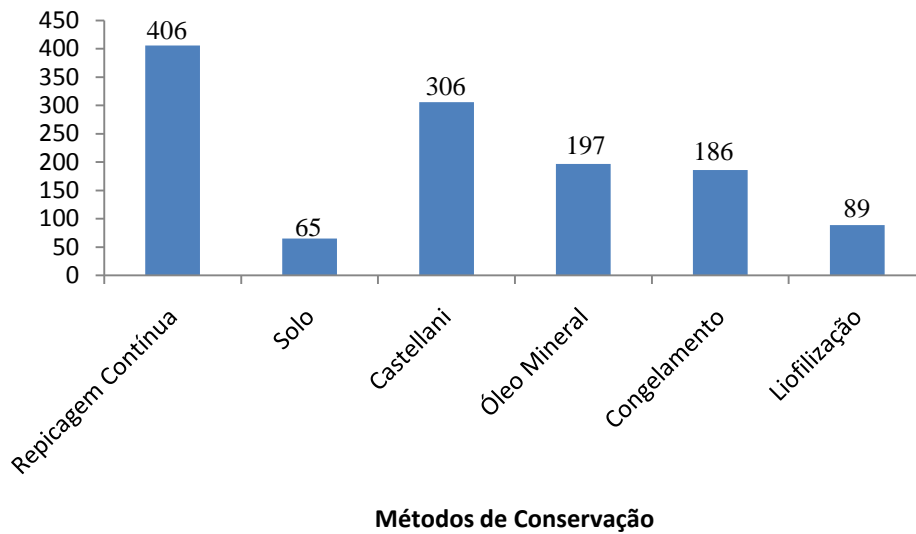


<i>Nigrospora</i>	1	1	1
<i>Penicilium</i>	1	5	3
<i>Pestalotiopsis</i>	1	4	2
<i>Phomopsis</i>	1	5	3
<i>Phytophthora</i>	1	4	2
<i>Rhizopus</i>	1	1	1
<i>Phoma</i>	1	1	1
<i>Stemphyllium</i>	1	2	1
<i>Trichoderma</i>	1	15	5
<i>Não identificado</i>	-	12	7
<b>TOTAL</b>	46	212	97

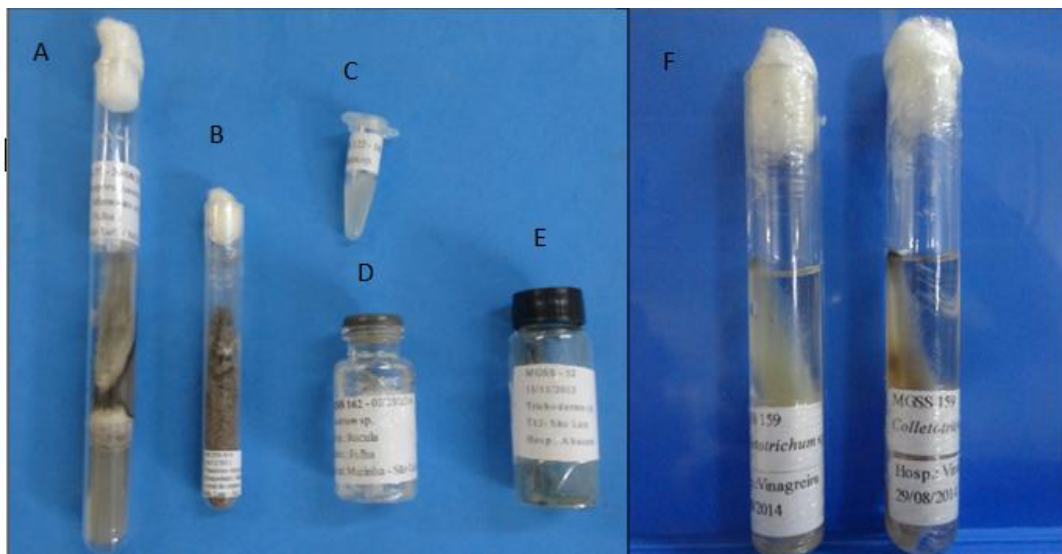
Os isolados foram identificados e cadastrados em ficha contendo o timbre da Micoteca e recebendo o código MGSS seguido de uma numeração crescente de acordo com a ordem de obtenção da cultura fúngica (ANEXO 01). No registro foram preenchidos os dados do método de preservação em que os isolados se encontram gênero e espécie, número da linhagem, data de isolamento, local de origem, hospedeiro de origem ou substrato de origem. Até o presente momento, novos isolados foram identificados no Laboratório de Fitopatologia – UEMA aumentando ainda mais o número de isolados fúngicos contribuindo para conservação da diversidade biológica.

Em relação aos métodos de conservação de fungos da Micoteca “Prof. Gilson Soares da Silva” foram empregados os de Repicagem Contínua, Conservação em Solo, Método de Castellani, Preservação em Óleo Mineral, Congelamento e Liofilização com o número total de réplicas (Figuras 03 e 04).

**Figura 3.** Métodos de preservação empregados na Micoteca Prof.º Gilson Soares da Silva.”



**Figura 4.** Representação dos métodos de preservação empregados na Micoteca “Prof. Gilson Soares da Silva”. A- Método do Repicagem Contínua, B- Preservação em Solo, C- Congelamento, D- Preservação no método de Castellani, E- Método de Liofilização, F- Método de Preservação em Óleo Mineral.



Foram preservados no método de Castellani 306 réplicas dos isolados, de 25 gêneros, no método de Congelamento 186 réplicas dos isolados, divididos em 19 gêneros, no método de Preservação em Óleo Mineral foram 197 réplicas dos isolados, em 18 gêneros, no método de Repique Contínuo, considerado como clássico, foram 406 réplicas dos isolados, que pertenciam 31 gêneros e no método de preservação em solo foram armazenado 65 réplicas

dos isolados de 3 gêneros *Fusarium*, *Trichoderma* e *Sclerotium* e o de Liofilização 89 réplicas dos isolados, de 7 gêneros.

O método mais empregado foi o de Repique Contínuo, pelo fato de ser de simples manuseio, pois permite que o fungo desenvolva todas as suas estruturas vegetativas e reprodutivas, e armazenado em temperaturas baixas, em torno de 4 °C, tem-se a desaceleração do crescimento celular. Visto que após o consumo total do meio, um fragmento é retirado do tubo e passado para um novo tubo com meio, e guardado em curto prazo, a desvantagem desse método é o manuseio constante dos isolados, pela exaustão do meio de cultura, e com isso, os riscos de contaminações e perdas de patogenicidade são maiores.

Barker (2002) e Romeiro (2006) mencionaram que a repetição do processo para novos meios deve ser realizada em intervalos de tempo condizentes com as necessidades e particularidades de cada microrganismo, avaliando-se as condições ótimas e período máximo de sobrevivência entre as diferentes cepas. Entretanto, é aconselhável que a transferência de culturas seja realizada antes que o substrato do meio seja totalmente consumido pelos microrganismos, ou antes, que o meio desidrate.

O segundo método mais empregado foi o de Castellani ou manutenção em água esterilizada. Resultados satisfatórios têm sido obtidos no que se refere à viabilidade deste método, que apresenta vantagens como: a preservação das características originais da cultura por longos períodos, nenhuma contaminação por ácaros micófagos, baixo custo do processo por utilizar somente água destilada e necessidade de pequeno espaço físico para acondicionar os frascos, além de poder ser empregado para grande número de gêneros e espécies de fungos (APARECIDO et al., 2001).

O Terceiro método mais empregado foi o de Preservação em Óleo Mineral. A alternativa de preservação de microrganismos em óleo mineral possui as mesmas vantagens que o repique contínuo, diferindo somente na longevidade da cultura, que se apresenta por maiores intervalos. Segundo Dhingra; Sinclair, (1995) este método não é indicado para fitopatógenos de solo como *Fusarium*.

O método de Preservação em Congelamento foi o quarto mais utilizado para preservação dos fungos. Trata-se de um método simples, menos oneroso, não requer equipamentos sofisticados, nem mesmo quanto ao preparo do material. Como desvantagem, verifica-se possível redução da viabilidade de alguns microrganismos, em função dos danos causados às células decorrentes da formação de cristais de gelo e da variação eletrolítica na faixa de temperatura utilizada (ROMEIRO, 2006; MEDEIROS, 2008).

A liofilização foi o quinto método empregado na Micoteca “Prof.º Gilson Soares da Silva”, devido a recente aquisição do equipamento sendo o gênero *Trichoderma* selecionado para iniciar este método de preservação. Após a liofilização dos isolados foi realizado o isolamento dos mesmos em meio BDA para o crescimento das estruturas fúngicas e constatação do sucesso do método. Esta técnica pode ser usada apenas para fungos esporulantes e desde que os esporos sejam resistentes, pois estruturas demasiadamente delicadas não suportam esse procedimento, sendo esta a principal desvantagem da técnica (FIGUEIREDO; PIMENTEL, 1977; PITOMBO, 1989). Quanto aos fungos, grande parte das coleções de culturas utiliza a liofilização como método de conservação de microrganismos, justamente por atingirem uma manutenção de viabilidade de algumas espécies por períodos de 17 a 21 anos. Com relação às vantagens, o método evita a contaminação por ácaros, diminui a variação de linhagens devido ao raro manuseio e necessita de espaço bastante reduzido para o acondicionamento das ampolas. Pires et al. (2012) constataram que o isolado do *Fusarium* preservado no método de Liofilização foi o mais agressivo em comparação com outros métodos em frutos de abacaxi.

A liofilização e a criopreservação são as técnicas mais amplamente empregadas na conservação da biodiversidade microbiana. Essa é uma das chaves para a realização dos serviços de coleção de culturas microbiológicas (MYAMOTO-SHINOHARA et al., 2000; PAOLI, 2005).

Segundo as Recomendações para Operação e Gerenciamento de Coleções de Culturas de Microrganismos da Sociedade Brasileira de Microbiologia para minimizar a possibilidade de perda de linhagens, cada cultura deve ser mantida por pelo menos dois métodos distintos. É recomendável que pelo menos um dos métodos utilizados seja a liofilização ou a criopreservação (ultracongelamento), pois para muitas linhagens esses métodos apresentam menos riscos de alterações genéticas, além de garantir a preservação por longo período de tempo (SBM, 2006).

Preservação em Solo foi o sexto método mais utilizado. Este método deve ser utilizado de acordo com a natureza do patógeno, ou seja, apenas para os habitantes do solo como do gênero *Fusarium*, *Trichoderma* e *Sclerotium*.

Segundo Dhingra; Sinclair; (1995) e Costa et al. (2009) relatam que não existe nenhum método universal para armazenar patógenos de plantas e microorganismos em geral, pois a seleção do método deve ser baseada na natureza do patógeno e nas suas vantagens e desvantagens.

A despeito da importância do tema, observa-se uma lacuna entre as publicações científicas pertinentes, no sentido de que um número significativamente reduzido de estudos tem sido produzido, abordando a problemática da seleção e validação de protocolos nessa área, bem como avaliando os desafios e as perspectivas da coleta, processamento e estocagem de amostras em microbiologia (COSTA et al., 2009).

#### **4.2 – Recuperação dos isolados fúngicos mantidos na Micoteca “Prof. Gilson Soares da Silva”.**

Foram recuperados isolados dos gêneros *Fusarium* (Figuras 05 e 06), *Gliocladium* (Figura 9), *Myrothecium* (Figura 8), *Trichoderma* (figura 10) e *Isaria* (Figura 12) que pertencem a ordem Hypocreales; dos gêneros *Aspergillus* (Figura 7) e *Penicillium* (Figura 9) pertencentes à ordem Eurotiales; dos gêneros *Curvularia*, *Stemphylium* (Figura 9) e *Corynespora* (Figura 11) que pertencem a Ordem Pleosporales; do gênero *Chaetomium* (figura 9) pertencente à ordem Sordariales; do gênero *Phomopsis* (figura 9) que pertencem a ordem Diaporthales; do gênero *Chalara* (figura 11) que pertencem a ordem Microascales; do gênero *Pestalotiopsis* (Figura 13) pertencente a ordem Xylariales; e isolados do gênero *Colletotrichum* (figura 8) que pertencem a classe Sordariomycetes.

Após sete dias de crescimento em câmara BOD os microorganismos já apresentavam coloração típica da cultura, aparecimento de conídios que puderam ser visualizados e identificados em microscopia óptica, além da velocidade de crescimento no meio de cultura satisfatório.

A recuperação dos isolados é importante, principalmente, quando estes são depositados nos métodos de Repique Contínuo e de Liofilização. O Primeiro devido ao seu rápido consumo do meio de cultura pelos microrganismos até sua exaustão e o segundo método por seu processo agressivo, em que alguns gêneros de fungos não resistem, por essa razão, o monitoramento deve ser feito a cada quatro meses ou antes dependendo da velocidade de consumo do meio de cultivo para o primeiro método e o segundo a cada seis meses.

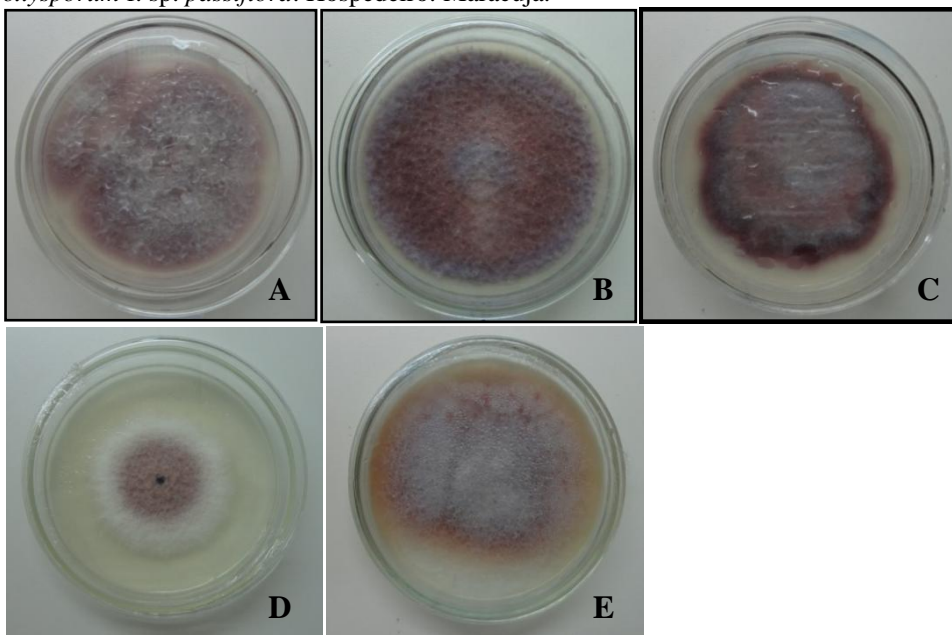
Alguns destes isolados foram utilizados na caracterização morfológica e molecular. A manutenção de isolados fúngicos dá garantias de sua utilização futura. Os isolados de fitopatógenos são importantes como referências para quarentena, para serem utilizados no desenvolvimento de “kits” diagnósticos de doenças, estudos de variabilidade e posterior uso na seleção de plantas resistentes às doenças (EMBRAPA, 2007).

A recuperação dos isolados fúngicos permite ainda que se verifique a possível contaminação por outros fungos de determinado isolado. Por isso este trabalho deve ser realizado constantemente com todas as amostras depositadas na Micoteca.

### Método de Repicagem Contínua

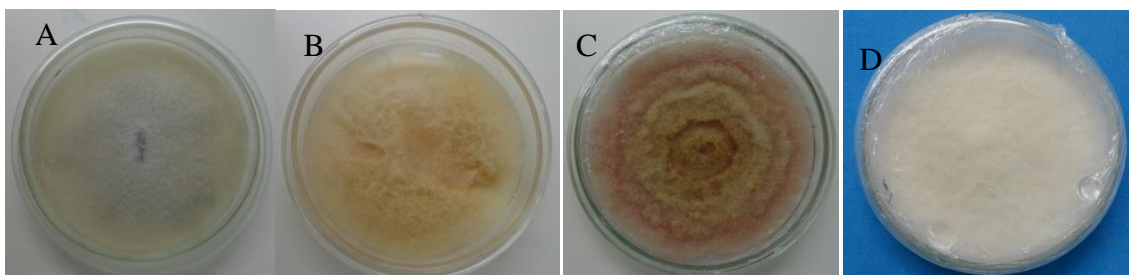
#### *Fusarium oxysporum*:

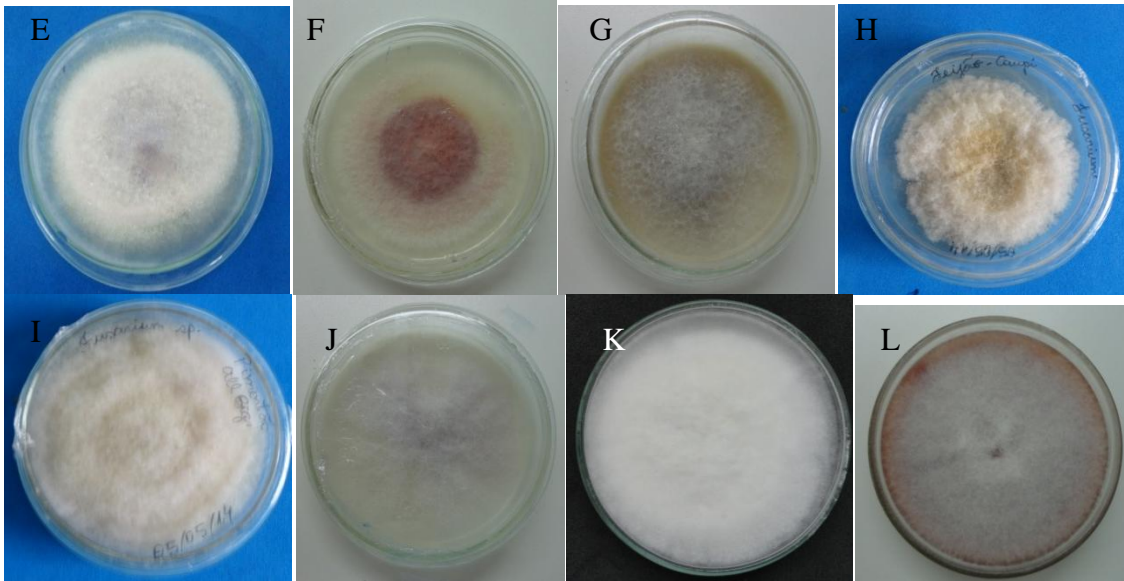
**Figura 5.** Colônias recuperadas de *Fusarium oxysporum*. **A- MGSS 09:** *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. Hospedeiro: Bananeira. Preservado desde 2011. **B- MGSS 14:** *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. Hospedeiro: Helicônia. Preservado desde 2011. **C- MGSS 10:** *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*. Hospedeiro: Quiabeiro. Preservado desde 2011. **D- MGSS 43.** *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. **E- MGSS 103.** *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflora*. Hospedeiro: Maracuja.



#### *Fusarium* sp.

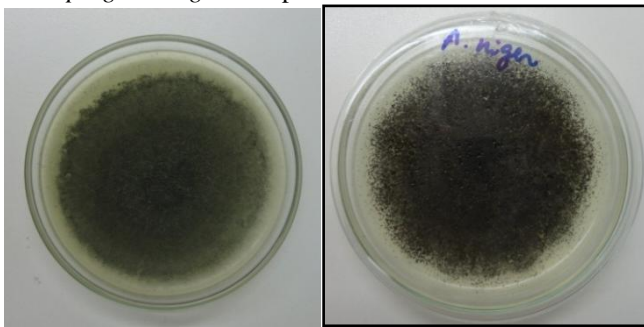
**Figura 6.** . Colônias de isolados recuperados do gênero *Fusarium*. **A- MGSS 118.** *Fusarium* sp. Hospedeiro: Coentro. **B- MGSS 140.** *Fusarium* sp. Hospedeiro: Pepino. **C- MGSS 12.** *Fusarium guttiforme*. Hospedeiro: Abacaxi Turiaçu. **D- MGSS 149.** *Fusarium equiseti* Hospedeiro: Alface. **E- MGSS 58.** *Fusarium guttiforme*. Hospedeiro: Abacaxi. **F- MGSS 60.** *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum*. Hospedeiro: Feijão Caupi. **G- MGSS 82.** *Fusarium* sp. Hospedeiro: Vinagreira. **H- MGSS 117.** *Fusarium equiseti*. Hospedeiro: Feijão Caupi. **I - MGSS 122.** *Fusarium equiseti* Hospedeiro: Pimentão All big. **J- MGSS 124.** *Fusarium* sp. **K- MGSS 139.** *Fusarium* sp. Hospedeiro: Mamoeiro. **L- MGSS 141.** *Fusarium* sp. Hospedeiro: Vinagreira.





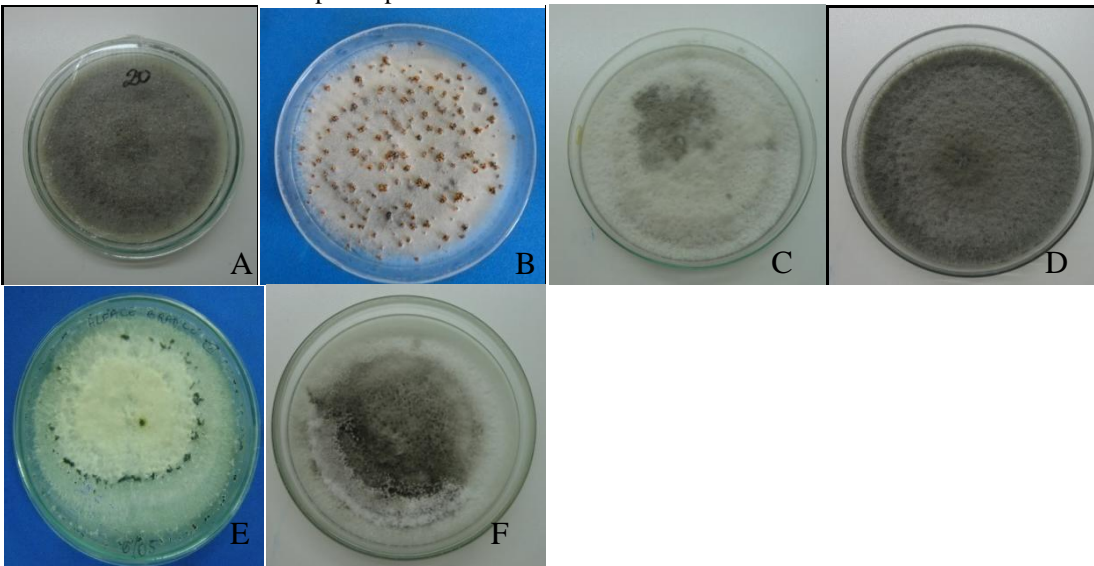
**Gênero *Aspergillus*:**

**Figura 7.** Colônias de isolados recuperados do gênero *Aspergillus*. A-MGSS 03. *Aspergillus flavus*. B-MGSS 07. *Aspergillus niger*. Hospedeiro: Mamoeiro. Preservado desde 2011.



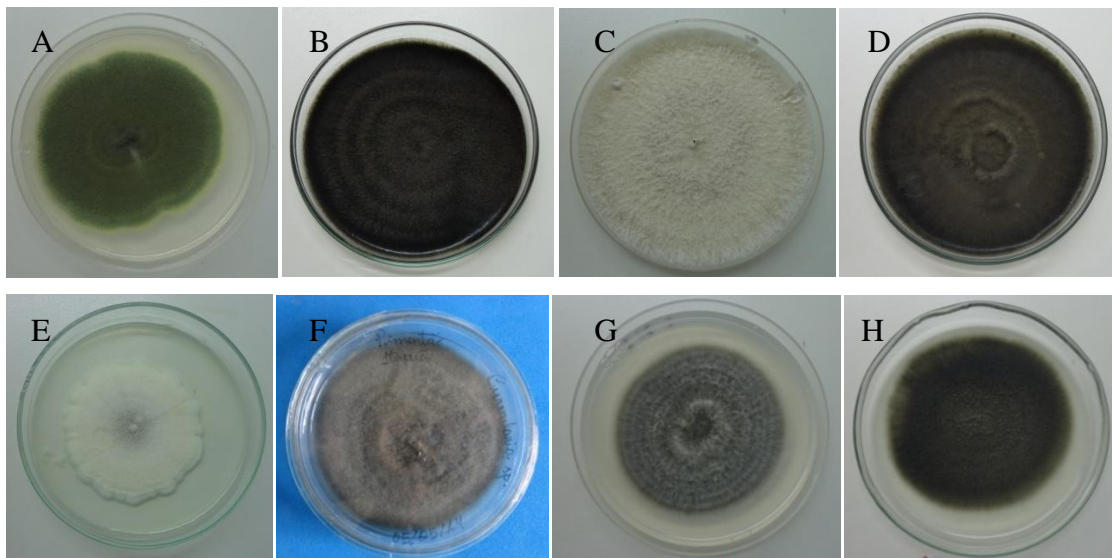
**Gênero *Colletotrichum* e *Myrothecium*:**

**Figura 8.** Colônias de isolados recuperados dos gêneros *Colletotrichum* e *Myrothecium*. A - MGSS 20. *Colletotrichum gloeosporioides*. Hospedeiro: Tangerina. B - MGSS 85. *Colletotrichum musae*. Hospedeiro: Banana. C - MGSS 113. *Colletotrichum gloeosporioides*. Hospedeiro: Orquídea. D - MGSS 119. *Colletotrichum gloeosporioides*. Hospedeiro: Goiabeira. E- MGSS 143. *Myrothecium* sp. Hospedeiro: Alfaca. F- MGSS 144. *Colletotrichum* sp. Hospedeiro: Pimentão.



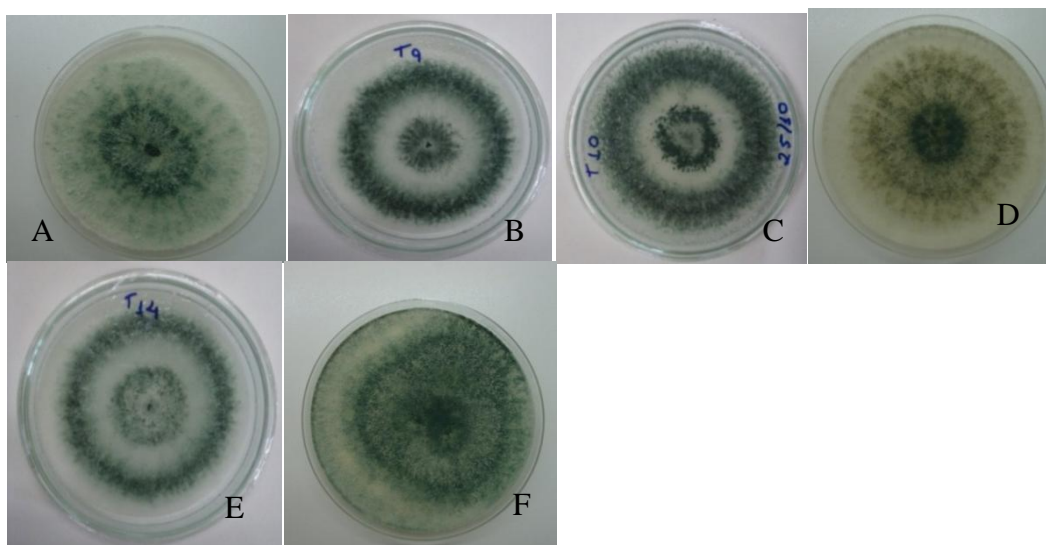
**Gênero *Penicillium*; Gênero *Curvularia*; Gênero *Phomopsis*; Gênero *Gliocladium*,  
Gênero *Chaetomium*, Gênero *Stemphylium*.**

**Figura 9.** Características das colônias de isolados recuperados dos gêneros *Penicillium*, *Curvularia*, *Phomopsis*, *Gliocladium*, *Chaetomium*, *Stemphylium*. **A- MGSS 95.** *Penicillium* sp. Hospedeiro: Arroz (Preservado desde 2013). **B - MGSS 115.** *Curvularia lunata*. Hospedeiro: Milho. Preservado desde 2014. **C-MGSS 80.** *Phomopsis pseudomangifera*. Hospedeiro: Roseira. Preservado desde 2013. **D - MGSS 172.** *Curvularia lunata*. Hospedeiro: Gramado. Preservado desde 2014. **E - MGSS 150.** *Gliocladium* sp. Hospedeiro: Tomateiro. Preservado desde 2014. **F - MGSS 121.** *Curvularia* sp. Hospedeiro: **G- MGSS 125.** *Chaetomium* sp. Hospedeiro: Alfaca Gl. Americana. **H- MGSS 137.** *Stemphylium* sp. Hospedeiro: Tomateiro.



***Trichoderma* sp.**

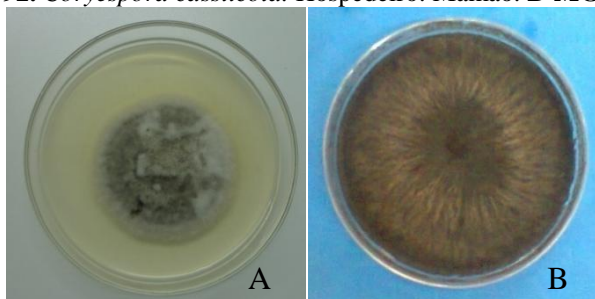
**Figura 10.** Características das colônias de isolados recuperados do gênero *Trichoderma*. **A - MGSS 46.** *Trichoderma* sp. Hospedeiro: Arroz. **B - MGSS 48.** *Trichoderma* sp. **C - MGSS 49.** *Trichoderma* sp. **D - MGSS 50.** *Trichoderma* sp. Hospedeiro: **E - MGSS 53.** *Trichoderma* Hospedeiro: Abacaxi **F- MGSS 123.** Hospedeiro: Roseira.





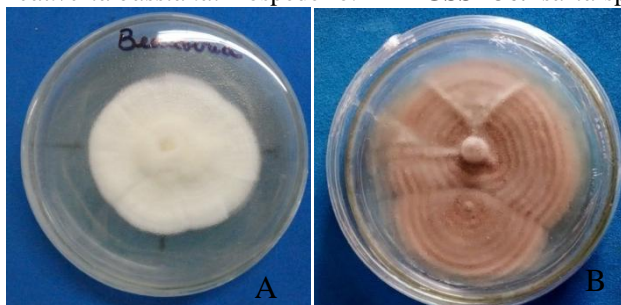
*Corynespora cassiicola*, *Chalara paradoxa*

**Figura 11.** Características das colônias de isolados recuperados dos gêneros *Corynespora* e *Chalara*. **A-** MGSS 92. *Corynespora cassiicola*. Hospedeiro: Mamão. **B-**MGSS 105. *Chalara paradoxa*. Hospedeiro: Abacaxi.



*Beauveria bassiana*, *Isaria* sp.

**Figura 12.** Características das colônias de isolados recuperados dos gêneros *Beauveria* e *Isaria*. **A-** MGSS 87. *Beauveria bassiana*. Hospedeiro: **B-** MGSS 136. *Isaria* sp.. Hospedeiro: Mosca negra.



*Pestalotiopsis* sp.

**Figura 13.** Características das colônias de isolados recuperados do gênero *Pestalotiopsis*. **A -** MGSS 186. *Pestalotiopsis* sp. Hospedeiro: *Heliconia* sp.



#### 4.3 Documentação e Informatização da Micoteca “Prof.º Gilson Soares da Silva”.

As informações referentes a cada fungo fitopatogênico são armazenadas em pastas no computador da Micoteca MGSS com foto da colônia, estrutura fúngica e sintomas. Além de cadastros com número de registros de cada isolado fúngico com informações de classificação taxonômica, nome científico e comum do hospedeiro, data da coleta, data da determinação da espécie ou gênero e da incorporação ao acervo, identificação de coletor e do determinador do fungo, localização (País, Estado, município) juntamente com dados da longitude, latitude, altitude e confirmação molecular da espécie. Essas informações fazem

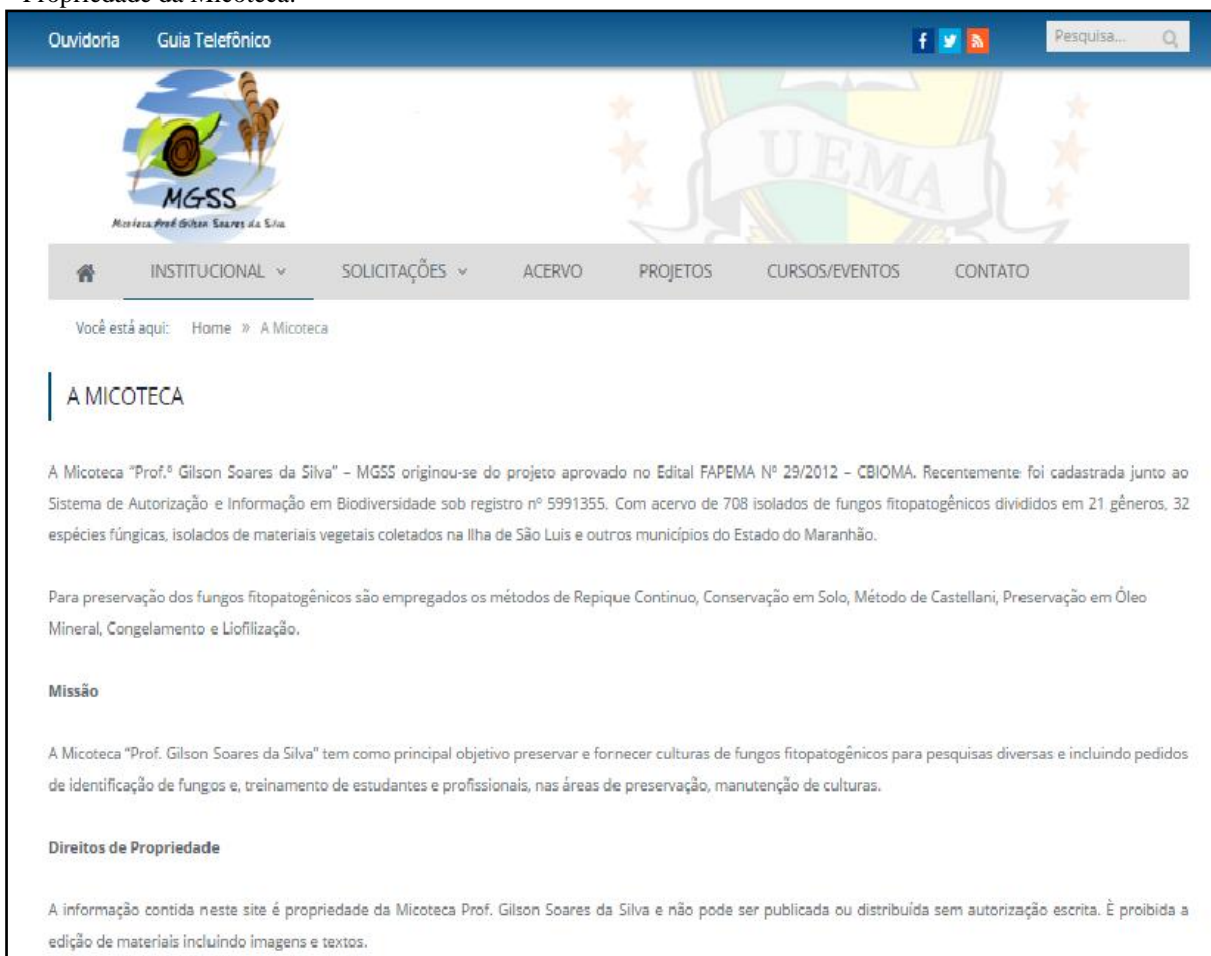
parte do modelo criado pelo *SpeciesLink*, que integra dados primários de Coleções de todo país tornando essas informações disponível de forma livre e aberta na internet. São feitos ainda cópias em duplicatas em CD's, nos dois computadores da Micoteca e em registros impressos.

A disponibilização destas informações está organizada em uma home page e será uma das primeiras Coleções Biológicas do Maranhão. Vale salientar que, todos os sites de coleções de fungos (micotecas) e periódicos só aceitam a identificação de espécies fúngicas em trabalhos científicos, com base na identificação morfológica e molecular, mesmo que as espécies já sejam conhecidas.

O site da Micoteca “Profº Gilson Soares da Silva” foi organizado de forma que o visitante internauta tivesse acesso às informações sem muita dificuldade. Por isso, criou-se o seguinte layout: Home, Institucional, Solicitações, Acervo, Projetos, Cursos/Eventos, Contato (Figura 14).

No Campo institucional está subdividida em: a Micoteca e a Equipe, onde o visitante tem informações sobre a coleção de fungos fitopatogênicos e a equipe. Na seção A MICOTECA do site descreve um pouco da criação da Micoteca através do Edital FAPEMA Nº 29/2012 – CBIOMA, dos métodos de preservação utilizados para conservação de fungos. A missão da Micoteca e os direitos de Propriedade (Figura 14).

**Figura 14.** Página que mostra o Campo Institucional do site sobre o histórico, Missão e Direitos de Propriedade da Micoteca.



The image is a screenshot of a website. At the top, there is a blue header with the text 'Ouvidoria' and 'Guia Telefônico' on the left, and social media icons for Facebook, Twitter, and YouTube on the right, along with a search bar labeled 'Pesquisa...'. Below the header is a banner area with the logo of 'MGSS Micoteca Prof. Gilson Soares da Silva' on the left and the logo of 'UEMA' (Universidade Estadual do Maranhão) on the right. A grey navigation menu is positioned below the banner, containing links for 'INSTITUCIONAL', 'SOLICITAÇÕES', 'ACERVO', 'PROJETOS', 'CURSOS/EVENTOS', and 'CONTATO'. Below the navigation menu, a breadcrumb trail reads 'Você está aqui: Home » A Micoteca'. The main content area is titled 'A MICOTECA' and contains three sections: a paragraph about the micoteca's origin and collection, a paragraph about preservation methods, a 'Missão' section, and a 'Direitos de Propriedade' section. The footer contains a disclaimer about the site's content ownership.

OUVIDORIA Guia Telefônico

Pesquisa...

MGSS  
Micoteca Prof. Gilson Soares da Silva

UEMA

INSTITUCIONAL SOLICITAÇÕES ACERVO PROJETOS CURSOS/EVENTOS CONTATO

Você está aqui: Home » A Micoteca

## A MICOTECA

A Micoteca "Prof.º Gilson Soares da Silva" – MGSS originou-se do projeto aprovado no Edital FAPEMA Nº 29/2012 – CBIOMA. Recentemente foi cadastrada junto ao Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade sob registro nº 5991355. Com acervo de 708 isolados de fungos fitopatogênicos divididos em 21 gêneros, 32 espécies fúngicas, isolados de materiais vegetais coletados na Ilha de São Luís e outros municípios do Estado do Maranhão.

Para preservação dos fungos fitopatogênicos são empregados os métodos de Repique Contínuo, Conservação em Solo, Método de Castellani, Preservação em Óleo Mineral, Congelamento e Liofilização.

