

LUÍSA SALVADOR BORGES

**MICOPARASITAS DE *Austropuccinia psidii* E ESCALA DIAGRAMÁTICA
PARA AVALIAÇÃO DA FERRUGEM DO EUCALIPTO**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2018

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

T

B732m
2018 Salvador Borges, Luísa, 1991-
Micoparasitas de *Austropuccinia psidii* e escala
diagramática para avaliação da ferrugem do eucalipto / Luísa
Salvador Borges. – Viçosa, MG, 2018.
vii, 80 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Gleiber Quintão Furtado.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. *Austropuccinia psidii*. 2. Ferrugem-do-eucalipto -
Análise - Métodos estatísticos. 3. Ferrugem-do-eucalipto -
Filogenia. 4. Ferrugem-do-eucalipto - Morfologia. 5. Eucalipto -
Doenças e pragas. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Fitopatologia. Programa de Pós-Graduação em
Fitopatologia. II. Título.

CDD 22. ed. 579.592

LUÍSA SALVADOR BORGES

**MICOPARASITAS DE *Austropuccinia psidii* E ESCALA DIAGRAMÁTICA
PARA AVALIAÇÃO DA FERRUGEM DO EUCALIPTO**

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

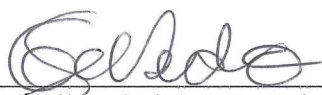
APROVADA: 26 de fevereiro de 2018.



Robert Weingart Barreto



Carlos Eduardo Aucique Pérez



Gleiber Quintão Furtado
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela oportunidade de aprendizado e por me guiar em todos os momentos difíceis;

Aos meus amados pais Ronaldino e Lúcia, por todo carinho, incentivo e compreensão;

Aos meus irmãos Rodrigo e Rafael, pelo apoio e torcida; ao meu afilhado Vitor, por ser o melhor presente;

Aos meus familiares por todo amor e orações;

Aos queridos amigos de longa data e aos conquistados durante a caminhada de graduação e pós-graduação, pela ajuda, por toda a força, por deixarem meus dias mais alegres e por compartilharem comigo momentos inesquecíveis;

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

Aos funcionários da Universidade Federal de Viçosa pelos serviços prestados;

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

Aos professores do Departamento de Fitopatologia pelos ensinamentos;

Ao professor Gleiber Quintão Furtado pela excelente orientação e a toda equipe do Laboratório de Patologia Florestal pela convivência diária, pela ajuda e conselhos;

Aos membros da banca de defesa, Prof. Robert Weingart Barreto, Doutor Carlos Eduardo Aucique Pérez pela disponibilidade e por contribuírem com a avaliação dessa dissertação;

À equipe do Laboratório de Micologia e Etiologia de Doenças Fúngicas de Plantas e à equipe da Clínica de Doenças de Plantas, por toda ajuda e auxílio.

Muito obrigada!

BIOGRAFIA

LUÍSA SALVADOR BORGES, filha de Ronaldino Guarnieri Borges e Lúcia Cristina Salvador Borges, nasceu em 18 de agosto de 1991, em São João Nepomuceno, Minas Gerais, Brasil.

Em 2010, iniciou o curso de Agronomia na Universidade Federal de São João Del Rei, e em 2011, fez a transferência para o mesmo curso na Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais.

Durante a graduação, foi bolsista de iniciação científica (PIBIC/CNPq) no laboratório de Patologia Florestal, no Departamento de Fitopatologia, sob orientação do Professor Gleiber Quintão Furtado.

Em março de 2016, iniciou o curso de Mestrado em Fitopatologia na Universidade Federal de Viçosa, sob a orientação do professor Gleiber Quintão Furtado, submetendo-se à defesa da dissertação em 26 de fevereiro de 2018.

SUMÁRIO

| | |
|--|-----|
| Resumo..... | vi |
| Abstract..... | vii |
| Introdução Geral..... | 1 |
| Referências..... | 4 |
| Capítulo 1 - Diversidade de micoparasitas associados à ferrugem das mirtáceas | |
| Resumo..... | 9 |
| Abstract..... | 10 |
| 1. Introdução..... | 11 |
| 2. Material e métodos..... | 12 |
| 2.1 Obtenção, isolamento e armazenamento de fungos..... | 12 |
| 2.2 Caracterização morfológica..... | 13 |
| 2.3 Taxa de crescimento micelial..... | 14 |
| 2.4 Caracterização molecular..... | 14 |
| 3. Resultados..... | 16 |
| 3.1 Isolamento dos micoparasitas..... | 16 |
| 3.2 Caracterização morfológica..... | 17 |
| 3.3 Taxa de crescimento micelial..... | 19 |
| 3.4 Análise filogenética..... | 20 |
| 4. Discussão..... | 21 |
| 5. Referências..... | 24 |
| Capítulo 2-Development and validation of a standard area diagram set to assess rust severity on eucalyptus leaves | |
| Abstract... .. | 58 |

| | |
|--|----|
| 1. Introduction..... | 59 |
| 2. Materials and methods..... | 61 |
| 2.1 Diseased eucalyptus leave..... | 61 |
| 2.2 Development and evaluation of the SAD..... | 61 |
| 2.3 Data analyses..... | 62 |
| 3. Results..... | 64 |
| 4. Discussion..... | 67 |
| 5. References..... | 69 |
| Conclusões Gerais..... | 80 |

RESUMO

BORGES, Luísa Salvador, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2018. **Micoparasitas de *Austropuccinia psidii* e escala diagramática para avaliação da ferrugem do eucalipto.** Orientador: Gleiber Quintão Furtado.

Austropuccinia psidii (Pucciniales), fungo nativo dos neotrópicos e causador da ferrugem das mirtáceas, é um dos principais patógenos das culturas do eucalipto e da goiabeira na América do Sul. Em situações onde foi introduzido, ele vem causando impactos notáveis, sobretudo para espécies arbóreas exóticas no Hawai e para ecossistemas naturais na Austrália. O controle biológico clássico é a única forma sustentável de se controlar espécies invasoras introduzidas, com exemplos de grande sucesso para o controle de artrópodes, mamíferos e plantas invasoras. O presente estudo teve como objetivos (i) avaliar a diversidade de fungos micoparasitas de *A. psidii*, por meio de caracterização morfológica e análises filogenéticas, em plantas pertencentes à família Myrtaceae em quatro municípios da Zona da Mata Mineira e (ii) desenvolver e validar uma escala diagramática para quantificação da severidade da ferrugem do eucalipto. Foi possível observar uma frequente incidência de fungos micoparasitas em colônias de *A. psidii* formadas sobre *Syzygium jambos* (jambeiro), *Plinia cauliflora* (jabuticabeira), *Eucalyptus* spp. e, principalmente, a *Psidium guajava* (goiabeira). Foram selecionados oito isolados de micoparasitas pertencentes aos seguintes gêneros e espécies: *Colletotrichum melonis*, *Epicoccum nigrum*, *Didymella adianticola*, *Fusarium* sp. (complexo *F. fujikuroi*), *Mucor* sp. e *Trichothecium roseum*. A escala diagramática desenvolvida foi composta de oito imagens de folhas de eucalipto com valores de severidade da ferrugem variando de 0,97 a 37,3%. As estimativas dos avaliadores da severidade da ferrugem se aproximaram da severidade real quando foi usada a escala diagramática, independentemente da experiência do avaliador. A elevada incidência de micoparasitas associados a *A. psidii* e a escala diagramática serão de grande importância em estudos futuros de biocontrole da ferrugem em clones de eucalipto suscetíveis. Além disso, é de grande relevância a avaliação do potencial dos micoparasitas no controle da ferrugem das mirtáceas em ecossistemas naturais, onde o controle químico torna-se inviável.

ABSTRACT

BORGES, Luísa Salvador, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2018. **Mycoparasites of *Austropuccinia psidii* and a standard area diagram set to assess rust severity on eucalyptus.** Adviser: Gleiber Quintão Furtado.

Austropuccinia psidii (Pucciniales), a native fungus of the neotropics and a cause of myrtle rust, is one of the main pathogens of eucalyptus and guava cultivation in South America. In situations where it has been introduced, it has caused notable impacts, especially for tree species exotic species in Hawaii and to natural ecosystems in Australia. Classical biological control is the only sustainable way to control invasive species introduced, with examples of great success for the control of arthropods, mammals and invasive plants. The objectives of the present study were (i) to evaluate the mycoparasites diversity of *A. psidii* by means of morphological characterization and phylogenetic analyzes in plants belonging to the Myrtaceae family in four municipalities of the Zona da Mata Mineira region and (ii) to develop and validate a diagrammatic scale for quantification of eucalyptus rust severity. Frequent incidence of mycoparasites was observed in association to *Syzygium jambos* (rose-apple), *Plinia cauliflora* (jabuticaba), *Eucalyptus* spp., and mainly to *Psidium guajava* (guava). Eight isolates of antagonists were identified as follows: *Colletotrichum melonis*, *Epicoccum nigrum*, *Didymella adianticola*, *Fusarium* sp. (*F. fujikuroi* complex), *Mucor* sp. and *Trichothecium roseum*. The standard area diagram set consisted in eight images of eucalyptus leaves with rust severity values varying from 0.97 to 37.3%. The rust severity estimates approximated the actual severity when using the diagrammatic scale regardless of the evaluator's experience. The high incidence of mycoparasites associated to *A. psidii* and the diagrammatic scale will be of great importance in future studies of rust biocontrol in susceptible eucalyptus clones. In addition, it is of great relevance to evaluate the potential use of mycoparasites in the control of myrtle rust in natural ecosystems, where chemical control becomes unfeasible.

Introdução Geral

A família Myrtaceae, com 131 gêneros e cerca de 4.600 espécies, é particularmente abundante na Austrália e na América tropical. Cerca de 1.500 e 2.400 espécies ocorrem na Austrália e na América tropical, respectivamente. Somente o gênero *Eucalyptus* e *Corymbia*, contém cerca de 700 espécies (Encyclopaedia Britannica, 2018). Em relação à cultura do eucalipto, atualmente, o Brasil possui mais de 5,6 milhões de hectares plantados e uma produtividade anual de 39 metros cúbicos (Ibá, 2015).

O fungo biotrófico *Austropuccinia psidii* (sin. *Puccinia psidii*, Sphaerophragmiaceae, Pucciniales), agente causal da ferrugem das mirtáceas, foi originalmente descrito em 1884 em folhas de goiabeira (*Psidium guajava*) no município de São Francisco do Sul, Santa Catarina, Brasil (Winter, 1884). Recentemente, favorecido pelo processo de globalização, ele se disseminou para fora de sua área nativa, tornando-se invasor e ameaçando diversas espécies frutíferas e arbóreas de importância econômica e ecológica. O fungo é polífago e já foi relatado em um total de 56 gêneros e 244 espécies de mirtáceas nas regiões da América do Sul (Coutinho et al., 1998), América Central, Caribe (Maclachlan, 1938; Laundon & Waterston, 1965), Flórida (Marlatt & Kimbrough, 1979), Califórnia (Mellano, 2006), Havaí (Uchida et al., 2006), Japão (Kawanishi et al., 2009), Austrália (Carnegie et al., 2010; Pegg et al., 2014), China (Zhuang & Wei, 2011) e mais recentemente na África do Sul (Roux et al., 2013) e Nova Caledônia (Giblin, 2013).