### Missão

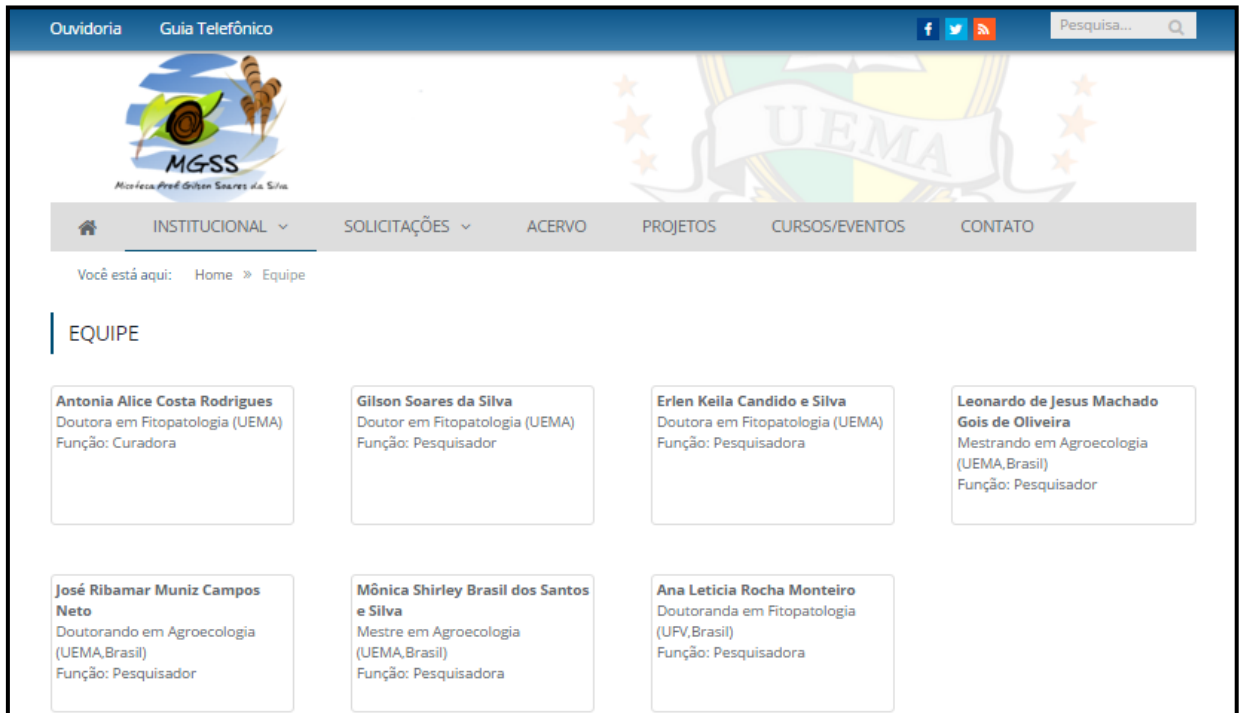
A Micoteca "Prof. Gilson Soares da Silva" tem como principal objetivo preservar e fornecer culturas de fungos fitopatogênicos para pesquisas diversas e incluindo pedidos de identificação de fungos e, treinamento de estudantes e profissionais, nas áreas de preservação, manutenção de culturas.

### Direitos de Propriedade

A informação contida neste site é propriedade da Micoteca Prof. Gilson Soares da Silva e não pode ser publicada ou distribuída sem autorização escrita. É proibida a edição de materiais incluindo imagens e textos.

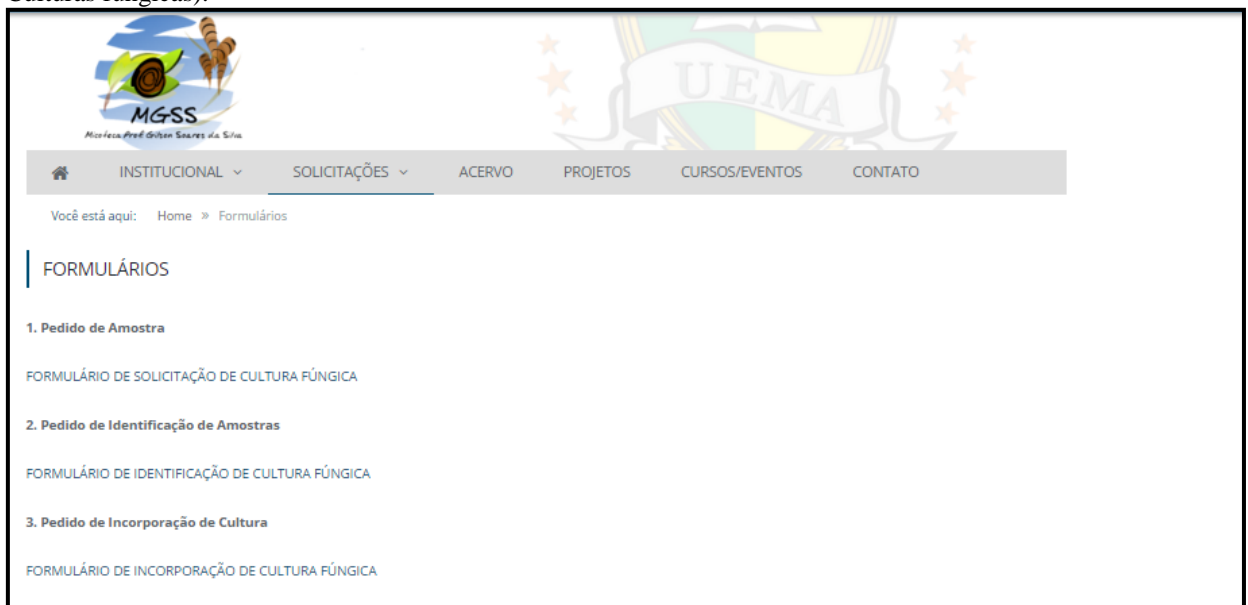
Na seção **Equipe** vêm discriminado os nomes dos responsáveis pela identificação dos isolados de fungos fitopatogênicos da Micoteca juntamente com a titulação do profissional e função dentro da Micoteca (Figura 15).

**Figura 15.** Página dentro campo Institucional na seção Equipe que mostra nome e função de quem atua na Micoteca



A micoteca dispõe de serviços como envio, identificação e Incorporação de amostras fúngicas. Para qualquer destes serviços o interessado ao entrar no site fará o download do formulário a ser preenchido de acordo com o serviço que pretende. Estes formulários estão em anexo a este relatório (Figura 16).

**Figura 16.** Solicitações. Formulários (Pedido de Amostras, Pedido de Identificação e Pedido de Incorporação de Culturas fúngicas).



## Busca no Acervo

A busca no Acervo da Micoteca “Prof. Gilson Soares da Silva” de fungos fitopatogênicos foi um dos motivos de reuniões para a discussão da melhor forma do usuário obter as informações e é realizada no campo “Acervo” de duas maneiras distintas. A primeira digitando o gênero de interesse ou a segunda maneira inserindo a espécie fúngica ou nome da doença causada por este ou ainda pelo nome do hospedeiro e neste ultimo caso aparecerão às espécies de fungos fitopatogênicos associadas aquele hospedeiro (Figura 17).

**Figura 17.** Página que estabelece a busca ao acervo da Micoteca das espécies fúngicas a partir do gênero, nome de espécie, nome de doenças ou nome de hospedeiros.

The screenshot shows the website's search interface. At the top, there is a navigation bar with links for 'Ouvidoria' and 'Guia Telefônico', and a search bar labeled 'Pesquisa...'. Below this is the MGSS logo (Micoteca Prof. Gilson Soares da Silva) and the UEMA logo. A main navigation menu includes 'INSTITUCIONAL', 'SOLICITAÇÕES', 'ACERVO', 'PROJETOS', 'CURSOS/EVENTOS', and 'CONTATO'. The 'ACERVO' menu item is highlighted. Below the navigation, a breadcrumb trail reads 'Você está aqui: Home » Acervo'. The main content area is titled 'ACERVO' and contains a search form. The form has a title 'Pesquisa por Acervo' and a section for 'Gêneros' with a dropdown menu currently showing 'Alternaria'. Below this is a text input field labeled 'Pesquisa por texto (espécie, doença, e hospedeiro)' and a 'Pesquisar' button.

## Resultados da Pesquisa

Por exemplo, ao digitar no campo Gênero o nome *Alternaria* o usuário observará duas espécies catalogadas na micoteca, como mostra a figura abaixo. São elas: *Alternaria cucumerina* e *Alternaria solani*. O usuário observará informações de Reino, Filo, Classe, Ordem, Família e Gênero (Figura 18).

**Figura 18.** Página que mostra resultados da pesquisa realizada para o gênero *Alternaria*.



**Informações referentes a espécie escolhida com fotos da colônia, estruturas microscópicas e sintomas no hospedeiro.**

O usuário ao clicar em cima da espécie desejada terá acesso às seguintes informações como a classificação taxonômica do fungo, o hospedeiro, o substrato de isolamento do fungo no hospedeiro (folhas, caules, frutos, raízes, flores etc.), os métodos de preservação do fungo na Micoteca, informações sobre a doença especialmente dos sintomas característicos, os danos que acometem ao hospedeiro, as referências bibliográficas relacionadas ao patossistema e uma galeria de fotos com a colônia fúngica, estruturas microscópicas (esporos, conidióforos, hifas e outras estruturas) e sintomas nos hospedeiros causados pelo patógenos. (Figura 19).

**Figura 19.** Informações referentes à espécie escolhida com fotos da colônia, estruturas microscópicas e sintomas no hospedeiro.

O usuário está aqui: Home > Espécies > Alternaria cucumerina

## Alternaria cucumerina

POII PASLOSH C EM 12 DE JANEIRO DE 2016

**Reino:** Fungi  
**Filo:** Ascomycota  
**Classe:** Dothideomycetes  
**Ordem:** Pleosporales  
**Família:** Pleosporaceae  
**Gênero:** Alternaria  
**Hospedeiro:** Melância (Citrullus lanatus)  
**Substrato de Isolamento:** folha

**Métodos de preservação:** Replique Contínuo, Casteliani, congelamento e Óleo Mineral.

**Doença:** Em folhas os sintomas expressam-se através de lesões foliares necróticas, circulares ou não, pardoescuras, com característicos anéis concêntricos e bordos bem definidos. As lesões ocorrem isoladamente ou em grupos, podendo apresentar ou não halo clorótico (TOPOLLI; DOMINGUES, 2006).

**Danos:** A doença costuma apresentar alto poder destrutivo em condições de altas temperaturas e umidade. A ocorrência de epidemias severas estão sempre associadas a temperaturas diárias de 25 a 32° C (TOPOLLI; DOMINGUES, 2006).

**Referências**  
 TOPOLLI, J. G.; DOMINGUES, R.J. Alternarioses em hortaliças: sintomas, etiologia e manejo integrado. O Biológico, São Paulo, n° 11, 2006

Galeria de Fotos

## Projetos

O usuário poderá ainda ter acesso aos projetos que estão sendo desenvolvidos ou já foram encerrados que utilizam ou utilizaram os isolados fúngicos depositados na Micoteca.

Neste campo estão inseridos os títulos dos projetos, fonte de financiamento (FAPEMA, CAPES etc.), o período de execução do projeto, os alunos envolvidos no projeto, descrição (Mestrado, Doutorado, Iniciação Científica, Monografias etc.) (Figura 20).

**Figura 20.** Página que mostra Título, fonte de Financiamento, Período, Aluno e descrição dos projetos relacionados à Micoteca.

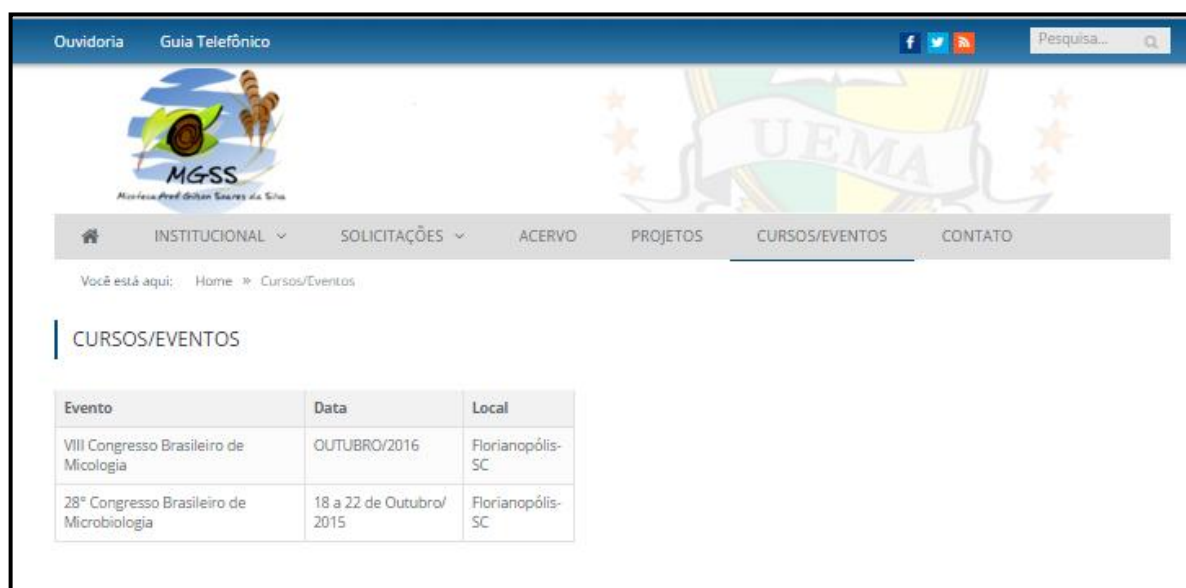
Título do Projeto	Fonte de Financiamento	Período	Aluno	Descricao
Consolidação e Informatização da Coleção de Fungos Fitopatogênicos (Micoteca "Prof. Gilson Soares da Silva" - MGSS) da Universidade Estadual do Maranhão.	FAPEMA	2013-2015		
Organização, Conservação e Informatização da Coleção de Fungos Fitopatogênicos.	CAPEB	03/2014 - 03/2016.	Leonardo de Jesus Machado Gois de Oliveira - Pós-graduação em Agroecologia (UEMA)	Mestrado
Formulações de Bacillus sp. na indução de resistência e promoção do crescimento em tomateiro contra Murcha de Fusarium.	FAPEMA	2014/2018	José Ribamar Muniz Campos Neto - Pós-graduação em Agroecologia (UEMA)	Doutorado
Manejo ecológico de fitopatógenos em sementes de hortaliças.	FAPEMA	2013/ 2015	Mônica Shirley Brasil dos Santos e Silva - Pós-graduação em Agroecologia (UEMA)	Mestrado
Avaliação da Incidência de Doenças e Qualidade do Arroz De Terras Altas Microbiolizado com Bacillus sp. e sob cultivo com Agrosilício.	FAPEMA	2013-Atual	Ivaneide de Oliveira Nascimento - Pós-graduação em Agroecologia (UEMA)	Doutorado
Teste de Patogenicidade dos Isolados Fúngicos da Micoteca Gilson Soares Da Silva - Laboratorio De Fitopatologia/Uema.	FAPEMA	2012-2013	Ana Letícia Rocha Monteiro	Iniciação Científica

## Cursos/Eventos

No campo Cursos/Eventos estão notícias relacionadas ao tema da Micoteca. Com eventos na área da Micologia, Microbiologia, Fitopatologia e áreas afins. As informações trazem nome do evento, data de realização e local de realização (Figura 21).



**Figura 21.** Página destinada à divulgação de Cursos e Eventos na área de Micologia, Microbiologia, Fitopatologia.



The screenshot shows a website interface for 'CURSOS/EVENTOS'. At the top, there is a navigation bar with links for 'Ouvidoria', 'Guia Telefônico', and social media icons (Facebook, Twitter, YouTube). A search bar is located on the right. Below the navigation bar, there is a header with the logo of 'MGSS Micoteca Prof. Gilson Soares da Silva' and the logo of 'UEMA'. A main navigation menu includes 'INSTITUCIONAL', 'SOLICITAÇÕES', 'ACERVO', 'PROJETOS', 'CURSOS/EVENTOS', and 'CONTATO'. The 'CURSOS/EVENTOS' section is active, and the breadcrumb trail reads 'Você está aqui: Home » Cursos/Eventos'. Below this, there is a table listing events.

Evento	Data	Local
VIII Congresso Brasileiro de Micologia	OUTUBRO/2016	Florianópolis-SC
28º Congresso Brasileiro de Microbiologia	18 a 22 de Outubro/2015	Florianópolis-SC

## Contatos

No campo Contatos, o usuário tem acesso a informações de endereço da Micoteca “Prof. Gilson Soares da Silva”. Este contato poderá ser feito via e-mail, carta, ofício ou ainda enviar mensagem no campo abaixo com preenchimento do nome, e-mail do solicitante, assunto e mensagem, são as formas e disponíveis para entrar em contato com a Micoteca (Figura 22).

**Figura 22.** Formas de contatos da Micoteca “Prof. Gilson Soares da Silva”.

The image shows a web browser window displaying the contact page for the Micoteca "Prof. Gilson Soares da Silva" - MGSS. The page has a blue header with the text "Ouvidoria" and "Guia Telefônico" on the left, and social media icons (Facebook, Twitter, YouTube) and a search bar on the right. Below the header is a navigation menu with the following items: "INSTITUCIONAL", "SOLICITAÇÕES", "ARQUIVO", "PROJETOS", and "CURSOS/EVENTOS". The "CONTATO" link is highlighted. Below the navigation menu, there is a breadcrumb trail: "Você está aqui: Home > Contato". The main content area is titled "CONTATO" and contains the following information:

**Micoteca "Prof. Gilson Soares da Silva" - MGSS**  
Universidade Estadual do Maranhão  
Centro de Ciências Agrárias  
Núcleo de Biotecnologia Agronômica  
Laboratório de Fitopatologia  
Cidade Universitária Paulo VI, C.P. 09, Timineal - CEP. 65055-970 - São Luís/MA.  
E-mail: aacrodrigues@outlook.com

**Envie sua mensagem**

Seu nome (obrigatório)

Seu e-mail (obrigatório)

Assunto

Sua mensagem

Além do site, todos os isolados fúngicos possuem um cadastro onde foram identificados e cadastrados em ficha contendo o timbre da Micoteca recebendo o código MGSS seguido de uma numeração crescente de acordo com a ordem de obtenção da cultura fúngica (ANEXO 01). No registro foram preenchidos os dados do método de preservação em que os isolados se encontram, o gênero e espécie, número da linhagem, data de isolamento, local de origem, hospedeiro de origem ou substrato de origem. Até o presente momento, novos isolados foram identificados no Laboratório de Fitopatologia – UEMA aumentando

ainda mais o número de isolados fúngicos contribuindo para conservação da diversidade biológica.

Esta Micoteca já nasce seguindo Convenção da Diversidade Biológica que no artigo 17 da CDB sobre o intercâmbio de informações diz: “As Partes Contratantes devem proporcionar o intercâmbio de Informações, de todas as fontes disponíveis do público, pertinentes à conservação e à utilização sustentável da diversidade biológica, levando em conta as necessidades especiais dos países em desenvolvimento” (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2000).

É necessário conhecer e disseminar a informação sobre o que já foi colecionado ao longo de muitos anos e encontra-se depositado nas coleções. Essas informações são imprescindíveis, como por exemplo, no estabelecimento de áreas com biota pouco conhecida, de áreas prioritárias para pesquisa e conservação, de grupos taxonômicos pouco estudados, dentre outras funções. Porém, esse é um árduo caminho que inclui entre os seus desafios: o gerenciamento da digitação e digitalização de dados e imagens juntamente com a organização e modernização do acervo; o tombamento dos espécimes, sua acomodação em ambientes adequados e identificação acurada (MARINONI; PEIXOTO, 2010).

A Lei 6.938, de 1981, que dispõe sobre a Política Nacional do Meio Ambiente, prevê a divulgação de dados e informações ambientais para a formação da consciência pública sobre a necessidade de preservação da qualidade ambiental e do equilíbrio ecológico (artigo 4º, inciso V). O artigo 9º afirma que, entre os instrumentos da Política Nacional do Meio Ambiente, está a garantia da prestação de informações relativas ao meio ambiente, obrigando-se o poder público a produzi-las, até mesmo quando inexistentes (CANHOS; CANHOS; SOUZA, 2006).

Os ministros de países membros da OCDE reconhecem que, ao promover o acesso aberto e amplo aos dados de pesquisa, estarão melhorando a qualidade e a produtividade dos sistemas científicos do mundo (GONZALÉZ et al., 2010).

#### **4.4 Identificação morfológica dos fungos fitopatogênicos da Micoteca “Prof.º Gilson Soares da Silva”.**

##### **ALTERNARIA**

O isolado MGSS 178 apresentou colônias de coloração cinza, conídios de forma obclavados, ovóide ou elipsooidal, quanto ao número de células são frágmosporo (pluricelular com septos transversais) ou dictiosporos (pluricelular com septos longitudinais e transversais)

em cadeia, os conidióforos eram simples. Já o isolado MGSS 184 apresentou coloração de colônia marrom com bastante micélio aéreo. Quanto aos conídios são de cor marrom e a forma podendo ser obclavados, ovóide ou elipsoide apresentando-se os tipos fragmósporo (pluricelular com septos transversais) ou dictiosporos (pluricelular com septos longitudinais e transversais) este último com oito septos, havendo também a formação de conídios em cadeia. Os conidióforos apresentaram-se ramificados (Figuras 23 e 24).

Os isolados MGSS 178 e MGSS 184 foram classificados pertencentes ao gênero *Alternaria*. Esses resultados estão de acordo com a classificação de fungos hifomicetos dematiaceos proposta por Ellis (1971); e pela redefinição do gênero proposta por Woudenberg et al. (2013).

**Figura 23.** Colônia e estruturas micromorfológica do isolado MGSS 178. A. Colônia de *Alternaria* sp., B.-C. esporos, D. conídios em cadeia.



**Figura 24.** Colônia e estruturas micromorfológica do isolado MGSS 184 da espécie *Alternaria alternata*. A.. Colônia, B. conídios, C. Conidioforo, D. Conídios em cadeia.



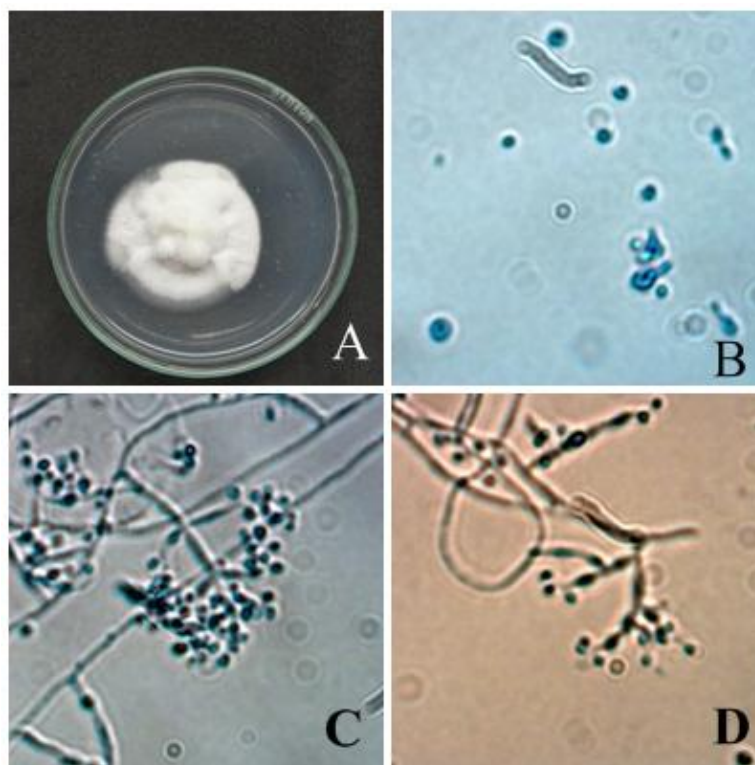
## BEAUVERIA

*Beauveria* apresenta poucas características morfológicas que são taxonomicamente de diagnóstico em classificação de espécies. Características de crescimento da colônia e aparência são semelhantes entre a maioria das espécies de *Beauveria* com colônias aparecendo branco ao amarelo claro.

O isolado MGSS 87 apresentou colônias de coloração branca e aspecto cotonoso, formato dos conídios globoso e quanto ao número de células é amerósporo (unicelular e sem septos), hifas aéreas ramificadas, hialina, septadas com parede fina. Conidióforos ramificados (Figura 25).

Diante das características morfológicas o isolado MGSS 87 foi classificado como pertencente à espécie *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill. Estes resultados estão acordo com os encontrados com Hoog (1972), Rehner et al. (2011), Wang et al. (2013).

**Figura 25. MGSS 87.** Características morfológicas de *Beauveria bassiana* A. colônia, B. conídios. C-D. Conidióforos ramificados.



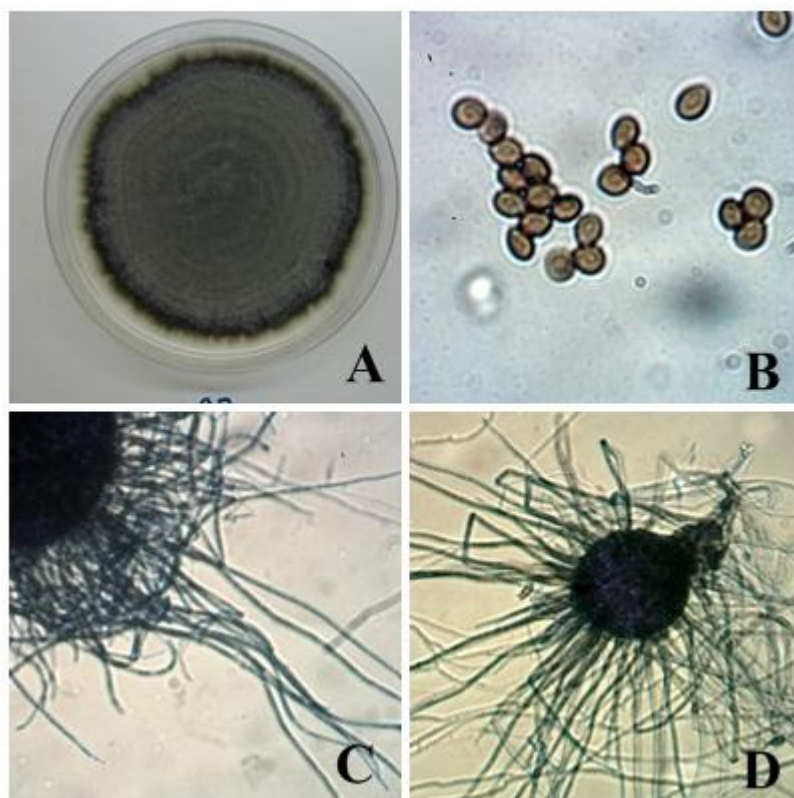
## CHAETOMIUM

O isolado MGSS 83 apresentou colônias de coloração cinza esverdeado com ascósporos amerósporo (unicelular, esseptado) de formato subgloboso de coloração marrom escuro, ascoma globoso e elíptico. Cabelos dos ascoma são retos (Figura 26).

Diante das características morfológicas o isolado MGSS 83 foi classificado como pertencente a espécie *Chaetomium fuscum* Basu.

Outros trabalhos foram realizados para a caracterização deste gênero realizados por Asgari; Zare (2011); Aggarwal et al. (2013); Wang et al. (2014a); Ahmed et al. (2016).

**Figura 26. MGSS 83.** Características morfológicas de *Chaetomium fuscum*. A. Aspecto da Colônia, b. ascósporos, C. Cabelos ascoma. D. Ascoma



## CLADOSPORIUM

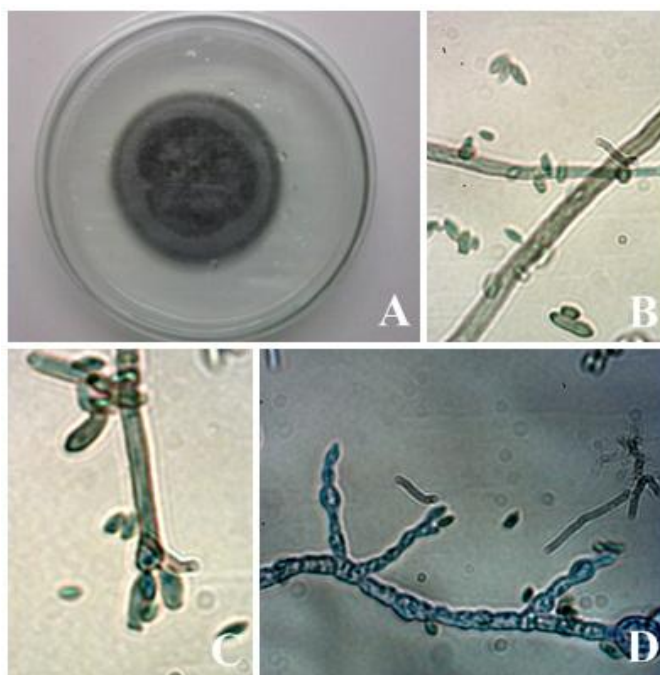
O isolado MGSS 180 apresentou colônias de coloração cinza com conídios amerósporo (unicelular, esseptado) e alguns didimósporos (bicelular, uniseptado) de formato elíptico de coloração esverdeado (Figura 27).

Diante das características morfológicas o isolado MGSS 180 foi classificado como pertencente ao *Cladosporium cladosporioides complex*.

A classificação morfológica de *Cladosporium cladosporioides* é de difícil diferenciação porque as espécies mostram muita semelhança na morfologia, nas características da cultura.

Por isso diversos trabalhos sugerem a união da caracterização morfológica e molecular para a correta identificação de espécies que se encontram inseridas dentro do complexo *Cladosporium cladosporioides*. Os caracteres fenotípicos mais importantes para distinguir as espécies dentro do complexo *C. cladosporioides* são a forma, largura, comprimento, a formação de septos e ornamentação da superfície de conídios e conidióforos; comprimento e padrões de ramificação de cadeias de conídios e forma e largura de hifas (BENSCH et al., 2010).

**Figura 27. MGSS 180.** Características morfológicas de *Cladosporium cladosporioides*. A. Colônia. B. Conídio unicelular. C-D. Conidióforos.



## COLLETOTRICHUM

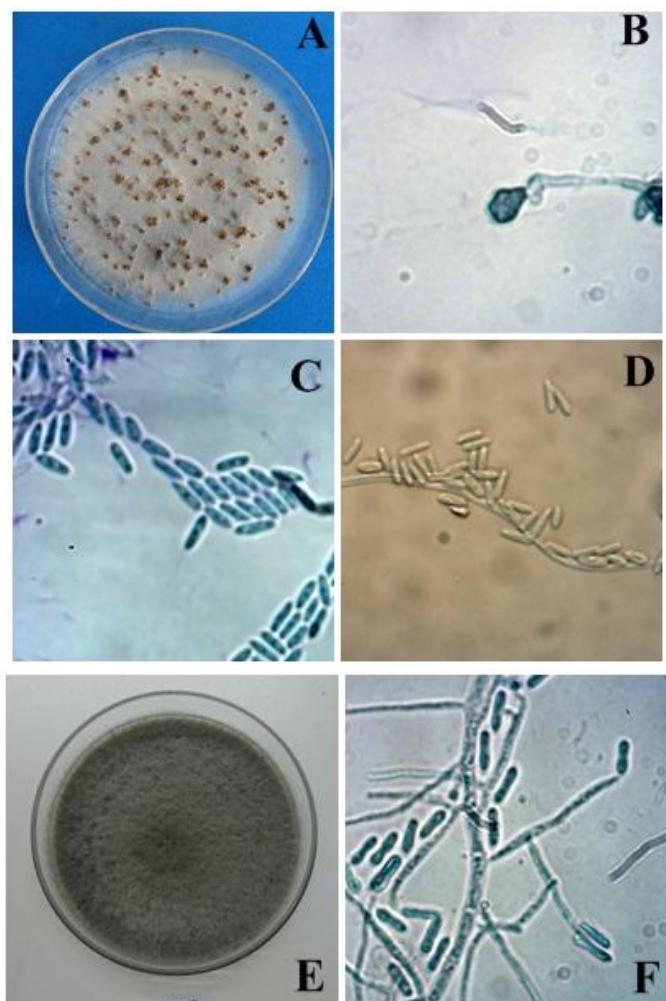
Quanto a características da colônia o isolado MGSS 85 apresentou colônias de coloração laranja com pontos de massa de conídios em laranja mais acentuado. Os isolados MGSS 113, MGSS 144, MGSS 174 apresentaram colônias de cor clara com o centro cinza escuro e aspecto cotonoso. Os dois últimos isolados apresentaram coloração bem distintas um

do outro, o isolado MGSS 119 apresentou colônia de coloração cinza escuro e o isolado MGSS 198 com coloração branca e ambos com bastante micélio aéreo e aspecto cotonoso (Figura 28, 29,30).

Os isolados apresentaram conídios hialinos formato cilíndrico, amerósporo – unicelular, asseptado. De modo geral, observou-se a produção de apressórios tanto com o formato irregular, como obovóide, dotados de uma simples célula exibindo um poro de germinação hialino na parte central. Foi também observada a presença de um septo separando o apressório da hifa, existindo apressórios hialinos e de cor castanha

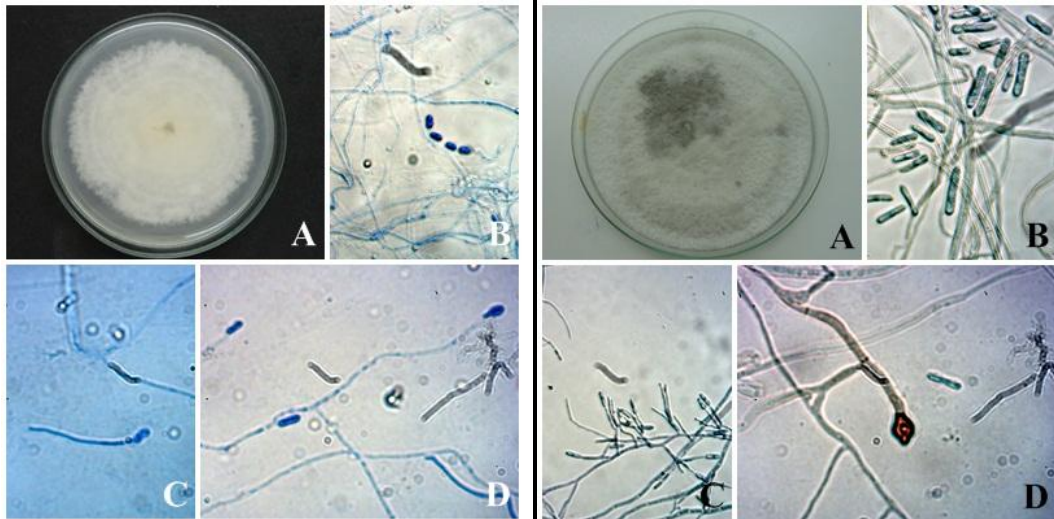
Essas características identificaram o isolado MGSS 113, MGSS 144, MGSS 174, MGSS 119, MGSS 198 como *Colletotrichum gloeosporioides* e o isolado MGSS 85 como *Colletotrichum musae* segundo Sutton (1980).

**Figura 28.** Características morfológicas de *Colletotrichum musae* e *Colletotrichum gloeosporioides*. **MGSS 85.** A. Colônia de *Colletotrichum musae*, B. Apressório. C-D. Conídios. E. Colônia do isolado MGSS 119 da espécie *Colletotrichum gloeosporioides*, F. conídios unicelulares do isolado MGSS 119.

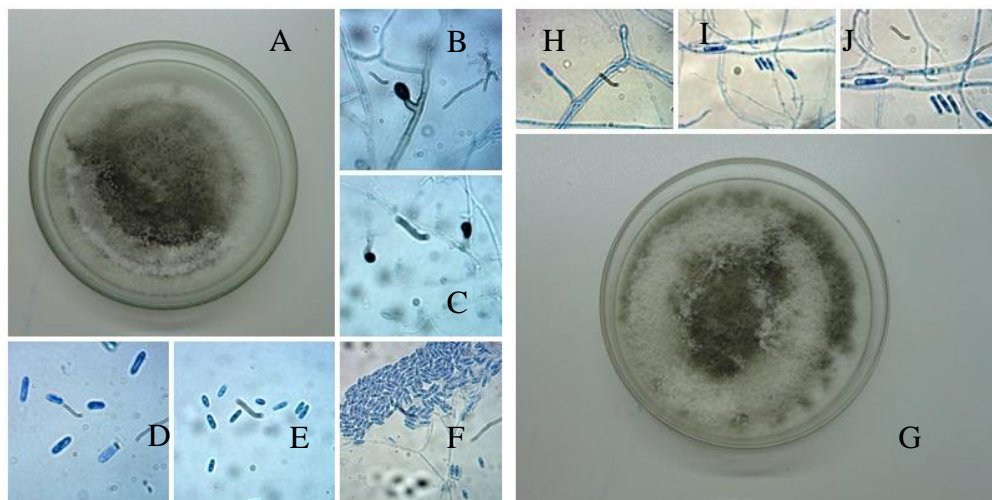




**Figura 29.** Características morfológicas de *Colletotrichum gloeosporioides* de dois isolados. **MGSS 198 (esquerda).** A. Colônia. B. Conídios, C. apressório, D. Conidióforo. **MGSS 113 (direita).** A. Colônia, B. conídios, C- conidióforo, D- apressório.



**Figura 30.** Características morfológicas de *Colletotrichum gloeosporioides* de dois isolados. **MGSS 144 (Lado Esquerdo).** A. Colônia, B-C. Apressório, D-E-F. Conídios, **MGSS 174 (Lado Direito).** A. Colônia, B. Conidióforo, C-D. Conídios.



## CORYNESPORA

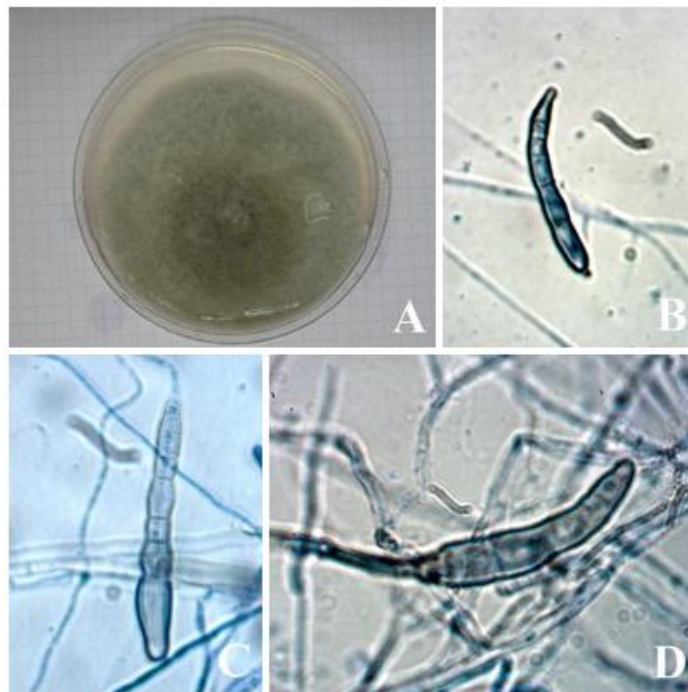
O isolado MGSS 93 apresentou características de colônia com coloração marrom claro com micélio aéreo e cotonoso. Conidioforo de coloração marrom e conídios de forma cilíndrica e quanto ao número de células são framósporo apresentando sete pseudosseptos e a

coloração varia de sub-hialino a marrom (Figura 31).

Esses resultados estão de acordo com Ellis (1971) que descreveu os conídios de *C. cassicola* com número de pseudosseptos variando de quatro a vinte e conidióforo variando de levemente pálido a marrom.

Essas características identificaram o isolado como *Corynespora cassicola* (Berk. & Curt.) Wei).

**Figura 31. MGSS 93.** Características morfológicas de *Corynespora cassicola*. A. Colônia. B-C. Conídios com pseudosseptos. D. Conidióforo.



## CURVULARIA

Os isolados MGSS 29, MGSS 115 e MGSS 172 apresentaram colônias de coloração marrom a negra com presença de micélios aéreos. Os conídios quanto ao número de células são frágilísporo (Pluricelular, septos transversais) apresentando três septos, podendo ser curvos ou elípticos. Conidióforos retos de coloração marrom (Figura 32, 33 e 34).

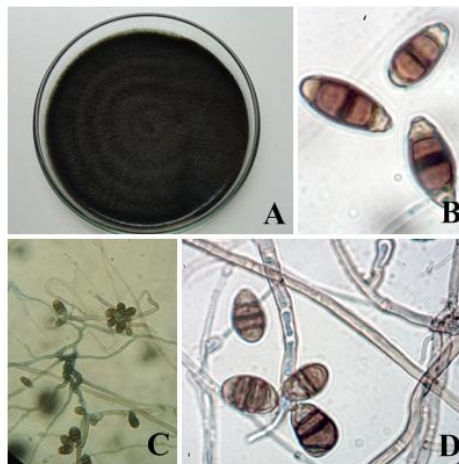
Os isolados MGSS 29 e MGSS 172 apresentaram características próprias das espécies *Curvularia eragrostides* e *Curvularia lunata*. Já o isolado MGSS 115 foi identificado somente em nível de gênero.

As características dos isolados estudados estão de acordo com as referidas na bibliografia consultada (ELLIS, 1971).

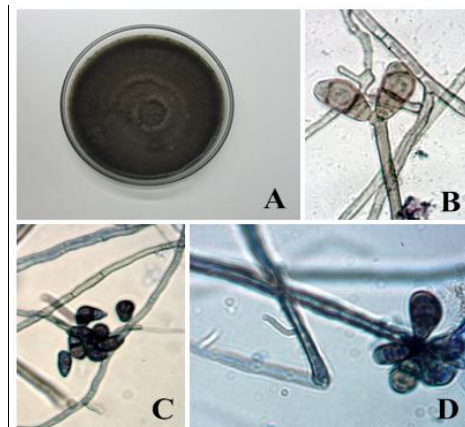
**Figura 32. MGSS 29.** Características morfológicas de *Curvularia eragrostidis*. A. Colônia. B. Conidióforo, C. conídio. D. Conidióforo reto e simples.



**Figura 33. MGSS 115.** Características morfológicas de *Curvularia* sp. A. Colônia. B. Conídios, C- D. Conidióforos.



**Figura 34. MGSS 172.** Características morfológicas de *Curvularia lunata*. A. Colônia. B. Conídios, C- D. Conidióforos retos.



## FUSARIUM

Quanto à coloração de colônias os isolados MGSS 54, MGSS 66, MGSS 68, MGSS 157, MGSS 194 apresentaram o centro da colônia rosa e bordas claras, os isolados MGSS 141 e MGSS 159 apresentaram colônias totalmente rosas próximos do vermelho em tons fracos para a primeira estirpe e mais acentuado na segunda estirpe e os isolados MGSS 61 e MGSS 71 com colônias de cor salmão (Figuras 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43).

Outro grupo com os isolados MGSS 09, MGSS 10, MGSS 14, MGSS 65 e MGSS 67 apresentaram colônias de coloração roxa. E o outro grupo colônias totalmente rosa: os isolados MGSS 01, MGSS 15, MGSS 42, MGSS 118, MGSS 155, MGSS 182, MGSS 183 (Figuras 44, 45, 46, 47, 48, 49).

Outro grupo com isolados MGSS 117, MGSS 122 apresentaram coloração da colônia salmão. Já a estirpe MGSS 138 apresentou colônia de cor amarelo queimado, e os isolados MGSS 149 e MGSS 191 apresentaram coloração rosa (Figuras 50, 51)

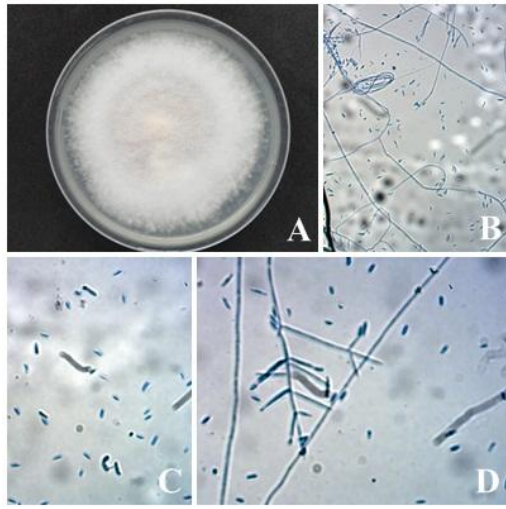
E um isolado MGSS 169 apresentou colônia de coloração central levemente dourado e bordas rosa (Figura 49).

Quanto à presença de macroconídios na forma alantóide e do tipo fragmósporo (pluricelular e septos transversais) os isolados foram divididos quanto o número de septos. As estirpes que produziram macroconídios entre 3-5 septos foram: MGSS 01, MGSS 15, MGSS 183, MGSS 67, MGSS 155, MGSS 66, MGSS 68, MGSS 182, MGSS 61, MGSS 10, MGSS 54, MGSS 42, MGSS 14, MGSS 118, MGSS 09. E os isolados que produziram entre 5-7 septos foram: MGSS 191, MGSS 149, MGSS 169, MGSS 122, MGSS 138, MGSS 117. Os isolados MGSS 71, MGSS 141, MGSS 157, MGSS 159 e MGSS 194 não produziram macroconídios.

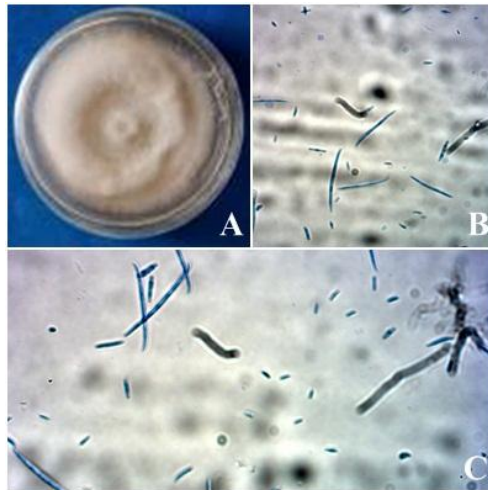
Quanto à presença de microconídios, estes apresentaram as forma oval, elipítica ou reniforme podendo ser amerósporo (unicelular sem septos) ou didimósporo (bicelular, uniseptado). Foram constatados nos seguintes isolados: MGSS 01, MGSS 15, MGSS 183, MGSS 65, MGSS 159, MGSS 67, MGSS 155, MGSS 66, MGSS 71, MGSS 68, MGSS 141, MGSS 182, MGSS 122, MGSS 61, MGSS 10, MGSS 54, MGSS 42, MGSS 149, MGSS 14, MGSS 118, MGSS 09, MGSS 194, MGSS 157. Também se verificou que alguns não produziram microconídios são eles: MGSS 117, MGSS 138, MGSS 169 e MGSS 191.

A produção de estrutura de resistência (Clamidósporo) foi observada nos seguintes isolados MGSS 10, MGSS 15, MGSS 42, MGSS 155, MGSS 182 e MGSS 183.

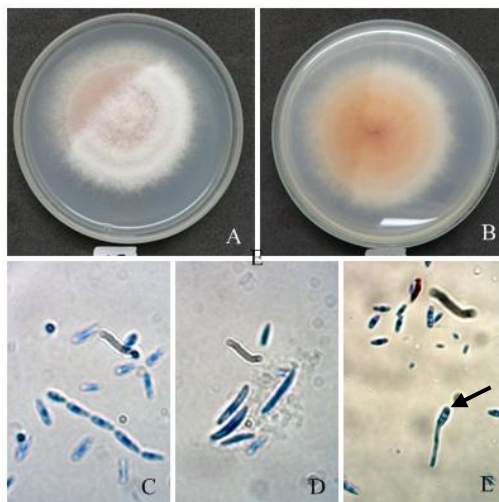
**Figura 35.** Características morfológicas do isolado MGSS 54.. A. Colônia de *Fusarium guttiforme*. B. Conídios, C- D. Conidioforos retos.



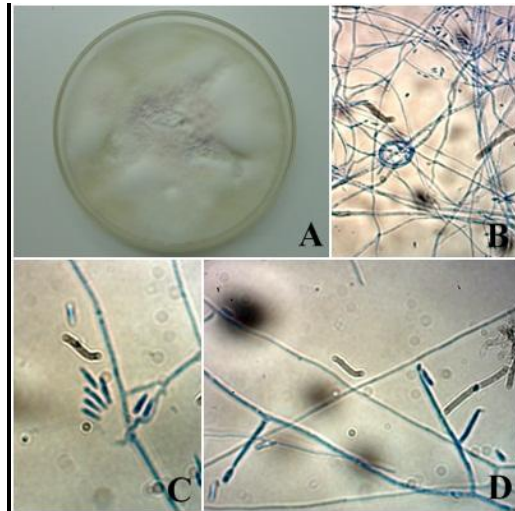
**Figura 36.** Características morfológicas do isolado MGSS 61. A. Aspecto da Colônia de *Fusarium* em meio de cultura BDA. B. Macroconídios. C. Macroconídios e Microconídios.



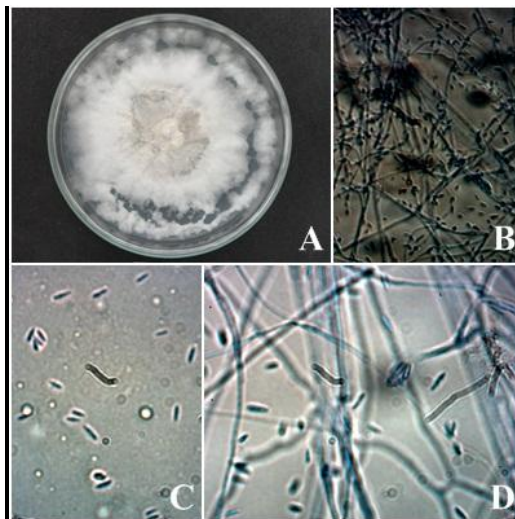
**Figura 37.** Características morfológicas do isolado MGSS 68. A. Aspecto da Colônia de *Fusarium guttiforme* (Verso). B. Aspecto da Colônia (Reverso). C. conídios em cadeia. D. mesoconídios. E. conídio germinando.



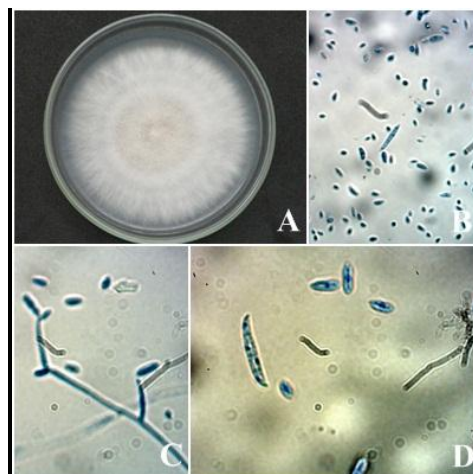
**Figura 38.** Características morfológicas do isolado MGSS 157. Aspecto da colônia de *Fusarium* sp. B. Hifas em espiral. C. Conídios. D . Monofialides e polifialides.



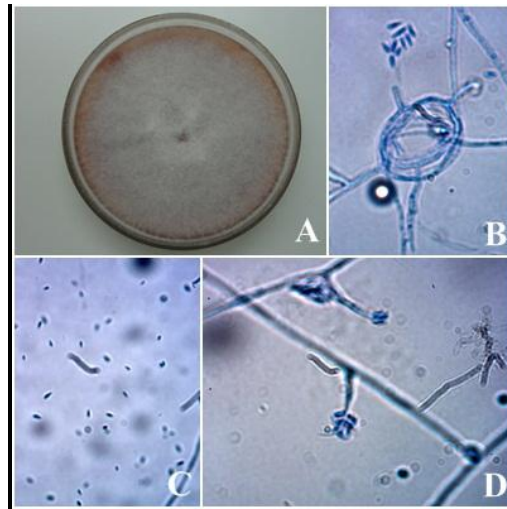
**Figura 39.** Características morfológicas do isolado MGSS 194. Aspecto de Colônia de *Fusarium* sp. B. Abundância de microconídios. C-D. Microconídios.



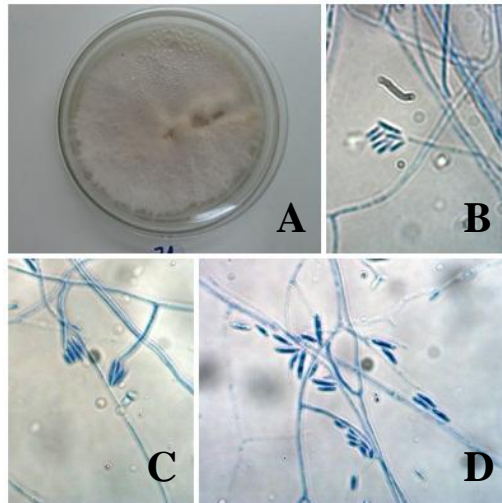
**Figura 40.** Características morfológicas do isolado MGSS 66. A. Aspecto da Colônia de *Fusarium sacchari*. B. Conidos. C. Fiálides. D. Microconídios e Macroconídios.



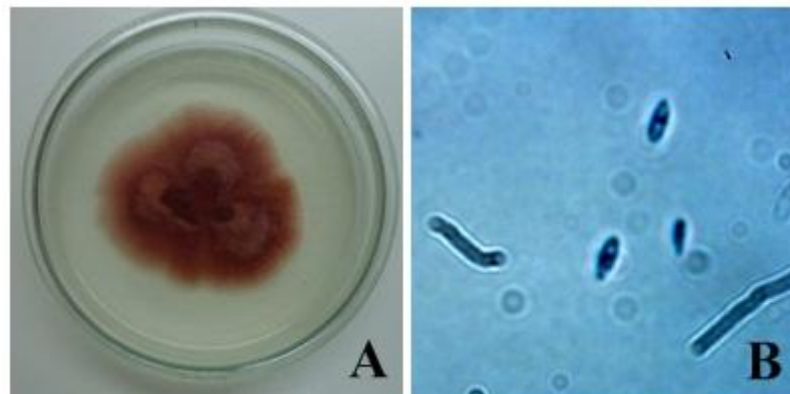
**Figura 41.** Características morfológicas do isolado MGSS 141. A. Aspecto da Colônia de *Fusarium* sp. B. Hifa em espiral. C. Conídios. Falsas Cabeças.



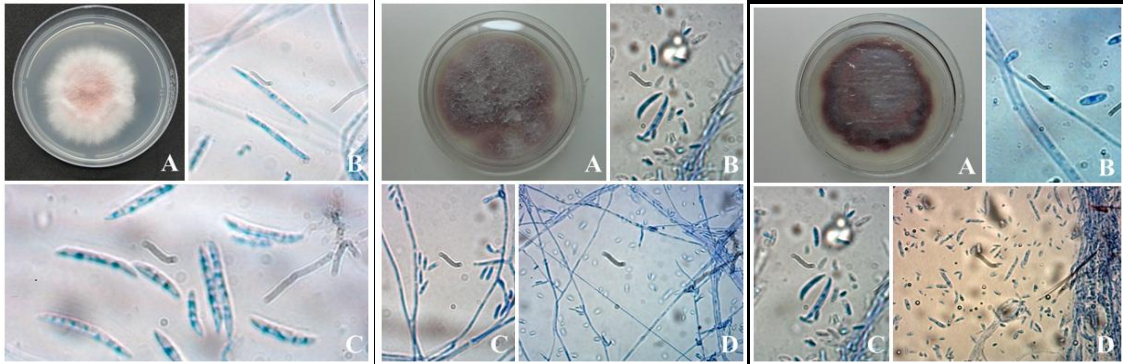
**Figura 42.** Características morfológicas do isolado MGSS 71. A. Aspecto da Colônia de *Fusarium*. B. Microconídios. C. Fiálides. D. Abundância de microconídios.



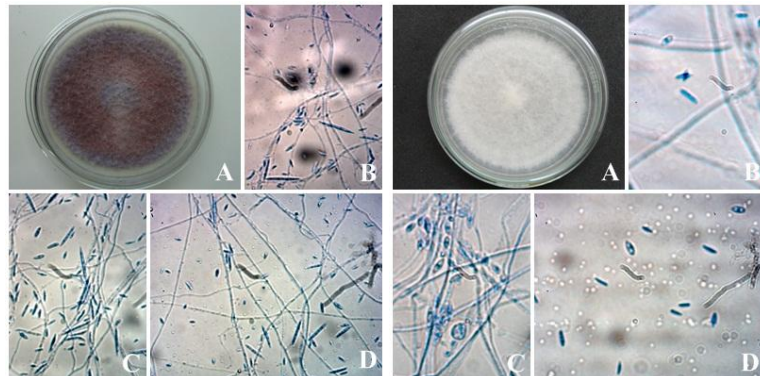
**Figura 43.** Características morfológicas do isolado MGSS 159. A. Aspecto da Colônia de *Fusarium* sp. B. Microconídios.



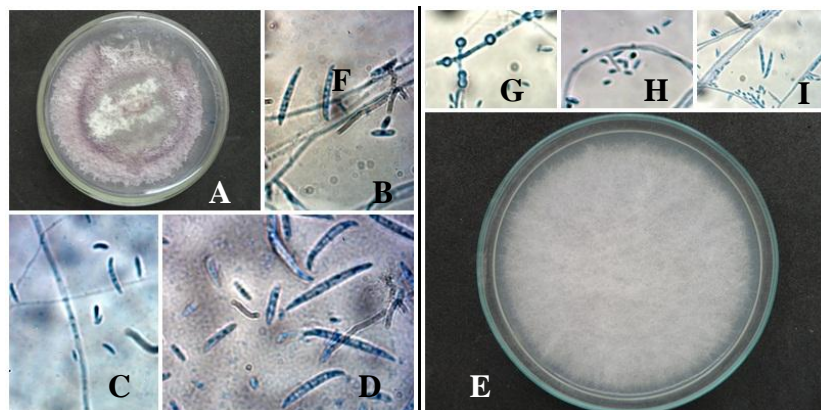
**Figura 44.** Características morfológicas do isolado MGSS 01 (esquerda). A. Aspecto da Colônia de *Fusarium oxysporum*. B-C. Macroconídios. Características morfológicas do isolado MGSS 09 (Centro). A. Aspecto da Colônia de *Fusarium*. B. Macroconídio, C-D. Microconídio. Características morfológicas do isolado MGSS 10 (direita). A. Aspecto da Colônia de *Fusarium oxysporum*. B. Microconídio. C-D. Macro e Microconídios.



**Figura 45.** Características morfológicas do isolado MGSS 14 (à esquerda). A. Aspecto da Colônia de *Fusarium oxysporum*. B.C.D. Macro e Microconídios. Características morfológicas do isolado MGSS 15 (à direita). A. Aspecto da Colônia de *Fusarium oxysporum*. B-C-D. Microconídios.

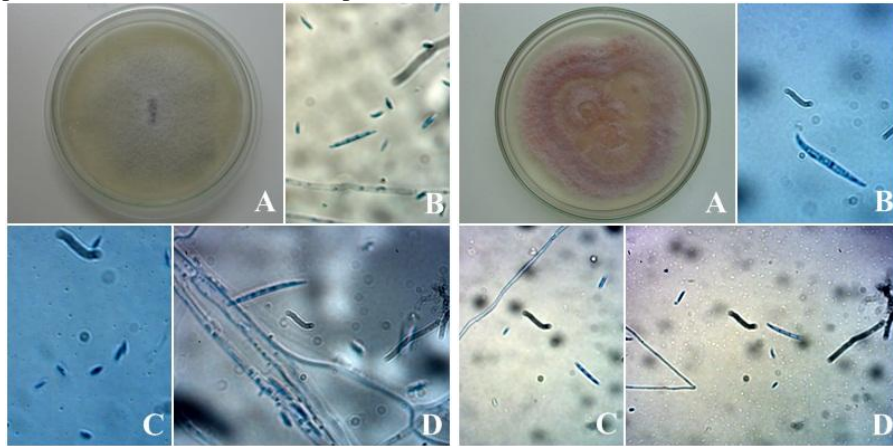


**Figura 46.** Características morfológicas do isolado MGSS 65 (à esquerda). A. Aspecto da Colônia de *Fusarium* sp. B-C-D. Macroconídios e microconídios. E. Características morfológicas do isolado MGSS 42 (à direita). E. Aspecto da Colônia de *Fusarium oxysporum*. F. Clamidosporos, G-H. Microconídios e Macroconídios.

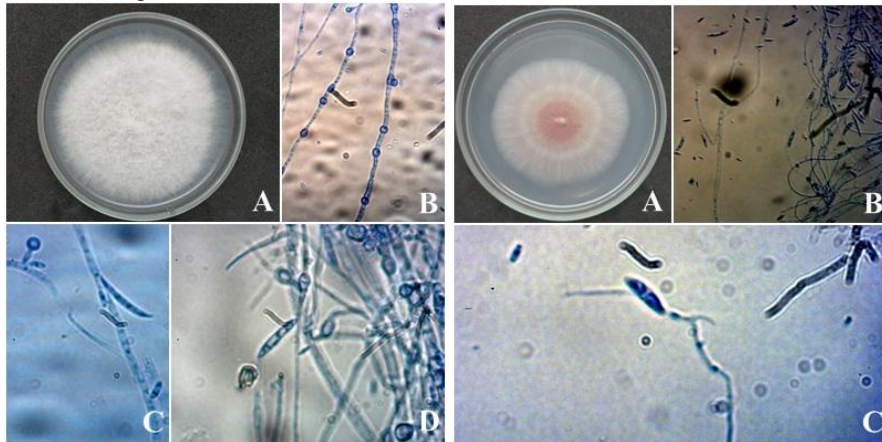




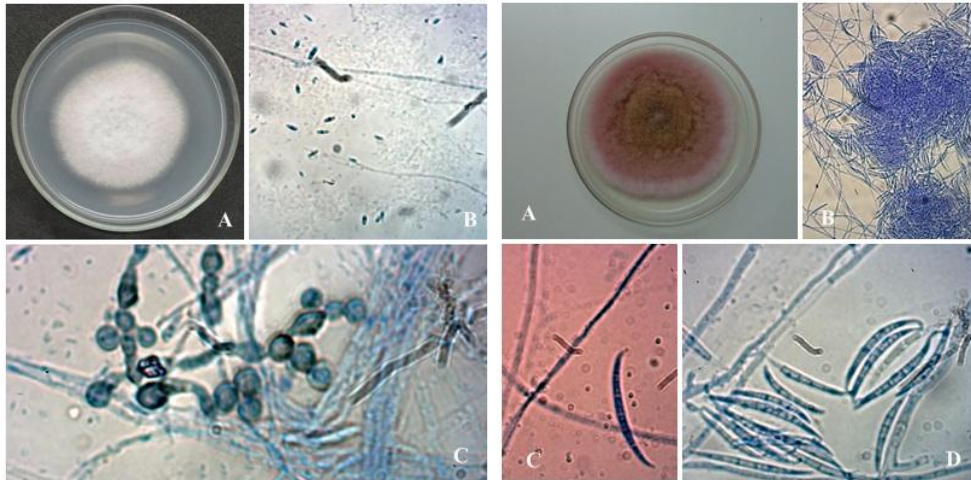
**Figura 47.** Características morfológicas do isolado MGSS 118. (à esquerda). A. Aspecto da Colônia de *Fusarium oxysporum*. B. C. D. Macro e Microconídios. Características morfológicas do isolado MGSS 67 (à direita). A. Aspecto da Colônia de *Fusarium* sp. B. Macroconídios. C.D. Micro e Macroconídios.



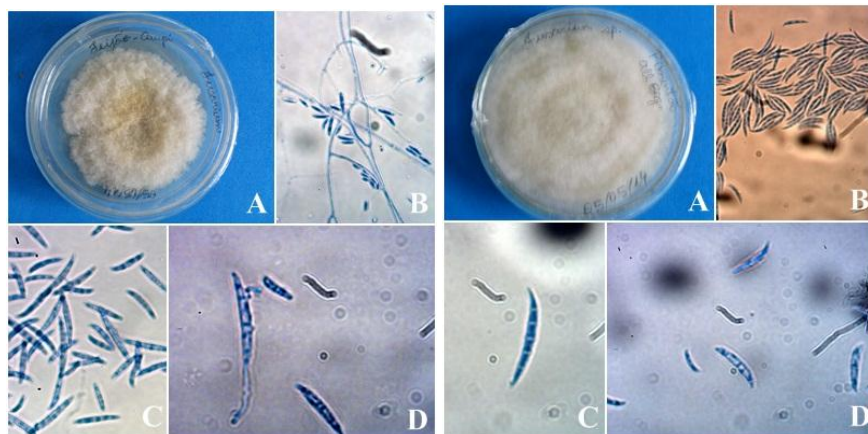
**Figura 48.** Características morfológicas do isolado MGSS 155 (à esquerda). A. Aspecto da Colônia de *Fusarium oxysporum*. B. Clamidosporo. C Macroconidio. D. Hifas, Macroconidio e clamidósporo. Características morfológicas do isolado MGSS 183. A. Aspecto da Colônia de *Fusarium oxysporum*. B. Macro e Microconídios. C. Conídio germinando.



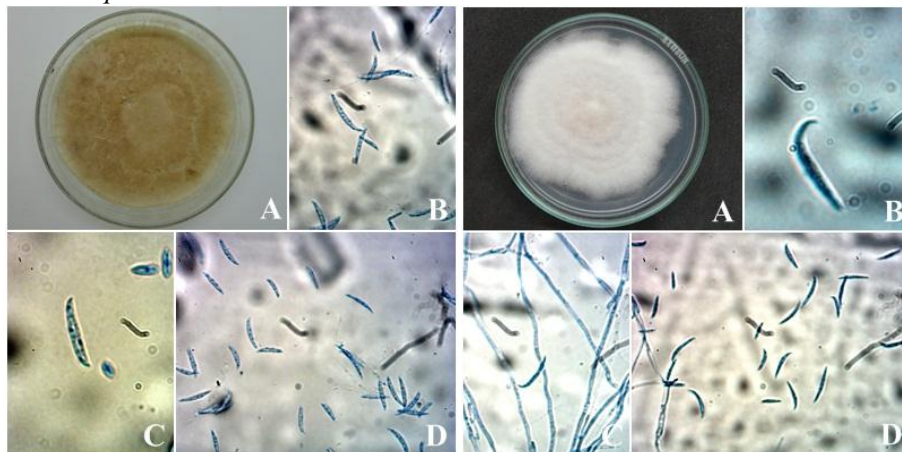
**Figura 49.** Características morfológicas do isolado MGSS 182. (à esquerda). A. Aspecto da Colônia de *Fusarium oxysporum*, B. microconídios, C. Clamidosporos. Características morfológicas do isolado MGSS 169. A. Aspecto da Colônia de *Fusarium longipes*. B. abundância de Macroconídios. C.D. Macroconídios.



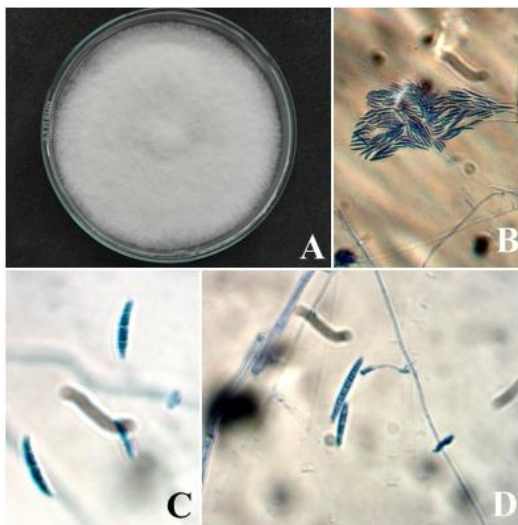
**Figura 50.** Características morfológicas do isolado MGSS 117 (à esquerda). A. Aspecto da Colônia de *Fusarium equiseti*. B.C.D. Macroconídio. Características morfológicas do isolado MGSS 122 (à direita). A. Aspecto da Colônia de *Fusarium*. B.C.D. Macroconídios.



**Figura 51.** Características morfológicas do isolado MGSS 138 (à esquerda). Aspecto da Colônia de *Fusarium equiseti*. B.C.D. Macroconídio. Características morfológicas do isolado MGSS 191 (à direita). Aspecto da Colônia de *Fusarium equiseti*. B.C.D. Macroconídio



**Figura 52.** Características morfológicas do isolado MGSS 149. Aspecto da Colônia de *Fusarium*. B.C.D. Macroconídios.



Com base nos locais de obtenção dos fungos em órgãos das plantas, associados aos tipos de sintomas causados pelos fungos fitopatogênicos e observação das estruturas micromorfológica classificou-se as espécies em *Fusarium oxysporum* as estirpes: MGSS 01, MGSS 09, MGSS 10, MGSS 14, MGSS 42, MGSS 118, MGSS 155, MGSS 182, MGSS 183. Os isolados oriundos de abacaxi com sintomas de gomose como MGSS 15, MGSS 68, MGSS 71, MGSS 54, MGSS 67, MGSS 65 foram classificados como *F. guttiforme*. O isolado MGSS 66 obtido da cultura do milho foi classificado com *F. sacchari*. Outros isolados oriundos de caule e sementes de vinagreira, MGSS 141, MGSS 157, MGSS 159 e de insetos como *Mosca negra* (*Aleurocanthus woglumi*), percevejo (*Tibraca limbativentris*) apresentaram características de espécies do complexo *Gibberella fujikuroi* dentro da seção *Liseola*. Já os isolados MGSS 169 foi classificado como *F. longipes*.

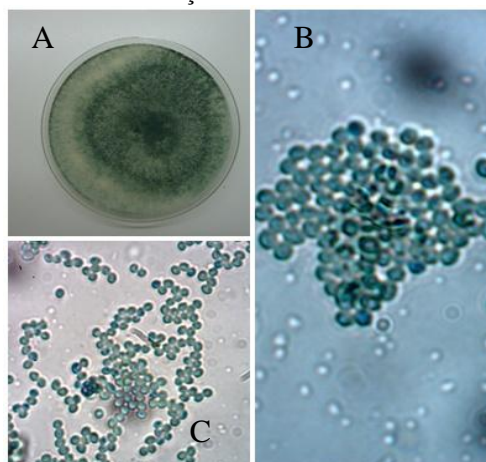
Os isolados MGSS 117, MGSS 138, MGSS 191 foram classificados como *F. equiseti*. Os isolados MGSS 122 e MGSS 149 foram classificados como *F. scirpi*.

As características dos isolados estudado estão de acordo com as referidas na bibliografia consultada (LESLIE; SUMMERELL, 2006).

## TRICHODERMA

O isolado MGSS 123 apresentou colônias de crescimento rápido com coloração verde em meio de cultura BDA e conídios de forma globosos e amerósporos (unicelular, asseptado) quanto ao número de células. Os conídios tinham coloração verde e muitas vezes formavam massas de conídios (Figura 53).

**Figura 53.** Características morfológicas do isolado MGSS 123. A. Colônia de *Trichoderma*, B. Massa de conídios e formato globoso. C. Conídios de coloração verde.



Os conidióforos apresentaram-se altamente ramificados, irregularmente verticilados, muitas vezes irregularmente dobrados, com alongamentos de hifas estéreis. Fiálides em forma de balão em cachos terminais pequenos, geralmente reorganizados pelo seu rápido crescimento.

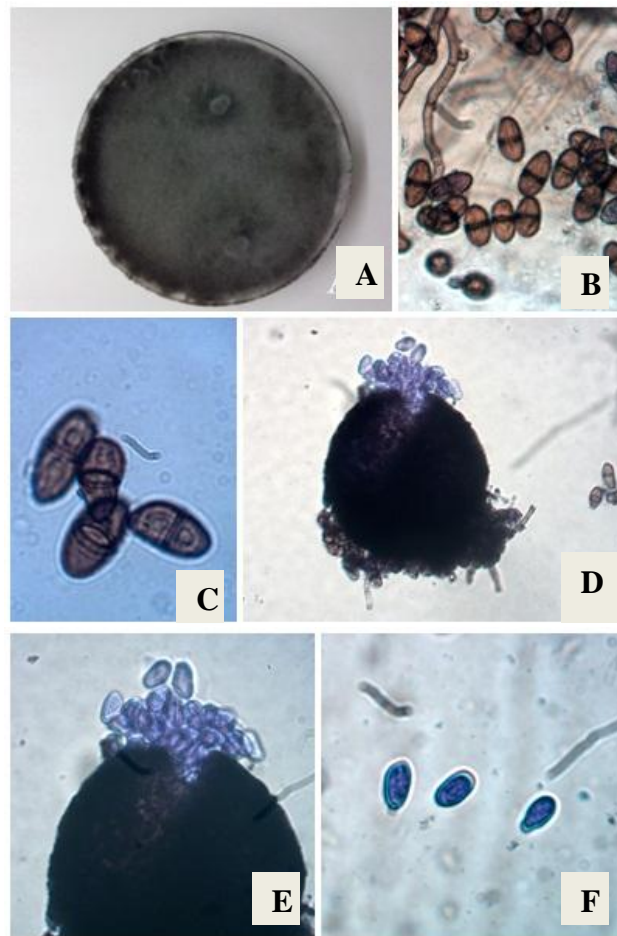
O isolado MGSS 123 foi classificado pertencente ao gênero *Trichoderma* Persoon:Fr. e as características do isolado estão de acordo com as descritas por Samuels et al. (2015) para este gênero.

### LASIODIPLODIA

O isolado MGSS 176 cresceu rapidamente em meio de cultura BDA. O micélio aéreo cresceu de forma uniforme em todas as direções e cobriu totalmente a superfície do meio de cultura. A cor da colônia mudou gradualmente de cinza para preto ao longo de dez dias de incubação. Quanto aos conídios havia presença de maduros e imaturos. Quanto à forma, os conídios maduros eram oval de coloração marrom escuro com leves estrias verticais, e quanto ao número de células eram didimósporo (bicelular, uniseptado). Os conídios imaturos eram ovais, hialinos e quanto ao número de células unicelular, sem septos, com parede dupla (Figura 63).

Os picnídios formados após 4 semanas por este isolado eram de formato oval com ostíolo (abertura) do qual estavam sendo expelidos conídios imaturos hialinos (Figura 54).

**Figura 54.** Características morfológicas do isolado MGSS 176. A. Colônia, B-C- Conídios maduros septados. D.E. Picnídios liberando conídios imaturos. F. Conídios imaturos

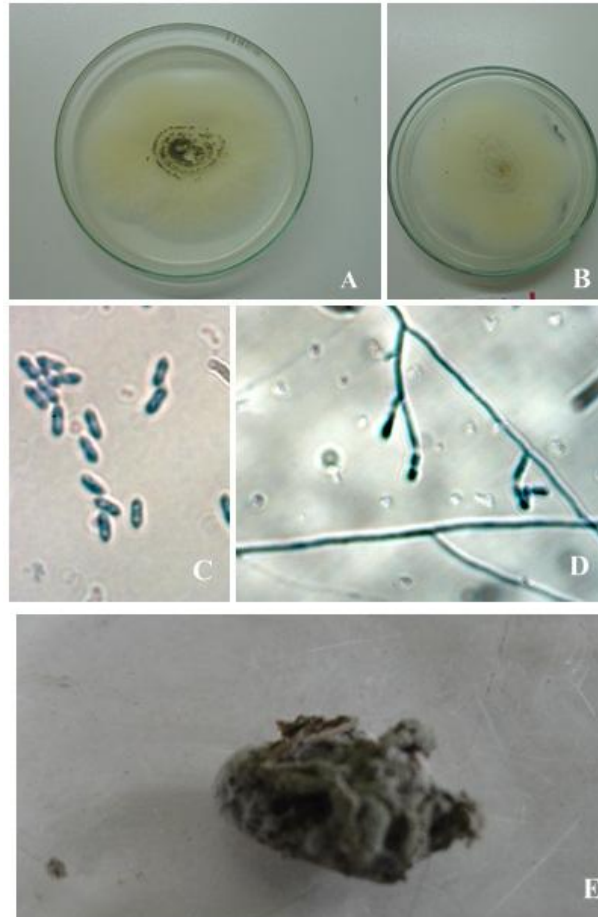


De acordo com essas características o isolado MGSS 176 foi classificado como *Lasiodiplodia theobromae*. Outros autores relatam as mesmas características para espécie *L. theobromae* (ALVES et al., 2008; NORHAYATI; ERNEEZA; KAMARUZAMAN; 2016; CHEN et al., 2016a).

## **METARHIZIUM**

O isolado MGSS 192 apresentou no verso da placa colônias com coloração verde no centro e amarelo nas bordas e no lado reverso da placa amarelo claro. Conídios cilíndricos do tipo amerósforo (unicelular, esseptado) com extremidades arredondadas que variaram de cor de verde claro para verde escuro com conidióforos simples justapostos, resultando em uma massa regular. As fiálides, clavadas ou cilíndricas foram originárias do vértice de hifas e se colocam uma ao lado das outras (Figura 55).

**Figura 55.** Características morfológicas do isolado MGSS 192. A. Colônia de *Metarhizium* (verso), B. Colônia de *Metarhizium* (reverso). C. Conídios cilíndricos. D. Conidioforos simples. E. Colonização do fungo em *Tibraca limbativentris*.



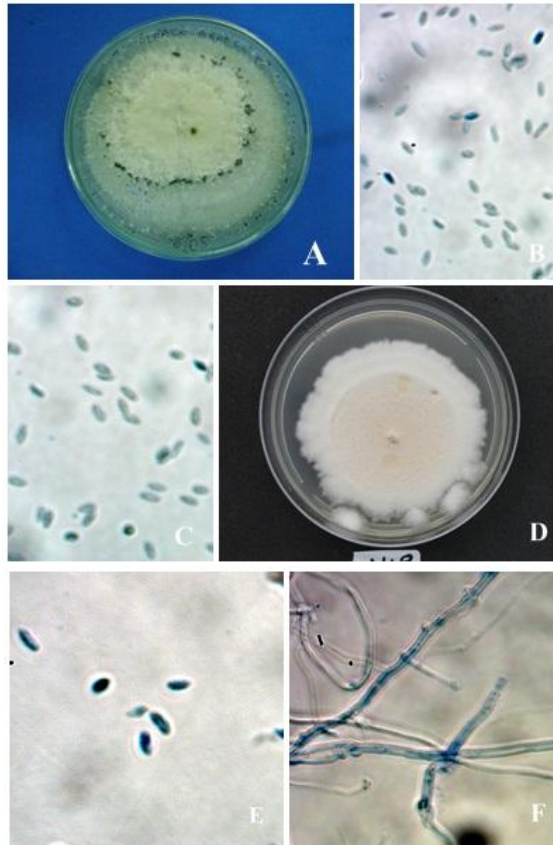
De acordo com as características morfológicas observadas o isolado MGSS 192 foi classificado como *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok.

Outros autores também observaram essas mesmas características em isolados de *M. anisopliae* (BISCHOFF, REHNER, HUMBER, 2009; TANGTHIRASUNUN et al., 2010).

### **MYROTHECIUM.**

Os isolados MGSS 143 e MGSS 148 apresentaram colônias com características de colônias bem distintas uma da outra. O isolado MGSS 143 apresentou crescimento em meio de cultura BDA de coloração branca e micélio aéreo e o isolado MGSS 148 apresentou colônias com coloração salmão (Figura 56 A e D).

**Figura 56.** Características morfológicas do isolado MGSS 143. A. Aparência da Colônia de *Myrothecium verrucaria*. B-C. Conídios limoniforme ou elipsoides. D. Colonia de *Myrothecium gramineum* (MGSS 148) de cor salmão. E. Conídios elipsóide ou cilíndrico. F. Micélio hialino.



Os isolados MGSS 143 apresentaram conídios na forma limoniforme ou elíptico do tipo amérosporo (unicelular, esseptado) com base truncada. Já o isolado MGSS 148 apresentou conídios elipsoides e cilíndricos sendo hialino do tipo amerósporo (unicelular, asseptado).

De acordo com as características analisadas o isolado MGSS 143 foi classificado como *Myrothecium verrucaria* e o isolado MGSS 148 foi classificado como *Myrothecium gramineum*.

Estes resultados estão de acordo com a chave de identificação proposta por Ellis (1971).

## NEOSCYTALIDIUM

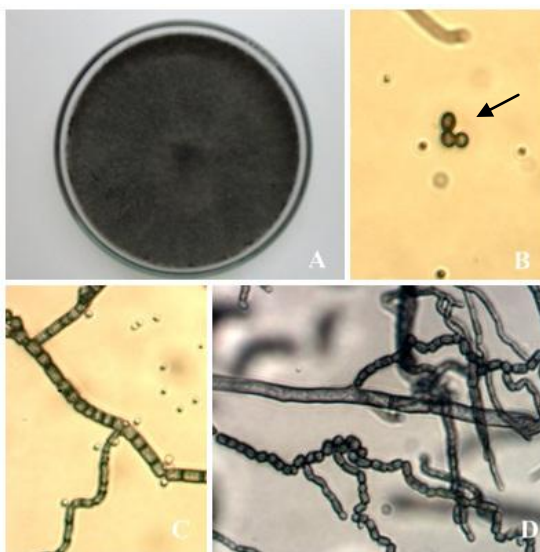
O isolado MGSS 106 apresentou características de crescimento rápido em meio de

cultura BDA, com preenchimento de toda placa de 9 cm em 4 dias de incubação a 25 °C. A colônia apresentou a coloração negra com bastante micélio (Figura 57 - A)

Apresentou conídios de forma ovóide do tipo amérosporo (unicelular) e os arthriconídios ocorrendo em cadeia de parede espessa e de cor marrom escura apresentando entre 0 -1 septos (Figura 57- B-C).