A ferrugem das mirtáceas incide principalmente sobre órgãos jovens de plantas, tanto no viveiro como no campo, incluindo folhagem, frutos e flores em desenvolvimento. As lesões são observadas 3 a 5 dias após a inoculação e a formação

de urediniósporos, após 12 dias. As lesões apresentam coloração variando de marrom a cinza e sobre elas acumulam-se massas de urediniósporos amarela ou laranja brilhante (Glen et al., 2007).

Em eucalipto, o fato de a doença predominar em folhas novas pode ser explicado pela maior porcentagem de germinação de urediniósporos e maior formação de apressórios por *A. psidii* nessas folhas. Além disso, considerando que o patógeno penetra no tecido do hospedeiro de forma direta, acredita-se que a menor espessura da cutícula e o menor teor de cera encontrado em folhas novas facilitam a infecção do patógeno no hospedeiro (Xavier et al., 2015).

Em relação ao ciclo de vida, ainda há dúvidas sobre se *A. psidii* é autoécia ou heteroécia. Embora ela possa ser heteroécia, tendo um hospedeiro alternativo desconhecido, também é possível que os basidiósporos tenham perdido sua capacidade de infectar mirtáceas. Assim, pode ser também considerada autoécia, pois nenhuma evidência de penetração de basidiósporos foi observada em testes realizados em folhas de *Agonis flexuosa* e em *Syzygium jambos* (Morin et al., 2014).

As principais estratégias para controlar a ferrugem do eucalipto são o uso de clones, progênies ou espécies resistentes; e seleção de plantas com elevada taxa de crescimento (evasão), pois em partes mais jovens da planta formadas em posições mais altas, o patógeno não encontra microclima favorável à infecção. Além disso, em casos de utilização de materiais genéticos suscetíveis, que possuem características silviculturais de interesse, a ferrugem pode ser inicialmente controlada com fungicidas (Alfenas et al., 2009).

O uso de agentes biológicos para o controle da ferrugem das mirtáceas tem sido pouco explorado. Uma alternativa que pode ser promissora no manejo da

ferrugem, e que ainda não foi investigada, é a utilização de fungos micoparasitas de *A. psidii*.

Os fungos micoparasitas são hiperparasitas de outros fungos, com capacidade para destruir as estruturas vegetativas e de propagação e, em alguns casos, tendo estruturas robustas de resistência de seus hospedeiros como alvos (Viterbo & Horwitz, 2010). Dependendo do seu modo de parasitismo, os micoparasitas podem ser necrotróficos ou biotróficos (Barnett & Binder, 1973). Fungos micoparasitas especializados podem afetar os seus hospedeiros por dois mecanismos principais: penetração direta em estruturas fúngicas com produção de substâncias que resultam na sua destruição por lise e formação de crosta micelial, que se sobrepõem a estruturas reprodutivas do patógeno (Blakeman & Fokkema, 1982).

Em Pucciniales, os micoparasitas são frequentemente encontrados colonizando urédias, télias e écios, podendo diminuir o número de esporos e reduzir o inóculo que serviria para infectar novos órgãos ou novas plantas (Moricca et al., 2001; Carrion & Gray, 2002). Estudos mais amplos sobre a diversidade de fungos micoparasitas de *A. psidii* presentes no Brasil e o seu efeito no controle biológico da ferrugem devem ser realizados. Além disso, não existe na literatura uma escala diagramática para avaliação da severidade da ferrugem do eucalipto, o que dificulta avaliar o efeito dos micoparasitas no controle da ferrugem.

Com base nisso, os objetivos deste trabalho foram (i) avaliar a diversidade de fungos micoparasitas associados a *A. psidii* em algumas localidades da Zona da Mata Mineira por meio da caracterização morfológica e análises filogenéticas e (ii) desenvolver uma escala diagramática para quantificação da ferrugem em plantas de eucalipto.

Referências

- Alfenas, A. C., Maffia, L. A. & Sartorio, R.C. (1993). Eficiência de triadimenol, oxicarboxim e diniconazole para o controle da ferrugem *Puccinia psidii* em brotações de *Eucalyptus cloeziana*, em condições de campo. *Revista Árvore*, 17, 247-263
- Alfenas, A. C., Zauza, E. Â. V., Mafia, R. G. & Assis, T. F. (2009). *Clonagem e doenças do eucalipto*. (Editora UFV: Viçosa, MG)
- Amorim, E. P. R., Pio-Ribeiro, G., Menezes, M. & Coelho, R. S. B. (1993). The pathogenicity and hyperparasitic action of *Fusarium decemcellulare* on *Puccinia psidii* in guava (*Psidium guajava*). *Fitopatologia Brasileira*, 18, 226-229
- Barnett, H. L. & Binder, F. L. (1973). The fungal host parasite relationship. *Annual Review Phytopathology*, 11, 273-292
- Blakeman J. P. & Fokkema, N. J. (1982). Potential for biological control of plant diseases on the Phylloplane. *Annual Review Phytopathology*, 20, 167-172
- Carrion, G. & Rico-Gray, V. (2002). Mycoparasites on the coffee rust in Mexico. *Fungal Diversity*, 11, 49-60
- Carnegie, A. J., Lidbetter, J. R, Walker, J., Horwood, M. A., Tesoriero, L., Glen, M. & Priest, M. (2010). *Uredo rangelii*, a taxon in the guava rust complex, newly recorded on *Myrtaceae* in Australia. *Australasian Plant Pathology*, 39, 463-466

- Coutinho, T. A., Wingfield, M. J., Alfenas, A. C. & Crous, P. W. (1998). *Eucalyptus* rust: a disease with the potential for serious international implications. *Plant Disease*, 82, 819-825
- Encyclopaedia Britannica, Retrieved February 18, 2018, from (<https://www.britannica.com/plant/Myrtaceae>)
- Giblin, F. (2013). Myrtle rust report: New Caledonia. Assessment of myrtle rust situation in New Caledonia. University of the Sunshine Coast Maroochydore, Queensland, Austrália
- Glen, M., Alfenas, A. C., Zauza, E. A. V., Wingfield, M. J. & Mohammed, C. (2007). *Puccinia psidii*: a threat to the Australian environment and economy - a review. *Australasian Plant Pathology*, 36, 1-16
- Ibá - Indústria Brasileira de Árvores. (2015). Relatório Ibá 2015. Retrieved January 25, 2018, from http://iba.org/images/shared/iba_2015.pdf
- Kawanishi, T., Uematsu, S., Kakishima, M., Kagiwada, S., Hamamoto, H., Horie, H. & Namba, S. (2009). First report of rust disease on ohia and the causal fungus, *Puccinia psidii*, in Japan. *Journal of General Plant Pathology*, 75, 428-431
- Laundon, G. F. & Waterston, J. M. (1965). *Puccinia psidii*. *CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria*, 56, 1-2
- MacLachlan, J. D. (1938). A rust of the pimento tree in Jamaica. *Phytopathology*, 28, 157-170

- Marlatt, R. B. & Kimbrough, J. W. (1979). *Puccinia psidii* on *Pimento dioica* in South Florida. *Plant Disease*, 63, 510-512
- Mellano, V. (2006). Rust on myrtle found in San Diego county USDA. *Retail Nursery Newsletter*, 1, 6
- Moricca, S., Ragazzi, A., Mitchelson, K. R. & Assante, G. (2001). Antagonism of two-needle pine stem rust fungi *Cronartium flaccidum* of *Peridermium pini* by *Cladosporium tenuissimum* in vitro and in planta. *Phytopathology*, 91, 457-468
- Morin, L., Talbot., M. J., Glen, M. (2014). Quest to elucidate the life cycle of *Puccinia psidii* sensu lato. *Fungal Biology*, 118, 253-263
- Pegg, G. S., Brawner, J. T. & Lee, D. J. (2014). Screening *Corymbia* populations for resistance to *Puccinia psidii*. *Plant Pathology*, 63, 425-436
- Roux, J., Granados, G. M., Shuey, L., Barnes, I., Wingfield, M. J. & McTaggart, A. R. (2016). A unique genotype of the rust pathogen, *Puccinia psidii*, on Myrtaceae in South Africa. *Australasian Plant Pathology*, 45, 645-652
- Uchida, J., Zhong, S. & Killgore, E. (2006). First report of a rust disease on Ohi'a caused by *Puccinia psidii* in Hawaii. *Plant Disease*, 90, 524
- Viterbo, A. & Horwitz, B. Z. (2010). Mycoparasitism Chapter 42. In: Borkovich KA, Ebbole DJ (Eds). Cellular and Molecular Biology of Filamentous Fungi. *American Society Microbiology Press*, Washington, DC
- Winter, G. (1884). Repertorium. Rabenhorstii fungi europaei et extraeuropaei. Cent. XXXI et XXXII. *Hedwigia*, 23, 164-172

Xavier, A. A., da Silva, A. C., da Silva, G. L. M., Matsuoka, K., Hodges, C. S. & Alfenas, A. C. (2015). Infection process of *Puccinia psidii* in *Eucalyptus grandis* leaves of different ages. *Tropical Plant Pathology*, 40, 318

Zhuang, J. Y. & Wei, S. X. (2011). Additional materials for the rust flora of Hainan Province, China. *Mycosystema*, 30, 853-860

Capítulo 1

Micoparasitas associados à ferrugem das mirtáceas

Resumo

O fungo *Austropuccinia psidii* é considerado uma das principais ameaças a espécies de Myrtaceae no mundo. O estudo teve como objetivo avaliar a diversidade de potenciais micoparasitas de *A. psidii* na região da Zona da Mata Mineira por meio de caracterizações morfológicas e análises filogenéticas. A taxa de crescimento micelial foi avaliada em relação à área abaixo da curva para três meios de cultura: extrato de malte-ágar (MEA), batata-dextrose-ágar (BDA) e meio ágar pobre em nutrientes (SNA). Diferenças estatísticas significativas foram observadas para a maioria dos isolados. Foram obtidos oito isolados fúngicos associados a diferentes espécies de Myrtaceae (goiabeira, eucalipto, jabuticaba e jambeiro) com ferrugem. Estes foram identificados como pertencentes aos seguintes gêneros e espécies: *Colletotrichum melonis* (goiabeira), *Didymella adianticola* (eucalipto), *Epicoccum nigrum* (jambeiro), *Fusarium* sp. (goiabeira, jabuticabeira, eucalipto e jambeiro), *Mucor* sp. (jabuticabeira) e *Trichothecium roseum* (goiabeira). Estudos posteriores serão realizados com o intuito de avaliar o potencial dos isolados no biocontrole da ferrugem das mirtáceas.

Abstract

The fungus *Austropuccinia psidii* is considered one of the main threats to species of Myrtaceae in the world. The objective of this study was to evaluate the diversity of potential mycoparasites of *A. psidii* in the region of Zona da Mata Mineira through morphological characterization and phylogenetic analysis. The mycelial growth rate was evaluated in relation to the area under the curve for three culture media: malt-agar extract (MEA), potato dextrose agar (PDA), and nutrient-poor agar medium (SNA). Significant statistical differences were observed for most isolates. Eight fungal isolates were associated to rust in different Myrtaceae species (guava, eucalyptus, jabuticaba, and rose-apple). The isolates were identified as following: *Colletotrichum melonis* (guava), *Didymella adianticola* (eucalyptus), *Epicoccum nigrum* (rose-apple), *Fusarium* sp. (guava, jabuticaba, eucalyptus and rose-apple), *Mucor* sp. (jabuticaba) and *Trichothecium roseum* (guava). Further studies will be carried out to evaluate the potential of the isolates in the biocontrol of myrtle rust.

1. Introdução

O fungo *Austropuccinia psidii*, agente causal da ferrugem das mirtáceas, foi descrito no Brasil em 1884 infectando folhas de goiabeira (*Psidium guajava*) no município de São Francisco do Sul, Santa Catarina (Winter, 1884). Em plantações de goiabeiras esse patógeno sempre foi importante, porém, para plantações de eucalipto, esse patógeno ganhou notoriedade apenas a partir da década de 70, quando causou severos danos em viveiros (Ferreira, 1983).

Atualmente, *A. psidii* já está relatado em diversas espécies de Myrtaceae na América do Sul (Coutinho et al., 1998), América Central/ Caribe (Maclachalan, 1938; Laundon & Waterston, 1965), América do Norte (Mellano, 2006; Uchida et al., 2006), Japão (Kawanishi et al., 2009), Austrália (Carnegie & Lidbetter, 2012), China (Zhuang & Wei, 2011), África do Sul (Roux et al., 2013) e Nova Caledônia (Giblin, 2013).

Na Austrália, o fungo invasor *A. psidii* tem se mostrado extremamente prejudicial a espécies arbóreas endêmicas de Myrtaceae em área de florestas nativas. Com base em avaliações de campo, tem sido observado elevados danos a folhas novas e brotações, diminuição na densidade de copas e mortalidade de árvores. Portanto, existe o risco de extinção de espécies, o que pode afetar negativamente a biodiversidade local (Carnegie et al., 2015). Com isso, torna-se de grande relevância a avaliação do potencial dos micoparasitas, inimigos naturais de *A. psidii*, no controle da ferrugem das mirtáceas em ecossistemas naturais, onde o controle químico torna-se inviável. Além disso, esta estratégia de controle pode ser também utilizada no controle da ferrugem em viveiros e plantios, principalmente, de eucalipto e de goiabeira suscetíveis.

Fungos micoparasitas são frequentemente encontrados associados a diferentes ferrugens, tais como *Eudarluka caricis* sobre *Puccinia* spp. (Kajamuhan et al., 2015), *Simplicillium lanosoniveum* sobre *Phakopsora pachyrhizi* (Gauthier et al., 2014), *Trichoderma atroviride* sobre *Cronatium ribicola* (Gordon & Pfender, 2012), *Zygosporium gibbum* sobre *Coleosporium plumeriae* (Manimohan & Mannethody, 2011), *Sphaerellopsis filum* sobre *Melampsora larici-epitea* (Pei et al., 2010), *Cladosporium tenuissimum* sobre *Uromyces appendiculatus* (Assante et al., 2004), *Fusarium chlamyosporum* sobre *Puccinia arachidis* (Mathivanan et al., 1998).

Considerando que o fungo *A. psidii* ocorre como espécie nativa, tendo sido originalmente descrito no Brasil, o objetivo deste estudo foi levantar, preliminarmente, a microbiota micoparasítica de *A. psidii* em Viçosa (Minas Gerais) e regiões próximas por meio da caracterização morfológica e análises filogenéticas, para subsidiar estudos posteriores na avaliação de potencial para o biocontrole da ferrugem das mirtáceas no Brasil e no exterior.

2 . Material e métodos

2.1 Obtenção, isolamento e armazenamento de fungos micoparasitas de *A. psidii*

As coletas foram realizadas em Minas Gerais, nos municípios de Viçosa, Teixeira, Piraúba e Paula Cândido. Os fungos micoparasitas foram obtidos de colônias de *A. psidii* formadas sobre folhas e frutos de goiabeira (*Psidium guajava*), jameiro (*Syzygium jambos*), jabuticabeira (*Plinia cauliflora*) e eucalipto (*Eucalyptus* spp.) (Figura 1). As amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Patologia Florestal do Departamento de Fitopatologia da UFV e examinadas sob microscópio

estereoscópico. As estruturas dos fungos micoparasitas foram transferidas com auxílio de um estilete de ponta fina esterilizado, para placas de Petri contendo meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA, Sigma-Aldrich[®]) para obtenção de cultura pura de cada isolado. Para obtenção de culturas monospóricas dos isolados, foi preparada uma suspensão de conídios em água destilada esterilizada para cada isolado e uma alíquota de 5 µL transferida para placas de Petri contendo meio ágar-água 3% (AA, Himedia[®]). A alíquota foi espalhada na superfície do meio com o auxílio de uma alça de Drigalski. Posteriormente, sob microscópio de luz, um único esporo foi transferido, utilizando agulha esterilizada, para placas de Petri contendo meio de cultura BDA.

Os fungos micoparasitas obtidos foram mantidos por meio de repicagens periódicas e preservados em água destilada esterilizada ou Castellani, Sílica-gel e em glicerol a -80°, conforme descrito por Alfenas & Mafia (2007).

2.2 Caracterização morfológica

Para a análise morfológica, os isolados foram cultivados por meio da técnica de microcultura (Alfenas & Mafia, 2007). As placas preparadas foram incubadas a 25°C em fotoperíodo de 12 horas de luz (32 µmol m⁻²s⁻¹). Lâminas com as colônias fúngicas foram mantidas em lactoglicerol, seladas e observadas ao microscópio de luz. Foram medidas pelo menos 30 estruturas de cada fungo, examinado sob microscópio de luz (OLYMPUS BX 53) equipado com uma câmera digital (OLYMPUS Q-COLOR5). Características das culturas de cada isolado foram observadas após o cultivo em placas de BDA após 15 dias sob 25 °C e fotoperíodo de 12 horas de luz. Terminologia para cores seguiram Rayner (1970).

2.3 Taxa de crescimento micelial

Um disco de micélio de aproximadamente 1 cm de diâmetro de cada isolado foi transferido para três diferentes meios de cultura: extrato de malte-ágar (MEA), batata-dextrose-ágar (BDA) e meio ágar pobre em nutrientes (SNA) e mantidos em câmara de crescimento sob temperatura de 25°C e fotoperíodo de 12 horas. As avaliações foram realizadas de dois em dois dias, com o auxílio de um paquímetro digital, por meio da medição do diâmetro das colônias em duas posições perpendiculares até que a margem da colônia, de pelo menos uma das repetições, atingisse a borda da placa. O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, com 3 repetições, sendo que cada repetição consistiu de uma placa de Petri ($\varnothing=90$ mm). Para comparação das médias foi utilizado teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software SAS (Statistical Analysis System), versão 9.4.

2.4 Caracterização molecular

Para realizar a extração de DNA, culturas monospóricas foram cultivadas em meio BDA, recobertas com papel celofane esterilizado, a 25°C por 7 dias. Colônias foram raspadas, com auxílio de palito de dente esterilizado, e depositadas em um tubo esterilizado de microcentrífuga de 1,5 mL. A extração foi realizada com disruptor mecânico de células na qual se utiliza microesferas (beads). O DNA total foi extraído utilizando o Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega Corporation, WI, EUA), seguindo o protocolo do fabricante.

Para cada reação de PCR foram utilizados os seguintes reagentes: 12,5 μ L de Dream Taq™ PCR Master Mix 2X (MBI Fermentas, Vilnius, Lithuania), 1 μ L de

cada primer (forward e reverse) sintetizados pela Invitrogen (Carlsbad, U.S.A), 1 μ L de sulfóxido de dimetilo (DMSO, Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A.), 5 μ L de 100 \times (10 mg/mL) Bovine Serum Albumin (BSA, Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A.), 2 μ L do DNA genômico (25 ng/ μ L) e 2,5 μ L de água livre de nucleasse para completar o volume total.

As seguintes regiões genômicas do DNA dos isolados em estudo foram amplificadas dependendo de sua relevância para o grupo taxonômico: 5.8S rRNA (ITS), β -tubulina (TUB2), glyceraldehyde-3-phosphatedehydrogenase (GAPDH), fator de alongação 1- α (TEF1- α) e subunidade maior do RNA ribossomal (LSU rRNA). Essas regiões foram amplificadas e sequenciadas usando-se os seguintes primers: ITS-1 e ITS-4 (White et al., 1990), T1 e bt2B (O’Donnell et al., 1997), GDF e GDR (Templeton et al., 1992), EF-1 e EF-2 (O’Donnell et al., 1998) e LROR e LR5 (Vilgalys & Hester, 1990) respectivamente.

Os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel com 2% de agarose e corados com GelRed TM (Biotium Inc., Hayward, CA, EUA) em tampão TAE (1x). Posteriormente, as bandas resultantes foram visualizadas sob luz UV em um fotodocumentador (L-Pix Touch, Loccus Biotecnologia) para verificação do tamanho e qualidade das bandas. A purificação e o seqüenciamento das amostras foram feitos pela MacroGen Inc., Coréia do Sul (<http://www.macrogen.com>) e Myleus Biotechnology (<http://facility.myleus.com/>).

Para as análises filogenéticas, as seqüências de nucleotídeos geradas foram montadas em contigs e editadas utilizando o software SeqAssem. Todas as seqüências foram verificadas manualmente e nucleotídeos com posições ambíguas foram esclarecidos utilizando as seqüências de ambos os sentidos dos primers. Os

isolados foram inicialmente identificados pela verificação da região parcial dos genes no banco de dados público GenBank, utilizando a ferramenta BLAST nucleotide (Basic Local Alignment Search Tool). As sequências dos isolados foram alinhadas com as sequências adicionais de banco de dados já publicados (Tabela 1 a 3) utilizando-se o software Muscle® (Edgar, 2004), implementado no programa MEGA 6.06 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) (Tamura et al., 2011).