Para o micélio, as hifas foram ramificadas, septadas, de coloração marrom (Figura 56 -D).

**Figura 57.** Características morfológicas do isolado MGSS 106. A. aspecto da colônia de *Neoscytalidium* em BDA. B. Conídios ovóide. C. Arthriconídios. D. Micélio.



Com base nas descrições de Crous et al. (2006), o fungo isolado a partir do Abacaxi (*Ananas comosus*) foi identificado como *Neoscytalidium dimidiatum* (Penz.).

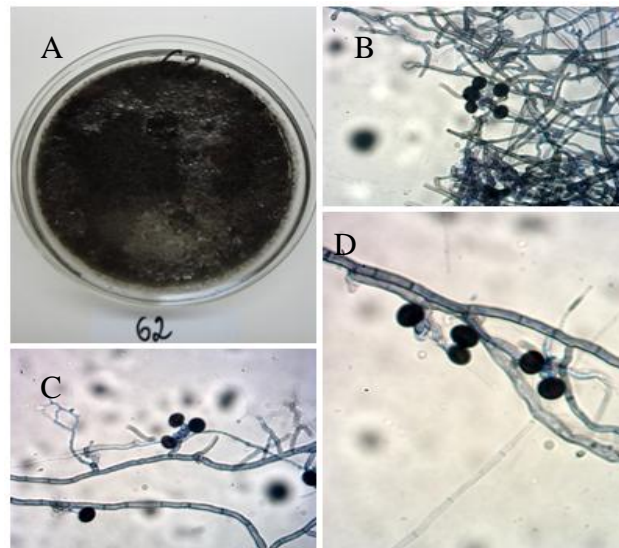
## NIGROSPORA

O isolado MGSS 62 obtido de lesões em folhas de arroz (*Oryza sativa* L.) apresentou colônias com crescimento inicial branco e após sete dias estava de coloração negra devida intensa espourlação de conídios.

Os conídios eram esféricos de coloração negra do tipo amerósporo unicelular, asseptado. Conidióforo micronemático e células conidiogências monoblásticas, solitárias, determinadas (crescimento cessa após a produção dos conídios) (Figuram 58).



**Figura 58.** Características morfológicas do isolado MGSS 62. A. Aspecto da colônia de *Nigrospora oryzae* em cultura BDA. B. Conídios esféricos. C-D. Conidioforos.

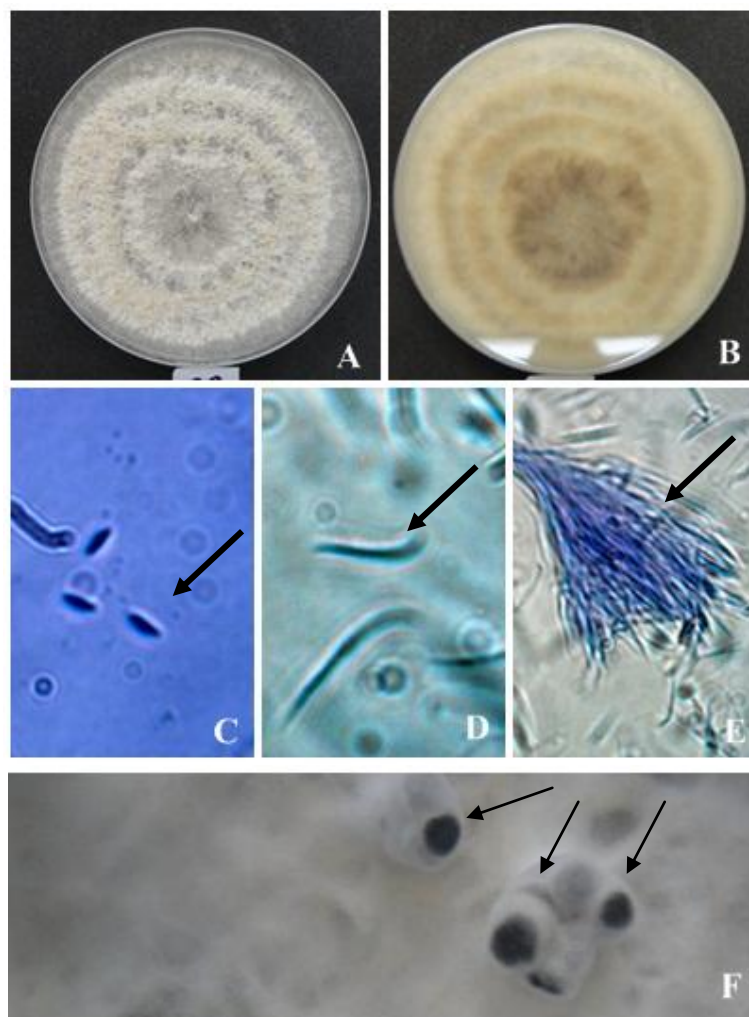


De acordo com as características o isolado MGSS 62 foi classificado como *Nigrospora oryzae* (Berk & Br.) Petch. Estes resultados estão de acordo com a chave de identificação proposta por Ellis (1971).

### **PHOMOPSIS / DIAPORTHE**

O isolado MGSS 80 oriundo de lesões foliares de Roseira (*Rosa* sp.) apresentou características de colônia de coloração creme e no reverso da placa marrom claro. Alpha conídios foram do tipo amerósporo (unicelular, asseptados), hialinos, liso, fusiforme, vértice truncado base arredondada. Os conídios beta foram filiforme, curvo, amerósporo (unicelular asseptados) hialinos presente em maior número do que Alpha conídios. Os picnídios formados apresentaram coloração negra e superficial em meio de cultura BDA (Figura 59).

**Figura 59.** Características morfológicas do isolado MGSS 80. A. Aspectos do Verso da Colônia de *Phomopsis*. B. Reverso da Colônia. C. Alpha conídios. D. Beta conídios. E. Grande número de Beta conídios produzidos. F. Picnídios produzidos em meio de cultura.



De acordo com essas características o isolado MGSS 80 foi classificado como *Phomopsis* sp.

Outros autores também observaram as mesmas características aqui descritas (SERRATO-DIAZ et al., 2014); (GOMES et al., 2013).

## PHOMA

O isolado MGSS 152 apresentou colônias de coloração castanha, de tom aveludado com bordas claras (Figura 60).

Picnídios solitários ou confluentes, globosos para subglobosos ou irregular, glabro, marrom ao preto, superficial ou imerso, de tamanho variável, parede picnídios pseudoparenquimatosos, composto por oblongo a cilíndrica ou células alongadas, 4-5

camadas, células conidiogênicas filídicas, hialina, simples, suave, em forma de balão.

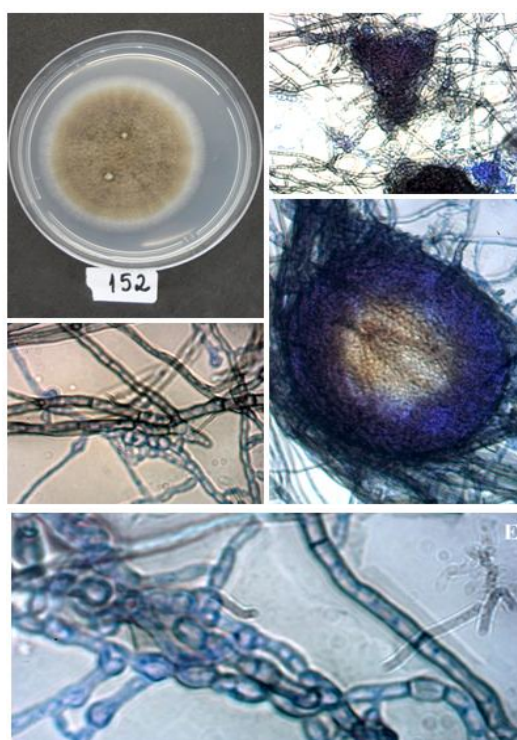
Formato dos conídios oblongo a elipsoidal, de parede fina, lisa, hialina, asseptados, altamente variável em tamanho. Presença de clamidósporos principalmente unicelulares, 5-15 µm de diâmetro, elipsoidal a oblongo a pouco piriforme, oliváceos ou marrom pálido com *guttules* esverdeados, solitário ou em cadeias, intercalada, mas também terminal.

Um conjunto de clamidósporos unicelulares, em *cluster* podem ser observado regularmente, em culturas mais velhas (AVESKAMP et al., 2009).

O isolado MGSS 152 foi classificado como *Phoma multirostrata*.

Assim, devido a caracteres fenotípicos que não podem sempre ser distintivo entre a taxa, é indicado o auxílio de caracterização molecular para delinear claramente a fronteira entre as espécies deste gênero controverso.

**Figura 60.** Características morfológicas do isolado MGSS 152. A. Aspecto de colônia de *Phoma multirostrata* em meio BDA. B. picnídio de *Phoma*. C – E. Clamidosporo de *Phoma*; D. Picnídio globoso.



As informações morfológicas de cada isolados foram reunidas nas tabelas 4 e 5. A tabela 4 é exclusivamente com características morfológicas de espécies do gênero *Fusarium*. Já a tabela 5 mostra características morfológicas de isolados pretencentes a 15 gêneros.

**Tabela 4.** Resumo das características morfológicas de isolados do gênero *Fusarium*.

MGSS	CONÍDIOS (Formato e número de Células)		CLAMIDOSPOROS	Local de Isolamento	Cor da colônia	Gênero/Espécie
	MACROCONÍDIO	MICROCONÍDIO				
01	Alantóide e fino com célula apical sem corte entre 3-5 septos	Oval Amerósporo (unicelular)	Não	Sistema vascular	Totalmente Rosa	<i>Fusarium oxysporum</i>
71	Não observado.	Oval (1 septo), Didimósporo (bicelular) Produziu também mesoconídios com 2 septos fragmósporo (pluricelular)	Não	Fruto	Salmão	<i>Fusarium guttiforme</i>
183	Alantóide e fragmósporo com 3 septos e célula apical sem corte	Oval (1 septo) Didimósporo (uniseptado)	Sim. Individual	Sistema vascular	Totalmente Rosa	<i>Fusarium oxysporum</i>
65	Alantóide e fragmósporo com 3-7 septos e célula apical curvada	Oval Amerósporo (unicelular)	Não	Mudas	Roxa	<i>Fusarium</i> sp.
159	Ausente	Oval (1 septo) Didimósporo (uniseptado)	Não	Sementes	Vermelho	<i>Fusarium</i> sp.
67	Alantóide e fragmósporo 3-5 septos e célula apical curvada	Oval (1 septo) Didimósporo (uniseptado)	Não	Mudas	Totalmente Rosa	<i>Fusarium</i> sp.
117	Alantóide e fragmósporo 5-7 septos. com célula apical curvada em abundância de macroconídios	Ausente	Não	Caule	Salmão	<i>Fusarium equiseti</i>
155	Alantóide e fragmósporo com célula apical curvada (4-5 septos)	Oval (1 septo) Didimósporo (bicelular)	Sim. Simples ou individual	Fruto	Totalmente Rosa	<i>Fusarium oxysporum</i>
66	Alantóide e fragmósporo com 3 septos, célula apical curvada.	Oval (1 septo) Didimósporo (bicelular) abundância de microconídios. Produziu também mesoconídios com 1 septo	Não	Milho	Rosas com bordas claras	<i>Fusarium sacchari</i>
138	Alantóide Curvatura no lado dorsal superior maior que no lado ventral, célula apical afinando e fragmósporo com 7 septos	Ausente	Não	Fruto	Amarelo queimado	<i>Fusarium equiseti</i>

Continuação						
MGSS	CONÍDIOS (Formato e número de Células)		CLAMIDOSPORO	Local de isolamento	Cor da Colônia	Gênero/Espécie
	MACROCONÍDIO	MICROCONÍDIO				
68	Alantóide -Curvatura no lado dorsal superior maior do que no lado ventral com célula apical afinando e fragmósporo com 5 septos.	Oval (1 septo,) Didimósporo (bicelular) Produziu também mesoconídios Fragmosporo (pluricelular) com 2 septos	Não	Fruto	Rosa e bordas claras.	<i>Fusarium guttiforme</i>
15	Alantóide e fragmósporo (3-5 septo transversais)	Oval com base truncada Didimósporo (uniseptado)	Sim. Individual	Mudas	Totalmente Rosa	<i>Fusarium oxysporum</i>
141	Ausente	Oval (1 septo) Didimósporo (bicelular)	Não	Caule	Totalmente Rosa	complexo <i>Gibberella fujikuroi</i>
182	Alantóide e fragmósporo (pluricelular) 3- 5 septos	Oval ( 1 septo) Didimósporo (bicelular)	Sim. Agrupado em cadeia.	Sistema vascular	Totalmente Rosa	<i>Fusarium oxysporum</i>
122	Alantóide Curvatura no lado dorsal superior maior do que no lado ventral e célula apical curvada e fragmósporo com 5 septos.	Oval e reniforme com 1 septo Didimósporo (bicelular)	Não	Semente	Salmão	<i>Fusarium scirpi</i>
54	Alantóide e fino com célula apical sem corte e fragmósporo(pluricelular) com 3 a 5 septos	Oval (0-1 septos) em mono e polifialides Amerosporo (unicelular) 0 septo Didimósporo (bicelular) 1 septo	Não	Mudas	Rosa e bordas claras	<i>Fusarium guttiforme</i>
10	Alantóide e fino fragmósporo (pluricelular) com 3 septos	Oval Amerosporo (unicelular) 0 septo Didimósporo (bicelular) 1 septo	Sim. Simples ou Individual	Sistema Vascular	Roxo	<i>Fusarium oxysporum</i>
169	Alantóide Curvatura no lado dorsoventral e fragmósporo (pluricelular) com 5 septos e abundância de macroconídios	Ausente	Não	Folha	Rosa com centro dourado e bordas rosa claro.	<i>Fusarium longipes</i>

Continuação						
MGSS	CONÍDIOS (Formato e número de Células)		CLAMIDOSPORO	Local de isolamento	Cor da Colônia	Gênero/Espécie
	MACROCONÍDIO	MICROCONÍDIO				
61	Alantóide com célula apical curvada e Frágmosporo com 5 septos	Oval Amerosporo (unicelular)	Não	Inseto- Mosca negra	Salmão	complexo <i>Gibberella fujikuroi</i>
42	Alantóide com célula apical sem corte e frágmosporo (pluricelular) com 3 a 5 septos.	Oval (0-1 septos) Amerosporo (unicelular) 0 septo Didimósporo (bicelular) 1 septo	Sim. Individual ou em pares.	Sistema vascular	Totalmente Rosa	<i>Fusarium oxysporum</i>
149	Alantóide e frágmosporo (pluricelular) com 3 a 6 septos.	Elíptico (0-2 septos) Amerosporo (unicelular) 0 septo Didimósporo (bicelular) 1 septo Frágmosporo (pluricelular) 2 septos	Não	Folha	Rosa	<i>Fusarium scirpi.</i>
14	Alantóide com célula apical sem corte e frágmosporo (pluricelular) com 3 a 6 septos	Oval (0-1 septo) Amerosporo (unicelular) 0 septo Didimósporo (bicelular) 1 septo	Não	Sistema vascular	Totalmente Rosa	<i>Fusarium oxysporum</i>
118	Alantóide com célula apical sem corte e frágmosporo com 3 a 5 septos	Oval (0-1 septo) Amerosporo (unicelular) 0 septo Didimósporo (bicelular) 1 septo	Não	Sistema vascular	Totalmente Rosa	<i>Fusarium oxysporum</i>
191	Alantóide - Curvatura no lado dorsoventral e célula apical afinando e frágmosporo (pluricelular) com 5 septos, e abundância de macroconídios	Ausente	Não	Caule	Rosa	<i>F. equiseti.</i>
09	Alantóide com célula apical curvado e frágmosporo (pluricelular) com 3 septos.	Oval em monofialides Amerosporo (unicelular) 0 septo	Não	Sistema vascular	Roxa	<i>Fusarium oxysporum</i>

Continuação						
MGSS	CONÍDIOS (Formato e número de Células)		CLAMIDOSPORO	Local de isolamento	Cor da Colônia	Gênero/Espécie
	MACROCONÍDIO	MICROCONÍDIO				
194	Ausente	Oval com base truncada Amerosporo (unicelular) 0 septo	Não	Inseto -( <i>Tibraca limbativentris</i> )	Rosa e bordas claras	complexo <i>Gibberella fujikuroi</i>
157	Ausente	Oval com base truncada Amerosporo (unicelular) 0 septo	Não	Caule	Rosa e bordas claras	complexo <i>Gibberella fujikuroi</i>

**Tabela 5.** Resumo das características morfológicas de 15 gêneros de fungos fitopatogênicos.

MGSS	TIPOS DE CONÍDIOS		Estrutura de resisitência	Corpo de frutificação			Cor da Colônia	Gênero
	Forma	Número de células		Ascoma	Picnidio	Conidióforo livre		
93	Cilíndrica	Fragmosporo 7 células	-	-	-	Sim	cinza esverdeado	<i>Corynespora cassiicola</i>
62	Esféricos	Amerósporo - 1 célula	-	-	-	Sim	Inicialmente clara e negra após 7 dias	<i>Nigrospora oryzae</i>
148	Elipsoides e cilíndricos	amerósporo (unicelular)	-	-	-	-	Salmão	<i>Myrothecium gramineum</i>
180	Elíptico	amerósporo (unicelular) e alguns didimósporos (bicelular)	-	-	-	Sim	Cinza esverdeado	<i>Cladosporium cladosporioides</i>
29	Conídios simétricos podendo ser elípticos.	Fragmósporo (Pluricelular, septos transversais) apresentando 3 septos.	-	-	-	-	Marrom	<i>Curvularia eragrostidis</i>
115	Conídios simétricos podendo ser elípticos.	fragmósporo (Pluricelular, septos transversais) apresentando 3 septos.	-	-	-	-	Negra	<i>Curvularia</i> sp.
172	Conídios assimétrico sendo curvos .	Fragmósporo (Pluricelular, septos transversais) apresentando 3 septos,	-	-	-	-	Negra	<i>Curvularia lunata</i>



Continuação								
MGSS	TIPOS DE CONÍDIOS		Estrutura de resisitência	Corpo de frutificação			Cor da Colônia	Gênero
	Forma	Número de células		Ascoma	Picnidio	Conidióforo livre		
178	Obclavados, ovóide ou elipisoidal	Fragmósporo (pluricelular com septos transversais) ou dictiosporos (pluricelular com septos longitudinais e transversais) em cadeia.	-	-	-	Conidióforos simples	Cinza	<i>Alternaria</i> sp.
176	Conídios maduros eram oval de coloração marrom escuro com leves estrias verticais e conídios imaturos eram ovais, hialinos.	Conídios maduros eram didimósporo (bicelular, uniseptado). Os conídios imaturos eram unicelulares sem septos	-	-	-	sim	Negra	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>
184	Obclavados, ovóide ou elipisoidal	Fragmósporo (pluricelular com septos transversais) ou dictiosporos (pluricelular com septos longitudinais e transversais) este ultimo com 8 septos.	-	-	-	Conidióforo ramificado	Marrom	<i>Alternaria alternata</i>

Continuação								
MGSS	TIPOS DE CONÍDIOS		Estrutura de resisitência	Corpo de frutificação			Cor da Colônia	Gênero
	Forma	Número de células		Ascoma	Picnidio	Conidióforo livre		
106	Presença de conídios forma ovóide	Conídios amérosporo (unicelular) e os arthriconídios ocorrendo em cadeia de parede espessa e de cor marrom escura podendo ser unicleular ou bicelular.	-	-	-	Sim	Negra	<i>Neoscytalidium dimidiatum</i>
144	Presença de conídios em forma de cilíndricos com falso septo. Houve abundância desses conídios.	Amerosporos (unicelular)	-	-	-	Conidióforo hialino. Houve a formação ainda de apressórios.	Bordas cinzas e centro cinza escuro.	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>
143	conídios na forma limoniforme ou elíptico Presença de conídios em forma cilíndrica.	Amerósporo (unicelular, esseptado) com base truncada.	-	-	-	-	Branca	<i>Myrothecium verrucaria</i>
174	Houve produção de poucos conídios.	Amerosporo (unicelular)	-	-	-	Sim.	Bordas cinza claro e centro cinza escuro	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>

Continuação								
MGSS	TIPOS DE CONÍDIOS		Estrutura de resisitência	Corpo de frutificação			Cor da Colônia	Gênero
	Forma	Número de células		Ascoma	Picnidio	Conidióforo livre		
198	Presença de conídios em forma cilíndrica. Houve produção de poucos conídios.	Amerosporo (unicelular)	-	-	-	-	Branca e centro laranja	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>
85	Presença de conídios em forma cilíndrica. Houve produção de muitos conídios	Amerosporo (unicelular)	-	-	-	Sim. Houve também produção de apressórios.	Salmão com pontos laranjas.	<i>Colletotrichum musae</i>
123	Conídios globosos.	Amerosporo (unicelular)	-	-	-	sim	Verde	<i>Trichoderma</i>
83	Conídios de formato subgloboso de coloração marrom escuro,	Amerosporo (unicelular)	-	Presença de ascoma globoso e elíptico.	-	-	Cinza esverdeado	<i>Chaetomium fuscum</i>
152	Conídios hialinos de pequeno porte oblongo a elipsoidal	Amerosporo (unicelular)	Presença de clamidosporos	-	Presença de picnidio	-	Negra	<i>Phoma multirostrata</i>

Continuação								
MGSS	TIPOS DE CONÍDIOS		Estrutura de resisitência	Corpo de frutificação			Cor da Colônia	Gênero
	Forma	Número de células		Ascoma	Picnidio	Conidióforo livre		
80	Presença de conídios alfa (fusiforme, vértice truncado base arredondada) e Beta (filiforme, curvo).	Amerosporo (unicelular)	-	-	Presença de Picnidio	-	Creme	<i>Phomopsis pseudomangiferae</i>
87	Conídios arredondados	Amerósporo (unicelular) Sem septos	-	Ascoma	-	Sim	Branca	<i>Beauveria bassiana</i>
192	cilíndricos extremidades redondas que variam de cor de verde claro para verde escuro	Amerosporo (unicelular) Sem septos	-	-	-	Sim . conidióforos são simples que justapostos , resultam em uma massa regular.	coloração verde no centro e amarelo nas bordas	<i>Metarhizium anisopliae</i>
119	Conídios em formato cilíndrico e formação de apressório melanizados	Amerósporo (unicelular) Sem septos	-	-	-	Sim.	Negra	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>
113	Conídios em formato cilíndrico e formação de apressório melanizados	Amerósporo (unicelular) Sem septos	-	-	-	Sim	Cinza com escurecimento no centro da colônia	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>

#### **4.5 Identificação molecular dos fungos fitopatogênicos da Micoteca “Prof.º Gilson Soares da Silva”.**

Foram extraído DNA fúngico de 74 isolados fúngicos das espécies classificados morfológicamente como *Fusarium* spp., *Colletotrichum* spp., *Cladosporium* sp., *Isaria* sp., *Corynespora cassiicola*, *Trichoderma* spp., *Alternaria* sp., *Pestalotiopsis* sp., *Sclerotium* sp., *Myrothecium* sp., *Phomopsis* sp., *Phoma* sp., *Curvularia* spp., *Beauveria* sp., *Chaetomium* sp., *Neoscytalidium* sp., *Nigrospora* sp., *Lasiodiplodia* sp., *Metarhizium* sp.

Vale ressaltar que por se tratar de uma Micoteca em que constantemente recebe-se material fúngico para incorporação ao acervo, a identificação seja morfológica ou molecular, bem como todos os processos que a envolve é de fluxo contínuo.

#### **4.6 Amplificação e análise filogenética da região ITS do rDNA dos isolados fúngicos da Micoteca “Prof.º Gilson Soares da Silva”.**

Foram amplificados DNA de 51 isolados com sucesso de fungos fitopatogênicos da Micoteca “Prof. Gilson Soares de Silva”. As sequências obtidas foram comparadas com outras depositadas no Genbank (Tabela 6).

Na análise do gel de eletroforese foi possível observar que houve amplificação da região de interesse do DNA de 16 gêneros: *Fusarium* (27 isolados), *Colletotrichum* (6 isolados), *Alternaria* (2 isolados), *Lasiodiplodia* (1 isolado), *Neoscytalidium* (1 isolado), *Beauveria* (1 isolado), *Metarhizium* (1 isolados), *Nigrospora* (1 isolado), *Curvularia* (3 isolados), *Trichoderma* (1 isolado), *Phomopsis* (1 isolado), *Corynespora* (1 isolados), *Phoma* (1 isolado), *Chaetomium* (1 isolado), *Cladosporium* sp. (1 isolado), *Myrothecium* (2 isolados).

**Tabela 6.** Comparação das sequências dos isolados da Micoteca “Prof. Gilson Soares da Silva” e de sequências depositadas no Genbank.

<b>ISOLADO</b>	<b>GÊNERO/ESPÉCIE</b>	<b>CÓDIGO NO GENBANK DAS SEQUÊNCIAS SIMILARES</b>	<b>SIMILARIDADE (%)</b>
MGSS 178	<i>Alternaria</i>	KF021888	100%
MGSS 184	<i>Alternaria alternata</i>	KM374667	100%
MGSS 87	<i>Beauveria bassiana</i>	JF837125	100%
MGSS 83	<i>Chaetomium fuscum</i>	KP862604	100%
MGSS 180	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	KU508798	100%
MGSS 85	<i>Colletotrichum musae</i>	KC790968	99%
MGSS 113	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	KT390195	100%
MGSS 119	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	KP900291	99%
MGSS 144	<i>Colletotrichum hymenocallidis</i>	KT582142	100%
MGSS 174	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	KT224835	100%
MGSS 198	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	KT582184	100%
MGSS 93	<i>Corynespora cassiicola</i>	GU461300	90%
MGSS 172	<i>Curvularia lunata</i>	JN116704	100%
MGSS 115	<i>Curvularia lunata</i>	KR633133	100%
MGSS 29	<i>Curvularia eragrostidis</i>	KJ541818	100%
MGSS 118	<i>Fusarium oxysporum</i>	LN828189	99%
MGSS 68	<i>Fusarium oxysporum</i>	LN828189	99%
MGSS 09	<i>Fusarium oxysporum</i>	EF017214	100%
MGSS 66	<i>Fusarium sacchari</i>	AB374082	99%
MGSS 71	<i>Fusarium verticillioides</i>	KJ544799	99%
MGSS 15	<i>Fusarium oxysporum</i>	KF646094	99%

Continuação...

ISOLADO	GÊNERO/ESPÉCIE	CÓDIGO NO GENBANK DAS SEQUÊNCIAS SIMILARES	SIMILARIDADE (%)
MGSS 65	<i>Fusarium oxysporum</i>	KF494053	100%
MGSS 67	<i>Fusarium oxysporum</i>	KU170716	100%
MGSS 183	<i>Fusarium oxysporum</i>	DQ093759	100%
MGSS 169	<i>Fusarium longipes</i>	KF918597	99%
MGSS 149	<i>Fusarium equiseti</i>	KT634075	100%
MGSS 191	<i>Fusarium equiseti</i>	HQ995668	100%
MGSS 54	<i>Fusarium subglutinans</i>	KR909409	99%
MGSS 01	<i>Fusarium oxysporum</i>	KT455376	100%
MGSS 117	<i>Fusarium equiseti</i>	KU939084	99%
MGSS 182	<i>Fusarium oxysporum</i>	KF914468	100%
MGSS10	<i>Fusarium oxysporum</i>	KX009445	100%
MGSS 14	<i>Fusarium oxysporum</i>	EF155534	99%
MGSS 155	<i>Fusarium oxysporum</i>	KX009445	100%
MGSS 159	<i>Fusarium oxysporum</i>	KT710787	99%
MGSS 194	<i>Fusarium verticillioides</i>	JF499677	100%
MGSS 122	<i>Fusarium equiseti</i>	JN014954	100%
MGSS 61	<i>Fusarium proliferatum</i>	KT376487	100%
MGSS141	<i>Fusarium sp.</i>	DQ098909	100%
MGSS 138	<i>Fusarium equiseti</i>	KX400789	100%
MGSS 42	<i>Fusarium oxysporum</i>	KT357580	99%
MGSS 157	<i>F.proliferatum</i>	EU151485	99%
MGSS 123	<i>Gongronella butleri</i>	KP067277	100%
MGSS 176	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	KR860460	100%

Continuação...

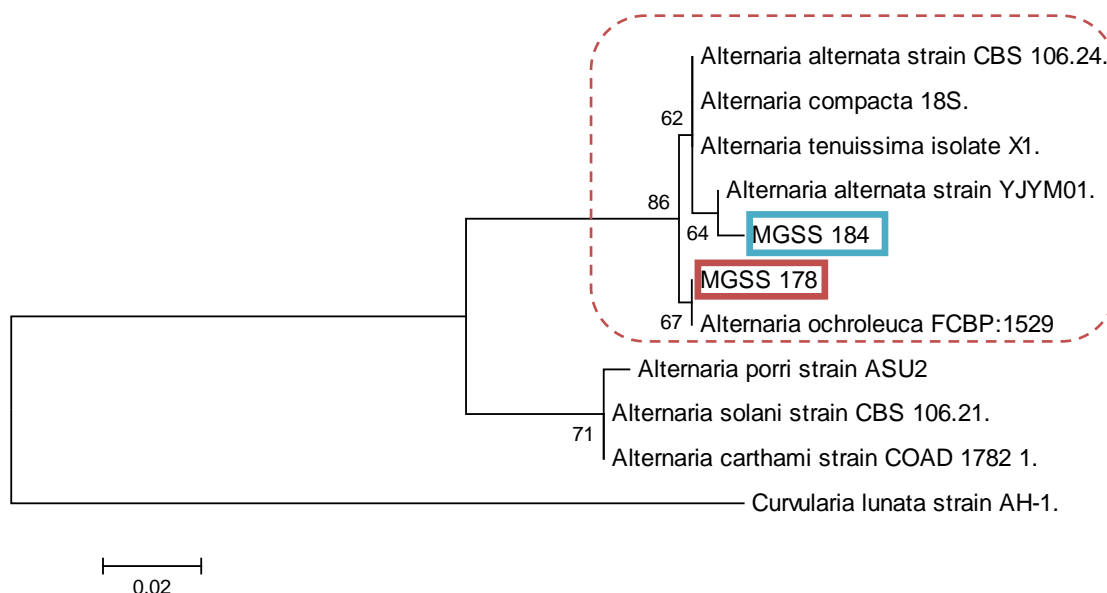
ISOLADO	GÊNERO/ESPÉCIE	CÓDIGO NO	
		GENBANK DAS SEQUÊNCIAS SIMILARES	SIMILARIDADE (%)
MGSS 192	<i>Metarhizium anisopliae</i>	KR998524	100%
MGSS 143	<i>Myrothecium verrucaria</i>	KT305924	100%
MGSS 148	<i>Myrothecium gramineum</i>	JX406554	100%
MGSS 106	<i>Neoscytalidium hyalinum</i>	KT211562	99%
MGSS 62	<i>Nigrospora oryzae</i>	KT266531	100%
MGSS 152	<i>Phoma multirostrata</i>	AF046019	99%
MGSS 80	<i>Phomopsis phaseolorum</i>	AY945987	100%

### **Análise filogenética de espécies do gênero *Alternaria***

Realizou-se a análise filogenética pelo método de Máxima Verossimilhança (ML), modelo evolutivo Jukes-Cantor (JC) e 1000 repetições para os isolados classificados morfologicamente como pertencentes ao gênero *Alternaria* o isolado MGSS 184, obtidos de lesões foliares de Melancia e o isolado MGSS 178 obtidos de lesões em frutos de tomate junto as sequências do Genbank. Em um clado suportado por 86% o isolado MGSS 184 formou um subclado com suporte de 64 % com a sequência de *A. alternata* patógeno foliar de Teca (*Tectona grandis*) na China e o isolado MGSS 178 formou um outro subclado com suporte de bootstrap de 67 % com a sequência de *A. ochroleuca* patogênico a (*Scindapsus aureus*) no Paquistão (Figura 61).



**Figura 61.** Árvore filogenética dos isolados *Alternaria* spp. derivados de sequências do gene de ITS de acordo com o método estatístico Máxima Verossimilhança (ML) e com base em 1000 réplicas de bootstrap. Distâncias evolutivas foram calculados utilizando o modelo Jukes-Cantor (JC).



A matriz mostra que a divergência genética entre os isolados MGSS 178 e MGSS 184 é de 1,6 % sendo estes obtidos de hospedeiros e órgãos da planta distintos. O isolado MGSS 178 apresentou pouca divergência com espécies de *Alternaria alternata*, *A. compacta* e *A. tenuissima* variando entre 0,5 % - 1,0 % e nenhuma divergência com a espécie *A. ochroleuca* (0 %). Já o isolado MGSS 184 apresentou menor distância genética com a espécie *A. alternata* (0,5 %) e como característica comum está o fato de serem obtidos a partir de lesões foliares. Apresentou uma distância genética elevada com as espécies *A. solani*, *A. carthami* (7,5 %) (Tabela 7).

**Tabela 7.** Matriz de divergência genética através do gene ITS para as espécies do gênero *Alternaria*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1 <b>MGSS_178</b>	-										
2 <b>MGSS_184</b>	1,6	-									
3 <i>A.solani</i> CBS 106.21.	6,4	7,5	-								
4 <i>A.alternata</i> YJYM01.	1,0	<b>0,5</b>	7,0	-							
5 <i>A.alternata</i> CBS106.24.	0,5	1,0	6,4	0,5	-						
6 <i>A.ochroleuca</i> FCBP1529	<b>0,0</b>	1,6	6,4	1,0	0,5	-					
7 <i>A.carthami</i> COAD782 1.	6,4	7,5	0,0	7,0	6,4	6,4	-				
8 <i>A.compacta</i> 18S.	0,5	1,0	6,4	0,5	0,0	0,5	6,4	-			
9 <i>A.porri</i> ASU2	7,0	8,1	0,5	7,5	7,0	7,0	0,5	7,0	-		
10 <i>A.tenuissima</i> X1.	0,5	1,0	6,4	0,5	0,0	0,5	6,4	0,0	7,0	-	
11 <i>Curvularia lunata</i>	19,8	20,5	19,2	20,5	19,8	19,8	19,2	19,8	19,8	19,8	-

O gênero *Alternaria* é um fungo cosmopolita composto por várias espécies saprófitas e patogênicas. Espécies dentro seção *Alternaria* têm sido quase sempre descrito com base na morfologia e/ou associação com hospedeiro-específico, porém a variação molecular entre eles é mínima. Observando os resultados da figura 61 e Tabela 7 em conjunto com os resultados da caracterização morfológica conclui-se que os isolados MGSS 178 e MGSS 184 pertencem às espécies *Alternaria ochroleuca* e *Alternaria alternata*.

Woudenberg et al., (2015) empregaram comparações do genoma e filogenia molecular para esclarecer as espécies presentes no gênero *Alternaria* seção *Alternaria* e concluiu que esta seção contém 11 espécies filogenéticas e um complexo de espécies *Alternaria arborescens* e trinta e cinco morfoespécies que não pode ser claramente distinguidos com base na filogenia de multi-genes e classificou três forma specialis de acordo com as toxinas produzidas.

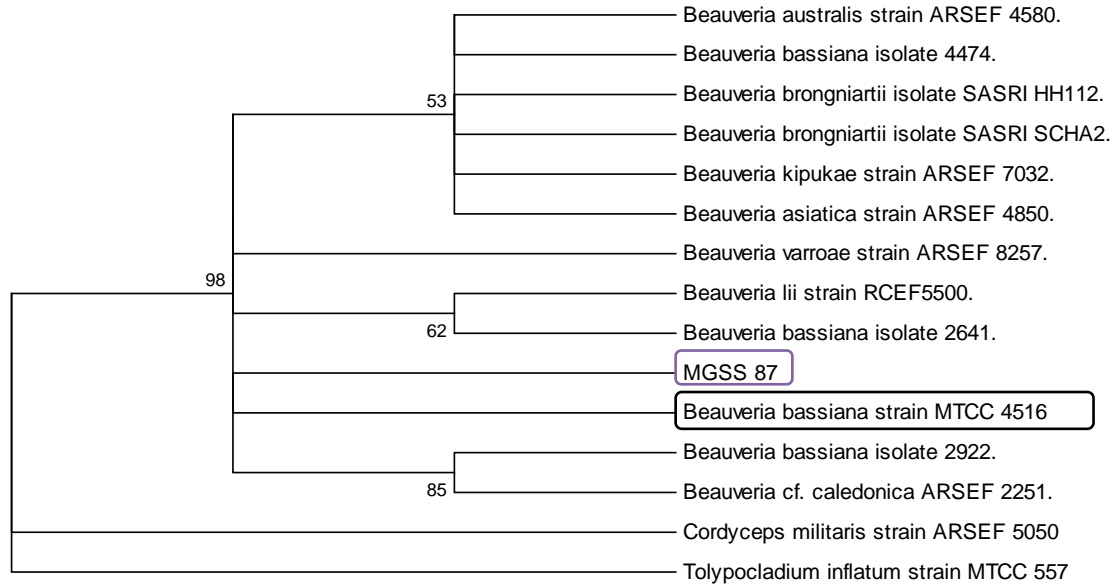
A espécie *Alternaria alternata* já foi encontrada causando manchas foliares em Tangerina (LENGI, NIAZMAND; KIANOUSH, 2014), *Scindapsus aureus* (SANKAR; SREE, 2011), batata (VASCONCELOS et. al., 2014). A espécie *Alternaria ochroleuca* ainda não havia sido descrito causando lesões em frutos de tomate (*Solanum lycopersicum*) no Brasil. O que merece uma investigação maior deste isolado conservado na Micoteca Prof.º Gilson Soares da Silva desde 2014.

### **Análise filogenética de espécies do gênero *Beauveria***

Realizou-se a análise filogenética pelo método de Máxima Verossimilhança (ML), modelo evolutivo Jukes-Cantor (JC) e 1000 repetições para o isolado classificado morfológicamente como pertencente ao gênero *Beauveria* - MGSS 87, entomopatogênico, comparando-os com as sequências do Genbank. O isolado MGSS 87 formou um clado com suporte de 98 % com as sequências de várias espécies de *Beauveria* apresentando uma politomia (Figura 62).

Os isolados utilizados neste estudo são filogeneticamente distintos. A matriz gerada a partir do alinhamento das sequências mostra que o isolado MGSS 87 apresenta menor distância genética com o isolado da espécie de *B. bassiana* (0,5 %) e as maiores distancias com outros isolados de *B. bassiana*, *B. asiatica* (2,8 %), *B. lii*, *B. caledonica*, *B. kipukae* (2,2 %) (Tabela 8).

**Figura 62.** Árvore filogenética de isolado MGSS 87 do gênero *Beauveria* derivados de sequências do gene de ITS de acordo com o método estatístico Máxima Verossimilhança (ML) e com base em 1000 réplicas de bootstrap. Distâncias evolutivas foram calculados utilizando o modelo Jukes-Cantor (JC).