Para cada região, realizou-se a análise dos modelos probabilísticos no programa JModelTest 2.1.7 (Darriba et al., 2015). Os modelos foram escolhidos conforme os valores estabelecidos para o Critério de Informação de Akaike (AIC) e Critério Bayesiano (BIC), proposto por Schwarz (1978).

As análises filogenéticas foram realizadas através da interface online do CIPRES Science Gateway (Miller et al., 2010) utilizando MrBayes on XSEDE v3.2.6 (Ronquist & Huelsenbeck, 2003). As quatro cadeias MCMC foram conduzidas simultaneamente, iniciando as árvores aleatoriamente até 10.000.000 de gerações. As árvores foram amostradas a cada 1.000 gerações, resultando em 10.000 árvores. As primeiras 2.500 árvores, isto é 25%, foram descartadas da análise na fase de “*burn-in*”. Os valores de probabilidade posterior (Rannala & Yang, 1996) foram determinados na árvore consenso através das 7.500 árvores remanescentes. As árvores foram visualizadas no software FigTree (Rambaut, 2009) e editadas no programa gráfico CoreDRAW X7 (64-Bit).

3. Resultados

3.1 Isolamento dos micoparasitas

Oito isolados de fungos reconhecidos como morfotipos diferentes de micoparasitas foram obtidos em associação com pústulas de *A. psidii* sobre diferentes espécies de Myrtaceae: goiabeira (*Psidium guajava*), jambeiro (*Syzygium jambos*), jabuticabeira (*Plinia cauliflora*) e eucalipto (*Eucalyptus* spp.), cultivadas em municípios da Zona da Mata Mineira, conforme indicado abaixo.

| Isolados | Hospedeiros | Local |
|-----------------|--------------------|---------------|
| PFLB 6 | Jabuticabeira | Viçosa |
| PFLB 7 | Goiabeira | Viçosa |
| PFLB 8 | Goiabeira | Piraúba |
| PFLB 10 | Goiabeira | Viçosa |
| PFLB 14 | Eucalipto | Viçosa |
| PFLB 15 | Goiabeira | Teixeiras |
| PFLB 18 | Goiabeira | Paula Cândido |
| PFLB 19 | Jambeiro | Viçosa |

3.2 Caracterização morfológica

Colletotrichum melonis Damm et al., *Studies in Mycology* 73, 37-113 (2012). (Fig 2)

Conidióforos hialinos, de paredes lisas, ramificados, 2 - 4 × 6 - 24µm. Conídios hialinos, asseptados, de paredes retas, algumas ligeiramente curvas, 3 - 5 × 9 - 22µm. Apressório formado individualmente, marrom, ligeiramente ondulado, 2 -5 × 3 - 7µm.

Característica da cultura - colônias de 44 - 45 mm de diâmetro após 12 dias com coloração “buff” e branco para “lavender grey” em direção às margens; reverso “salmon” para “buff” em direção às margens.

Epicoccum nigrum Aveskamp, et al., *Studies in Mycology*, 65, 1-60 (2010). (Fig 3)

Conídios globosos multicelulares, de coloração marrom escuro 6 - 10 × 7 - 10µm de diâmetro. Células conidiogênicas fialídicas, simples, lisas, medindo 3-7 × 3-7µm.

Característica da cultura- colônias de 64 - 76 mm de diâmetro após 12 dias com coloração “luteous”; reverso “bay”.

Didymella adianticola Boerema et al., *CABI publishing* (2004). (Fig 4)

Picnídios globosos de coloração marrom, medindo 35 - 175 × 60 - 122µm, inicialmente fechado e posteriormente aberto por uma ruptura da parede. Presença de um ostíolo. Conídios asseptados, hialinos com formato ligeiramente curvado e algumas vezes irregular, medindo 2 - 3 × 3 - 6 µm.

Característica da cultura- colônias de 53 - 54 µm de diâmetro após 12 dias com coloração “hazel” para “olivaceous” em direção às margens; reverso “sienna”.

Fusarium sp. Leslie & Summerell, *The Fusarium Laboratory Manual* (2006). (Fig 5)

Macroconídios 2 - 4 × 21 - 45µm com 3 a 5 septos, célula apical curva e célula basal pouco desenvolvida. Microconídios 2 - 4 × 4 - 12µm com formato oval; sem septos. Presença de polifialides. Foram observados clamidósporos em cadeia.

Característica da cultura - colônias de 59 - 68µm de diâmetro após 12 dias com coloração “pale vinaceous” para “rosy buff” em direção às margens; reverso “vinaceous buff”.

***Mucor* sp.** Hoffmann et al., *Persoonia*, 30, 57-76 (2013). (Fig 6)

Presença de esporangiósporos 2 - 5µm × 5 - 9µm produzidos em esporângios 6 - 10 × 15 - 23µm.

Característica da cultura - colônias de 59-60 mm após 12 dias sob 25°C com coloração “luteos” para “orange” em direção às margens; reverso “pale luteous”.

Trichothecium roseum Oh, S. Y et al., *Mycobiology* 42, 269-273 (2014). (Fig 7)

Presença de conídios hialinos bicelulares de formato elipsoide a piriforme, com hilo basal de terminação truncada evidente, 9 - 13 × 10 - 30µm.

Característica da cultura - colônias de 80 mm após 12 dias com coloração “salmon”; reverso “pale luteous”.

3.3 Taxa de crescimento micelial

A avaliação do crescimento micelial foi realizada até o décimo dia de crescimento da cultura, com avaliações realizadas em intervalo de dois dias (Figura 7). Para o isolado PFLB 6 (*Mucor* sp.), a taxa de crescimento diferiu estatisticamente entre os meios BDA e MEA, apresentando a maior taxa de crescimento no meio MEA em relação aos demais. O crescimento dos isolados PFLB18 e PFLB 10 (*Colletotrichum melonis*) diferiram estatisticamente entre os três meios de cultura utilizados, obtendo maior valor médio em meio SNA. Para o isolado PFLB19 (*Epicoccum nigrum*), não houve diferenças significativas da taxa de crescimento entre os meios de cultura. O meio de cultura SNA proporcionou a maior taxa de crescimento para os isolados PFLB 8 e PFLB 15 (*Fusarium* sp.), seguido do meio de BDA. O isolado PFLB14 (*Didymella adianticola*) obteve maior taxa de crescimento

nos meios BDA e MEA, diferindo estatisticamente em relação ao meio SNA, que obteve menor taxa de crescimento. Para o isolado PFLB 7 (*Trichothecium roseum*), os meios de cultura BDA e SNA proporcionaram maiores taxas de crescimento, diferindo estatisticamente do meio MEA, que apresentou a menor taxa.

3.4 Análises filogenéticas

A análise filogenética baseada na região TUB2 dos isolados de *Colletotrichum* PFLB7 e PFLB 15 (Figura 9), permitiu a sua identificação precisa como *C. melonis*. O alinhamento incluiu 52 taxa com 494 caracteres, incluindo o grupo externo *Colletotrichum pseudoacutatum*. Os isolados PFLB 7 e PFLB 15 agruparam com as espécies do clado de *C. melonis* do complexo *Colletotrichum acutatum* como um suporte estatístico de 1.00.

A análise filogenética baseada na região ITS permitiu a identificação dos isolados PFLB 9 e PFLB 14, respectivamente como pertencentes a *E.nigrum* e *D. adianticola*. O alinhamento consistiu de 40 taxa com 500 caracteres e 27 taxa com 113 caracteres, respectivamente (Figura 10 e 11), incluindo o grupo externo *Aschochyta hordei*. Os isolados se agruparam cada qual em um clado com alto suporte estatístico (probabilidades posteriores foram equivalentes a 0.99 para *E.nigrum* e 0.92 para *D. adianticola*).

A árvore obtida pelo método de inferência Bayesiana utilizando a região gênica LSU agrupou o isolado PFLB 7 em um clado com alto suporte estatístico (1.00 de probabilidade superior) junto com a espécie *T. roseum*. O alinhamento incluiu 36 taxa e 794 caracteres, incluindo o grupo externo *Valetoniellopsis laxa*.

Para a árvore consenso obtida pelo método de inferência Bayesiana (Figura 12), os isolados PFLB 8 e PFLB 15 se agruparam em um clado, com alto suporte estatístico (0.98), incluído pelas espécies *F. sterilihyphosum* e *F. fracticaudum*. O alinhamento concatenado incluiu 28 taxas e 1154 caracteres (TUB = 1-544 e TEF= 545-1154), incluindo o grupo externo *F. verticillioides*. A posição taxonômica de PFLB 8 e PFLB 15 ainda é incerta.

4. Discussão

As análises filogenéticas e morfológicas permitiram uma identificação bastante precisa dos fungos micoparasitas encontrados sobre *A. psidii*. PFLB 10 e PFLB 18 (aqui identificados como *C. melonis*) é conhecido como agente etiológico de antracnose em maçã, pêsego e goiaba em diferentes localidades do Brasil (Bragança et al., 2016). É possível que seu isolamento a partir de pústulas de *A. psidii* indique que as lesões de ferrugem sirvam de porta de entrada para *C. melonis* infectar a goiabeira. Nesse caso, o seu papel não seria de micoparasitas, mas apenas de oportunistas. Com isso, essa hipótese merece ser investigada.

Para a identificação dos isolados PFLB 19 (*E. nigrum*) e PFLB 14 (*D. adianticola*), foi realizada a montagem dos alinhamentos a partir de um mesmo banco de dados, porém gerando duas árvores diferentes. Essas espécies estão associadas muitas vezes ao material vegetal, seja como oportunistas ou como patógenos primários. Para ambas as espécies, as características morfológicas e filogenéticas encontradas estão de acordo com a descrição apresentada por Aveskamp et al., (2010). *Epicoccum nigrum* já foi relatado como patógeno de plantas, como por exemplo, causando mancha foliar em *Eryobotrya japonica* na

China (Wu & Zhang, 2017) e em *Lablab purpureus* na Índia (Mahadevakumar et al., 2014).

Os isolados PFLB 10 e PFLB 18, inicialmente reconhecidos como pertencentes ao gênero *Fusarium* com base na morfologia, pertencem ao complexo de espécies *F. fujikuroi*, mais precisamente do “clado americano” (Herron, 2015). Filogeneticamente, ambos os isolados estão próximos de *F. fracticaudum* e *F. sterilihyphosum*, no entanto, essas espécies apresentam algumas diferenças morfológicas, dificultando a identificação em nível de espécie. Enquanto os isolados deste estudo apresentam clamidósporos (Figura 5 letra g), *F. fracticaudum* e *F. sterilihyphosum* não apresentam essa estrutura de resistência. Por outro lado, uma característica em comum entre *F. fracticaudum*, *F. sterilihyphosum* e os isolados do estudo é a morfologia dos macroconídios, com formato ligeiramente curvado, variando de 3 a 5 septos, com célula pé evidente (Herron et al., 2015; Leslie & Summerell, 2016).