**Tabela 8.** Matriz de divergência genética através do gene ITS para as espécies do gênero *Beauveria*.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
<b>1 MGSS_87</b>	-														
2 <i>B. bassiana</i> 2922.	2,8	-													
3 <i>B. bassiana</i> _4516	<b>0,5</b>	2,2	-												
4 <i>B. bassiana</i> _2641.	2,8	3,3	2,2	-											
5 <i>B. bassiana</i> _4474.	1,6	2,2	1,1	2,2	-										
6 <i>B. lii</i> _500.	2,2	2,8	1,6	1,6	1,6	-									
7 <i>B. varroae</i> _8257.	1,6	3,3	1,1	2,2	1,1	1,6	-								
8 <i>B. cf. caledonica</i> .	2,2	0,5	1,6	2,8	2,8	2,2	2,8	-							
9 <i>B. australis</i> 4580.	1,6	2,2	1,1	2,2	0,0	1,6	1,1	2,8	-						
10 <i>B. kipukae</i> 7032.	2,2	2,8	1,6	2,8	0,5	2,2	1,6	3,3	0,5	-					
11 <i>B. asiatica</i> 4850.	2,8	3,3	2,2	3,3	1,1	2,8	2,2	3,9	1,1	1,6	-				
12 <i>B. brongniartii</i>	1,6	2,2	1,1	2,2	0,0	1,6	1,1	2,8	0,0	0,5	1,1	-			
13 <i>B. brongniartii</i>	1,6	2,2	1,1	2,2	0,0	1,6	1,1	2,8	0,0	0,5	1,1	0,0	-		
14 <i>Cordyceps militaris</i>	11,1	13,0	11,7	13,7	12,4	13,0	12,4	12,4	12,4	13,0	12,4	12,4	12,4	-	
15 <i>Tolyposcladium inflatum</i>	27,2	26,4	26,4	29,6	28,0	27,2	28,0	25,7	28,0	27,2	28,0	28,0	28,0	30,4	-

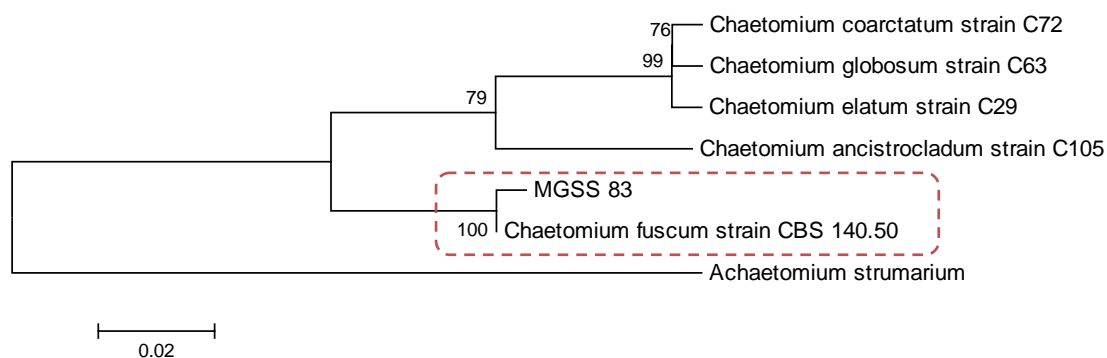
Esses resultados foram semelhantes aos de Rehner; Buckley (2005) que observaram para este gênero a região gênica ITS foi menos informativa com baixo suporte de apoio dos ramos pelo bootstrap. Ainda neste estudo observou-se que, *B. bassiana* considerado monofilético na verdade é polifilético com tendência a formar dois clados indicando que a filogenia molecular de *Beauveria* não está definida, devido ao pouco entendimento taxonômico atual deste gênero. Meyling et al. (2012) trabalhando apenas com isolados de *Beauveria* patogênicos a *Meligethes aeneus* (Escaravelho) na Suíça obtiveram resultados parecidos aos anteriores mencionados com base nas sequências da região ITS e 5' end EF1- $\alpha$  onde a análise filogenética mostrou a formação de dois clados de *B. bassiana*. Fernandes et al. (2009) sugere que *B. bassiana* seja um aglomerado de espécies ao invés de uma única espécie.

Diante dos resultados de caracterização morfológica, da análise filogenética e matriz de divergência confirma-se que esta espécie é *B. bassiana*.

### **Análise filogenética de espécies do gênero *Chaetomium***

Para o isolado classificado morfológicamente como pertencente ao gênero *Chaetomium* - MGSS 83, comparando-os com as sequências do Genbank mostrou que a estirpe MGSS 83 formou um clado com suporte de 100 % com a sequência de *C. fuscum* (CBS 140.50) que foi oriundo de patogênias em humanos, já o isolado da coleção foi encontrado colonizando sementes de Vinagreira (*Hibiscus sabdariffa*) (Figura 63).

**Figura 63.** Árvore filogenética do isolado MGSS 83 *Chaetomium fuscum* derivado de sequências do gene de ITS de acordo com o método estatístico Máxima Verossimilhança (ML) e com base em 1000 réplicas de bootstrapping. Distâncias evolutivas foram calculados utilizando o modelo Jukes-Cantor (JC).



A representação da matriz mostra claramente que o isolado MGSS 83 tem menor distância com a espécie *C. fuscum* com apenas 0,5% de divergência genética e uma elevada

divergência genética com as espécies de *C. ancistrocladum*, *C. coarctatum*, *C. elatum*, *C. globosum* (8,6%) (Tabela 9).

**Tabela 9.** Matriz de divergência genética através do gene ITS para as espécies do gênero *Chaetomium*.

		1	2	3	4	5	6	7
1	MGSS_83	-	-					
2	<i>Chaetomium fuscum</i> CBS 140.50	0,5	-					
3	<i>Chaetomium ancistrocladum</i>	8,6	8,0	-				
4	<i>Chaetomium coarctatum</i> C72	8,6	8,0	6,3	-			
5	<i>Chaetomium elatum</i> C29	8,6	8,0	6,3	1,0	-		
6	<i>Chaetomium globosum</i> C63	8,6	8,0	6,3	1,0	1,0	-	
7	<i>Achaetomium strumarium</i>	15,7	15,1	16,3	16,9	15,7	16,9	-

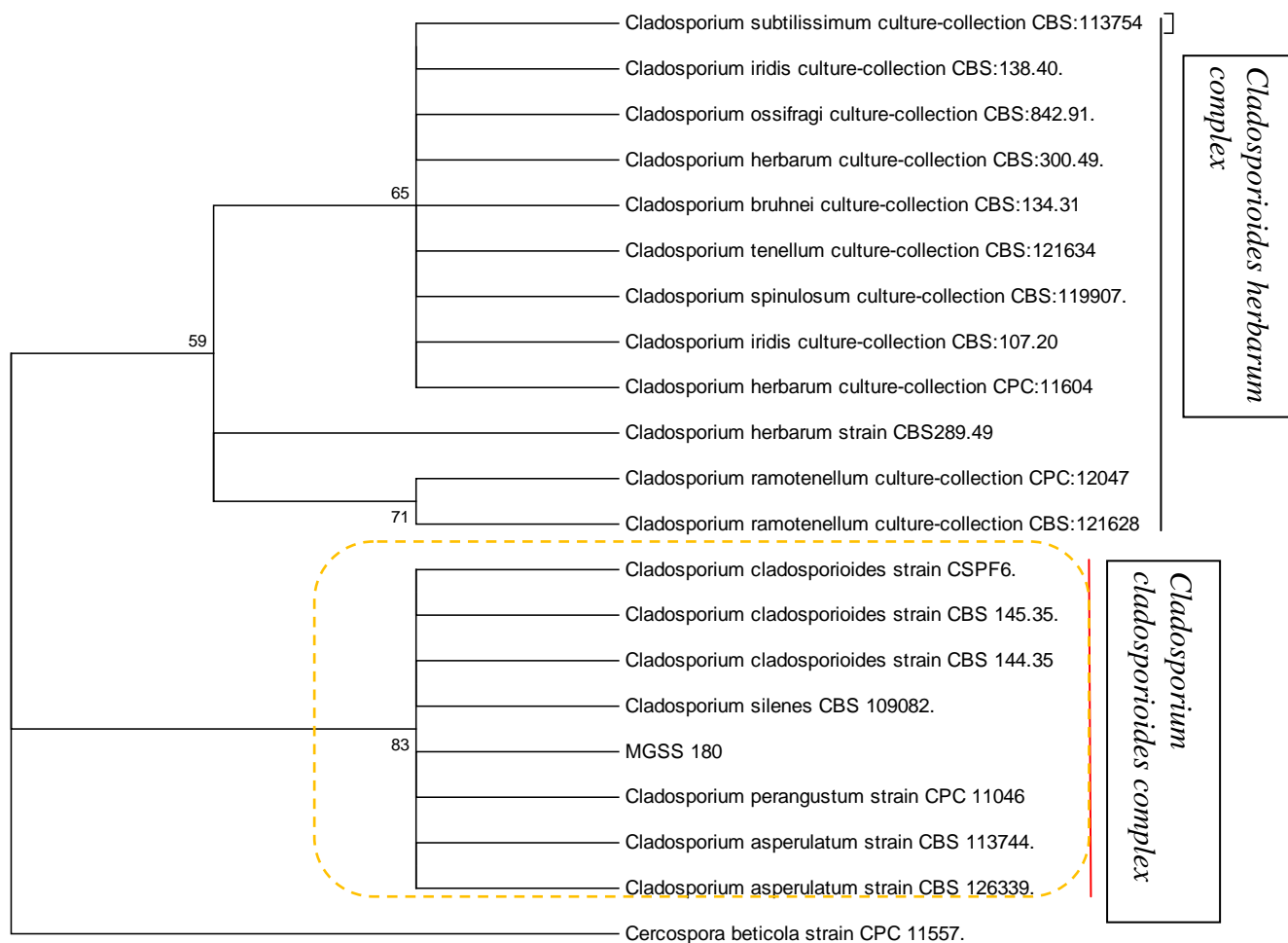
Estudos filogenéticos já foram realizados por vários autores com o gênero *Chaetomium* (ASGARI; ZARE, 2011; WANG et al. 2014a; AHMED et al. 2016). Este gênero tem uma ampla gama de hospedeiros e a espécie *C. fuscum* ainda não havia registro na literatura colonizando sementes de *Hibiscus sabdariffa*.

Ao analisar as figura 63 e a tabela 9 além das características morfológicas do isolado afirma-se que este pertence a espécie *C. fuscum*. Observa-se ainda que a região espaço interno transcrito - ITS é ótima para estudos filogenéticos deste gênero.

### **Análise filogenética de espécies do gênero *Cladosporium***

A análise filogenética revelou que o isolado MGSS 180 formou um clado suportado por 83 % de bootstrap com sequências pertencentes ao complexo de espécies *Cladosporium cladosporioides* (Figura 64). Este isolado geneticamente mais próximo de *Cladosporium perangustum* foi isolado de folhas de alface (*Lactuca sativa*).

**Figura 64.** Árvore filogenética de Máxima Verossimilhança (ML) do gênero *Cladosporium* baseado no modelo Jukes-Cantor. A árvore de consenso de bootstrap inferida a partir de 1000 repetições. Valores menores que 50 % de bootstrap foram colapsados. Análises foram realizadas no MEGA 6. *Cercospora beticola* CPC11557- (n° de acesso no Genbank: AY840527 – para ITS) foi utilizado como outgroup.



O isolado MGSS 180 apresentou uma maior distância genética em relação às espécies do Complexo *Cladosporium herbarum* com variação entre 2,3 e 2,9 % e menor divergência genética com relação as espécies do Complexo *Cladosporium cladosporioides* (0 %). Isso significa que este isolado pertence ao Complexo de espécies de *Cladosporium cladosporioides* (Tabela 10).

**Tabela 10.** Matriz de divergência genética através do gene ITS para as espécies do gênero *Cladosporium*.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	
<b>1 MGSS180</b>	-																					
2 <i>C. tenellum</i>	2,9	-																				
3 <i>C. subtilissimum</i>	2,9	0,0	-																			
4 <i>C. spinulosum.</i>	2,9	0,0	0,0	-																		
5 <i>C. ramotenellum</i>	1,1	1,7	1,7	1,7	-																	
6 <i>C. ramotenellum</i>	2,9	1,7	1,7	1,7	0,0	-																
7 <i>C. ossifragi</i> :	2,9	0,0	0,0	0,0	1,7	1,7	-															
8 <i>C. iridis</i>	2,9	0,0	0,0	0,0	1,7	1,7	0,0	-														
9 <i>C. iridis</i>	2,9	0,0	0,0	0,0	1,7	1,7	0,0	0,0	-													
10 <i>C. herbarum</i>	2,3	0,6	0,6	0,6	1,7	1,7	0,6	0,6	0,6	-												
11 <i>C. herbarum</i>	2,9	0,0	0,0	0,0	1,7	1,7	0,0	0,0	0,0	0,6	-											
12 <i>C. herbarum</i> :	2,9	0,0	0,0	0,0	1,7	1,7	0,0	0,0	0,0	0,6	0,0	-										
13 <i>C. cladosporioides</i>	0,0	2,9	2,9	2,9	1,1	1,1	2,9	2,9	2,9	2,3	2,9	2,9	-									
14 <i>C. cladosporioides</i>	0,0	2,9	2,9	2,9	1,1	1,1	2,9	2,9	2,9	2,3	2,9	2,9	0,0	-								
15 <i>C. cladosporioides</i>	0,0	2,9	2,9	2,9	1,1	1,1	2,9	2,9	2,9	2,3	2,9	2,9	0,0	0,0	-							
16 <i>C. bruhnei</i> 134.31	2,9	0,0	0,0	0,0	1,7	1,7	0,0	0,0	0,0	0,6	0,0	0,0	2,9	2,9	2,9	-						
17 <i>C. perangustum</i>	0,0	2,9	2,9	2,9	1,1	1,1	2,9	2,9	2,9	2,3	2,9	2,9	0,0	0,0	0,0	2,9	-					
18 <i>C. asperulatum</i>	0,0	2,9	2,9	2,9	1,1	1,1	2,9	2,9	2,9	2,3	2,9	2,9	0,0	0,0	0,0	2,9	0,0	-				
19 <i>C. asperulatum</i>	0,0	2,9	2,9	2,9	1,1	1,1	2,9	2,9	2,9	2,3	2,9	2,9	0,0	0,0	0,0	2,9	0,0	0,0	-			
20 <i>C. silenes</i>	0,0	2,9	2,9	2,9	1,1	1,1	2,9	2,9	2,9	2,3	2,9	2,9	0,0	0,0	0,0	2,9	0,0	0,0	0,0	-		
21 <i>Cercospora beticola</i>	23,0	23,7	23,7	23,7	23,7	23,7	23,7	23,7	23,7	24,5	23,7	23,7	23,0	23,0	23,0	23,7	23,0	23,0	23,0	23,0	23,0	-



*Cladosporium cladosporioides* é considerado um complexo com cerca de 38 espécies (Bensch et al., 2012) de difícil diferenciação morfológica e molecular. A tabela 10, mostra a alta similaridade molecular entre a sequência deste estudo e sequências obtidas do Genbank que comprovam o afirmação de Bensch et al. (2012).

Outros autores também obtiveram resultados semelhantes ao desta pesquisa, quando analisaram a região ITS para a realização da análise filogenética. Os isolados pertencentes ao complexo *Cladosporium cladosporioides* foi de difícil diferenciação porque as espécies mostraram muita semelhança na morfologia, nas características da cultura, e na identidade da sequência (KIM et al., 2011). Já Wirsal et al. (2002) analisando espécies do gênero *Cladosporium* colonizando (*Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steudel, Poaceae) observaram que a região gênica actina foi mais informativa na análise filogenética do que a região ITS indicando que havia quatro ou mais espécies de *Cladosporium* colonizando a espécie de planta referida.

A espécie *Cladosporium cladosporioides* foi relatada como fitopatogênica em frutos de cafeeiro (Chalfoun et al., 2007) no Brasil, em sementes de Tabaco (Wang et al., 2014b) na China, em flores de morango na Coréia do Sul (Nam et al., 2015) e neste estudo em folhas de alface, mostrando a sua distribuição no mundo e ataque em diferentes hospedeiros e órgãos (flores, folhas, sementes e frutos) da planta.

### **Análise filogenética de espécies do gênero *Colletotrichum*.**

Para construção da árvore filogenética do gênero *Colletotrichum* foram analisados 51 sequências de nucleotídeos.

Dos seis isolados identificados morfológicamente como pertencentes ao gênero *Colletotrichum* foram feitos a análise filogenética revelando que todos pertencem ao Complexo de espécies de *Colletotrichum gloeosporioides* com clado suportado por 93 % de bootstrap apresentando politomia, ou seja, dentro desse clado os isolados MGSS 119, 113, 198 formaram-se grupos com outras espécies de *Colletotrichum*, assim como os isolados MGSS 144 e o isolado MGSS 174. Ao contrário dos outros o isolado MGSS 85 formou um subclado bem caracterizado com sequências apenas da espécie *Colletotrichum musae* com 61 % de bootstrap (Figura 65).

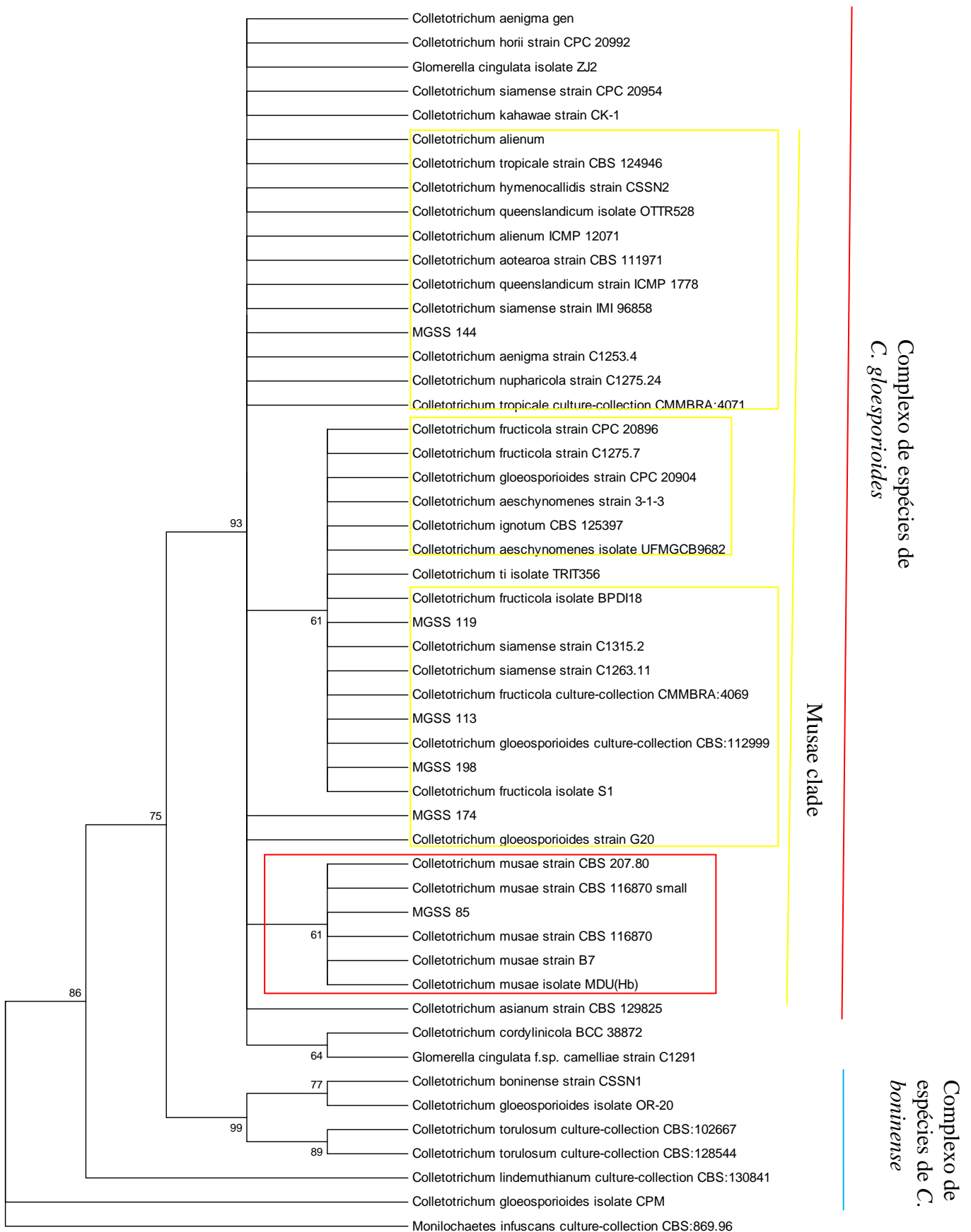
O isolado MGSS 85 foi oriundo de lesões em frutos de banana e todas as sequências agrupadas juntamente com este isolado são oriundos de bananeira (*Musa* sp.) de várias regiões geográficas do mundo.

Estes resultados estão de acordo com Weir et al., (2012), que estudando a relação genética e taxonômica de espécies de *C. gloeosporioides complex* através da região gênica ITS concluíram que a espécie *C. musae* é definida utilizando esta região do DNA dos fungos. Além desta espécie os autores concluíram que a região ITS define as espécies de *C. asianum*, *C. gloeosporioides*, *C. alatae*, *C. theobromicola*, *C. xanthorrhoeae*, *C. horrii*, *Glomerella cingulata* “f. sp. camelliae”, *C. psidii*, *C. cordylinicola*. Os autores afirmam ainda que as seguintes espécies não distinguíveis pela análise filogenética da região ITS: *C. fructicola*, *C. nupharicola*, *C. alienum*, *C. aenigma*, *C. siamense*, *C. aeschynomenes*, *C. tropicale*, *C. queenslandicum*, *C. salsolae*, *C. aotearoa*, *C. ti*, *C. kahawae*, *C. clidemiae* (WEIR et al., 2012).

Filogeneticamente os isolados MGSS 113, MGSS 119, MGSS 144, MGSS 174 e MGSS 198 ficaram mais próximos de espécies que pertenciam ao Musae Clade dentro *C. gloeosporioides species complex*. Estes isolados foram obtidos a partir de folhas com sintomas de antracnose em orquídeas, cupuaçu, ornamental, frutos de goiaba e pimentão.

Algumas espécies do Musae clade que não são distinguíveis com apenas as sequências da região ITS já ocorrem no Brasil em frutos de manga (*Mangifera indica*) - *C. fructicola*, *C. tropicale*, *C. dianesei* - Nordeste do país (LIMA et al., 2013), em frutos de maçã (*Malus domestica*) - *C. fructicola* (WEIR et al., 2012). E no continente Americano como *C. nupharicola* fitopatogênico ao *Nuphar lutea* subsp. *Polysepala* nos EUA (LIMA et al., 2013), *C. aeschynomenes* causando doença em *Aeschynomene virginica* nos EUA (WEIR et al., 2012), *C. fructicola* ocorrendo endofiticamente em *Tetragastris panamensis* no Panamá (ROJAS et al., 2010).

**Figura 65.** Árvore filogenética pelo Método de Máxima Verossimilhança com base no modelo Jukes-Cantor para o gênero *Colletotrichum*. A árvore consenso de bootstrap inferida a partir de 1000 repetições. Ramos correspondentes às partições reproduzidas em menos de 50 % de bootstrap estão colapsadas.



A matriz construída com as sequências do gênero *Colletotrichum* mostra que os isolados depositados na micoteca, MGSS 144 e 174 apresentam 0 % de distância genética entre eles, e entre as espécies pertencentes ao Clado Musae ( *C. aenigma*, *C. alienum*, *C. nhpharicola*, *hymenocallidis*, *C. queenslandicum*, *C. gloeosporioides*, *C. siamense*, *C. tropicale*) assim como, os isolados MGSS 113, 119 e 198 são evolutivamente próximos entre si, apresentando 0 % de divergência genética e entre as espécies do (*C. aeschynomenes*, *C. gloeosporioides*, *C. ignotum*, *C. siamense*, *C. fructicola*) Clado Musae e *C. ti* pertencente ao Clado Kahawae todas dentro do Complexo de espécies de *C. gloeosporioides*. O isolado MGSS 85 que divergiu geneticamente de todos os isolados depositados na micoteca com a maior divergência de 1,4 % em relação aos isolados MGSS 113, 119 e 198. Com relação as sequências do Genbank os resultados mostram que eles foram próximos da espécie *C. musae* com 0 % de divergência todas elas tiveram como hospedeiro *Musa* spp (Tabela 11).

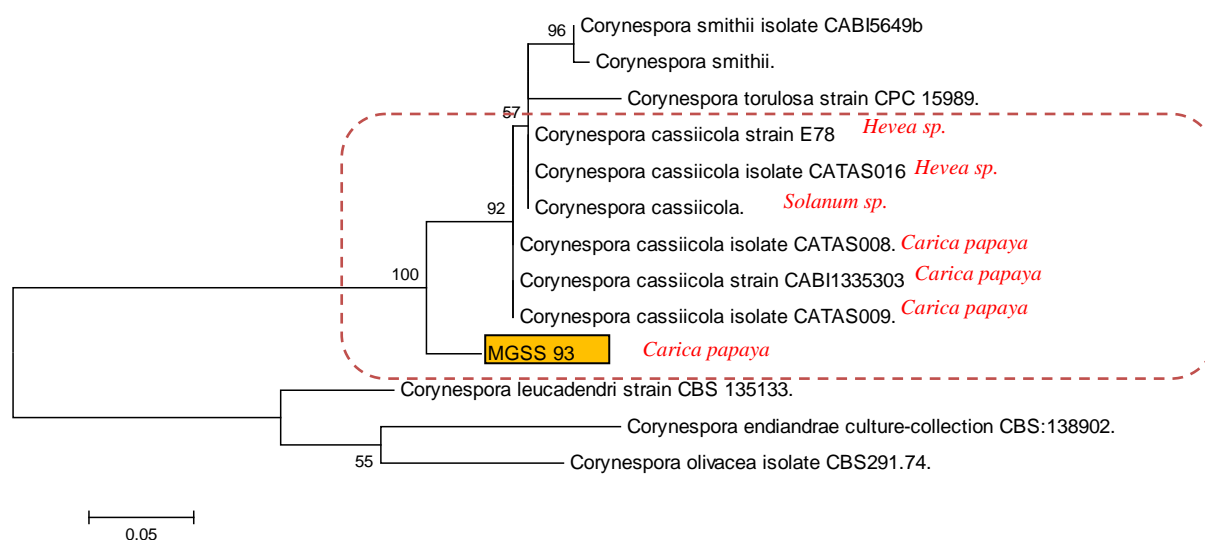
Os resultados da análise filogenética, matriz de divergência e caracterização morfológica nos mostram que as espécies possuem alta similaridade genética e morfológica sendo indicado nesse caso uma abordagem de múltiplos genes para a separação das espécies.



### Análise filogenética de espécies do gênero *Corynespora*

A análise filogenética revelou que o isolado MGSS 93 formou um clado com suporte altamente significativo de 100 % bootstrap com sequências do Genbank pertencentes do gênero *Corynespora* (Figura 66). Observou-se a formação de um grupo formado apenas por *C. cassiicola* patogênicas ao mamoeiro (*Carica papaya*), e outro grupo formado por isolados de *C. cassiicola* patogênicas a *Hevea brasiliensis* e *Solanum lycopersicum*.

**Figura 66.** Árvore filogenética de Máxima Verossimilhança (ML) do gênero *Cladosporium* baseado no modelo Jukes-Cantor. A árvore de consenso de bootstrap inferida a partir de 1000 repetições. Valores menores que 50 % de bootstrap foram colapsados. Análises foram realizadas no MEGA 6. *Corynespora leucadendri* KF251150 – para ITS), *Corynespora endiandrae* KP004450, *Corynespora olivacea* (FJ852595) foram utilizados como outgroup.



A representação da matriz revela que mesmo sendo de espécies iguais, o isolado MGSS 93 apresentou uma elevada distância genética em relação à sequência da espécie *Corynespora cassiicola* com 6,7 % - 7,5 %, depositadas no Genbank e houve uma distância ainda maior para as outras espécies de 9,9 % (*C. smithii*) e 12,4 % (*C. torulosa*) (Tabela 12).

A investigação sobre a especialização de *C. cassiicola* sobre plantas hospedeiras vem sendo relatado na literatura. Dixon et al. (2009) revelaram em seu estudo, que de 50 isolados obtidos de diferentes hospedeiros, 16 revelaram uma afinidade específica única com seus hospedeiros de origem sendo os hospedeiros avaliados manjerição, feijão (*Phaseolus vulgaris*), feijão-caupi (*Vigna unguiculata*), pepino (*Cucumis sativus*), mamão (*Carica papaya*), soja (*Glycine Max*), batata-doce (*Ipomoea batatas*) e tomate (*Solanum*

*lycopersicum*) e mostra que há uma correlação filogenética entre os isolados obtidos de um mesmo hospedeiro. Qi et al. (2011) obtiveram resultados de análise filogenética de *C. cassiicola* sobre isolados de *Perilla* sp., pepino, tomate, berinjela e pimentão sugerindo uma correlação entre o hospedeiro original e linhagens filogenéticas entre os isolados japoneses. Já Shinomoto et al. (2011) revelaram que alguns isolados de *C. cassiicola* mostram virulência a uma ampla gama de hospedeiros enquanto outros apresentam uma especificidade com um único hospedeiro, além da variabilidade genética dos isolados japoneses deste patógeno através de técnicas de RAPD.

Quanto à variabilidade genética da espécie de *C. cassiicola* Qi et al. (2011) investigando a variabilidade morfológica e molecular apresentou como resultado um elevado grau de variabilidade indicando que a técnica molecular de microsatelites ISSR pode ser utilizado para estudos populacionais dentro da espécie. Dixon et al. (2009) em uma ampla investigação sobre a *Corynespora cassiicola* com base em dados de sequencia de quatro *loci* concluiu que há uma alta diversidade genética e que através de teste de patogenicidade de isolados oriundos a partir ao mamoeiro, estes eram somente patogênico a este hospedeiro de origem, que traz evidências fortes da especificidade de linhagens de *Corynespora cassicola* com *Carica papaya*.

Com os resultados da análise filogenética e da matriz de divergência define-se com segurança que o isolado MGSS 93 pertence ao gênero *Corynespora*.

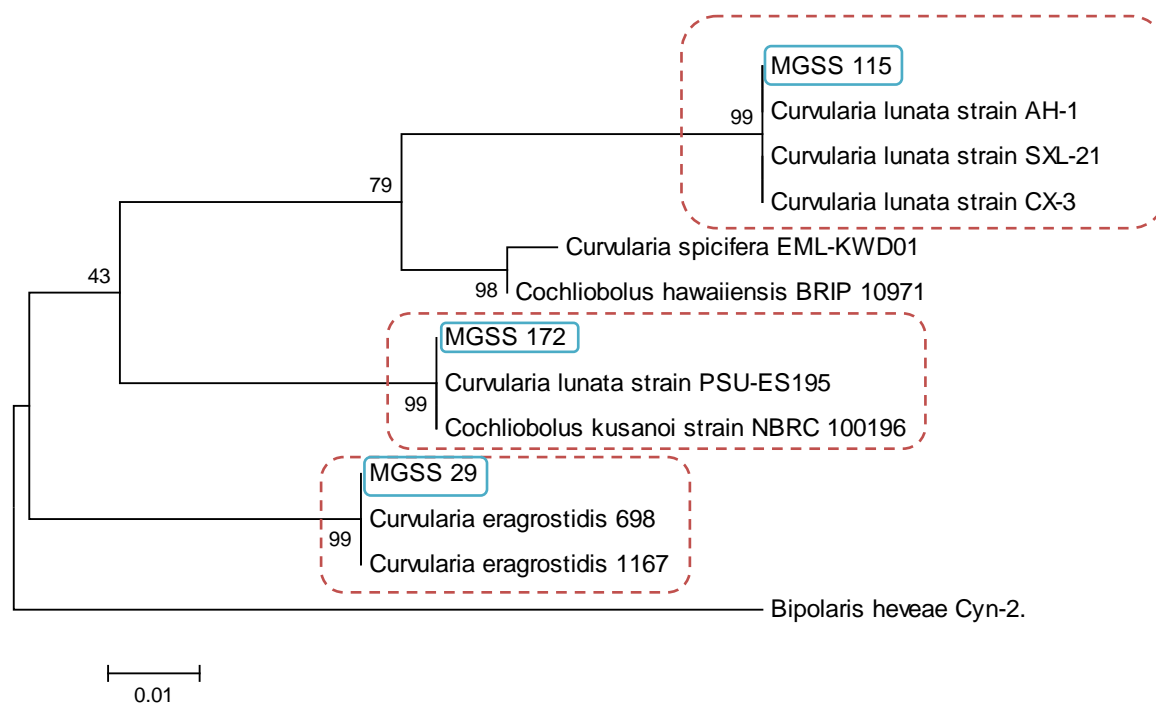
**Tabela 12.** Matriz de divergência genética através do gene ITS para as espécies do gênero *Corynespora*.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1 MGSS 93													
2 <i>C. cassiicola</i> 008.	6,7												
3 <i>C. cassiicola</i>	6,7	0,0											
4 <i>C. cassiicola</i> E78	7,5	0,7	0,7										
5 <i>C. cassiicola</i> 009.	6,7	0,0	0,0	0,7									
6 <i>C. cassiicola</i> 016	7,5	0,7	0,7	0,0	0,7								
7 <i>C. cassiicola</i> .	7,5	0,7	0,7	0,0	0,7	0,0							
8 <i>C. smithii</i>	9,9	2,9	2,9	2,2	2,9	2,2	2,2						
9 <i>C. smithii</i> .	10,7	3,7	3,7	2,9	3,7	2,9	2,9	0,7					
10 <i>C. torulosa</i>	12,4	5,2	5,2	4,5	5,2	4,5	4,5	6,0	6,8				
11 <i>C. leucadendri</i> .	39,7	42,4	42,4	43,7	42,4	43,7	43,7	47,9	49,2	48,3			
12 <i>C. endiandrae</i>	44,3	45,8	45,8	44,3	45,8	44,3	44,3	45,5	46,8	47,5	21,8		
13 <i>C. olivacea</i>	47,9	49,4	49,4	51,0	49,4	51,0	51,0	55,7	57,1	56,3	18,2	20,9	

### Análise filogenética de espécies do gênero *Curvularia*

A análise filogenética dos isolados MGSS 115, MGSS 172 e MGSS 29 confirmaram a caracterização morfológica como pertencentes ao gênero *Curvularia*. Os isolados formaram três grupos de linhagens distintas (Figura 67). O isolado MGSS 115, patogênico a cultura do milho formou um clado altamente significativo (99 %) de bootstrap com espécies de *Curvularia lunata* todas, assim como o isolado desta micoteca, obtidos de milho. O isolado MGSS 172, obtido de grama formou um outro clado distinto com as espécies de *Curvularia lunata* e do seu teleomorfo (fase sexuada) *Cochliobolus kusanoi* com clado bem suportado por 99 % de bootstrap. E o terceiro clado formado pelo isolado MGSS 29, obtidos de lesões foliares de *Heliconia* sp., altamente suportado com 99 % de bootstrap agrupando as espécies de *Curvularia eragrostidis* depositadas no Genbank e patogênicas a abacaxi (*Ananas comosus*) e arroz.

**Figura 67.** Árvore filogenética pelo Método de Máxima Verossimilhança (ML) com base no modelo Jukes-Cantor derivadas do gene ITS para o gênero *Curvularia*. A árvore consenso de bootstrap inferida a partir de 1000 repetições. *Bipolaris heveae* (AB179835) foi utilizado como outgroup.



A matriz de divergência genética com os isolados de *Curvularia* da micoteca mostrou que eles são geneticamente distantes uns dos outros. O isolado MGSS 29 da espécie *C. eragrostidis* apresentou uma distância genética dos isolados pertencentes a espécie *C. lunata* MGSS 172 de 7,3 % e do isolado MGSS 115 de 8,5 %. Já a divergência intraespecífica



entre os isolados MGSS 172 e MGSS 115 foi bastante elevada de 7,9 %. Esses resultados são interessantes pois a própria morfologia dos conídios desses dois isolados diferiram e a matriz de divergência mostra uma base sustentada da grande variabilidade morfológica e genética da espécie (Tabela 13). Quando em comparação com as sequências das espécies depositadas no Genbank, o isolado MGSS 29 apresentou 0 % de divergência com a espécie de *C. eragrostidis* e entre 6,7 % e 8,5 % em relação à demais espécies apresentadas nessa tabela. Já o isolado MGSS 172 apresentou uma divergência genética de 0 % com a espécie *C. lunata* e o teleomorfo *Cochliobolus kusanoi* e entre 6,7 % e 7,9 %, com as outras espécies. E por fim, o isolado MGSS 115 apresentou uma divergência de 0 % com a espécie de *C. lunata*, quando o hospedeiro de origem foi o milho e de 7,9 % com isolados de *C. lunata* oriundo de outro hospedeiro, e a divergência para as outras espécies variou entre 4,4 % e 8,5 %.

**Tabela 13** Matriz de divergência genética através do gene ITS para as espécies do gênero *Curvularia*.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1 MGSS_29	-												
2 MGSS_172	7,3	-											
3 MGSS_115	8,5	7,9	-										
4 <i>Curvularia lunata</i>	8,5	7,9	0,0	-									
5 <i>C. lunata</i> SXL-21	8,5	7,9	0,0	0,0	-								
6 <i>C. lunata</i> CX-3	8,5	7,9	0,0	0,0	0,0	-							
7 <i>C. lunata</i> PSU-ES195	7,3	0,0	7,9	7,9	7,9	7,9	-						
8 <i>Cochliobolus kusanoi</i>	7,3	0,0	7,9	7,9	7,9	7,9	0,0	-					
9 <i>C. eragrostidis</i> 698	0,0	7,3	8,5	8,5	8,5	8,5	7,3	7,30	-				
10 <i>C. eragrostidis</i> 1167	0,0	7,3	8,5	8,5	8,5	8,5	7,3	7,30	0,0	-			
11 <i>C. spicifera</i>	7,3	7,3	5,0	5,0	5,0	5,0	7,3	7,30	7,3	7,3	-		
12 <i>Cochliobolus hawaiiensis</i>	6,7	6,7	4,4	4,4	4,4	4,4	6,7	6,70	6,7	6,7	0,5	-	
13 <i>Bipolaris heveae</i>	9,7	9,7	10,4	10,4	10,4	10,4	9,7	9,70	9,7	9,7	11,6	11,0	-

A região do gene ITS foi eficiente na separação inter/intraespecífico do gênero *Curvularia*. Liu et al. (2015) obteve resultados semelhantes ao desta pesquisa no qual realizando estudos com 52 isolados de *Curvularia*, obtidos de lesões foliares do milho, através do gene ITS formou 2 grupos distintos com vários subgrupos, indicando um alto nível de diversidade genética dentro *C. lunata*. Kusai et al. (2015) caracterizando molecularmente 33 isolados de patógenos foliares do arroz utilizando o gene ITS, conseguiram identificar cinco diferentes espécies do gênero *Curvularia* - (*Curvularia hawaiiensis*, *C. geniculata*, *C. eragrostidis*, *C. aerea* e *C. lunata*) e *Bipolaris*. Em pesquisa realizada por Jeon, Thuong e Lee (2015) em que caracterizou molecularmente um isolado de *Curvularia* sp. obtido de sementes de trigo através do genes rDNA ITS, 28S, e sequências de gene GAPDH também obteve

sucesso na identificação da espécie ao analisar a filogenia do isolado com o apenas o gene ITS ou em combinação de todos os genes mencionados.

Quanto a *Curvularia eragrostidis*, que esta entre as espécies depositadas na Micoteca já foi relatada no Brasil causando podridão pós-colheita em abacaxi Pérola (FERREIRA et al., 2014), em brácteas das inflorescência de *Tapeinochilus ananassae* (FURTADO et al., 2007), causando mancha foliar em *Heliconia* sp. (SARDINHA et al., 2012).

### **Análise filogenética de espécies do gênero *Fusarium***

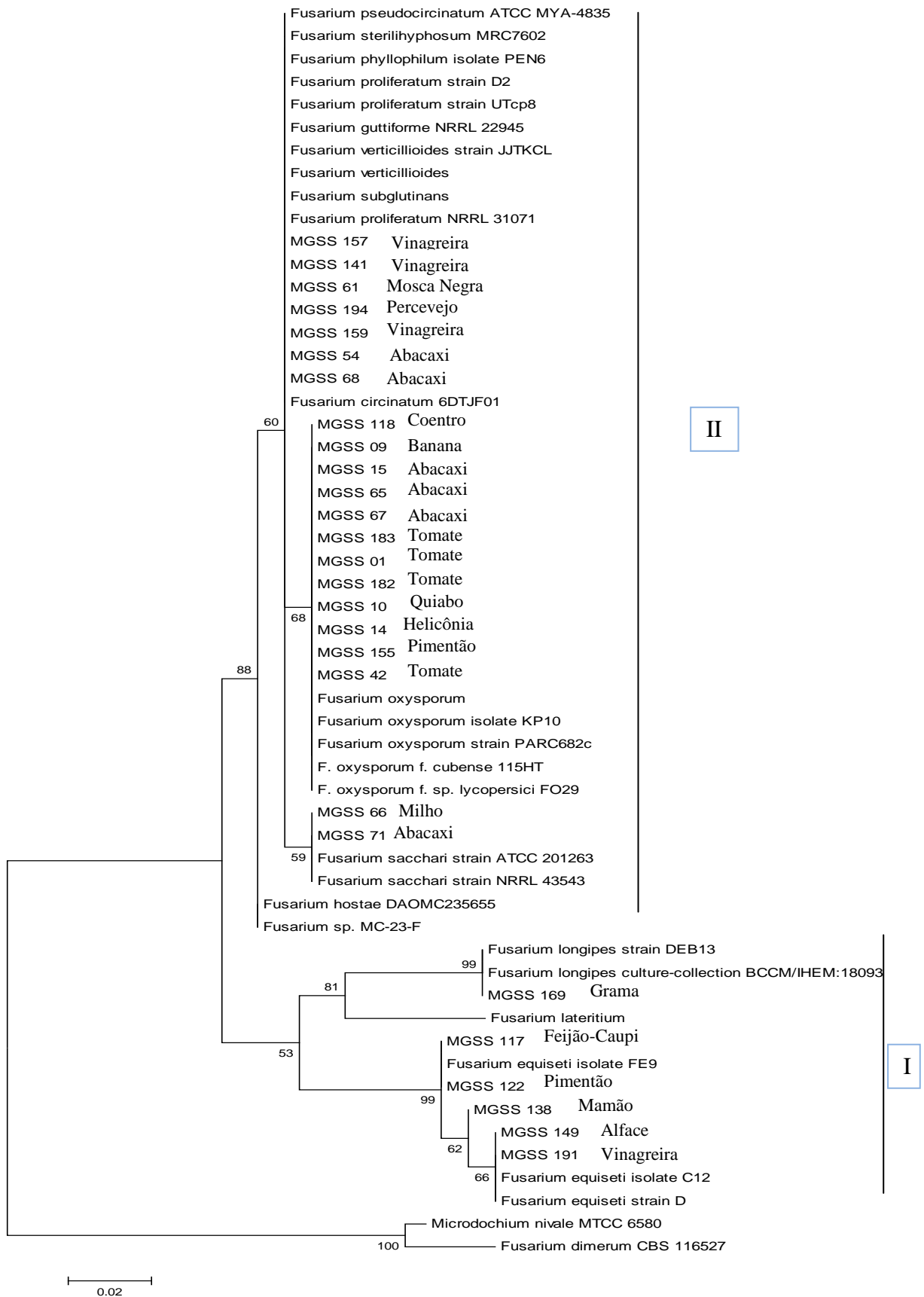
Para a construção da árvore filogenética foram utilizados 55 sequências de nucleotídeos com 27 isolados deste estudo identificados morfológicamente como pertencentes do gênero *Fusarium*.

A análise filogenética revelou a formação de dois grupos. O primeiro grupo com espécies da seção *Liseola* e *Elegans* e o segundo grupo com espécies da seção *Gibbosum*.

O grupo com as espécies da seção *Liseola* e *Elegans* apresentaram um ramo suportado por 88 % de bootstrap. Dentro da seção *Liseola* dois isolados MGSS 66 e MGSS 71 agruparam-se com a espécie *F. sacchari*, e sete isolados (MGSS 157, MGSS 141, MGSS 61, MGSS 194, MGSS 159, MGSS 54, MGSS 68) foram mais próximos das espécies do Complexo *Gibberella fujikuroi* (CGF), um complexo de espécies bastante diverso de aproximadamente 50 linhagens sendo que muitas espécies permanecem desconhecidas (O'DONNELL et al., 2013). Dentro da seção *Elegans*, doze isolados (MGSS 118, MGSS 09, MGSS 15, MGSS 65, MGSS 67, MGSS 183, MGSS 01, MGSS 182, MGSS 10, MGSS 14, MGSS 155, MGSS 42) agruparam-se com as linhagens de *Fusarium oxysporum*.

O grupo da seção *Gibbosum* apresentou dois cladogramas bem definidos, o primeiro clado com 99 % de bootstrap em que o isolado MGSS 169 agrupou-se com as linhagens de *Fusarium longipes* e o segundo clado com bootstrap altamente significativo (99 %) agrupou os isolados MGSS 117, MGSS 122, MGSS 138, MGSS 149, MGSS 191 com as linhagens de *F. equiseti*. (Figura 68).

**Figura 68.** Árvore filogenética pelo Método de Máxima Verossimilhança (ML) com base no modelo Jukes-Cantor derivadas do gene ITS para o gênero *Fusarium*. A árvore consenso de bootstrap inferida a partir de 1000 repetições. *Microdochium nivale* JN642711 e *Fusarium dimerum* EU926284 foram utilizados como outgroup.



Ao analisar a divergência genética para o gene ITS dos 27 isolados e das sequências depositadas no Genbank, observou-se que os isolados MGSS 118, MGSS 09, MGSS 15, MGSS 65, MGSS 67, MGSS 183, MGSS 01, MGSS 182, MGSS 10, MGSS 14, MGSS 155, MGSS 42 apresentaram 0 % de divergência entre eles e entre as sequências de linhagens de *Fusarium oxysporum* e quando comparado com o grupo MGSS 157, MGSS 141, MGSS 61, MGSS 194, MGSS 159, MGSS 54, MGSS 68 MGSS 66 e MGSS 71 pertencentes a seção *Liseola* a divergência ficou entre 0,6 % -1,3 % e por último com o grupo MGSS 169, MGSS 117, MGSS 122, MGSS 138, MGSS 149, MGSS 191 pertencentes a seção *Gibbosum* a divergência ficou entre 6,2 – 8,5 % (Tabela 14).

Já os isolados MGSS 157, MGSS 141, MGSS 61, MGSS 194, MGSS 159, MGSS 54, MGSS 68 apresentaram 0 % de divergência entre si e entre as espécies do Complexo *Gibberella fujikuroi* (*F. verticilloides*, *F. subglutinans*, *F. guttiforme*, *F. proliferatum*, *F. phyllophilum*, *F. pseudocircinatum*, *F. sterilihyphosum*, *F. circinatum* ). A divergência genética entre os isolados MGSS 66 e MGSS 71 foi de 0 % entre eles, assim como, entre a espécie *F. sacchari*. (Tabela 14).

O isolado MGSS 169 apresentou 0 % de divergência com *F. longipes*. Já os isolados MGSS 149, MGSS 191, MGSS 122, MGSS 117 apresentaram 0 % e MGSS 138 (0,6 %) de divergência genética com a espécie *F. equiseti* (Tabela 14).



As estirpes de espécies de *Fusarium* podem causar doenças em uma gama muito ampla de espécies vegetais. A natureza da doença fornece importantes pistas quanto às espécies que foram recuperadas, e muitas vezes limita a gama de espécies que devem ser distinguidas (LESLIE; SUMMERELL, 2006).

Neste trabalho foram isolados fungos do gênero *Fusarium* de hospedeiros como pimentão, tomate, heliconia, quiabo (*A. esculentus*), abacaxi, banana (*Musa* sp.), coentro (*C. sativum*), milho (*Z. mays*), vinagreira (*H. sabdariffa*), percevejo (*T. limbativentris*), mosca negra (*A. woglumii*), grama (Poaceae), alface (*L. sativa*), mamão (*Carica papaya*), feijão caupi (*V. unguiculata*). *Fusarium oxysporum* é um complexo de espécies compreendendo patógenos habitantes do solo e de plantas onipresentes com mais de 150 hospedeiros específicos ou *formae speciales*.

Interessante notar que as sequências dos isolados MGSS 15, MGSS 65, MGSS 67 oriundos de Abacaxi de estados diferentes do Nordeste (Maranhão e Pernambuco) foram filogeneticamente agrupados dentro da espécie *Fusarium oxysporum*. Jiménez; Granados (2014) relataram a ocorrência deste patógeno em cultivos de abacaxi na Costa Rica, causando diferentes formas de podridão, com folhas apresentando sintomas amarelados.

Estudos filogenéticos com *Fusarium oxysporum* têm sido realizados geralmente enfatizando uma única *formae speciales*. Nirmaladevi et al. (2016) estudando a filogenia de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* com base em sequências da região ITS mostrou a presença de pelo menos quatro linhagens evolutivas do patógeno. O agrupamento de *F. oxysporum* com isolados não patogênicos e com os membros de outras *formae speciales* indica uma origem polifilética de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*.

Isto é evidente a partir de árvores filogenéticas, onde isolados representando diferentes *formae speciales* agrupados, em vez de com os representantes da mesma *formae specialis*. Em estudo das relações filogenéticas de *F. oxysporum* f.sp. *cubense* com base na informação da sequência de DNA de duas diferentes regiões nucleares (TEF e IGS) e duas regiões de genes mitocondriais (MtSSU e Mtr), Fourie et al. (2009) observaram que as linhagens I e II deste patógeno fizeram parte do clado A, onde são mais estreitamente relacionado com *F. oxysporum* f. sp. *canariense* e *F. oxysporum* f. sp. *perniciosum* do que para outros isolados de *F. oxysporum* f. sp. *cubense*. Estes resultados confirmam os encontrados nesta pesquisa em que todas as diferentes *formae speciales* avaliadas formaram um único grupo na análise filogenética, esses resultados ficam ainda mais consistentes observando a divergência genética dos isolados que foi de 0 % entre eles.

Quanto a região gênica do DNA fúngico para elucidação de clados, Hill et al. (2011) realizou análise filogenética avaliando 86 isolados de *Fusarium oxysporum*, 20 de outras espécies de *Fusarium* obtidos de beterraba sacarina, juntamente com quatro isolados de *Fusarium oxysporum* obtidos de feijão e cinco isolados oriundos de espinafre através dos genes ITS,  $\beta$ -tubulina e TEF 1- $\alpha$  (1 $\alpha$ - fator de alongação), observaram que este último obteve uma melhor definição dos clados apresentando uma topologia da árvore filogenética com valores semelhantes ao da combinação das três conjuntos de genes analisados.

Quanto ao *Gibberella fujikuroi* complexo (GFC) é um taxon monofilético que inclui um conjunto de espécies de *Fusarium* com características morfológicas semelhantes e sobrepostas que complica a sua diferenciação. A maior parte das espécies neste complexo foram associados com doenças devastadoras de várias plantas economicamente importantes (KVAS et al., 2009).

Neste estudo, dois isolados foram classificados como *Fusarium sacchari* cujos hospedeiros são o milho e o abacaxi. Segundo Leslie; Summerell, (2006) *F. sacchari* é ocasionalmente associado ao milho e frequentemente associado à cana-de-açúcar e sorgo.

Alguns dos isolados que agruparam-se junto às espécies deste complexo foram encontrados colonizando insetos. Arantes; Correia (1999) encontraram a espécie *Fusarium coccophilum* em condições naturais colonizando *Parlatoria ziziphus* uma praga de *Citrus* em pomares citrícolas do município de Taiúva. Assim como espécies *F. proliferatum* (ISO-DPV-LCBPF004) e *F. equiseti* (ISO-DPV-LCBPF009), vem sendo utilizado para controle biológico do percevejo bronzeado (*Thaumastocoris peregrinus*) praga exótica de *Eucalyptus* spp. com bastante eficiência, sendo *F. proliferatum*, pertencente ao *Gibberella fujikuroi* complexo (VELOZO, 2015).

Outros isolados deste complexo foram obtidos da cultura da vinagreira e apresentaram divergência de 0 % entre eles. Já foi relatada a ocorrência de *Fusarium* causando doença nesta cultura em países do continente africano: na Nigéria por Amusa et al., (2005) e Agbenin; Ogulana, (2006), no Egito por Hassan et al., (2014).

Dentro da seção Gibbosum o isolado MGSS 169 foi classificado como *Fusarium longipes* e segundo Leslie; Summerell, (2006) a distribuição geográfica deste patógeno encontra-se ao longo dos trópicos e normalmente é recuperado a partir do solo. Já *Fusarium equiseti* é uma espécie com uma distribuição cosmopolita sendo encontrado na natureza como saprófita ou como invasor secundário.

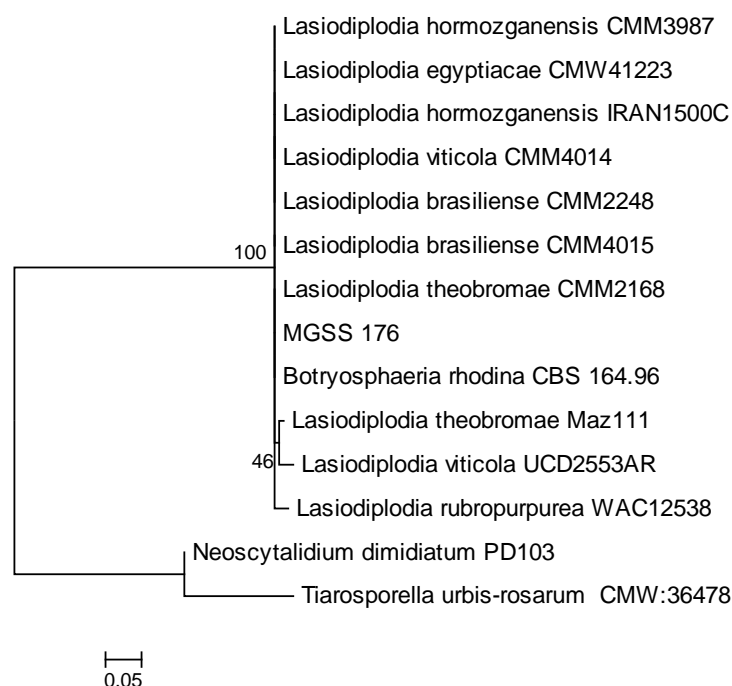
Os isolados classificados como *F. equiseti* obtiveram distância genética de 0 % a 1,3 % entre eles. Bonde; Gade; Rai, (2014) encontraram alta variabilidade genética entre isolados

de *Fusarium equiseti* obtidos de frutos (mamão, tomate, berinjela, banana) e legumes - cenoura (*Daucus carota*), beterraba (*Beta vulgaris*), batata, quiabo através da técnica de RAPD e matriz de distância genética. Nadarajah et al. (2015) estudando a filogenia, através da região ITS, de um isolado de *Fusarium* sp. obtido de uma variedade de arroz apresentou 100 % de homologia com *Fusarium equiseti* Fe2 e *Fusarium* sp. estirpe AL-21 IRH-2012h. Os hospedeiros de *Fusarium equiseti* encontrados nesta pesquisa foram vinagreira (colo da planta), alface (folha), mamão (fruto), feijão caupi (colo da planta), pimentão (semente) o que indica uma ampla gama de espécies e órgãos vegetais que são suscetíveis a este patógeno.

### **Análise filogenética de espécie do gênero *Lasiodiplodia*.**

A análise filogenética através do gene ITS revela que, o isolado MGSS 176, agrupou-se em um clado com valor de 100 % de bootstrap juntamente com outras espécies do gênero *Lasiodiplodia* (Figura 69).

**Figura 69.** Árvore filogenética de Máxima Verossimilhança (ML) do gênero *Lasiodiplodia* baseado no modelo Kimura 2 parâmetros. A árvore de consenso de bootstrap inferida a partir de 1000 repetições. Análises foram realizadas no MEGA 6. *Neoscytalidium dimidiatum* GU251106 – para ITS), *Tiarosporella urbis-rosarum* JQ239408) foram utilizados como outgroup.



A matriz de divergência genética mostra o quão próximos evolutivamente estão às espécies de *Lasiodiplodia*. O isolado MGSS 176 apresentou 0 % de distância genética com



as espécies de *Lasiodiplodia theobromae* e seu teleomorfo *Botryosphaeria rhodina*, *L. brasiliense*, *L. viticola*, *L. hormozganensis*, *L. egyptiaca* (Tabela 15).

**Tabela 15.** Matriz de divergência genética através do gene ITS para as espécies do gênero *Lasiodiplodia*.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
<b>1 MGSS_176</b>														
2 <i>Botryosphaeria rhodina</i>	0,0													
3 <i>Lasiodiplodia theobromae</i>	0,0	0,0												
4 <i>Lasiodiplodia theobromae</i>	1,3	1,3	1,3											
5 <i>Lasiodiplodia brasiliense</i>	0,0	0,0	0,0	1,3										
6 <i>Lasiodiplodia brasiliense</i>	0,0	0,0	0,0	1,3	0,0									
7 <i>Lasiodiplodia viticola</i>	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5								
8 <i>Lasiodiplodia viticola</i>	0,0	0,0	0,0	1,3	0,0	0,0	2,5							
9 <i>Lasiodiplodia hormozganensis</i>	0,0	0,0	0,0	1,3	0,0	0,0	2,5	0,0						
10 <i>Lasiodiplodia hormozganensis</i>	0,0	0,0	0,0	1,3	0,0	0,0	2,5	0,0	0,0					
11 <i>Lasiodiplodia egyptiaca</i>	0,0	0,0	0,0	1,3	0,0	0,0	2,5	0,0	0,0	0,0				
12 <i>Lasiodiplodia rubropurpurea</i>	1,9	1,9	1,9	3,2	1,9	1,9	3,2	1,9	1,9	1,9	1,9			
13 <i>Neoscytalidium dimidiatum</i>	27,7	27,7	27,7	28,6	27,7	27,7	30,6	27,7	27,7	27,7	27,7	28,6		
14 <i>Tiarosporella urbis-rosarum</i>	31,2	31,2	31,2	33,3	31,2	31,2	34,3	31,2	31,2	31,2	31,2	31,2	12,2	

O isolado MGSS 176 foi obtido colonizando fruto de melancia no município de Igarapé do Meio - MA. Este gênero tem ampla distribuição geográfica e de hospedeiros como já constataram em uva de mesa, no Brasil (CORREIA et al., 2016), em *Rosa rugosa*, na China (CHEN et al., 2016a), em mamão, no Brasil (NETTO et al., 2014), em *Syzygium cordatum*, na África do Sul (PLAVIC et al., 2004), em sementes de *Hibiscus cannabinus*, na Malásia (NORHAYATI; KAMARUZAMAN, 2016); em diversos hospedeiros de regiões diferentes do mundo (ALVES et al., 2008).

Dados de sequências de DNA e características morfológicas são interessantes para a taxonomia de espécies deste gênero. Plavic et al. (2004) comparando espécies de *Lasiodiplodia* através de características morfológicas e sequências de DNA do gene espaçadores internos

transcrito – ITS concluíram que o isolado oriundo de *Syzygium cordatum* tratava-se de uma nova espécie denominada *Lasiodiplodia gonubiensis*. Norhayati; Erneeza; Kamaruzaman (2016) constataram que a espécie *Lasiodiplodia theobromae* era transmitida através de sementes de *Hibiscus cannabinus* e recomendaram que a identificação do referido patógeno deve ser feita em combinação da caracterização morfológica e molecular, pois existem uma série de espécies críticas que não são identificadas apenas com base nas sequências do gene ITS.

Alves et al. (2008) analisando os genes ITS e EF1- $\alpha$  (fator de alongação 1-  $\alpha$ ) de isolados identificados previamente como *Lasiodiplodia* observou que árvore filogenética mostrou três clados, um com a espécie *Lasiodiplodia theobromae*, e os outros dois clados com novas espécies do gênero *Lasiodiplodia* e esses isolados que não agruparam-se com qualquer espécie conhecida, apresentaram diferenças morfológicas com a espécie *L. theobromae* dando ainda mais consistência aos resultados de filogenia.

Diante de uma grande diversidade de fungos no Brasil, recentemente no Vale do São Francisco, região Nordeste do Brasil foi constatado a presença de oito diferentes espécies de *Lasiodiplodia* causando morte dos ramos “dieback” em videiras sendo cinco destas espécies relatada pela primeira vez neste hospedeiro no mundo (CORREIA et al. 2016). Ainda nesta mesma região, cinco diferentes espécies de *Lasiodiplodia* foram relatadas causando podridão peduncular do mamoeiro com a descoberta de duas novas espécies através da análise filogenética e morfológica dos isolados obtidos deste hospedeiro (NETTO et al., 2014).

Do conjunto de relações filogenéticas conclui-se que este isolado MGSS 176 pertence ao gênero *Lasiodiplodia*. Assim, uma combinação de dados de sequência e características morfológicas são benéficas para esclarecer a taxonomia deste patógeno.

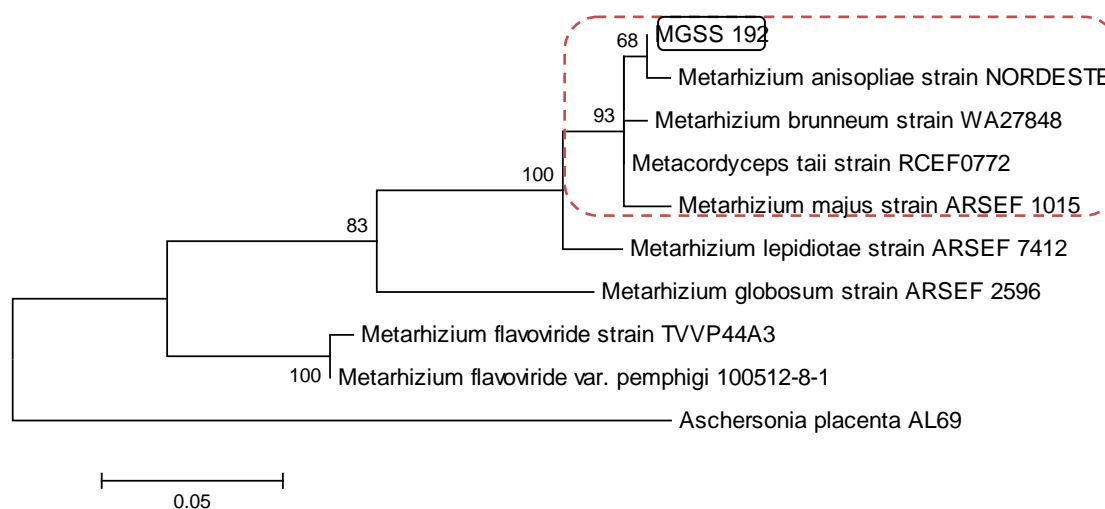
### **Análise filogenética de espécie do gênero *Metarhizium***

O isolado MGSS 192 classificado morfológicamente como *Metarhizium anisopliae*, obtido de *Tibraca limbativentris* no município de Matões do Norte-MA, foi submetido a análise filogenética pelo método de Máxima Verossimilhança (ML) e modelo de evolução Jukes-Cantor (JC) e 1000 repetições, comparando-os com as sequências do Genbank.

A análise filogenética revelou um grupo monofilético onde o isolado MGSS 192 agrupou-se com a espécie *Metarhizium anisopliae* confirmando a caracterização morfológica. O clado bem suportado por 93 % de bootstrap mostra em um sub-clado formado pelo isolado

MGSS 192 e a espécie de *Metarhizium anisopliae* isolado NORDESTE, que tinha como hospedeiro *Mahanarva posticata*, na região Nordeste do Brasil (Figura 70).

**Figura 70.** Árvore filogenética de Máxima Verossimilhança (ML) do gênero *Metarhizium* baseado no modelo Jukes-Cantor. A árvore de consenso de bootstrap inferida a partir de 1000 repetições. Análises foram realizadas no MEGA 6. *Aschersonia placenta* (DQ365845) – para ITS foi utilizado como outgroup.



Nesse mesmo clado outras espécies agruparam-se as espécies *Metarhizium brunneum*, *Metacordyceps taii*, (anamorfo: *M. guizhouense*), *Metarhizium majus*.

A matriz revela que o isolado MGSS 192 apresentou 0,6 % de divergência genética com a espécie de *Metarhizium anisopliae* e o teleomorfo *Metacordyceps taii* e 1,3 % para *M. brunneum*, 1,9 % para *M. majus*, 3,9 % para *M. lepidiotae*, 13,3 % para *M. globosum*, 17,2 % para *M. flavoviride* var. *pemphigi*, 18 % para *M. flavoviride* (Tabela 16).

**Tabela 16.** Matriz de divergência genética através do gene ITS para as espécies do gênero *Metarhizium*.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1 MGSS 192	-									
2 <i>Metarhizium anisopliae</i>	0,6	-								
3 <i>Metacordyceps taii</i>	0,6	1,3	-							
4 <i>Metarhizium brunneum</i>	1,3	1,9	0,6	-						
5 <i>Metarhizium flavoviride</i>	18,0	18,8	17,2	18,0	-					
6 <i>Metarhizium flavoviride</i> var. <i>pemphigi</i>	17,2	18,0	16,4	17,2	0,6	-				
7 <i>Metarhizium globosum</i>	13,3	13,3	12,5	13,3	15,6	14,8	-			
8 <i>Metarhizium lepidiotae</i>	3,9	4,6	3,3	3,9	16,4	15,6	12,5	-		
9 <i>Metarhizium majus</i>	1,9	2,6	1,3	1,9	18,0	17,2	13,3	4,6	-	
10 <i>Aschersonia placenta</i>	29,5	29,5	30,4	31,4	26,7	25,7	28,5	29,5	31,4	-

Esta espécie é caracterizada por conidióforos de comprimento variável e são relativamente curtos, de formato irregular ramificado ou não ramificado e dispostos em

grupos compactos que formam uma massa de esporos, os esporos são alongados com lados paralelos (BISCHOFF, REHNER, HUMBER, 2009).

É importante o conhecimento de fungos entomopatogênicos para posteriores estudos genéticos e utilização no controle biológico de pragas. Este isolado foi coletado em epizootia (infecção generalizada da população de *Tibraca limbativentris* numa área extensa de cultivo de arroz) no município de Matões do Norte – MA. Em estudos das relações filogenéticas da espécie *Metarhizium anisopliae* Tangthirasunun et al. (2010) investigando características morfológicas e moleculares através de dados de sequências do espaçador interno transcrito (ITS) do rDNA de 24 isolados de *Metarhizium* de diferentes hospedeiros de insetos e do solo oriundos da Tailândia mostrou que *M. anisopliae*, *M. album.*, *M. anisopliae var. acridum* e *M. flavoviride* podem ser diferenciados claramente, porém as espécies de *M. anisopliae* e *M. anisopliae var. majus* (= *Metarhizium majus*) mostraram-se geneticamente muito próximas havendo somente a separação das espécies através de características morfológicas.

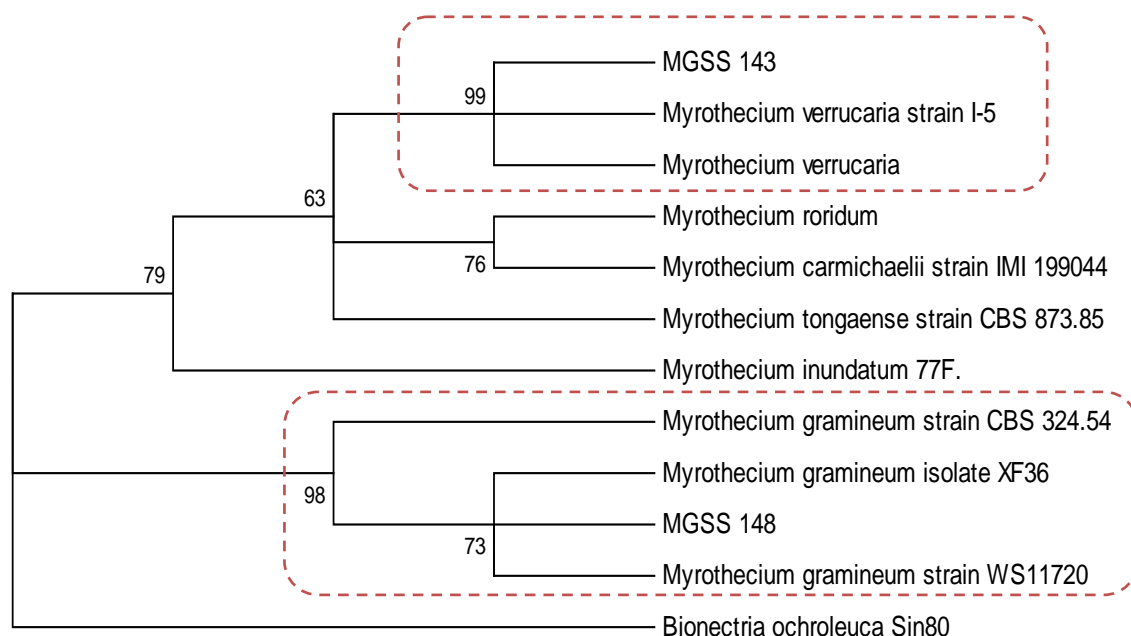
A utilização da região espaçadora interna (ITS) em conjunto com outros genes também tem tido sucesso na filogenia de espécies do gênero *Metarhizium*. Myrand et al., (2015) realizou a caracterização molecular de seis isolados de *Metarhizium* através da região ITS e a região intergênica MzIGS3 identificando as espécies: *M. anisopliae*, *M. brunneum*, *M. majus*. Lyra et al. (2012) utilizando a região ITS em conjunto com análise de restrição do rDNA amplificado (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis – ARDRA) para estudos filogenéticos mostraram que o complexo *Metarhizium anisopliae* é monofilético. Bischoff et al., (2009) através da análise de multilocus em conjunto com análise morfológica de nove táxons do complexo de *M. anisopliae* também confirmam seu monofilatismo.

No Brasil já foi relatado as espécies *Metarhizium anisopliae*, *Metarhizium anisopliae var. anisopliae*, *Metarhizium majus*, *Metarhizium flavoviride* (LUBECK et al., 2008) e a ocorrência natural de *Metarhizium anisopliae* em Adultos de Cascudinho (*Alphitobius diaperinus*) (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae) (ALVES et al., 2004).

### **Análise filogenética de espécies do gênero *Myrothecium***

A análise filogenética dos isolados MGSS 143 e MGSS 148 confirmaram a caracterização morfológica como pertencentes ao gênero *Myrothecium*. Observou-se que o isolado MGSS 143 agrupou-se com a espécie *Myrothecium verrucaria* em clado monofilético muito bem suportado por 99 % de bootstrap. Já o isolado MGSS 148 agrupou-se com a espécie *Myrothecium gramineum* em um clado suportado por 98 % de bootstrap (Figura 71).

**Figura 71.** Árvore filogenética de Máxima Verossimilhança (ML) do gênero *Myrothecium* baseado no modelo Kimura 2 parâmetros para o gene ITS. A árvore de consenso de bootstrap inferida a partir de 1000 repetições. Análises foram realizadas no MEGA 6. *Bionectria ochroleuca* KF055399 foi utilizado como outgroup.



A tabela 17 mostra que os isolados MGSS 148 e MGSS 143 do gênero *Myrothecium* apresentam uma elevada divergência genética entre eles (24,8 %), o que confirma pertencerem a espécies distintas. Ao analisar a divergência genética entre o isolado MGSS 148 e a espécie *M. gramineum* esta distância variou entre 1,7 % e 5,3 % e com relação a espécie *M. verrucaria* divergiu geneticamente 24,8 %.

**Tabela17.** Matriz de divergência genética através do gene ITS para as espécies do gênero *Myrothecium*.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1 MGSS_148	-											
2 MGSS_143	24,8	-										
3 <i>Myrothecium verrucaria</i>	24,8	0,0	-									
4 <i>Myrothecium verrucaria</i>	24,8	0,0	0,0	-								
5 <i>Myrothecium gramineum</i>	5,3	28,8	28,8	28,8	-							
6 <i>Myrothecium gramineum</i>	2,8	23,8	23,8	23,8	7,2	-						
7 <i>Myrothecium gramineum</i>	1,7	27,8	27,8	27,8	6,5	3,4	-					
8 <i>Myrothecium roridum</i>	23,9	5,3	5,3	5,3	29,9	21,0	24,8	-				
9 <i>Myrothecium tongaense</i>	19,2	3,4	3,4	3,4	24,7	18,4	21,9	4,1	-			
10 <i>Myrothecium carmichaelii</i>	20,1	4,0	4,0	4,0	25,7	19,2	22,9	2,3	1,7	-		
11 <i>Myrothecium inundatum.</i>	21,0	8,6	8,6	8,6	24,7	20,1	23,8	12,2	8,6	9,2	-	
12 <i>Bionectria ochroleuca</i>	38,5	41,9	41,9	41,9	43,3	38,5	41,1	41,9	39,1	41,9	41,6	-

O isolado MGSS 143 apresentou uma divergência genética de 0 % com a espécie *M. verrucaria* e entre 23,8 % - 28,8 % com a espécie *M. gramineum*.

O isolado MGSS 143 foi obtido de folhas de alface (*Lactuca sativa*) e o isolado MGSS 148 de folhas de quiabo. No Brasil, o gênero *Myrothecium* já foi relatado em outros hospedeiros, como a espécie *Myrothecium roridum* patogênica aos hospedeiros *Spathiphyllum wallisii*, *Cucumis sativus*, *Anthurium andreanum*, *Solanum lycopersicum*, *Capsicum annuum*, *Dieffenbachia amoena*, *Nicandra physaloides* e a espécie *M. verrucaria* patogênica a *Solidago canadensis* (QUEZADO DUVAL et al., 2010). E no mundo, *M. roridum* patogênico ao *Abutilon megapotamicum*, na China (BEN et al., 2015) e a *M. gramineum* patogênico ao *Coix lacryma-jobi*, na Índia (DUBEY; SENGUPTA, 2015).

Neste trabalho as relações filogenéticas através dos genes da região espaçadora transcrita interna (ITS) separou e identificou claramente as espécies do gênero *Myrothecium*. A utilização da região espaçadora transcrita interna (ITS) para a filogenia de espécies do gênero *Myrothecium* vem sendo realizada por diversos pesquisadores. Gnanasalomi; Gnanadoss, (2013) realizaram a filogenia baseada na região ITS rDNA de dois isolados que produziam lacase e identificaram as espécies como *Myrothecium gramineum* e *Psathyrella candolleana*. Okunowo et al., (2013) e Piyaboon et al. (2014) estudando um fungo patogênico a *Eichhornia crassipes* (espécie invasora que vem causando prejuízos econômicos na Nigéria e Tailândia), chegaram a identificação a nível de espécie deste microorganismos através da análise filogenética do região ITS, sendo identificado como *Myrothecium roridum* e indicado como potencial bioherbicida.

Chen et al. (2016b) afirmam que o gênero *Myrothecium* é polifilético, analisando os genes ITS e EF1- $\alpha$ , separados e em combinação. Sugerindo a análise por multi-gene para melhor identificação das espécies do gênero.

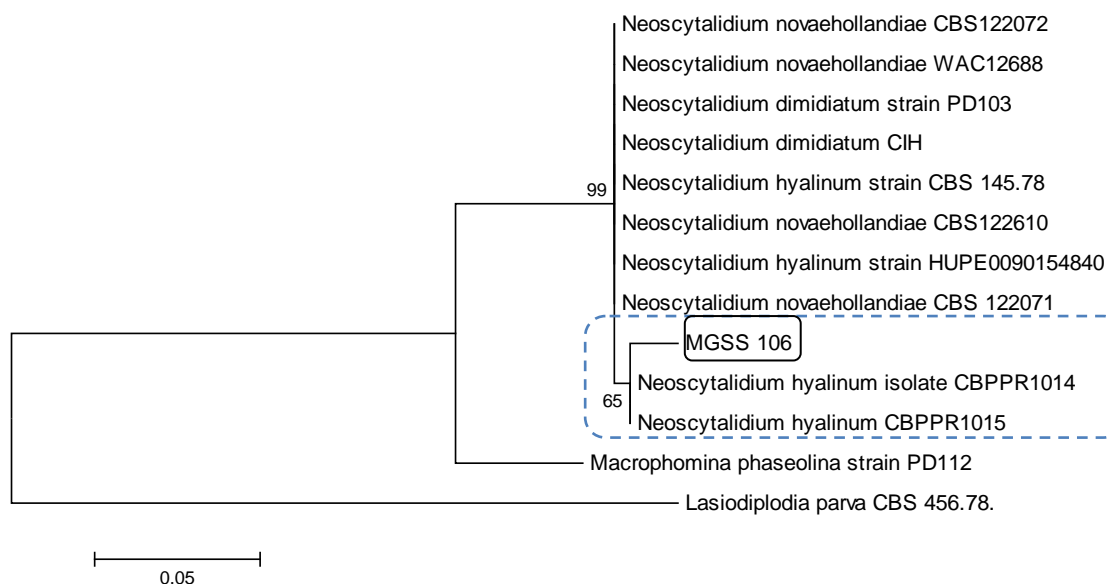
As espécies encontradas neste trabalho têm características que podem ser utilizadas na agricultura e na indústria. *Myrothecium verrucaria* já foi utilizada como bioherbicida contra plantas daninhas como *Senna obtusifolia* L. e *Sesbania exaltata* (Raf.) Rydb ex A.W. Hill (HOAGLAND; WEAVER; BOYETTE, 2007). A espécie *Myrothecium gramineum* teve comprovada a produção de lacases e sua capacidade de degradar corantes (GNANASALOMI; GNANADOSS, 2013). A espécie *Myrothecium inundatum* produz numerosos compostos orgânicos voláteis (COV), que demonstraram atividade inibidora do crescimento contra uma série de fungos patogênicos de plantas, incluindo *Pythium ultimum* e *Sclerotinia sclerotiorum*, (BANERJEE et al., 2010) desta forma o conhecimento da biodiversidade de uma região ou estado é imprescindível em alavancar as pesquisas com esses microorganismos tendo seus potenciais biotecnológicos explorados.

### Análise filogenética de espécies do gênero *Neoscytalidium*.

Realizou-se a análise filogenética pelo método de Máxima Verossimilhança (ML) com modelo de evolução Jukes-Cantor (JC) e 1000 repetições para o isolado classificado morfológicamente como *Neoscytalidium dimidiatum*- MGSS 106, comparando-os com as sequências do Genbank.

A árvore filogenética revela que, o isolado MGSS 106 formou um sub-clado monofilético com a espécie *Neoscytalidium hyalinum* dentro de um clado maior com suporte de 99 % de bootstrap (Figura 72).

**Figura 72.** Árvore filogenética de Máxima Verossimilhança (ML) do gênero *Neoscytalidium* baseado no modelo Jukes-Cantor para o gene ITS. A árvore de consenso de bootstrap inferida a partir de 1000 repetições. Análises foram realizadas no MEGA 6. *Lasiodiplodia parva* (KF766192) foi utilizado como outgroup.



A matriz de divergência genética realizada para as espécies de *Neoscytalidium* através da região espaçadora transcrito interno (ITS) revela que o isolado MGSS 106 apresenta proximidade genética com dois isolados pertencentes a espécie *N. hyalinum* (= *N. dimidiatum*) (1,4 %) e 1,9 % para espécie *N. dimidiatum* de origem de outros países e diferentes hospedeiros e assim como isolados da espécie *N. novaehollandiae* (Tabela 18).

Os resultados da árvore filogenética e da matriz de divergência mostram que o isolado MGSS 106 é filogeneticamente relacionado com os isolados de *N. hyalinum* oriundos de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) e de mesma origem geográfica do Brasil.

Quanto a região do gene ITS foi capaz de identificar o isolado MGSS 106 em nível de espécie. Outros autores também obtiveram êxito ao utilizar esta região para identificação

de linhagens de *Neoscytalidium*. Chen et al. (2014) em pesquisa sobre a filogenia, morfologia, distribuição, e patogenicidade de seis gêneros (*Diplodia*, *Dothiorella*, *Fusicoccum*, *Botryosphaeria*, *Lasiodiplodia*, *Neofusicoccum* e *Neoscytalidium*) dentro da família *Botryosphaeriaceae* em noqueira-comum (*Juglans regia*) conseguiram a identificação a nível de espécie do isolado do gênero *Neoscytalidium* utilizando o gene da região ITS. Resultados semelhantes relataram Mohd et al. (2013) estudando 40 isolados provenientes de plantas de Pitaya (*Hylocereus polyrhizus*) com sintomas de cancro da haste caracterizando morfologica e molecularmente através do gene ITS todos os isolados e identificando todos como *N. dimidiatum*.