Para o isolado PFLB 6, reconhecido com base morfológica como pertencente ao gênero *Mucor* sp., a identificação foi somente a nível de gênero uma vez que as sequências de DNA geradas tinham baixa qualidade, inviabilizando a realização das análises filogenéticas. Características morfológicas permitiram a identificação do gênero, tais como micélio asseptado abundante e de rápido crescimento; presença de esporângios com múltiplos esporangiósporos e columela bem desenvolvida de formato variado (Hoffmann et al., 2013).

Trichothecium roseum é um fungo com morfologia e hábito muito distinto e o reconhecimento com base morfológica de PFLB 7 como pertencente a essa espécie foi confirmado na análise filogenética. Existem relatos de *T. roseum* tanto de uso

como agente de biocontrole quanto de sua ocorrência como patógeno de plantas. Em um estudo de produção orgânica de pêssego realizado no Brasil, o uso de *T. roseum* como antagonista à podridão parda (*Monilinia fructicola*) proporcionou uma redução de 50% da doença, em condições de campo e 63% em pós-colheita (May-De Mio et al., 2014). *Trichothecium roseum* já foi relatado causando podridão de fruto de tomate no Brasil (Inácio et al., 2011), podridão de fruto de *Polygonatum cyrtonema* (Liu et al., 2016) e podridão da espiga do milho na China (Xue et al., 2016). Essa espécie nunca foi relatada como patógeno de goiabeira, mas isso deve ser investigado, pois é conhecido como patógeno oportunista em diversas culturas.

Este levantamento da diversidade de possíveis micoparasitas de *A. psidii* foi pioneiro mundialmente e limitado em seu alcance. Mesmo assim, revelou uma elevada frequência de associação de possíveis micoparasitas com a ferrugem das mirtáceas e uma boa diversidade mesmo em uma amostragem limitada. O esclarecimento da relação de cada fungo encontrado com *A. psidii* e a avaliação do potencial como agentes de controle biológico daqueles que se comprovarem como antagonistas da ferrugem das mirtáceas é agora necessária. Nota-se na lista de fungos associados a *A. psidii* obtida nesse levantamento, a ausência de grupos comumente encontrados atacando Pucciniales, tais como: *Simplicilium* e afins; *Sphaerellopsis* e grupos mais especializados de micoparasitas. Tais ausências justificam a ampliação das buscas, sobretudo para ocorrências de ferrugens em mirtáceas em situações de ocorrência em ecossistemas naturais.

5. Referências

- Alfenas, A. C. & Mafia, R. G. (2007). Métodos em Fitopatologia. Editora UFV, Viçosa, 382p
- Al-Hatmi, A. M., Mirabolfathy, M., Hagen, F., Normand, A. C., Stielow, J. B., Karami-Osbo, R., van Diepeningen, A. D., Meis, J. F. & de Hoog, G. S. (2016a). DNA barcoding, MALDI-TOF and AFLP data support *Fusarium ficicrescens* as a distinct species within the *F. fujikuroi* species complex. *Fungal Biology* 120, 265-278
- Assante, G., Maffi, D., Saracchi, M., Farina, G., Moricca, S. & Ragazzi, A. (2004). Histological studies on the mycoparasitism of *Cladosporium tenuissimum* on urediniospores of *Uromyces appendiculatus*. *Mycological research*.108, 170-82
- Aveskamp, M.M., de Gruyter, J., Woudenberg, J.H.C. (2010). Highlights of the *Didymellaceae*: a polyphasic approach to characterise *Phoma* and related pleosporalean genera. *Studies in Mycology*, 65, 1-60
- Boerema, G. H., Gruyter, J., Noordeloos, M. E., Hamers, M. E. C. (2004). *Phoma* identification manual. Differentiation of specific and infra-specific taxa in culture. CABI publishing, Wallingford, U.K
- Bragança, C. A., Damm, U., Baroncelli, R., Júnior, N. S. M. & Crous, P. W. (2016) Species of the *Colletotrichum acutatum* complex associated with anthracnose diseases of fruit in Brazil. *Fungal Biology*, 120, 547-561
- Carnegie, A. J. & Lidbetter, J.R. (2012). Rapidly expanding host range for *Puccinia psidii* sensu lato in Australia. *Australasian Plant Pathology*, 41, 13-29
- Carnegie, A. J., Kathuria, A., Pegg, G. S., Entwistle, P., Nagel, M. & Giblin, F. R. (2015). Impact of the invasive rust *Puccinia psidii* (myrtle rust) on native Myrtaceae in natural ecosystems in Australia. *Biological Invasions*, 18, 127-144

- Coutinho, T. A., Wingfield, M.J., Alfenas, A. C. & Crous, P. W. (1998). *Eucalyptus* rust: a disease with the potential for serious international implications. *Plant Disease* 82, 819-825
- Damm, U., Cannon, P. F., Woudenberg, J. H. C. & Crous, P. W. (2012). The *Colletotrichum acutatum* species complex. *Studies in Mycology* 73, 37-113
- Darriba D., Taboada, G. L., Doallo, R. & Posada, D. (2015). jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing
- Edwards, J., Auer, D., de Alwis, S. K., Summerell, B., Aoki, T., Proctor, R., Busman, M. & O'Donnell, K. (2016). *Fusarium agapanthi* sp. nov, a novel bikaverin and fusarubin-producing leaf and stem spot pathogen of *Agapanthus praecox* (African lily) from Australia and Italy. *Mycologia*
- Ferreira, F. A. (1983). *Eucalyptus* rust: *Revista Árvore* 7, 91-109
- Gauthier., Nicole., Maruthachalam., Karunakaran., Subbarao., Krishna., Brown., Matthew., Xiao., Ying., Robertson., Clark., Schneider & Raymond. (2014). Mycoparasitism of *Phakopsora pachyrhizi*, the soybean rust pathogen, by *Simplicillium lanosoniveum*. *Biological Control*, 76, 87-94
- Giblin, F. (2013). Myrtle rust report: New Caledonia. Assessment of myrtle rust situation in New Caledonia. University of the Sunshine Coast Maroochydoore, Queensland, Australia.
- Gordon, T. C. & Pfender, W. F. (2012). Effects of the mycoparasite *Sphaerellopsis filum* on overwintering survival of stem rust in perennial ryegrass. *Plant Disease*, 96, 1471-1481

- Herron, D. A., Wingfield, M. J., Wingfield, B. D., Rodas, C. A., Marinowitz, S. & Steenkamp, E. T. (2015). Novel taxa in the *Fusarium fujikuroi* species complex from *Pinus* spp. *Studies in Mycology*, 80, 131 - 150
- Hoffmann, K., Pawłowska, J., Walther, G., Wrzosek, M., de Hoog G. S., Benny, G. L., Kirk, P. M. & Voigt, K. (2013). The family structure of the *Mucorales*: a synoptic revision based on comprehensive multigene-genealogies. *Persoonia*, 30, 57-76
- Inácio, C. A., Carvalho, R. C. P. & Morgado, F. G. A. (2011). A Tomato Fruit Rot Caused by *Trichothecium roseum* in Brazil. *Plant Disease*, 95, 1318
- Kajamuhan, A., Saslis., Lagoudakis, H. & Shaw, M. W. (2015). Genetic diversity and specialisation of *Eudarlucacaricis* on some graminaceous *Puccinia* species. *Fungal Ecology*, 14, 116-124
- Kawanishi, T., Uemastu, S., Kakishima, M., Kagiwada, S., Hamamoto, H., Horie, H. & Namba, S. (2009). First report of rust disease on ohia and the causal fungus in Japan. *Journal of Genetic Plant Pathology*, 75, 428-431
- Laudon, G. F. & Waterston, J. M. (1965). *Puccinia psidii*: CMI descriptions of plant pathogenic fungi and bacteria. *Commonwealth Mycology Institute*, 56
- Laurence, M. H., Walsh, J. L., Shuttleworth, L. A., Robinson, D. M., Johansen, R. M., Petrovic, T., Vu, T. T. H., Burgess, L. W., Summerell, B. A. & Liew, E. C. Y. (2015) Six novel species of *Fusarium* from natural ecosystems in Australia. *Fungal Diversity* 77, 349-366
- Leslie, J. F. & Summerell, B.A. (2006). The *Fusarium* Laboratory Manual. Blackwell, Oxford

- MacLachlan, J. D. (1938). A rust of the pimento tree in Jamaica, *B.W.I. Phytopathology*, 28, 157-170
- Mahadevakumar, S., Jayaramaiah, K. M. & Janardhana, G. R (2014). First report of leaf spot disease caused by *Epicoccum nigrum* on *Lablab purpureus* in India. *Plant Disease*, 98, 284
- Manimohan, P. & Mannethody, S. (2011). *Zygosporium gibbum*: a new and remarkable rust hyperparasite. *Mycosphere*, 2, 219-222
- Mathivanan, N., Kabilan, V. & Murugesan, K. (1998). Purification, characterization, and antifungal activity of chitinase from *Fusarium chlamydosporum*, a mycoparasite to groundnut rust, *Puccinia arachidis*. *Canadian Journal of Microbiology*, 44, 646-651
- May-De Mio, L. L., Negri, G. & Themis J. M. (2014). Effect of *Trichothecium roseum*, lime sulphur and phosphites to control blossom blight and brown rot on peach. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 36, 428-437
- Mellano, V. (2006). Rust on myrtle found in San Diego County. Healthy Garden-Healthy Home, University of California Cooperative Extension Retail Nursery, 1-3
- Miller, M.A., Pfeiffer, W. & Schwartz, T. (2010) "Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees" in Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop (GCE), *New Orleans*, 1-8
- O'Donnell, K., Cigelnik, E. (1997). Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 7, 103-116

- O'Donnell, K., Kistler, H.C., Cigelnik, E. & Ploetz, R. C. (1998). Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: Concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95, 2044-2049
- Oh, S. Y., Nam, K. W. & Yoon, D. H. (2014). Identification of *Acremonium acutatum* and *Trichothecium roseum* isolated from grape with white stain symptom in Korea. *Mycobiology*, 42, 269-273
- Pei, M. H., Ruiz, C., Hunter, T. & Bayon, C. (2010). Interactions between *Melampsora larici-epitea* pathotypes and the mycoparasite *Sphaerellopsis filum* from willow rusts. *Forest Pathology*, 40, 33-42
- Rambaut, A. (2009). FigTree 1.2.2. Disponível em <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>
- Rannala, B. & Yang, Z. (1996). Probability distribution of molecular evolutionary trees: a new method of phylogenetic inference. *Journal of Molecular Evolution*, 43, 304-311
- Rayner, R. W. (1970). A Mycological Colour Chart. Kew: Commonwealth Mycological Institute;
- Ronquist, F. & Heulsenbeck, J. P. (2003). MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, 19, 1572-1574
- Roux, J., Greyling, I., Coutinho, T. A., Verleur, M. & Wingfield, M. J. (2013). The myrtle rust pathogen, *Puccinia psidii*, discovered in Africa. *IMA Fungus* 4, 155-159
- Scauflaire, J., Gourgue, M. & Munant, F. (2011). *Fusarium temperatum* f. sp. nov. from

- maize, an emergent species closely related to *Fusarium subglutinans*. *Mycologia*, 103, 586-597
- Schwarz, G. (1978). Estimating the dimension of a model. *The Annals of Statistics*, 6, 461-464
- Summerbell, R. C., Gueidan, C., Schroers, H. J., de Hoog, G. S., Starink, M., Arocha, Y., Rosete, J. & Guarro, J. A. (2011). *Acremonium* phylogenetic overview and revision of *Gliomastix*, *Sarocladium*, and *Trichothecium*. *Studies in Mycology*, 68, 139-162
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. & Kumar, S. (2011). MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology Evolution*, 28, 2731-2739
- Templeton, M. D., Rikkerink, E. H., Solon, S. L. & Crowhurst, R. N. (1992). Cloning and molecular characterization of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-encoding gene and cDNA from the plant pathogenic fungus *Glomerella cingulata*. *Gene*, 122, 225-30
- Uchida, J., Zhong, S. & Killgore, E. (2006). First report of a rust disease on Ohi' a caused by *Puccinia psidii* in Hawaii. *Plant Disease*, 90, 524
- Vilgalys, R. & Hester, M. (1990). Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. *Journal of Bacteriology*, 172, 4238-4246
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. & Taylor, J.W. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR Protocols: A*

Guide to Methods and Applications, 18, 315-322

Winter, G. (1884). Repertorium. Rabenhorstii fungi europaei et extraeuropaei.

Cent.XXXI et XXXII. *Hedwigia* 23, 164-172

Wu, D. & Zhang, D. H. (2017). First Report of *Epicoccum nigrum* causing brown

leaf spot of loquat in Southwestern China. *Plant Disease*, 101, 1553

Xue, C. S., Xu, J. N., Sun, J. Y., Lu, Y. Y., Li, G. F. & Xiao, S. Q. (2016). First

Report of *Trichothecium roseum* Causing Maize (*Zea mays*) Ear Rot in

Northern China. *Plant Disease*, 100, 2324-2324

Zhuang, J. Y., Wei, S. X. (2011). Additional materials for the rust flora of Hainan

Province, China. *Mycosystema* 30, 853-860

Tabela 1. Isolados de *Colletotrichum* spp. com o número de acesso ao Genbank das sequências usadas neste estudo

| Espécies | Isolado | Nº de acesso das sequências no GenBank | | Referências |
|------------------------|------------|--|-----------|----------------------|
| | | GAPDH | TUB | |
| <i>C. acerbum</i> | CBS 128530 | JQ948790 | JQ950110 | Damm U et al. (2012) |
| <i>C. acutatum</i> | CBS 113600 | JQ948679 | JQ949999 | Damm U et al. (2012) |
| <i>C. acutatum</i> | CBS 111993 | JQ948680 | JQ950000 | Damm U et al. (2012) |
| <i>C. australe</i> | CBS 116478 | JQ948786 | JQ950106 | Damm U et al. (2012) |
| <i>C. australe</i> | CBS 131325 | JQ948787 | JQ950107 | Damm U et al. (2012) |
| <i>C. brisbanense</i> | CBS 29267 | JQ948621 | JQ949942 | Damm U et al. (2012) |
| <i>C. chrysanthemi</i> | CBS 126518 | JQ948601 | JQ949922 | Damm U et al. (2012) |
| <i>C. chrysanthemi</i> | CBS 126519 | JQ948602 | JQ949923 | Damm U et al. (2012) |
| <i>C. cosmi</i> | CBS 85373 | JQ948604 | JQ949925 | Damm U et al. (2012) |
| <i>C. costaricense</i> | CBS 33075 | JQ 948510 | JQ 949831 | Damm U et al. (2012) |
| <i>C. costaricense</i> | CBS 21178 | JQ 948511 | JQ 949832 | Damm U et al. (2012) |
| <i>C. cuscatae</i> | IMI 304802 | JQ948525 | JQ949846 | Damm U et al. (2012) |
| <i>C. fioriniae</i> | CBS 128517 | JQ948622 | JQ949943 | Damm U et al. (2012) |
| <i>C. fioriniae</i> | CBS 20035 | JQ948623 | JQ949944 | Damm U et al. (2012) |
| <i>C. godetiae</i> | CBS 13344 | JQ948733 | JQ950053 | Damm U et al. (2012) |
| <i>C. godetiae</i> | CBS 28550 | JQ948734 | JQ950054 | Damm U et al. (2012) |
| <i>C. guajavae</i> | IMI 350839 | JQ948600 | JQ949921 | Damm U et al. (2012) |
| <i>C. indonesiense</i> | CBS 127551 | JQ948618 | JQ949939 | Damm U et al. (2012) |
| <i>C. johnstonii</i> | IMI 357027 | JQ948774 | JQ950094 | Damm U et al. (2012) |

| | | | | |
|--------------------------|------------|-----------|-----------|----------------------|
| <i>C. johnstonii</i> | CBS 128532 | JQ948775 | JQ950095 | Damm U et al. (2012) |
| <i>C. khinghornii</i> | CBS 19835 | JQ948785 | JQ950105 | Damm U et al. (2012) |
| <i>C. laticiphilum</i> | CBS 112989 | JQ948619 | JQ949940 | Damm U et al. (2012) |
| <i>C. laticiphilum</i> | CBS 129827 | JQ948620 | JQ949941 | Damm U et al. (2012) |
| <i>C. limetticola</i> | CBS 11414 | JQ948523 | JQ949844 | Damm U et al. (2012) |
| <i>C. lupini</i> | CBS 109225 | JQ 948484 | JQ 949806 | Damm U et al. (2012) |
| <i>C. lupini</i> | CBS 109216 | JQ 948486 | JQ 949807 | Damm U et al. (2012) |
| <i>C. melonis</i> | CBS 15984 | JQ948524 | JQ949845 | Damm U et al. (2012) |
| <i>C. nymphaeae</i> | CBS 51678 | JQ948528 | JQ949849 | Damm U et al. (2012) |
| <i>C. nymphaeae</i> | CBS 51578 | JQ948527 | JQ949848 | Damm U et al. (2012) |
| <i>C. orchidiphilum</i> | CBS 63280 | JQ 948481 | JQ 949802 | Damm U et al. (2012) |
| <i>C. orchidiphilum</i> | CBS 63180 | JQ 948482 | JQ 949803 | Damm U et al. (2012) |
| <i>C. paxtonii</i> | IMI 165753 | JQ948615 | JQ949936 | Damm U et al. (2012) |
| <i>C. paxtonii</i> | CBS 50297 | JQ948616 | JQ949937 | Damm U et al. (2012) |
| <i>C. phormii</i> | CBS 118194 | JQ948777 | JQ950097 | Damm U et al. (2012) |
| <i>C. phormii</i> | CBS 19935 | JQ948778 | JQ950098 | Damm U et al. (2012) |
| <i>C. pseudoacutatum</i> | CBS 43677 | JQ948811 | JQ950131 | Damm U et al. (2012) |
| <i>C. pyricola</i> | CBS 128531 | JQ948776 | JQ950096 | Damm U et al. (2012) |
| <i>C. rhombiforme</i> | CBS129953 | JQ948788 | JQ950108 | Damm U et al. (2012) |
| <i>C. rhombiforme</i> | CBS 131322 | JQ948789 | JQ950109 | Damm U et al. (2012) |
| <i>C. salicis</i> | CBS 60794 | JQ948791 | JQ950111 | Damm U et al. (2012) |
| <i>C. salicis</i> | CBS 19156 | JQ948792 | JQ950112 | Damm U et al. (2012) |
| <i>C. scovillei</i> | CBS 126529 | JQ948597 | JQ949918 | Damm U et al. (2012) |

| | | | | |
|--------------------------|----------------|-----------|-----------|----------------------|
| <i>C. scovillei</i> | CBS 126530 | JQ948598 | JQ949919 | Damm U et al. (2012) |
| <i>C. simmondsii</i> | CBS 122122 | JQ948606 | JQ949927 | Damm U et al. (2012) |
| <i>C. simmondsii</i> | CBS 29467 | JQ948607 | JQ949928 | Damm U et al. (2012) |
| <i>C. sloanei</i> | IMI 364297 | JQ948617 | JQ949938 | Damm U et al. (2012) |
| <i>C. sp</i> | CBS 129821 | JQ 948512 | JQ 949833 | Damm U et al. (2012) |
| <i>C. sp</i> | CBS 129820 | JQ 948513 | JQ 949834 | Damm U et al. (2012) |
| <i>C. sp</i> | CBS 129823 | JQ948522 | JQ949843 | Damm U et al. (2012) |
| <i>C. sp</i> | CBS 101611 | JQ948526 | JQ949847 | Damm U et al. (2012) |
| <i>C. sp</i> | CBS 129810 | JQ 948509 | JQ 949830 | Damm U et al. (2012) |
| <i>C. tamarilloi</i> | CBS 129814 | JQ 948514 | JQ 949835 | Damm U et al. (2012) |
| <i>C. tamarilloi</i> | CBS 129811 | JQ948515 | JQ949836 | Damm U et al. (2012) |
| <i>C. walleri</i> | CBS 125472 | JQ948605 | JQ949926 | Damm U et al. (2012) |
| <i>C. melonis</i> | PFLB 18 | | | This study |
| <i>C. melonis</i> | PFLB 10 | | | This study |