O isolado MGSS 106 foi obtido de fruto de abacaxi doente. Espécies do gênero *Neoscytalidium* já foram encontradas causando doenças em diversas culturas. Na Austrália em árvores frutíferas foi relatado a primeira vez da associação da *N. novaehollandiae* causando “dieback” em mangueiras e *Neoscytalidium dimidiatum* em mangueiras e figueiras (RAY et al. 2010), *N. dimidiatum* causando cancro da haste em Pitaya (*Hylocereus polyrhizus*) na Malásia (MOHD et al., 2013), nos Estados Unidos foi relatado a patogenicidade de *N. dimidiatum* a noqueira-comum (CHEN et al., 2014) e no Brasil foi confirmado a associação patogênica de espécie *N. dimidiatum* a *Mangifera indica* (MARQUES et al., 2013), causando podridão radicular em pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) (MACHADO et al., 2014a), e em mandioca (MACHADO et al., 2014b).

A árvore mostra ainda a espécie *N. dimidiatum* está filogeneticamente relacionada com a espécie *N. novaehollandiae*, como constataram os pesquisadores Plavic et al. (2008) através da combinação de dados de sequências dos genes ITS e EF-1 $\alpha$ , Mohd et al. (2013); Chen et al. (2014) pela utilização da região espaçadora transcrito interna (ITS).

Os resultados da análise filogenética, Matriz de divergência genética e caracterização morfológica assegura que o isolado MGSS 106 pertence à espécie *Neoscytalidium dimidiatum*.

A nomenclatura da espécie *Neoscytalidium dimidiatum* vem sofrendo alterações ao longo dos últimos anos (2006/2016). Em 2006 (*N. dimidiatum*), 2013 (*N. hyalinum*) e finalmente 2016 retornou a (*N. dimidiatum*). Crous; et al. (2006) haviam relatado a nova combinação com base no epíteto mais antigo *Torula dimidiata* (Penz.) de 1882. Phillips et al. (2013) alteraram a nomenclatura de *Neoscytalidium dimidiatum* para *Neoscytalidium hyalinum*, porque *Scytaalidium hyalinum* (C.K. Campb. & J.L. Mulder) de 1977, era indistinguível filogeneticamente da espécie *N. dimidiatum*. Porém, Huang et al. (2016) declarou em seu artigo sobre o gênero *Neoscytalidium* que Crous et al. (2006) haviam relatado



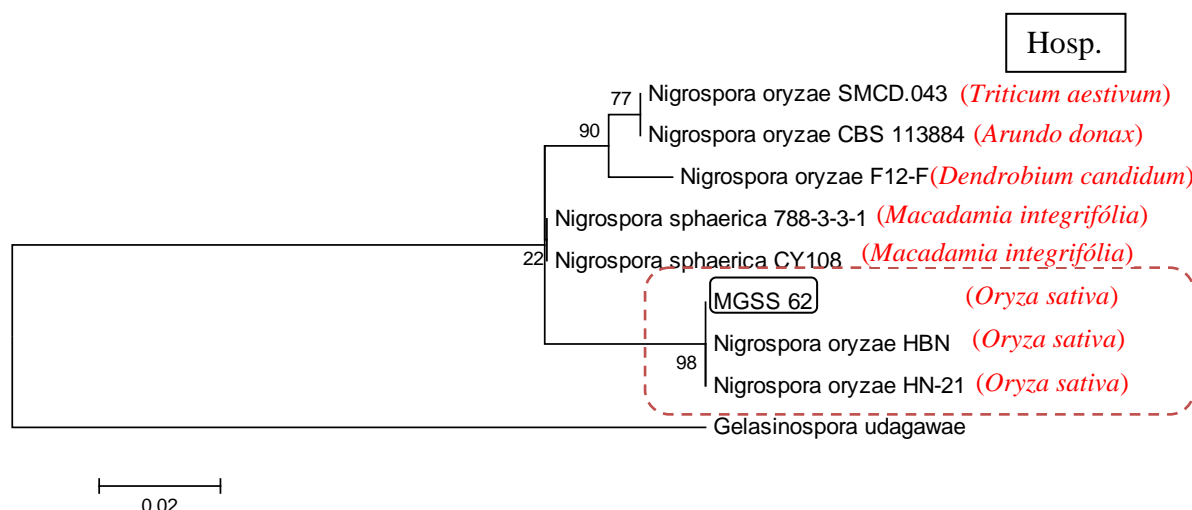


### Análise filogenética de espécies do gênero *Nigrospora*.

A análise filogenética mostra que houve a formação de dois clados de *Nigrospora oryzae*.

O isolado MGSS 62 apresentou relações filogenéticas com a espécie *Nigrospora oryzae* com clado altamente significativo de 98 % de bootstrap. Observando que neste clado todos os isolados foram obtidos a partir da cultura do arroz (*Oryza sativa*). Para o outro grupo formado com isolados de *Nigrospora oryzae* apresentou diferentes hospedeiros de origem (Figura 73).

**Figura 73.** Árvore filogenética de Máxima Verossimilhança (ML) do gênero *Nigrospora* baseado no modelo Jukes-Cantor para o gene ITS. A árvore de consenso de bootstrap inferida a partir de 1000 repetições. Análises foram realizadas no MEGA 6. *Gelasinospora udagawae* (AB640864) foi utilizado como outgroup.



Através da matriz de divergência observa-se que o isolado MGSS 62 apresentou 0 % de distância genética com os isolados de *N. oryzae* oriundos de arroz e uma divergência genética bastante elevada em relação aos isolados de *N. oryzae* patogênicos a outros hospedeiros de (*Dendrobium candidum* - 4,8 %), (*Triticum aestivum* - 4,3 %), (*Arundo donax* - 4,3 %) e com relação a espécie *N. sphaerica* 2,7 % (Tabela 19).

Os resultados da árvore filogenética (Figura 73) e da Matriz de divergência genética (Tabela 19) sugerem que há uma especialização de *N. oryzae* em relação a cultura do arroz, por isso houve uma divergência elevada e a formação de clados separados entre os isolados oriundo de *Oryza sativa* e os isolados de *N. oryzae* oriundos de outros hospedeiros.

**Tabela 19.** Matriz de divergência genética através do gene ITS para as espécies do gênero *Nigrospora*.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
<b>1 MGSS 62</b>	-								
2 <i>Nigrospora oryzae</i> HBN	<b>0,0</b>	-							
3 <i>Nigrospora oryzae</i> HN-21	<b>0,0</b>	0,0	-						
4 <i>Nigrospora oryzae</i> F12-F	4,8	4,8	4,8	-					
5 <i>Nigrospora oryzae</i> SMCD.043	4,3	4,3	4,3	1,6	-				
6 <i>Nigrospora oryzae</i> CBS_113884	4,3	4,3	4,3	1,6	0,0	-			
7 <i>Nigrospora sphaerica</i> 788-3-3-1	2,7	2,7	2,7	2,1	1,6	1,6	-		
8 <i>Nigrospora sphaerica</i> CY108	2,7	2,7	2,7	2,1	1,6	1,6	0,0	-	
9 <i>Gelasinospora udagawae</i>	23,7	23,7	23,7	23,0	22,3	22,3	20,2	20,2	-

Sangjoon et al., (2011) analisando os fungos filamentosos que se encontravam em palhas de arroz deixadas nas áreas de cultivo de 11 locais na Coréia do Sul confirmou morfológicamente e molecularmente – através da região ITS, 25 espécies e 16 gêneros. Dentre as espécies estava *N. oryzae*, que na árvore filogenética apresentou altos valores de bootstrap.

Espécies de *Nigrospora* vêm sendo encontradas também convivendo endofiticamente em tecidos de plantas como verificou Cosoveanu et al. (2016) em várias espécies vegetais do gênero *Artemisia*, onde isolou fungos filamentosos e através da região ITS identificou os isolados em duas espécies: *Nigrospora oryzae* e *Nigrospora sphaerica* além de outros 10 gêneros. Wang et al. (2011) também encontraram o gênero *Nigrospora* convivendo endofiticamente com o coral *Echinogorgia rebekka* e confirmou o gênero através da análise filogenética utilizando a região ITS. Assim como Rathod et al. (2014) que isolaram *N. oryzae* da planta medicinal *Emblica officinalis* (Amla) e constaram que este produz Griseofulvina, um composto que demonstrou atividade contra bactérias humanas e fungos patogênicos.

O isolado MGSS 62 foi obtido de folha de arroz com manchas, em uma área produtora do município de Arari-MA. O gênero *Nigrospora* também já foi identificado como causador de doenças em batata *Solanum tuberosum* (LOUIS et al., 2014), *Dendrobium candidium* (WU et al., 2014), *Arundo donax* (WIDMER et al., 2006), *Phoenix dactylifera* (ABASS et al., 2014).

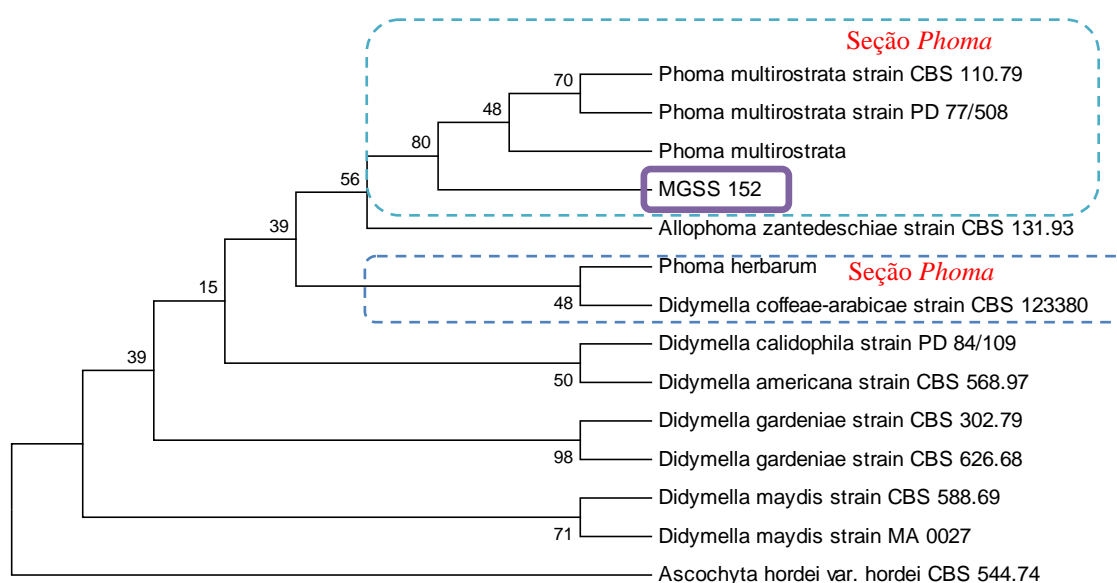
Neste estudo a região do gene ITS foi eficiente na separação em nível de espécie do isolado de *N. oryzae*. Resultado semelhantes obtiveram Rathod et al., (2014), Sangjoon et al. (2011), Cosoveanu et al. (2016).

### Análise filogenética de espécies do gênero *Phoma*.

Realizou-se a análise filogenética para Máxima Verossimilhança (ML) com evolução nucleotídica K2 e 1000 repetições para o isolado classificado morfologicamente como pertencente ao gênero *Phoma* - MGSS 152, comparando-os com as sequências do Genbank.

Ao analisar as relações filogenéticas do isolado MGSS 152 através da região ITS observou que este se agrupou com linhagens da espécie *Phoma multirostrata* com um clado de valores de significância moderada de 80 % de bootstrap (Figura 74).

**Figura 74.** Árvore filogenética de Máxima Verossimilhança (ML) do gênero *Phoma* baseado no modelo Kimura 2 parâmetros para o gene ITS. A árvore de consenso de bootstrap inferida a partir de 1000 repetições. Análises foram realizadas no MEGA 6. *Aschochyta hordei* var. *hordei* (GU237887) foi utilizado como outgroup. *Didymella* – fase *sexuada* (Teleomorfo), *Phoma* - fase *assexuada* (Anamorfo).



A representação da divergência genética através da matriz revela que o isolado MGSS 152 apresentou uma distância de 3,9 % em relação às sequências de DNA das linhagens de *Phoma multirostrata*. Com relação a outras espécies do gênero estudadas e o isolado MGSS 152 a divergência genética variou entre 6,3 e 8,7 % (Tabela 20).

**Tabela 20.** Matriz de divergência genética através do gene ITS para as espécies do gênero *Phoma*.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1 <b>MGSS_152</b>														
2 <i>Phoma_herbarum</i>	8,7													
3 <i>Phoma_multirostrata</i>	<b>3,9</b>	6,3												
4 <i>Phoma_multirostrata</i>	<b>3,9</b>	5,7	0,6											
5 <i>Phoma_multirostrata</i>	<b>3,9</b>	5,7	0,6	0,0										
6 <i>Didymella_calidophila</i>	7,5	4,5	3,9	3,4	3,4									
7 <i>Didymella_coffeae-arabicae</i>	6,9	3,4	5,1	4,5	4,5	2,2								
8 <i>Didymella_americana</i>	6,9	4,0	3,4	2,8	2,8	0,6	1,7							
9 <i>Didymella_gardeniae</i>	8,7	6,3	5,1	4,5	4,5	2,8	4,0	2,2						
10 <i>Didymella_gardeniae</i>	8,7	6,3	5,1	4,5	4,5	2,8	4,0	2,2	0,0					
11 <i>Didymella_maydis</i>	7,5	4,5	3,9	3,4	3,4	1,1	2,2	0,6	2,8	2,8				
12 <i>Didymella_maydis</i>	7,5	4,5	3,9	3,4	3,4	1,1	2,2	0,6	2,8	2,8	0,0			
13 <i>Allophoma_zantedeschiae</i>	6,3	6,3	4,5	4,0	4,0	5,1	4,0	4,5	6,3	6,3	5,1	5,1		
14 <i>Ascochyta_hordei_var._hordei</i>	13,9	10,7	10,0	9,4	9,4	8,2	9,4	7,5	8,8	8,8	6,9	6,9	10,1	

A identificação morfológica de *Phoma* é bastante problemática e da origem a muitos erros. Aveskamp et al. (2009) identificaram isolados da seção *Peyronellaea* dentro do gênero *Phoma* através da observação morfológica e caracterização molecular e classificou cinco novas espécies que estavam preservados em coleções de culturas sob nomes de espécies incorretos. Portanto, as técnicas de caracterização molecular foram empregadas, o que provou ser a melhor opção para a identificação e estudo das variações genéticas entre fungos deste gênero (AVESKAMP et al., 2008).

Assim como neste trabalho que houve elevada distância genética entre sequências da *P. multirostrata*, Tiwari et al. (2013) encontraram elevada distância entre sequências da espécie *Phoma tropica*, o que mostra uma alta variabilidade genética. Ao observar na figura 74 as espécies pertencentes à seção *Phoma* da qual está inserida a espécie *P. multirostrata* forma um grupo parafilético.

A região ITS foi eficiente na separação das espécies do gênero *Phoma* e vem sendo utilizada por diversos pesquisadores para investigar as relações filogenéticas do referido gênero (IRINYI et al., 2006; AVESKAMP et al. 2009; LAWREY et al., 2012; TIWARI et al., 2013).

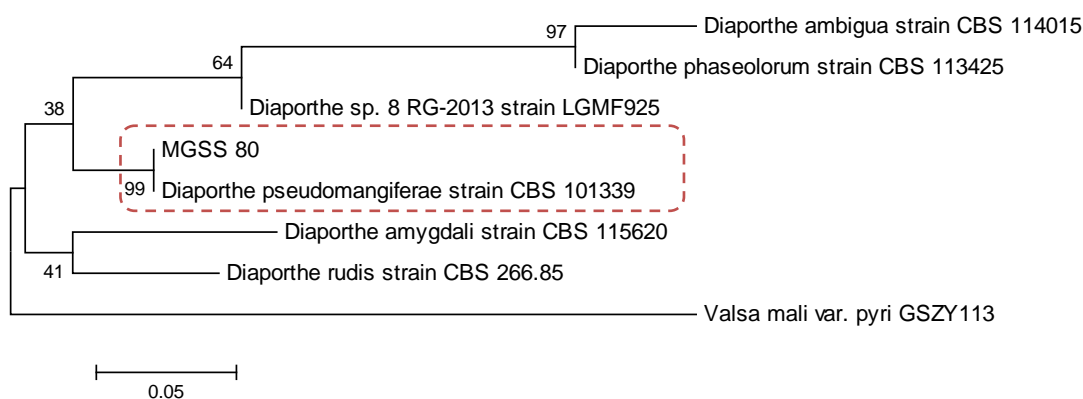
O isolado MGSS 152 foi obtido de folhas de alface com manchas. Na Itália houve o primeiro registro da espécie de *Phoma tropica* patogênico na cultura da alface (GARIBALDI et al. 2012), na Austrália foi relatado *Phoma multirostra* causando manchas foliares em coentro (GOLZAR et al. 2015). Até o presente momento, ainda não havia sido encontrados relatos de *Phoma multirostrata* causando doenças em alface no Brasil.

### **Análise filogenética de espécies do gênero *Phomopsis***

Foi realizada a construção das relações filogenéticas para o isolado MGSS 80 e espécies do gênero *Phomopsis* para a Máxima Verossimilhança (ML) com evolução nucleotídica (Kimura 2 parâmetros) K2 e 1000 repetições.

O isolado MGSS 80 formou um clado altamente consistente com valores de 99 % de bootstrap com a espécie *Diaporthe pseudomangiferae* (anamorfo: *Phomopsis pseudomangiferae*) estirpe CBS 101339 isolados de *Mangifera indica* na Republica Dominicana (Figura 75).

**Figura 75.** Árvore filogenética de Máxima Verossimilhança (ML) do gênero *Phomopsis* baseado no modelo Kimura 2 parâmetros para o gene ITS. A árvore de consenso de bootstrap inferida a partir de 1000 repetições. Análises foram realizadas no MEGA 6. *Valsa mali* var. *pyri* (GU174589) foi utilizado como outgroup. *Diaporthe*- fase sexuada (Teleomorfo), *Phomopsis*- fase assexuada (Anamorfo).



A representação da matriz de divergência genética mostra que a distância entre o isolado MGSS 80 e as sequências depositadas no Genbank do gênero *Phomopsis* foi de 0% para espécie *Diaporthe pseudomangiferae*. Já em relação às outras espécies a divergência genética foi mais elevada variando entre 8 e 15,5 % (Tabela 21).

**Tabela 21.** Matriz de divergência genética através do gene ITS para as espécies do gênero *Phomopsis*.

	1	2	3	4	5	6	7	8
<b>1 MGSS_80</b>	-							
2 <i>Diaporthe ambigua</i> CBS 114015	15,5	-						
3 <i>Diaporthe phaseolorum</i> CBS 113425	14,9	4,1	-					
4 <i>Diaporthe amygdali</i> CBS 115620	11,4	13,7	15	-				
5 <i>Diaporthe rudis</i> CBS 266.85	9,0	17,5	18,2	10,2	-			
6 <i>Diaporthe pseudomangiferae</i> CBS 101339	<b>0,0</b>	15,5	14,9	11,4	9,0	-		
7 <i>Diaporthe</i> sp. 8 LGMF925	8,0	13,8	9,6	10,8	12,0	8,0	-	
8 <i>Valsa mali</i> var. <i>pyri</i> GSZY113	19,3	22	22	18,6	18,6	19,3	20	-

Diante dos resultados dessa pesquisas esta espécie *Diaporthe pseudomangiferae* tem seu primeiro relato associados a lesões foliares em roseiras no Brasil e no mundo. Esta espécie foi registrada causando lesões em cascas de frutos de manga no México e Republica Dominicana (GOMES et al., 2013) e em inflorescências desta mesma espécie, causando podridão e aborto das flores sendo registrados em campos de germoplasma de Manga, da Universidade da Estação Experimental de Puerto Rico, em Juana Diaz, Porto Rico (SERRATO-DIAZ et al., 2014).

Com este relatol a espécie *D. pseudomangiferae* encontra-se comum a todo continente Americano (Brasil, México, República Dominicana e Porto Rico) e não

havendo relatos em países de outros continentes. Por outro lado, trata-se de um novo patógeno a floricultura brasileira afetando as roseiras. O gênero *Diaporthe* inclui espécies fitopatogênicas em muitos hospedeiros lenhosos e herbáceos como soja (COSTAMILAN et al., 2008), Mandioca (BOAS, 2015); videira (*Vitis vinifera*) (NIEKERK et al., 2005), funcho (*Foeniculum vulgare*) (SANTOS; PHILLIPS, 2009), Amendoeira (*Prunus dulcis*) (DIOGO et al., 2010).

A região ITS utilizada para revelar as relações filogenéticas de espécies do gênero *Diaporthe/Phomopsis* e do isolado MGSS 80 neste trabalho foi eficiente. Segundo Diogo et al., (2010) a região ITS é indicado para distinguir espécies do gênero *Diaporthe* com interpretação da filogenia realizada com cuidado. Costamilan et al. (2008) estudando as relações filogenéticas através da região rDNA-ITS de isolados oriundos de soja doentes observaram que estes agruparam-se com sequências de *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora* apresentando valores significativos de 99 % pelo teste de bootstrap na construção da árvore filogenética. Já Udayanga et al. (2014) estudando a delimitação de espécies do Complexo *Diaporthe eres* concluiu que a filogenia através da região ITS tem resolução limitada dentro deste complexo, muitas vezes resultando em uma ramificação inconclusiva. Ao contrário do gene ITS, a árvore filogenética EF1- $\alpha$  claramente distinguiu as fronteiras entre as espécies.

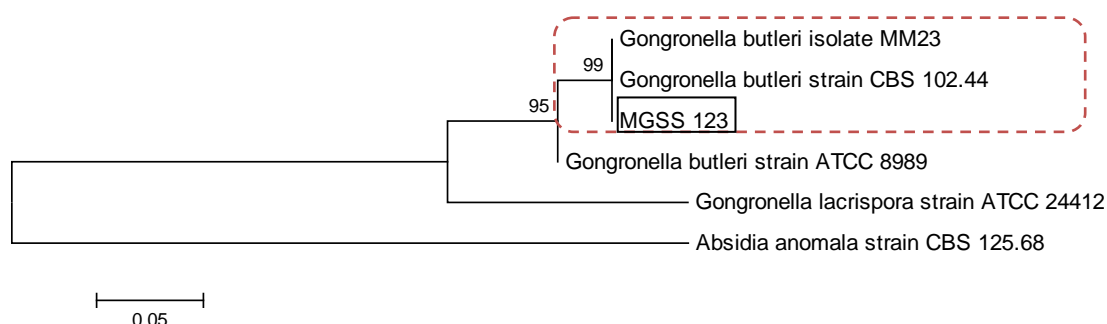
### **Análise filogenética de espécies do gênero *Gongronella***

Foi realizada a construção das relações filogenéticas para o isolado MGSS 123 e espécies do gênero *Gongronela* para a Máxima Verossimilhança (ML) com evolução nucleotídica (Tamura 3 parâmetros) T92 e 1000 repetições.

O isolado MGSS 123 formou um clado monofilético altamente consistente com valores de 99 % de bootstrap com a espécie *Gongronella butleri*, estirpes MM 23 e CBS 102.44 oriundos da Índia e Itália, respectivamente (Figura 76).



**Figura 76.** Árvore filogenética de Máxima Verossimilhança (ML) do gênero *Gongronella* baseado no modelo Tamura 3 parâmetros (T92) para o gene ITS. A árvore de consenso de bootstrap inferida a partir de 1000 repetições. Análises foram realizadas no MEGA 6. *Absidia anomala* (JN205815) foi utilizado como outgroup.



A representação da matriz de divergência genética revela que o isolado MGSS 123 apresentou 0 % de distância genética com as sequências das espécies *Gongronella butleri* estirpes MM23 e CBS 102.44 e 2,6 % para estirpe ATCC 8989 de mesma espécie anteriormente citada e 19,2 % *G. lacrispora*. (Tabela 22).

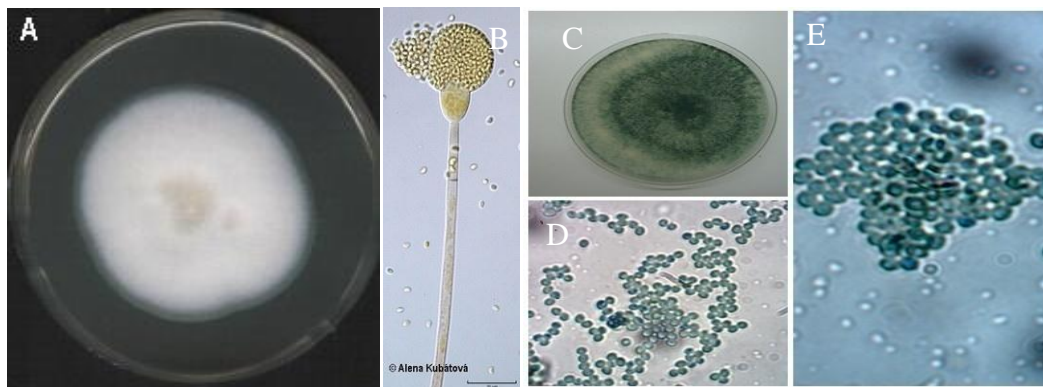
**Tabela 22.** Matriz de divergência genética através do gene ITS para as espécies do gênero *Gongronella*.

	1	2	3	4	5	6
1 <b>MGSS 123</b>	-					
2 <i>Gongronella butleri</i> MM23	<b>0,0</b>	-				
3 <i>Gongronella butleri</i> CBS 102.44	<b>0,0</b>	0,0	-			
4 <i>Gongronella butleri</i> ATCC 8989	2,6	2,6	2,6	-		
5 <i>Gongronella lacrispora</i> ATCC 24412	19,2	19,2	19,2	16,4	-	
6 <i>Absidia_anomala</i> CBS_125.68	57,9	57,9	57,9	55,0	61,8	-

Apesar destes resultados classificarem molecularmente o isolado MGSS 123 como *Gongronella butleri*, resultados divergentes foram obtidos através da caracterização morfológica do qual este isolado foi classificado como *Trichoderma* sp.

O isolado MGSS 123 apresentou conídios ovóides produzidos em série e acumulados no ápice das fiálides. Podem ser lisos ou ligeiramente rugosos com coloração variando do amarelo ao verde-escuro. A colônia apresentou crescimento rápido apresentando tons de verde (SAMUELS et al., 2015) (Figura 77).

**Figura 77.** Observação macro e micromorfológica de *Gongronella butleri* e do isolado MGSS 123 A – Colônia de *Gongronella butleri*. B. Esporângio. C) colônia do isolado MGSS 123; D) Conídios do isolado MGSS 123.; E) Concentração de Conídios de *Trichoderma* sp.



Fonte: KATEDRA BOTANIKY

Fonte: OLIVEIRA, 2016.

## 5– CONSIDERAÇÕES FINAIS

- A recuperação dos isolados demonstrou que os patógenos mostraram colônias com características micro-morfológicas normais *in vitro*, mostrando viabilidade e estado puro. Foram isolados de fungos pertencentes a 15 gêneros: *Fusarium*, *Colletotrichum*, *Pestalotiopsis*, *Curvularia*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Phomopsis*, *Gliocladium*, *Chaetomium*, *Trichoderma*, *Stemphylium*, *Corynespora*, *Chalara*, *Beauveria*, e *Isaria*.
- A documentação e informatização da Micoteca possibilitou a organização das informações relacionadas aos isolados e a criação do site que atende aos anseios de popularização das informações científicas.
- Estão conservados na Micoteca um total de 212 isolados de fungos fitopatogênicos em diferentes métodos de preservação.
- A caracterização morfológica de 51 isolados identificou 16 gêneros: *Fusarium*, *Colletotrichum*, *Alternaria*, *Lasiodiplodia*, *Neoscytalidium*, *Beauveria*, *Metarhizium*, *Nigrospora*, *Curvularia*, *Trichoderma*, *Phomopsis*, *Corynespora*, *Phoma*, *Chaetomium*, *Myrothecium*, *Cladosporium*.
- Foi possível sequenciar a região ITS1-5.8S-ITS2 do DNA ribossomal (rDNA) de 51 isolados de fungos fitopatogênicos depositados na Micoteca e elucidar suas relações filogenéticas para a maioria dos isolados a nível de espécie mostrando novos relatos de associação de fungos e hospedeiros como por exemplo, *Alternaria ochroleuca* e tomate (*Solanum lycopersicon*), *Chaetomium fuscum* e sementes de Vinagreira (*Hibiscus sabdariffa*), *Fusarium oxysporum* e Abacaxi (*Ananas comosus*) no Brasil, *Neoscytalidium dimidiatum* e Abacaxi (*A. comosus*), *Phoma multirostrata* e Alface (*Lactuca sativa*) no Brasil e *Phomopsis pseudomangiferae* e roseiras (*Rosa* sp.).
- A combinação da caracterização morfológica e caracterização molecular através do gene ITS (rDNA) foi eficiente e fundamental na identificação dos gêneros *Alternaria*; *Chaetomium*; *Myrothecium*; *Neoscytalidium*, *Nigrospora*, *Phomopsis*; *Metarhizium*; *Phoma*.
- Para os gêneros *Beauveria*, *Colletotrichum*, *Corynespora*, *Cladosporium*, *Lasiodiplodia* e *Trichoderma* é indicada a caracterização morfológica combinada com caracterização molecular através de dois ou mais genes.

- Para o gênero *Fusarium* a combinação caracterização morfológica e molecular foi eficiente na identificação das espécies *Fusarium oxysporum*, *Fusarium longipes*, *Fusarium sacchari*, *Fusarium equiseti* e para os isolados pertencentes ao complexo *Gibberella fujikuroi* deve-se utilizar uma abordagem multigênica.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABARENKOV, K.; NILSSON, R.H.; LARSSON, K.-H.; ALEXANDER, I.J.; EBERHARDT, U.; ERLAND, S.; HOILAND, K.; KJOLLER, R.; LARSSON, E.; PENNANEN, T.; SEN, R.; TAYLOR, A.F.S.; TEDERSOO, L.; URSING, B.M.; VRÅLSTAD, T.; LIIMATAINEN, K.; PEINTNER, U.; KÖLJALG, U. The UNITE database for molecular identification for fungi recent updates and future perspectives. **New Phytologist**, Oxford, v. 186, p. 281285, 2010.

ABASS, M. H.; MOHAMMED, N. H. Morphological, molecular and pathological study on *Nigrospora oryzae* and *Nigrospora sphaerica*, the leaf spot fungi of date palm. **Basra Journal for Date Palm Researches**, v. 13, n.1-2, p. 27-38, 2014.

ABREU, M. M. V.; TUTUNJI, V. L. Implantação e manutenção da coleção de culturas de microorganismos do UniCEUB. **Universitas Ciências da Saúde** – v.02 n.2, p. 236-25. 2004. Disponível em: <http://www.publicacoesacademicas.uniceub.br/index.php/cienciasaude/article/viewFile/535/356>. Acesso em 01 out. 2014.

AGBENIN, O. N.; OGUNLANA, M. O. Occurrence of *Fusarium* wilt and nematodes on Red Calyx Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) in northern Nigeria. **Journal of Plant Protection Research**, v. 46, n. 2, p. 117-121, 2006.

AGRIOS, G.N. **Plant Pathology**, 5<sup>o</sup> ed., San Diego. Elsevier Academic Press., 2005, 948p.

AGGARWAL, R.; KHARBIKAR, L. L.; SHARMA, S.; GUPTA, S.; YADAV, A. Phylogenetic relationships of *Chaetomium* isolates based on the internal transcribed spacer region of the rRNA gene cluster. **African Journal of Biotechnology**, Vol. 12, n.9, pp. 914-920, 2013

AHMED, S. A. et al. Chaetomium-like fungi causing opportunistic infections in humans: a possible role for extremotolerance. **Fungal Diversity**, n. 76, p. 11-26, 2016. doi 10.1007/s13225-015-0338-5

ALVES, A. et al. Morphological and molecular data reveal cryptic speciation in *Lasiodiplodia theobromae*. **Fungal Diversity**, v. 28, p. 1-13, 2008.

ALVES, L. F. A. et al. Ocorrência de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. em Adultos de Cascudinho (*Alphitobius diaperinus*) (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae) em Aviários Comerciais em Cascavel, PR. **Neotropical Entomology**, v. 33, n. 6, p. 793-795, 2004.

AMUSA, N. A.; ADEGBITE, A. A.; OLADAPO, M. O. Vascular wilt of Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L. var. *sabdariffa*) in the Humid Forest region of south-western Nigeria. **Plant Pathology Journal**, v. 4, n. 2, p. 122-125, 2005.

APARECIDO, C.C. et al. Avaliação da viabilidade de culturas fúngicas preservadas pelos métodos de castellani (água destilada) e liofilização. **Biológico**, São Paulo, v.69, n.1, 2007. p.5-8.

- APARECIDO, C.C.; EGYDIO, A.P.M.; FIGUEIREDO, M.B. Avaliação de três diferentes métodos utilizados na Micoteca do Instituto Biológico de São Paulo para preservação de fungos fitopatogênicos. **Summa Phytopathologica**, v.27, p.421-424, 2001.
- ARANTES, A. M. V. T.; CORREIA, A. C. B. Diversidade de Fungos Associados a *Parlatoria ziziphus* (Lucas) (Hemiptera: Diaspididae) em Citros. **An. Soc. Entomol. Brasil**, v. 28, n. 3, p. 477-483, 1999.
- ARRUDA, M. C. C.; FERREIRA, M. A. S. V.; MILLER, R. N. G.; RESENDE, M. L. V.; FELIPE, M. S. S. Nuclear and mitochondrial rDNA variability in *Crinipellis perniciosus* from different geographic origins and hosts. **Mycological Research**, Cambridge, v. 107, p. 25-37, 2003.
- ASGARI, B.; ZARE, R. The genus *Chaetomium* in Iran, a phylogenetic study including six new species. **Mycologia**, v. 103, n. 4, p. 863–882, 2011. doi: 10.3852/10-349
- AVESKAMP, M. M. et al. DNA phylogeny reveals polyphyly of *Phoma* section *Peyronellaea* and multiple taxonomic novelties. **Mycologia**, v. 101, n. 3, p. 363-382, 2009. doi: 10.3852/08-199
- AVESKAMP, M.M.; GRUYTER, J.; CROUS, P.W. Biology and recent developments in the systematics of *Phoma*, a complex genus of major quarantine significance. **Fungal Diversity**, v. 31, p.1-18, 2008.
- BAILEY, J.A.; O'CONNELL, R.J.; PRING, R.J.; NASH, C.; Infection Strategies of *Colletotrichum* Species. In: BAILEY, J.A.; JEGGER, M.J. (Eds.) **Colletotrichum: Biology, Pathology and Control**. CAB International, Wallingford, UK, 1992. pp.88-119.
- BANERJEE, D. et al. An endophytic *Myrothecium inundatum* producing volatile organic compounds. **Mycosphere**, v. 1, n. 3, p. 229-240, 2010.
- BARKER, K. **Manual de iniciação científica em laboratórios de pesquisas biomédicas**. Porto Alegre: Artmed, 2002. 474 p.
- BARNETT, H. L.; HUNTER, B. B. **Illustrated genera of imperfect fungi** (3<sup>a</sup> ed). Minneapolis: Burgess Publishing Company, 1998.
- BEDENDO, I. P. Murchas Vasculares. In: L. Amorim ; J.A.M. Rezende; A. Bergamin Filho. (Org.). **Manual de Fitopatologia : Princípios e Conceitos**. IV ed. São Paulo: Ceres, v. I, p. 451-466, 2011.
- BELLEMAIN, E.; CARLSEN, T.; BROCHMANN, C.; COISSAC, E.; TABERLET, P.; KAUSERUD, H. ITS as an environmental DNA barcode for fungi: an in silico approach reveals potential PCR biases. **BMC Microbiol.** n.10, p.189, 2010.
- BEN, H. et al. New Host Record of *Myrothecium roridum* Causing Leaf Spot on *Abutilon megapotamicum* from China. **Journal of Phytopathology**, short communication, p. 1-4, 2015. doi: 10.1111/jph.12439

BENSCH, K. et al. Species and ecological diversity within the *Cladosporium cladosporioides* complex (*Davidiellaceae*, *Capnodiales*). **Studies in Mycology**, v. 67, pp. 1–94, 2010.

BENSCH, K. et al. The genus *Cladosporium*. **Studies in Mycology**, v.72, p.1-401, 2012. doi:10.3114/sim0003

BERBEE, M.L.; TAYLOR, J.W. From 18S ribosomal sequence data to evolution of morphology among the fungi. *Canadian Journal of Botany*, v.73, p.S677-S683, 1995.

BISCHOFF, J. F.; REHNER, S. A.; HUMBER, R. A. A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage. **Mycologia**, v. 101, n. 4, p. 512-530, 2009. doi: 10.3852/07-202

BOAS, S. A. V. **Identificação de fontes de resistência e espécies de fungos e oomicetos causadores de podridão radicular em mandioca**. 2015. 96 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias), Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas - BA, 2015.

BONDE, S. R.; GADE, A. K.; RAI, M. K. Genetic Variations among ten isolates of *Fusarium equiseti* (Corda) Saccardo isolated from fruits and vegetables. **Austin Journal Biotechnology & Bioengineering**, v. 1, n. 5, p. 1-5, 2014.

BOOTH, C. The Genus *Fusarium*, **Commonwealth Mycological Institute**, Kew, Surrey, England, p.237, 1971.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Comissão Nacional de Biodiversidade. **Deliberação CONABIO nº 53, de 26 de Agosto de 2008**. Disponível: [http://www.mma.gov.br/estruturas/conabio/arquivos/deliberacao\\_53\\_ctpcoleoes\\_15.pdf](http://www.mma.gov.br/estruturas/conabio/arquivos/deliberacao_53_ctpcoleoes_15.pdf). Acessado em: 23/05/2014.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **Instrução Normativa nº 160 de 27 de abril de 2007**. Instruir o Cadastro Nacional de Coleções Biológicas (CCBIO). Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 30 de abr. 2007.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Secretaria de Biodiversidades e Florestas. **A Convenção sobre a Diversidade Biológica**. Brasília, DF, 2000.

BUENO, C.J. Métodos de preservação para fungos fitopatogênicos habitantes do solo. **Pesquisa & Tecnologia**, vol. 3, n.2, Jul-Dez 2006.

CANHOS, D. A. L.; CANHOS, V. P.; SOUZA, S. Coleções biológicas e sistemas de Informação. In: Diretrizes e estratégias para a modernização de coleções biológicas brasileiras e a consolidação de sistemas integrados de informação sobre biodiversidade / Adriano B. Kury ... [et al.]. – Brasília :Centro de Gestão e Estudos Estratégicos : Ministério da Ciência e Tecnologia, 2006.

CANHOS, D. A. L.; SOUZA, S.; GIOVANNI, R.; SIQUEIRA, M. F.; MARINO, A.; FONSECA, R. L.; CRUZ, B. A.; CANHOS, V. P. Estudo de Caso. Sistemas de Informação On line: A experiência do CRIA. Junho/2005. Disponível em: [www.cgee.org.br/atividades/redirect.php?idProduto=1757](http://www.cgee.org.br/atividades/redirect.php?idProduto=1757). Acessado em: 15/01/2015.

CARBONE, I.; KOHN, L. Ribossomal DNA sequence divergence within transcribed spacer 1 of the sclerotiniaceae. **Mycological**, v.85, p.415-427, 1997.

CEFAR EM NOTÍCIAS. Procedimentos para a conservação de microrganismos. Informativo Cefar de Microbiologia. Ano III - Ed. 13 - Jan/Fev/2006 – Circulação Bimestral.

CHALFOUN, S. M. et al., Seletividade de fungicidas cúpricos e sistêmicos sobre o fungo *Cladosporium cladosporioides* em cafeeiro. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 33, n. 1, p. 93-95, 2007.