Tabela 2. Isolados de *Epicoccum*spp.e*Phomaspp.* com o número de acesso ao Genbank das sequências usadas neste estudo

| Nº de acesso das sequências no GenBank | | | |
|--|-------------|----------|----------------------|
| Espécies | Isolados | ITS | Referências |
| <i>Didymella adianticola</i> | CBS 258.92 | GU237811 | Aveskamp et al. 2010 |
| <i>Didymella pisi</i> | CBS 122785 | GU237763 | Aveskamp et al. 2010 |
| <i>Didymella urticicola</i> | PD 73.570 | GU237914 | Aveskamp et al. 2010 |
| <i>Didymella adianticola</i> | CBS 258.92 | GU237811 | Aveskamp et al. 2010 |
| <i>Didymella adianticola</i> B | CBS 187.83 | GU237796 | Aveskamp et al. 2010 |
| <i>Didymella applanata</i> T | CBS 205.63 | GU237798 | Aveskamp et al. 2010 |
| <i>Didymella catariane</i> | CBS 102635 | GU237727 | Aveskamp et al. 2010 |
| <i>Didymella fabae</i> | CBS 649.71 | GU237902 | Aveskamp et al. 2010 |
| <i>Didymella pisi</i> | CBS 126.54 | GU237772 | Aveskamp et al. 2010 |
| <i>Didymella uticicola</i> T | CBS 121. 75 | GU237761 | Aveskamp et al. 2010 |
| <i>Diplodina coloradensis</i> | CBS 138.25 | GU237784 | Aveskamp et al. 2010 |
| <i>Epicoccum nigrum</i> | CBS 125.82 | FJ426995 | Aveskamp et al. 2010 |
| <i>Epicoccum nigrum</i> T | CBS 173.73 | FJ426996 | Aveskamp et al. 2010 |
| <i>Epicoccum pimprinu</i> T | CBS 246.60 | FJ427049 | Aveskamp et al. 2010 |
| <i>Epicoccum sorghi</i> | CBS 179.80 | FJ427067 | Aveskamp et al. 2010 |
| <i>Epicoccum sorghi</i> | CBS 627.68 | FJ427072 | Aveskamp et al. 2010 |
| <i>Leptosphaerulina arachidicola</i> | CBS 275.59 | GU237829 | Aveskamp et al. 2010 |
| <i>Microsphaeropsis olivacea</i> | CBS 432.71 | GU237863 | Aveskamp et al. 2010 |
| <i>Microsphaeropsis olivacea</i> | CBS 233.77 | GU237803 | Aveskamp et al. 2010 |

| | | | |
|--|------------|----------|----------------------|
| <i>Peyronellaea aurea</i> B | CBS 269.93 | GU237818 | Aveskamp et al. 2010 |
| <i>Peyronellaea coffeae-arabicae</i> | CBS 123398 | FJ426994 | Aveskamp et al. 2010 |
| <i>Peyronellaea coffeae-arabicae</i> T | CBS 123380 | FJ426993 | Aveskamp et al. 2010 |
| <i>Peyronellaea curtisii</i> B | CBS 251.92 | FJ427038 | Aveskamp et al. 2010 |
| <i>Peyronellaea eucalyptica</i> B | CBS 377.91 | GU237846 | Aveskamp et al. 2010 |
| <i>Peyronellaea gardeniae</i> | CBS 302.79 | FJ427002 | Aveskamp et al. 2010 |
| <i>Peyronellaea gardeniae</i> T | CBS 626.68 | FJ427003 | Aveskamp et al. 2010 |
| <i>Peyronellaea glomerata</i> | CBS 464.97 | FJ427012 | Aveskamp et al. 2010 |
| <i>Peyronellaea glomerata</i> B | CBS 528.66 | FJ427013 | Aveskamp et al. 2010 |
| <i>Peyronellaea sancta</i> T | CBS 281.83 | FJ427063 | Aveskamp et al. 2010 |
| <i>Phoma aubrietiae</i> B | CBS 627.97 | GU237895 | Aveskamp et al. 2010 |
| <i>Phoma brasiliensis</i> T | CBS 120105 | GU237760 | Aveskamp et al. 2010 |
| <i>Phoma celaginililcona</i> B | CBS 122.93 | GU237762 | Aveskamp et al. 2010 |
| <i>Phoma clematidina</i> | CBS 102.66 | FJ426988 | Aveskamp et al. 2010 |
| <i>Phoma clematidina</i> T | CBS 108.79 | FJ426989 | Aveskamp et al. 2010 |
| <i>Phoma crystallifera</i> T | CBS 193.82 | GU237797 | Aveskamp et al. 2010 |
| <i>Phoma draconis</i> B | CBS 186.83 | GU237795 | Aveskamp et al. 2010 |
| <i>Phoma erbarum</i> | CBS 502.91 | GU237874 | Aveskamp et al. 2010 |
| <i>Phoma erbarum</i> B | CBS615.75 | FJ427092 | Aveskamp et al. 2010 |
| <i>Phoma eupyrena</i> B | CBS 374.91 | FJ426999 | Aveskamp et al. 2010 |
| <i>Phoma eupyrena</i> B | CBS 527.66 | FJ427000 | Aveskamp et al. 2010 |
| <i>Phoma fungicola</i> | CBS 633.92 | GU237900 | Aveskamp et al. 2010 |
| <i>Phoma henningsii</i> B | CBS 104.80 | GU237731 | Aveskamp et al. 2010 |

| | | | |
|--|----------------|----------|----------------------|
| <i>Phoma huancayensis</i> | CBS 390.93 | GU237857 | Aveskamp et al. 2010 |
| <i>Phoma huancayensis T</i> | CBS 105.80 | GU237732 | Aveskamp et al. 2010 |
| <i>Phoma infossa</i> | CBS 123394 | FJ427024 | Aveskamp et al. 2010 |
| <i>Phoma infossa T</i> | CBS 123395 | FJ427025 | Aveskamp et al. 2010 |
| <i>Phoma matteuciicola B</i> | CBS 259.92 | GU237812 | Aveskamp et al. 2010 |
| <i>Phoma medicaginis var. macrospora B</i> | CBS 112.53 | GU237749 | Aveskamp et al. 2010 |
| <i>Phoma medicaginis var. macrospora B</i> | CBS 404.65 | GU237859 | Aveskamp et al. 2010 |
| <i>Phoma microchlamydospora</i> | CBS 491.90 | FJ427029 | Aveskamp et al. 2010 |
| <i>Phoma microchlamydospora T</i> | CBS 105.95 | FJ427028 | Aveskamp et al. 2010 |
| <i>Phoma nebulosa B</i> | CBS 503.75 | GU237875 | Aveskamp et al. 2010 |
| <i>Phoma negriana</i> | PD 79.74 | GU237916 | Aveskamp et al. 2010 |
| <i>Phoma omnivirens</i> | CBS 654.77 | FJ427043 | Aveskamp et al. 2010 |
| <i>Phoma omnivirens</i> | CBS 991.95 | FJ427044 | Aveskamp et al. 2010 |
| <i>Phoma plurivora</i> | CBS 28493 | GU237822 | Aveskamp et al. 2010 |
| <i>Phoma plurivora T</i> | CBS 558.81 | GU237888 | Aveskamp et al. 2010 |
| <i>Phoma putaminum B</i> | CBS 130.69 | GU237777 | Aveskamp et al. 2010 |
| <i>Phoma putaminum B</i> | CBS 372.91 | GU237843 | Aveskamp et al. 2010 |
| <i>Phoma saxea</i> | CBS 298.89 | GU237824 | Aveskamp et al. 2010 |
| <i>Phoma saxea T</i> | CBS 419.92 | GU237860 | Aveskamp et al. 2010 |
| <i>Phoma selaginellicola B</i> | CBS 122.93 | GU237762 | Aveskamp et al. 2010 |
| <i>Epicoccum nigrum</i> | PFLB 19 | | This study |
| <i>Didymella adianticola</i> | PFLB 14 | | This study |

Tabela 3. Isolados de *Fusarium* spp. com o número de acesso ao Genbank das sequências usadas neste estudo

| Nº de acesso das sequências no GenBank | | | | |
|--|------------|-----------|-----------|--|
| Espécies | Isolados | TEF | TUB2 | Referências |
| <i>F. acutatum</i> | NRRL13308 | AF160276 | U34431 | Scauftaire et al. (2011), Al-Hatmi et al. (2016a) |
| <i>F. agapanthi</i> | NRRL 54465 | KU9006311 | KU9006361 | Edwards et al. (2016) |
| <i>F. andiyazi</i> | CBS 119857 | KP662901 | KP662894 | Al-Hatmi et al. (2016a) |
| <i>F. anthophilum</i> | NRRL13602 | AF160292 | U61541 | Scauftaire et al. (2011), Al-Hatmi et al. (2016a) |
| <i>F. bactridioides</i> | NRRL20476 | AF160290 | U34434 | Scauftaire et al. (2011). |
| <i>F. begoniae</i> | NRRL25300 | AF160293 | U61543 | Scauftaire et al. (2011) |
| <i>F. brevicatenulatum</i> | NRRL25446 | AF160265 | U61623.1 | Scauftaire et al. (2011) |
| <i>F. bulbicola</i> | NRRL13618 | AF160294 | U61546 | Scauftaire et al. (2011), Proctor et al. (2013) |
| <i>F. circinatum</i> | NRRL25331 | AF160295 | U61547 | Scauftaire et al. (2011), O'Donnell et al. (2013). |
| <i>F. coicis</i> | RBG 5368 | KP083251 | | Laurence et al. (2015) |
| <i>F. concentricum</i> | NRRL25181 | AF160282 | U61548 | Scauftaire et al. (2011) |
| <i>F. denticulatum</i> | NRRL25302 | AF160269 | U34453.1 | Scauftaire et al. (2011) |
| <i>F. dlamirii</i> | NRRL 13164 | AF160277 | U34430 | Scauftaire et al. (2011) |

| | | | | |
|------------------------|------------|----------|----------|--|
| <i>F. ficicrescens</i> | CBS 125178 | KP662899 | KP662896 | Al-Hatmi et al. (2016a) |
| <i>F. fracticaudum</i> | CMW: 25245 | KJ541059 | KJ541051 | Herron et al. (2015) |
| <i>F. fractiflexum</i> | NRRL 28852 | AF160288 | AF160315 | Scauftaire et al. (2011) |
| <i>F. fujikuroi</i> | NRRL13566 | AF160279 | | Scauftaire et al. (2011), O'Donnell et al. (2007) |
| <i>F. globosum</i> | NRRL26131 | AF160285 | | Scauftaire et al. (2011), Proctor et al. (2013) |
| <i>F. guttiforme</i> | NRRL22945 | AF160297 | | Scauftaire et al. (2011), O'Donnell et al. (2013). |
| <i>F. inflexum</i> | NRRL 20433 | AF8479 | U334435 | Scauftaire et al. (2011), O'Donnell et al. (2013) |
| <i>F. lactis</i> | NRRL25200 | AF160272 | | Scauftaire et al. (2011), Triest et al. (2015) |
| <i>F. mangiferae</i> | NRRL 25226 | AF160281 | U61561 | Scauftaire et al. (2011), O'Donnell et al. (2013) |
| <i>F. marasasianum</i> | CMW: 25261 | KJ541063 | KJ541054 | Herron et al. (2015) |
| <i>F. mudagurra</i> | RBG 5717 | KP083256 | | Laurence et al. (2015) |
| <i>F. musae</i> | NRRL 28893 | FN552092 | FN545374 | Van Hove et al. (2011) |
| <i>F. napiforme</i> | NRRL13604 | AF160266 | | Scauftaire et al. (2011), O'Donnell et al. (2007) |
| <i>F. nygamai</i> | NRRL13488 | AF160273 | | Scauftaire et al. (2011), O'Donnell et al. (2007) |
| <i>F. oxysporum</i> | NRRL22902 | AF160312 | | O'Donnell,K. |
| <i>F. parvisorum</i> | CMW: 25267 | KJ541060 | KJ541055 | Herron et al. (2015) |
| <i>F. pininemorale</i> | CMW: 25243 | KJ541064 | KJ541049 | Herron et al. (2015) |
| <i>F. phyllophilum</i> | NRRL13617 | AF160274 | | Scauftaire et al. (2011), Proctor et al. (2013) |