CHEN, S. et al. Characteristics of *Lasiodiplodia theobromae* from Rosa rugosa in South China. **Crop Protection**, v. 79, p. 51-55, 2016a. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro>.

CHEN, S. et al. Phylogeny, Morphology, Distribution, and Pathogenicity of Botryosphaeriaceae and Diaporthaceae from English Walnut in California. **Plant Disease**, v. 98, p. 636-652, 2014. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-07-13-0706-RE>

CHEN, Y. et al. Mycosphere Essays 2. *Myrothecium*. **Mycosphere**, v. 7, n. 1, p. 64-80, 2016b. doi: 10.5943/mycosphere/7/1/7

CORREIA, K. C. et al., Phylogeny, distribution and pathogenicity of *Lasiodiplodia* species associated with dieback of table grape in the main Brazilian exporting region. **Plant Pathology**, v. 65, p. 92-103, 2016. doi: 10.1111/ppa.12388

COSOVEANU, A. et al. Fungi as endophytes in Chinese *Artemisia* spp.: juxtaposed elements of phylogeny, diversity and bioactivity. **Mycosphere**, v. 7, n. 2, p. 102-117, 2016. doi: 10.5943/mycosphere/7/2/2

COSTA, C. P.; FERREIRA, M. C. Preservação de microrganismos: revisão. Revista de Microbiologia, São Paulo, v.22, n. 3, p. 263-268, 1991.

COSTA, E. C.; TEIXEIRA, M. F. S.; DANTAS, T. V. M.; MELO, V. S. P.; ARAUJO, S. A. C.; ROLIM, B. N. Princípios da estocagem e preservação de amostras microbiológicas. Ciência Animal, Goiânia, v. 19, n. 2, p.111-122, 2009. Disponível em: [http://www.uece.br/cienciaanimal/dmdocuments/artigo10\\_2009.pdf](http://www.uece.br/cienciaanimal/dmdocuments/artigo10_2009.pdf). Acesso em 19/04/2014.

COSTAMILAN, L. M. et al., First report of *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora* infecting soybean plants in Brazil. **Tropical Plant Pathology**, v. 33, n. 5, p. 381-385, 2008.

CROUS, P. W. et al. Phylogenetic lineages in the *Botryosphaeriaceae*. **Studies in mycology**, v. 55, p. 235-253, 2006.



CRIA – Centro de Referência em Informação Ambiental. Disponível em: <http://www.cria.org.br/>. Acesso em: 04/04/2015

DHINGRA, O. D.; SINCLAIR, J. B. **Basic plant pathology methods**. 2. ed. Boca Raton: CRC Press, 1995. 434 p.

DIOGO, E. L. F.; SANTOS, J. M.; PHILLIPS, A. J. L. Phylogeny, morphology and pathogenicity of *Diaporthe* and *Phomopsis* species on almond in Portugal. **Fungal Diversity**, v. 44, p. 107-115, 2010. doi: 10.1007/s13225-010-0057-x

DIXON, L. J. et al. Host Specialization and Phylogenetic Diversity of *Corynespora cassiicola*. **Phytopathology**, v. 99, n. 9, p. 1015- 1027, 2009. doi:10.1094/PHYTO-99-9-1015 doi: 10.1007/s13225-014-0297-2.

DUBEY, R.; SENGUPTA, S. Some New Host Records of Fungi from India. **Journal on New Biological Reports**, v. 4, n. 2, p. 177-179, 2015.

ELLIS, M. B., 1971. Dematiaceous Hyphomycetes. **Commonwealth Mycological Institute Kew, Surrey England**: 1971. 608 p.

EMBRAPA. Plataforma Nacional de Recursos Genéticos. (Brasília, DF). Coleções de microrganismos fitopatogênicos 2007. Disponível em: <<http://plataformarg.cenargen.embrapa.br/pnrg/rede-microbiana/projetos-componentes/projeto-componente-4>> Acesso em: 28.02.2015.

ESTEVE-ZARZOSO, B.; BELLOCH, C.; URUBURU, F.; QUEROL, A. Identification of yeasts by RFLP analysis of 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.49, p.329-337, 1999.

FERNANDES, E. K. K. et al. Genetic diversity among Brazilian isolates of *Beauveria bassiana*: comparisons with non-Brazilian isolates and other *Beauveria* species. **Journal of Applied Microbiology**, v.107, p. 760–774, 2009. doi:10.1111/j.1365-2672.2009.04258.x

FERREIRA, A. P. S. et al. First Report of *Curvularia eragrostidis* Causing Postharvest Rot on Pineapple in Brazil. **Plant Disease**, v. 98, n. 9 p. 1277, 2014. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-03-14-0288-PDN>

FIGUEIREDO, M.B.; PIMENTEL, P.V.C. Primeiro catálogo da Micoteca da Seção de Micologia Fitopatológica, Instituto Biológico de São Paulo. **Arquivo do Instituto Biológico**, São Paulo, v.44, n.4, p.247-256, 1977.

FINATTI, D.; APARECIDO, C.C. Caracterização fisiológica e comparação de diferentes métodos na Preservação em Laboratório de isolados do gênero *Verticillium*. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.76, n.4, p.715-720, out./dez., 2009.

FOULY, H.; WILKINSON, H.T.; CHEN, W. Restriction analysis of internal transcribed spacers and the small subunit gene of ribosomal DNA among four *Gaeumannomyces* species. **Mycologia**, v.89, p.590-597, 1997.

- FOURIE, G. et al. Evolutionary relationships among the *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense vegetative compatibility groups. **Applied and environmental microbiology**, v. 75, n. 14, p. 4770-4781, 2009. doi:10.1128/AEM.00370-09
- FUNGARO, M. H. P. PCR na micologia. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v.14, p.12-16, 2000.
- FURTADO, D. C. M. et al., Ocorrência de *Curvularia lunata* e *Curvularia eragrostidis* em *Tapeinochilus ananassae* no Estado de Alagoas. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 33, n. 2, p. 201, 2007.
- GARGAS, A.; DEPRIEST, P.T. A nomenclature for fungal PCRprimers with examples from intron-containing SsurDNA. **Mycologia**, v.88, n.5, p.745-748, 1996.
- GARIBALDI, A. et al. First report of Leaf Spot of Lettuce (*Lactuca sativa* L.) caused by *Phoma tropica* in Italy. **Plant Disease**, v. 96, n.9, p. 1380, 2012. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-04-12-0394-PDN>
- GHERNA, R. L. Preservation. Manual of Methods for General Microbiology. **American Society for Microbiology**. Washington. 1981. 524 p
- GNANASALOMI, D. V. V.; GNANADOSS, J. J. **Research in Biotechnology**, v. 4, n. 5, p. 01-08, 2013.
- GOLZAR, H. et al. First report of *Phoma multirostrata* in Australia. **Australasian Plant Disease: notes**, v. 10, n. 8, p. 1-2, 2015. doi: 10.1007/s13314-015-0161-6
- GOMES, R. R. et al. *Diaporthe*: a genus of endophytic, saprobic and plant pathogenic fungi. **Persoonia**, v. 31, p. 1-41, 2013. <http://dx.doi.org/10.3767/003158513X666844>
- GONÇALVES, R.C.; ALFENAS, A.C.; MÁFIA, R.G. Armazenamento de microorganismos em cultura com ênfase em fungos fitopatogênicos. In: ALFENAS, A.C.; MÁFIA, R.G.(Orgs.) **Métodos em Fitopatologia**, 2 ed., Viçosa, Ed. UFV, 2016.
- GONZALEZ, M. Análise das restrições de acesso a dados de espécies ameaçadas, previstas em políticas de coleções biológicas científicas brasileiras, à luz do direito ambiental e da ciência da informação. **Ciência da Informação**. Brasília, DF, v. 39 n. 1, p.33-50, jan./abr., 2010.
- GONZALEZ, M. Quantificação de Custo e Tempo no Processo de Informatização das Coleções Biológicas Brasileiras: A Experiência do Herbário do Instituto de Pesquisas Jardim Botânico Do Rio De Janeiro. **Rodriguésia**, v. 60, n. 3, p. 711-721, 2009.
- GUARRO, J.; GENE, J.; STCHIGEL A. M. Development in fungal taxonomy. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 12, p. 454-500, 1999.

HALLUIN, A.P. The Biological Deposition Requirement. In: Hunter-Cevera, J. & Belt, A. (eds) **Maintaining Cultures for Biotechnology and Industry**. Academic Press, London, pp 1-13, 1996.

HASSAN, N.; SHIMIZU, M. HYAKUMACHI. Occurrence of Root Rot and Vascular Wilt Diseases in Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) in Upper Egypt. **Mycobiology**, v. 42, n. 1, p. 66-72, 2014. <http://dx.doi.org/10.5941/MYCO.2014.42.1.66>

HILL, A. L. et al. Genetic variability among isolates of *Fusarium oxysporum* from sugar beet. **Plant Pathology**, v. 60, p. 496-505, 2011. doi: 10.1111/j.1365-3059.2010.02394.x

HOAGLAND, R. E.; WEAVER M.A.; BOYETTE, C. D. Myrothecium verrucariu fungus; A bioherbicide and strategies to reduce its non-target risks. **Allelopathy Journal**, v. 19, n. 1, p. 179-192, 2007.

HOOG, G.S. de. The genera *Beauveria*, *Isaria*, *Tritirachium* and *Acrodontium* gen. nov. **Studies in Mycology**, n.1, setembro, 1972.

HUANG, S. et al. Morphology and Phylogeny of *Neoscytalidium orchidacearum* sp. nov. (Botryosphaeriaceae). **Mycobiology**, v. 44, n. 2, p. 79-84, 2016. <http://dx.doi.org/10.5941/MYCO.2016.44.2.79>

HUBÁLEK, Z. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. **Cryobiology**, New York, v. 46, p. 205-229, 2003.

IRINYI, L. et al. Studies of evolutionary relationships of *Phoma* species based on phylogenetic markers. In: 4th International Plant Protection Symposium at Debrecen University, 2006, Hungary. **Recent developments of IPM: Proceedings**. Debrecen University, Hungary, p. 99-113.

JEON, S. J.; NGUYEN, T. T. T.; LEE, H. B. Phylogenetic Status of an Unrecorded Species of *Curvularia*, *C. spicifera*, Based on Current Classification System of *Curvularia* and *Bipolaris* Group Using Multi Loci. **Mycobiology**, v. 43, n. 3, p. 210-217, 2015. <http://dx.doi.org/10.5941/MYCO.2015.43.3.210>

JIMENÉZ, J. V.; GRANADOS, X. M. Diagnosis of *Fusarium oxysporum* in the cultivation of pineapple *Ananas comosus* (L) Merr. **Net Journal of Agricultural Science**, Vol. 2, n. 3, pp. 107-112, 2014.

KIM et. al. Molecular and Morphological Identification of Fungal Species Isolated from *Bealmijang Meju*. **Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 21, n. 12, p. 1270-1279, 2011. <http://dx.doi.org/10.4014/jmb.1105.05013>

KUSAI, N. A. et al. Morphological and molecular characterization of *Curvularia* and related species associated with leaf spot disease of rice in Peninsular Malaysia. **Rendiconti Lincei Scienze Fisiche e Naturali**, v. 27, n. 2, p. 205-214, 2015. doi: 10.1007/s12210-015-0458-6

KVAS, M. et al. Diversity and evolution of *Fusarium* species in the *Gibberella fujikuroi* complex. **Fungal Diversity**, v. 34, p. 1-21, 2009.

LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C.; HEINS-VACARRI, E. M.; MELO, N. K. Tratado de Micologia Médica. 9. ed. São Paulo: Editora Savier, p. 1104, 2002.

LAWREY, J. D. et al. Phylogenetic placement of lichenicolous *Phoma* species in the Phaeosphaeriaceae (Pleosporales, Dothideomycetes). **Fungal Diversity**, v. 55, p. 195-213, 2012. doi: 10.1007/s13225-012-0166-9

LE GOFF, J. Memória. In: **Memória/ História**. Lisboa. Imprensa Nacional/ Casa da Moeda. Enciclopédia Einaudi. Vol. 1, p.11- 50, 1996.

LEAL-BERTOLI, S. C. M. O enfoque molecular na sistemática de fungos. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v.6, p.197-230, 1998.

LENGI, M. R.; NIAZMAND, A. R.; KIANOUSH, M. Genetic differences in *Alternaria alternata* isolates associated with brown spot in tangerine cultivars. **Science Asia**, v. 40, p. 263–267, 2014. doi: 10.2306/scienceasia1513-1874.2014.40.263

LESLIE, J. F.; SUMMERELL, B. A. **The *Fusarium* laboratory manual**. Ames: Blackwell, 2006, 388 p.

LIMA, N. B.; BATISTA, M. V. A.; MORAIS JÚNIOR; M.A. de; BARBOSA, M. A. G.; MICHEREFF, S.J.; HYDE, K. D.; CÂMARA, M. P. S. Five *Colletotrichum* species are responsible for mango anthracnose in northeastern Brazil **Fungal Diversity**, n. 61, p.75–88, 2013.

LIMA, N. Centros de Recursos Biológicos: novos desafios para as coleções de culturas. In: Nunes, M.L. & Bandarra, N.M. (eds) **Micologia, avanços no conhecimento: actas do Congresso Brasileiro de Micologia**. Universitária da UFPE, Recife, pp. 173-180. 2007.

LIU, T. et al. Comparative analysis of phylogenetic relationships, morphologies, and pathogenicities among *Curvularia lunata* isolates from maize in China. **Genetics and Molecular Research**, v. 14, n. 4, p. 12537-12546, 2015. doi: <http://dx.doi.org/10.4238/2015.October.16.21>

LOUIS, B. et al. Diversity of Ascomycetes at the potato interface: New devastating fungal pathogens posing threat to potato farming. **Plant Pathology Journal**, v.13, n.1, p. 18-27, 2014. doi: 10.3923/ppj.2014.18.27

LUBECK, I. et al Evaluation of *Metarhizium anisopliae* strains as potential biocontrol agents of the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* and the cotton stainer *Dysdercus peruvianus*. **Fungal ecology**, p. 78-88, 2008. doi:10.1016/j.funeco.2008.09.002

LYRA, M. C. C. P. et al. Characterization of *Metarhizium anisopliae* using amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA) and internal transcribed spacer (ITS) sequence analysis. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 101, p. 16635-16639, 2012. doi: 10.5897/AJB12.906

MACHADO, A. R. et al. New occurrences of Botryosphaeriaceae causing black root rot of cassava in Brazil. **Tropical Plant Pathology**, v. 39, n. 6, p. 464-470, 2014a

MACHADO, A. R.; PINHO, D. B.; PEREIRA, O. L. Phylogeny, identification and pathogenicity of the Botryosphaeriaceae associated with collar and root rot of the biofuel plant *Jatropha curcas* in Brazil, with a description of new species of *Lasiodiplodia*. **Fungal Diversity**, v. 67, p. 231-247, 2014b. doi: 10.1007/s13225-013-0274-1

MACHADO, D.F.M.; PARZIANELLO, F.R.; SILVA, A.C.F. da; ANTONIOLLI, Z. I. *Trichoderma* no Brasil: o fungo e o bioagente. **Revista de Ciências Agrárias** – Vol. 35, n.1, Cap.26, p.274-288, jan/jun. 2012.

MANFIO, G.P. Avaliação do Estado Atual do Conhecimento sobre a Diversidade Microbiana no Brasil. Projeto Estratégia Nacional de Diversidade Biológica. **Ministério do Meio Ambiente**. Secretaria de Biodiversidade e Florestas, Diretoria de Conservação da Biodiversidade. Campinas, SP, 2003.

MARINONI, L.; PEIXOTO, A. L. As coleções biológicas como fonte dinâmica e permanente de conhecimento sobre a biodiversidade. **Ciência e Cultura**, vol.62, n.3, São Paulo, p.54-57, 2010

MARQUES, M. W. et al. *Botryosphaeria*, *Neofusicoccum*, *Neoscytalidium* and *Pseudofusicoccum* species associated with mango in Brazil. **Fungal Diversity**, v. 61, p.195-208, 2013. doi: 10.1007/s13225-013-0258-1

MARTINS, M. K. **Variabilidade genética de isolados de Fusarium spp. e estudo da interação com a planta hospedeira**. 2005. 110 p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

McLAUGHLIN, D.J.; HIBBETT, D.S.; LUTZONI, F.; SPATAFORA, J.W.; VILGLAYS, R. The search for the fungal tree of life. *Trends in Microbiology*, Cambridge, v. 17, p. 488-497, 2009.

MEDEIROS, A. W. Acompanhamento de métodos de congelamento de bactérias. 2008. 32p. Trabalho de conclusão de curso (Bacharel em Biomedicina – Centro Universitário Feevale). Disponível em: <http://ged.feevale.br/bibvirtual/Artigo/Artigo AlineMedeiros.pdf>. Acesso em 08 out. 2013.

MENEZES, M. Aspectos Biológicos e Taxonômicos de Espécies do Gênero *Colletotrichum*. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônoma**, Recife, vol. 3, p.170-179, 2006.

MENEZES M.; ASSIS, SMP. **Guia prático para fungos fitopatogênicos**. 2ª. Ed. Recife PE. Imprensa Universitária, UFPRE, 2004.

MEYLING, N. V. et al. Diversity of *Beauveria* spp. isolates from pollen beetles *Meligethes aeneus* in Switzerland. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 109, p. 76-82, 2012. doi:10.1016/j.jip.2011.10.001

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. Convenção sobre Diversidade Biológica. Série Biodiversidade. Brasília, 2000.

MITCHELL, J.I.; ZUCCARO, A. Sequences, the environment and fungi. *Mycologist*, New York, v. 20, p. 62-74, 2006.

MOHD, M. H.; SALLEH, B.; ZAKARIA, L. Identification and Molecular Characterizations of *Neoscytalidium dimidiatum* Causing Stem Canker of Red-fleshed Dragon Fruit (*Hylocereus polyrhizus*) in Malaysia. **Journal of Phytopathology**, 2013. doi: 10.1111/jph.12146

MORGAN, C. A.; HERMAN, N.; WHITE, P. A.; VESEY, G. Preservation of microorganisms by drying – a review. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, [online], v.66, n. 2, p.183-193, aug. 2006. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16632005>. Acesso em 04/04/2014.

MYAMOTO-SHINOHARA, Y., IMAIZUMI, T.; SUKENOBE, J.; MARAKAMI, Y.; KAWAMURA, S.; KOMATSU, Y. Survival rate of microbes after freeze-drying and long-term storage. **Cryobiology**, v. 41, p. 251-255, 2000.

MYRAND; BUFFET; GUERTIN. Susceptibility of Cabbage Maggot Larvae (Diptera: Anthomyiidae) to Hypocreales Entomopathogenic Fungi, **Journal of Economic Entomology**, pp.1–11, 2015. doi: 10.1093/jee/tou0192015

NADARAJAH, K.; ALI, H. Z.; MUNI, N.M. The host pathogen interactions observed between *Fusarium* sp. F2 and Rice. **Plant Omics Journal**, v. 8, n. 6, p. 572-580, 2015.

NAKASONE KK, Peterson AW, Jong S. **Preservation and distribution of fungal cultures**. In: Mueller GM, Bills GF, Foster MS. Biodiversity of fungi, inventory and monitoring methods. 1st ed. San Diego: Elsevier Academic Press; 2004.

NAM, M. H. et al. *Cladosporium cladosporioides* and *C. tenuissimum* Cause Blossom Blight in Strawberry in Korea. **Mycobiology**, v. 43, n. 3, p 354-359, 2015. <http://dx.doi.org/10.5941/MYCO.2015.43.3.354>

NETTO, M. S. B. et al. Species of *Lasiodiplodia* associated with papaya stem-end rot in Brazil. **Fungal Diversity**, n. 67, p. 127-141, 2014. doi: 10.1007/s13225-014-0279-4

NEUFELD, P. M.; OLIVEIRA, P. C. Preservação de dermatófitos pela técnica da água destilada estéril. **Revista Brasileira Análises Clínicas**, São Paulo, [online], v. 40, n.3, p. 167-169, 2008. Disponível em: [www.sbac.org.br/pt/pdfs/rbac/rbac\\_40\\_03/01.pdf](http://www.sbac.org.br/pt/pdfs/rbac/rbac_40_03/01.pdf). Acesso em 04/02/2014.

NIEKERK, J. M. et AL. Reassessment of *Phomopsis* species on grapevines. **Australasian Plant Pathology**, v. 34, p. 27-39, 2005

NIRMALADEVI, D. et al. Molecular phylogeny, pathogenicity and toxigenicity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. **Scientific Reports**, v. 6, n. 21367, 2016. doi: 10.1038/srep21367.

NORHAYATI, M.; ERNEEZA M.H.; KAMARUZAMAN S. Morphological, pathogenic and molecular characterization of *Lasiodiplodia theobromae*: a causal pathogen of Black Rot disease on Kenaf seeds in Malaysia. **International Journal of Agriculture & Biology**, v. 18, n. 1, 2016. doi: 10.17957/IJAB/15.0065

O'DONNELL, K. et al. Phylogenetic analyses of *RPB1* and *RPB2* support a middle Cretaceous origin for a clade comprising all agriculturally and medically important fusaria. **Fungal Genetics and Biology**, v. 52, p. 20-31, 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fgb.2012.12.004>

OKUNOWO, W. O. et al. Occurrence and effectiveness of an indigenous strain of *Myrothecium roridum* Tode: Fries as a bioherbicide for water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) in Nigeria. **Biocontrol Science and Technology**, v. 23, n. 12, p. 1387-1401, 2013. <http://dx.doi.org/10.1080/09583157.2013.839981>

PAOLI, DE P. Biobanking in microbiology: from sample collection to epidemiology, diagnosis and research. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 29, p. 897- 910, 2005.

PASSADOR, M.M.; PIRES, G.C.C.; FINATTI, D.; APARECIDO C.C., FIGUEIREDO, M.B. Manutenção da viabilidade e patogenicidade de culturas mantidas na micoteca “Mário barreto figueiredo”. **Instituto Biológico**, São Paulo, v.72, n.1, p.51-55, jan./jun., 2010.

PHILLIPS, A. J. L. et al. The *Botryosphaeriaceae*: genera and species known from culture. **Studies in Mycology**, v. 76, p. 51-167, 2013. doi:10.3114/sim0021

PIMENTEL, C.P.V.; FIGUEIREDO, M.B. Métodos de preservação de fungos em meio de cultura. **Biológico**, São Paulo, v.55, n.1/2, p.27-33, 1989.

PINHO, D.B.; MACHADO, A.R.; FIRMINO, A.L. Princípios e Métodos para Identificação Molecular de fungos. In: : ALFENAS. A.C.; MÁFIA, R.G.(Orgs.) **Métodos em Fitopatologia**, 2 ed., Viçosa, Ed. UFV, 2016.

PIRES, G.C.C.; APARECIDO, C.C.; FINATTI, D. Preservação em laboratório de fungos filamentosos por longos períodos de tempo. **Divulgação Técnica.Biológico**, São Paulo, v.74, n.1, p.9-16, jan./jun., 2012.

PITOMBO, R.N.M. A liofilização como técnica de preservação de material de pesquisa. **Ciência e Cultura**, v.41, p.427-431, 1989.

PIYABOON, O.; UNARTNGAM, A.; UNARTNGAM, J. Effectiveness of *Myrothecium roridum* for controlling water hyacinth and species identification based on molecular data. **African Journal of Microbiology Research**, v. 8, n. 13, p. 1444-1452, 2014. Doi: 10.5897/AJMR2013.6214

PLAVIC, D. et al. *Lasiodiplodia gonubiensis* sp. nov., a new *Botryosphaeria* anamorph from native *Syzygium cordatum* in South Africa. **Studies in Mycology**, v. 50, p. 313-322. 2004.

PLAVIC, D. et al. Seven new species of the Botryosphaeriaceae from baobab and other native trees in Western Australia. **Mycologia**, v. 100, n. 6, p. 851–866, 2008. DOI: 10.3852/08-020

PORTER, T.M.; GOLDING, G.B. Are similarity- or phylogeny-based methods more appropriate for classifying internal transcribed spacer (ITS) metagenomic amplicons? **New Phytol.** n.192, pp. 775–782, 2011.

QI, Y. et al. Morphological and molecular analysis of genetic variability within isolates of *Corynespora cassiicola* from different hosts. **European Journal of Plant Pathology**, v. 130, p. 83-95, 2011. doi: 10.1007/s10658-010-9734-6

QUEZADO DUVAL, A. M. et. al. New hosts of *Myrothecium* spp. in Brazil and a preliminary *in vitro* assay of fungicides. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, p. 246- 252, 2010.

RAY, J. D. et al. First record of *Neoscytalidium dimidiatum* and *N. novaehollandiae* on *Mangifera indica* and *N. dimidiatum* on *Ficus carica* in Australia. **Australasian Plant Disease Notes**, v. 5, p. 48-50, 2010.

RATHOD; DAR; GADE; RAI. Griseofulvin Producing Endophytic *Nigrospora oryzae* from Indian *Embllica officinalis* Gaertn: a New Report. **Austin Journal of Biotechnology & Bioengineering**, v. 1, pp.1-5, 2014

REHNER, S. A.; BUCKLEY, E. A *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1- $\alpha$  sequences: evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps* teleomorphs. **Mycologia**, v. 97, n. 1, p. 84–98, 2005.

REHNER, S. A et al. Phylogeny and systematics of the anamorphic, entomopathogenic genus *Beauveria*. **Mycologia**, v.103, n.5, pp. 1055–1073, 2011.

RHODES, M. E. The preservation of pseudomonas under mineral oil. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, [online], v. 20, n. 1, p.108–118, apr. 1957. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.13652672.1957.tb04527.x/abstract>. Acesso em 13/03/2014.

RISTAINO, J.B.; MADRITCH, M.; TROUT, C.L.; PARRA, G. PCR amplification of ribossomal DNA for species identification in the plant pathogen genus *Phytophthora*. **Applied Environmental Microbiology**, v.63, n.3, p.948-954, 1998.

ROJAS, E. I. et al. *Colletotrichum gloeosporioides* s.l. associated with *Theobroma cacao* and other plants in Panamá: multilocus phylogenies distinguish host-associated pathogens from asymptomatic endophytes. **Mycologia**, v. 102, n. 6, p. 1318-1338, 2010. DOI: 10.3852/09-244



ROMEIRO, R. S. Preservação de culturas de bactérias fitopatogênicas. Material didático, [online], Laboratório de Bacteriologia de Plantas, Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, 2006. Disponível em: [www.ufv.br/dfp/bac/uni11.pdf](http://www.ufv.br/dfp/bac/uni11.pdf). Acesso em 15 out. 2013.

SAMUELS, G.J., CHAVERRI, P., FARR, D.F., & MCCRAY, E.B. *Trichoderma Online*, Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS, USDA. Disponível em: <http://nt.ars-grin.gov/taxadescriptions/keys/TrichodermaIndex.cfm>. Acessado em 02/02/2015

SANGJOON, L. et al. Rice Straw-Decomposing Fungi and Their Cellulolytic and Xylanolytic Enzymes. **Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 21, n. 12, p. 1322-1329, 2011. <http://dx.doi.org/10.4014/jmb.1107.07022>

SANKAR, N. R.; SREE, D. S. First report of leaf blight of money plant caused by *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler. **International Journal of Current Research**, v. 33, n. 6, p.063-064, 2011. ISSN: 0975-833X

SANTOS, J. M.; PHILLIPS, A. J. L. Resolving the complex of *Diaporthe* (*Phomopsis*) species occurring on *Foeniculum vulgare* in Portugal. **Fungal Diversity**, v. 34, p. 111-125, 2009.

SARDINHA, D. H. S. et al. Fungos e nematóides fitopatogênicos associados ao cultivo de flores tropicais em São Luís - MA. **Summa Phytopathologica**, v.38, n.2, p.159-162, 2012.

SBM – SOCIEDADE BRASILEIRA DE MICROBIOLOGIA. Recomendações para Operação e Gerenciamento de Coleções de Culturas de Microrganismos. SETTE, I.D. (Coord.). 2006.

SCHOCH, C.L.; SEIFERT, K.A.; HUHNDORF, S.; ROBERT, V.; SPOUGE, J.L.; LEVESQUE, C.A.; CHEN, W.; FUNGAL BARCODING CONSORTIUM. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proc Natl Acad Sci U S A* (In press. doi:10.1073/pnas.1117018109), 2012.

SHINOMOTO et al. Pathogenic and genetic variation among isolates of *Corynespora cassiicola* in Japan. **Plant Pathology**, v.60, pp. 253-260, 2011.

SERRATO-DIAZ, L. M.; RIVERA-VARGAS, L. I.; FRENCH-MONAR, R. D. First report of *Diaporthe pseudomangiferae* causing inflorescence rot, rachis canker, and flower abortion of Mango. **Plant Disease**, v. 98, n. 7, p. 10043-10043, 2014. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-12-13-1223-PDN>

SICOL - Sistema de Informação de Coleções de Interesse Biotecnológico, 2014. Disponível em: <http://sicol.cria.org.br>. Acessado em: 02/03/2014.

SILVA, A.C. Isolamento de fungos endofíticos de milho (*Zea mays*). Piracicaba, 1997.

SMITH, D. Culture collections over the world. **International Microbiology**. n.6, p.95-100, 2003.

SMITH; ONION. 1994. Projeto "The Tree of Life". Disponível em <http://tolweb.org>.

SOLA, C.; OLIVEIRA, A. P. de; FEISTEL, J. C.; REZENDE, C. S. M. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.8, N.14; p. – 2012.

SPECIESLINK. 2016. Disponível em: <http://www.splink.org.br/>. Acesso em: 06.jun.2016.

SUTTON, B.C. (1980). *The Coelomycetes*. Fungi imperfecti with pycnidia, acervuli and stromata. Commonwealth Mycological Institute, Kew, London, p.696, 1980.

SPENCER-MARTINS, I. Coleções de Culturas de Microrganismos: nos Bastidores da Biotecnologia. **Boletim de Biotecnologia**, n. 47, pp.33-37. 1994.

TAMURA K, STECHER G, PETERSON D, FILIPSKI A, AND KUMAR S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*:30 2725-2729, 2013.

TANGTHIRASUNUN, N. et al. Variation in morphology and ribosomal DNA among isolates of *Metarhizium anisopliae* from Thailand. **Journal of Agricultural Technology**, v. 6, n. 2, p. 317-329, 2010.

TIWARI, V. V.; GADE, A. G.; RAI, M. A study of phylogenetic variations among Indian *Phoma tropica* species by RAPD-PCR and ITS-rDNA sequencing. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 12, p. 187-194, 2013.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10 ed. Porto Alegre: Artmed, 2011. 964p.

UDAYANGA, D. et al. Insights into the genus *Diaporthe*: phylogenetic species delimitation in the *D. eres* species complex. **Fungal Diversity**, v. 67, p. 203–229, 2014.

URUBURU, F. History and services of cultures collections. **International Microbiology**. n.6, pp. 101-103, 2003.

VASCONCELOS, C. V.; SILVA, D. C.; CARVALHO, D. D. C. Ocorrência de *Alternaria alternata* (Fr.:Fr.) Keissl. em tubérculos de batata, no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 44, n. 2, p. 219-222, 2014. e-ISSN 1983-4063

VAZOLLER, R. F.; CANHOS, V. P. Coleções de Culturas de Serviços e Centros de Recursos Biológicos. **Nota Técnica**. CGEE - Centro de Gestão e Estudos Estratégicos. 18p. 2005.

VELOZO, S. G. M. **Identificação, caracterização e avaliação da patogenicidade de diferentes isolados de *Fusarium spp.* para o controle de *Thaumastocoris peregrinus* (HEMIPTERA: THAUMASTOCORIDAE)**. 2015. 59 f. Dissertação (Mestrado em Proteção de Plantas), Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômica, Botucatu - SP, 2015.

vol. 3, p.170-179, 2006.

WANG, H. C.; WANG, J.; LI, W. H.; HUANG, Y. F.; XIA, H. Q.; WANG, M. S.; LU, N.; GUO, Y. S. *Cladosporium cladosporioides* Identified in China on Tobacco Seeds. **Plant Disease**, St. Paul, v.98, n. 7, p. 1002, 2014b.

WANG, X. et al. Phylogenetic assessment of *Chaetomium indicum* and allied species, with the introduction of three new species and epitypification of *C. funicola* and *C. indicum*. **Mycological Progress**, v.13, p. 719-732, 2014a. doi: 10.1007/s11557-013-0955-x

WANG, Y. et al. Diversity and Antibacterial Activities of Fungi Derived from the Gorgonian *Echinogorgia rebekka* from the South China Sea. **Marine Drugs**, v. 9, 1379-1390, 2011. doi:10.3390/md9081379

WANG et al. Diversity analysis of *Beauveria bassiana* isolated from infected silkworm in southwest China based on molecular data and morphological features of colony. **World J Microbiol Biotechnol**, v.29, pp.1263–1269, 2013.

WDCM – World Data Center for Microorganisms. 2016. Disponível: [www.wfcc.info/ccinfo/statistics/](http://www.wfcc.info/ccinfo/statistics/). acessado em: 02/03/2016.

WEIR, B.S.; JOHNSTON, P.R.; DAMM, U. The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. **Studies in Mycology**, v.73, p. 115-180, 2012. doi:10.3114/sim0011.

WIDMER, T.; KIRK, A.; KIRK, G.; GUERMACHE, F. Foliar and Cane Rot of *Arundo donax* Caused by *Nigrospora oryzae* in Europe. **Plant Disease**, v. 90, n.8, pp.1107-1107, 2006.

WHITE, T.J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetic. In: Innis, M.A.; Gelfand, D.H.; Sninsky, J.J.; White, T.J. (Org). PCR Protocols: a guide to methods and applications. San Diego, Academic Press, 1990, p.315-322.

WIRSEL, S. G. R. et al. Four or More Species of *Cladosporium* Sympatrically Colonize *Phragmites australis*. **Fungal Genetics and Biology**, v.35, p. 99-113, 2002.

WOUDENBERG, J. H. C. et al. *Alternaria* redefined. **Studies in Mycology**, v.75, p. 171–212, 2013.

WU, J. B.; ZHANG, C. L.; MAO, P. P.; QIAN, Y. S.; WANG, H. Z.. First Report of Leaf Spot Caused by *Nigrospora oryzae* on *Dendrobium candidum* in China. **Plant Disease**, v.98, n. 7, pp. 996-996, 2014.

**ANEXOS**



**Universidade Estadual do Maranhão**  
Centro de Ciências Agrárias  
Núcleo de Biotecnologia Agrônômica  
Laboratório de Fitopatologia  
Cidade Universitária Paulo VI s/n° Tirirical  
CEP 65055970 São Luis – MA/Brasil  
Fone: (98) 32571106  
E-mail: alicecosta@cca.uema.br

---

## REGISTRO DE CULTURA FÚNGICA

Registro: MGSS-01

Data de depósito:

Métodos de preservação:

Gênero e espécie:

Número da Linhagem:

Data de isolamento:

Local de origem:

Hospedeiro de origem:

Substrato de origem:

São Luis, 11 de Outubro de 2013

Antônia Alice Costa Rodrigues

Curadora da Micoteca “Prof. Gilson Soares da Silva” - Coleção de Cultura de Fungos  
Fitopatogênicos.

Universidade Estadual do Maranhão

São Luis, Estado do Maranhão

Brasil



**Universidade Estadual do Maranhão**  
 Centro de Ciências Agrárias  
 Núcleo de Biotecnologia Agrônômica  
 Laboratório de Fitopatologia  
 Cidade Universitária Paulo VI s/n° Tirirical  
 CEP 65055970 São Luis – MA/Brasil  
 Fone: (98) 32571106  
 E-mail: alicecosta@cca.uema.br

## FORMULÁRIO DE INCORPORAÇÃO DE CULTURA FÚNGICA

### 1. Código do isolado (emitido pelo depositante):

•

### 2. Fungo:

- Gênero:
- Espécie:

### 3. Nome do Determinador:

Data da Determinação

- Identificação molecular (enviar comprovação em anexo):
  - Código GenBank ou outra base:

- 
- Primers específicos (nome dos primers e publicação):

### 4. Coleta do material:

Nome do Coletor:

Número do Coletor:

- Data:
- Local (cidade/estado):
- Coordenadas (GPS):

- 
- Propriedade (nome):
- 

### 5. Isolamento:

- Data:
- Meio de cultura:
- Cultura monospórica: ( ) sim ( ) não
- Fungo esporulando no meio: ( ) sim ( ) não

**6. Hospedeiro:**

- Tipo:
  - Parte: ( ) folha ( ) ramo ( ) raiz ( ) caule ( ) fruto ( ) inflorescência  
( ) tubérculo ( ) outra:
- 

- Cultivar:

**6. Teste de Patogenicidade:**

- Realização: ( ) sim ( ) não

**7. Bibliografia em que o isolado foi utilizado** (periódico, volume, número, página inicial e final, ano):

---

---

---

---

---

**8. Código de acesso do isolado em outras coleções** (oficiais e não oficiais):**9. Acesso ao isolado:**

- ( ) Restrito (durante 02 anos - acesso somente com autorização formal)
- ( ) Não restrito

**10. Depositante:**

CNPJ:

Nome:

Instituição:

Endereço:

Documento de Identificação (tipo, número e órgão emissor):

Telefone:

Fax:

E-mail:

Instituição ou coleção destinatária:

Endereço:

Nome do representante da instituição ou coleção destinatária:

Assinatura do depositante:  

---



Micoteca Prof. Gilson Soares da Silva

**Universidade Estadual do Maranhão**  
 Centro de Ciências Agrárias  
 Núcleo de Biotecnologia Agrônômica  
 Laboratório de Fitopatologia  
 Cidade Universitária Paulo VI s/n° Tirirical  
 CEP 65055970 São Luis – MA/Brasil  
 Fone: (98) 32571106  
 E-mail: alicecosta@cca.uema.br

---

## FORMULÁRIO DE SOLICITAÇÃO DE CULTURA FÚNGICA

### 1. Solicitante:

CNPJ:

Nome:

Instituição:

Endereço:

Documento de Identificação (tipo, número e órgão emissor):

Telefone:

Fax:

E-mail:

Instituição ou coleção destinatária:

Endereço:

Nome do representante da instituição ou coleção destinatária:

Assinatura do depositante:

---

### 2. Fungo:

• Gênero:

• Espécie:

### 3. Hospedeiro:

• Tipo:

• Parte: ( ) folha ( ) ramo ( ) raiz ( ) caule ( ) fruto ( ) inflorescência

( ) tubérculo ( ) outra:

---

• Cultivar:

### 4. Observações:-

---



---



---



---





**Universidade Estadual do Maranhão**  
 Centro de Ciências Agrárias  
 Núcleo de Biotecnologia Agronômica  
 Laboratório de Fitopatologia  
 Cidade Universitária Paulo VI s/n° Tirirical  
 CEP 65055970 São Luis – MA/Brasil  
 Fone: (98) 32571106  
 E-mail: alicecosta@cca.uema.br

---

## FORMULÁRIO DE IDENTIFICAÇÃO DE CULTURA FÚNGICA

### 1. Solicitante:

CNPJ:

Nome:

Instituição:

Endereço:

Documento de Identificação (tipo, número e órgão emissor):

Telefone:

Fax:

E-mail:

Instituição ou coleção destinatária:

Endereço:

Nome do representante da instituição ou coleção destinatária:

Assinatura do depositante:

---

### 2. Coleta do material:

Nome do Coletor:

Número do Coletor:

- Data:
  - Local (cidade/estado):
  - Coordenadas (GPS):
- 

- Propriedade (nome):
- 

### 3. Isolamento:

- Data:
- Meio de cultura:

- Cultura monospórica: ( ) sim ( ) não
- Fungo esporulando no meio: ( ) sim ( ) não

**4. Hospedeiro:**

- Tipo:
- Parte: ( ) folha ( ) ramo ( ) raiz ( ) caule ( ) fruto ( ) inflorescência  
( ) tubérculo ( ) outra:

- 
- Cultivar:

**5. Teste de Patogenicidade:**

- Realização: ( ) sim ( ) não

**6. Observações:-**

---

---

---

---

---