| | | | | |
|-----------------------------|------------------|----------|----------|--|
| <i>F. proliferatum</i> | NRRL22944 | AF160280 | | Scauftaire et al. (2011), O'Donnell et al. (2013). |
| <i>F. pseudoanthophilum</i> | NRRL25206 | AF160264 | | Scauftaire et al. (2011) |
| <i>F. pseudocircinatum</i> | NRRL22946 | AF160271 | | Scauftaire et al. (2011) |
| <i>F. pseudonygamai</i> | NRRL13592 | AF160263 | | Scauftaire et al. (2011) |
| <i>F. ramigenum</i> | NRRL25208 | AF160267 | | Scauftaire et al. (2011) |
| <i>F. sacchari</i> | NRRL 13999 | AF160278 | U34414 | Scauftaire et al. (2011), O'Donnell et al. (2013) |
| <i>F. sororula</i> | CMW: 40578 | KJ541067 | KJ541057 | Herron et al. (2015) |
| <i>F. subglutinans</i> | NRRL22016 | AF160289 | | Scauftaire et al. (2011), O'Donnell et al. (2013) |
| <i>F. succisae</i> | NRRL13613 | AF160291 | | Scauftaire et al. (2011) |
| <i>F. sudanense</i> | CBS 454.97 | KU711697 | KU603909 | |
| <i>F. temperatum</i> | MUCL 52436 | HM067684 | HM067692 | Scauftaire et al. (2011) |
| <i>F. terricola</i> | CBS 483.94 | KU711698 | KU603908 | |
| <i>F. tjaetaba</i> | RBG 5361 | KP083263 | | Laurence et al. (2015) |
| <i>F. thapsinum</i> | NRRL 22045 | AF160270 | U34444 | Scauftaire et al. (2011), O'Donnell et al. (2013) |
| <i>F. udum</i> | NRRL22949 | AF160275 | | Scauftaire et al. (2011) |
| <i>F. verticillioides</i> | NRRL 22172 | AF160262 | U34413 | Scauftaire et al. (2011), O'Donnell et al. (2013) |
| <i>Fusarium. sp</i> | PFLB 15 e | | | This study |
| | PFLB 8 | | | |

Tabela 4. Isolados de *Trichothecium roseum* com o número de acesso ao Genbank das sequências usadas neste estudo

| Espécies | Nº de acesso das sequências no GenBank | | |
|---------------------------|--|----------|-------------------------|
| | Isolado | LSU | Referências |
| <i>A.curvulum</i> | CBS 430.66 | HQ232026 | Summerbell et al., 2011 |
| <i>A.curvulum</i> | CBS 104.78 | HQ232019 | Summerbell et al., 2011 |
| <i>A.curvulum</i> | CBS 214.70 | HQ232020 | Summerbell et al., 2011 |
| <i>A.curvulum</i> | CBS 229.75 | HQ232021 | Summerbell et al., 2011 |
| <i>A.curvulum</i> | CBS 333.92 | HQ232022 | Summerbell et al., 2011 |
| <i>A.curvulum</i> | CBS 384.70A | HQ232023 | Summerbell et al., 2011 |
| <i>A.curvulum</i> | CBS 384.70C | HQ232024 | Summerbell et al., 2011 |
| <i>A.curvulum</i> | CBS 523.72 | HQ232028 | Summerbell et al., 2011 |
| <i>A.curvulum</i> | CBS 761.69 | HQ232029 | Summerbell et al., 2011 |
| <i>A.curvulum</i> | CBS 898.85 | HQ232030 | Summerbell et al., 2011 |
| <i>A.curvulum</i> | CBS 110514 | HQ232032 | Summerbell et al., 2011 |
| <i>T.crotocinigenum</i> T | CBS 129.64 | HQ232018 | Summerbell et al., 2011 |
| <i>T.indicum</i> | CBS 123.78 | AF096194 | Summerbell et al., 2011 |
| <i>T. sympodiale</i> | ATCC 36477 | U69889 | Summerbell et al., 2011 |
| <i>T.roseum</i> | CBS 113334 | | Summerbell et al., 2011 |
| <i>S.bacillisporum</i> T | CBS 425.67 | HQ231992 | Summerbell et al., 2011 |
| <i>A. implicatum</i> | CBS 243.59 | HQ232046 | Summerbell et al., 2011 |

| | | | |
|------------------------------------|---------------|----------|-------------------------|
| <i>S. glaucum T</i> | CBS 796.69 | HQ232041 | Summerbell et al., 2011 |
| <i>S. bacillisporum T</i> | CBS 425.67 | HQ231992 | Summerbell et al., 2011 |
| <i>S. bactrocephalum T</i> | CBS 749.69 | HQ23199 | Summerbell et al., 2011 |
| <i>A. strictum</i> | CBS 106.23 | HQ232138 | Summerbell et al., 2011 |
| <i>A. zonatum</i> | CBS 565.67 | HQ232155 | Summerbell et al., 2011 |
| <i>S. attenuatum T</i> | CBS 399.73 | HQ232165 | Summerbell et al., 2011 |
| <i>S. oryzae</i> | CBS 180.74 | HQ232166 | Summerbell et al., 2011 |
| <i>S. kiliense T</i> | CBS 122.29 | HQ232052 | Summerbell et al., 2011 |
| <i>A. breve T</i> | CBS 150.62 | HQ232005 | Summerbell et al., 2011 |
| <i>A. radiatum T</i> | CBS 142.62 | HQ232104 | Summerbell et al., 2011 |
| <i>A. strictum</i> | CBS 106.23 | HQ232138 | Summerbell et al., 2011 |
| <i>A. gamsii T</i> | CBS 726.71 | HQ232040 | Summerbell et al., 2011 |
| <i>Trichothecium roseum</i> | PFLB 7 | | This study |



Figura 1. Fungos associados com *A. psidii* em diferentes espécies de mirtáceas. **a.** *Fusarium* sp. em fruto de goiabeira; **b.** *T. roseum* em fruto de goiabeira; **c.** *C. melonis* em frutos de goiabeira; **d.** *Fusarium* sp. em fruto de jaboticabeira; **e-f.** *Mucor* sp. em folhas de

jaboticabeira; **g.** *Didymella adianticola* em folha de eucalipto; **h.** *Fusarium* sp. em folhas de eucalipto; **i.** *Epicoccum nigrum* em folhas de jambeiro.

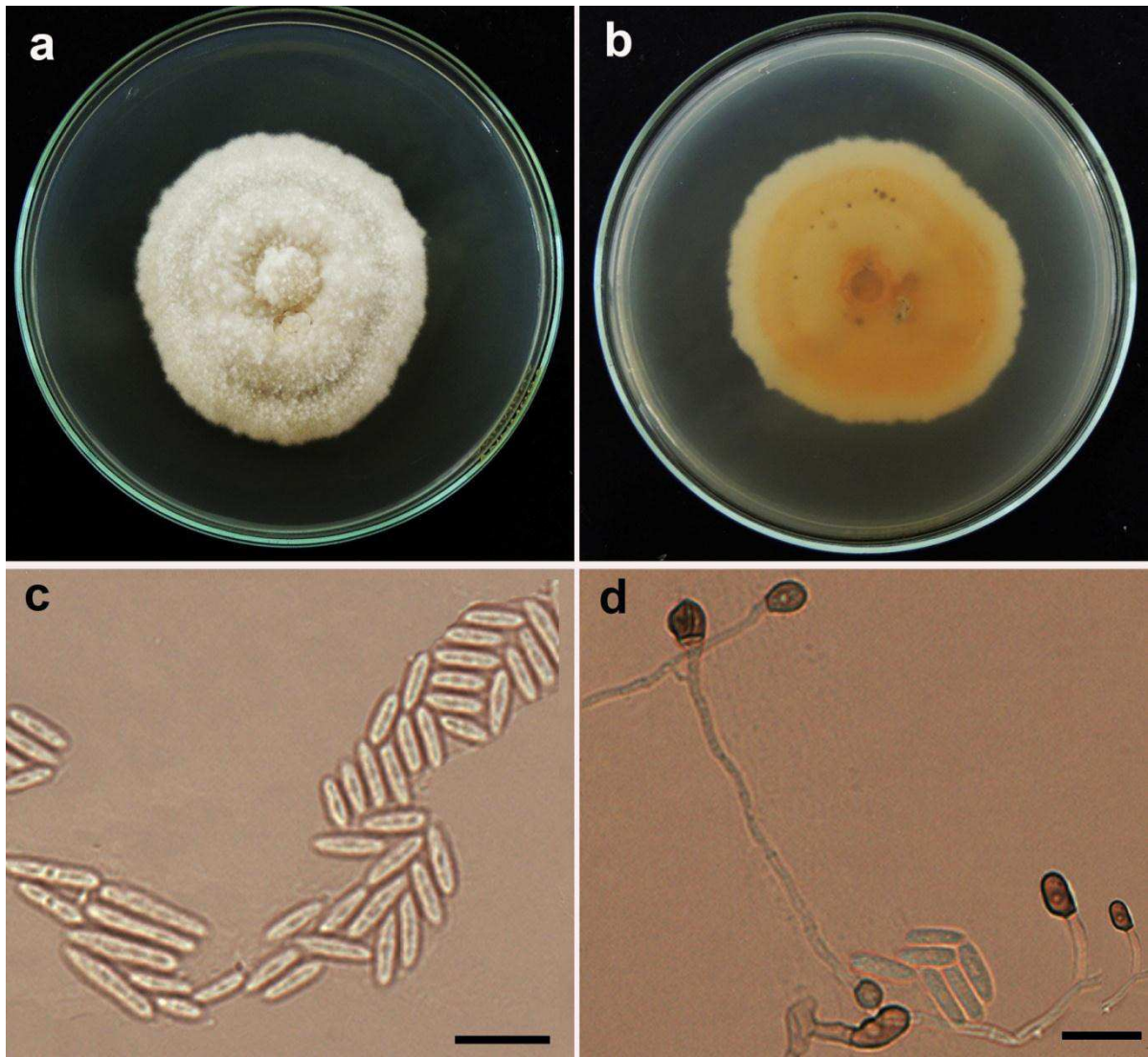


Figura 2. *Colletotrichum melonis*. **a.** Vista superior de colônia em BDA após 12 dias de crescimento; **b.** Vista inferior da mesma colônia; **c.** Conídios hialinos, aseptados, de paredes retas, algumas ligeiramente curvas e **d.** Conidióforos hialinos, ramificados e de paredes lisas; apressório formado individualmente, de cor marrom médio, ligeiramente ondulado. Barras = 20 μ m

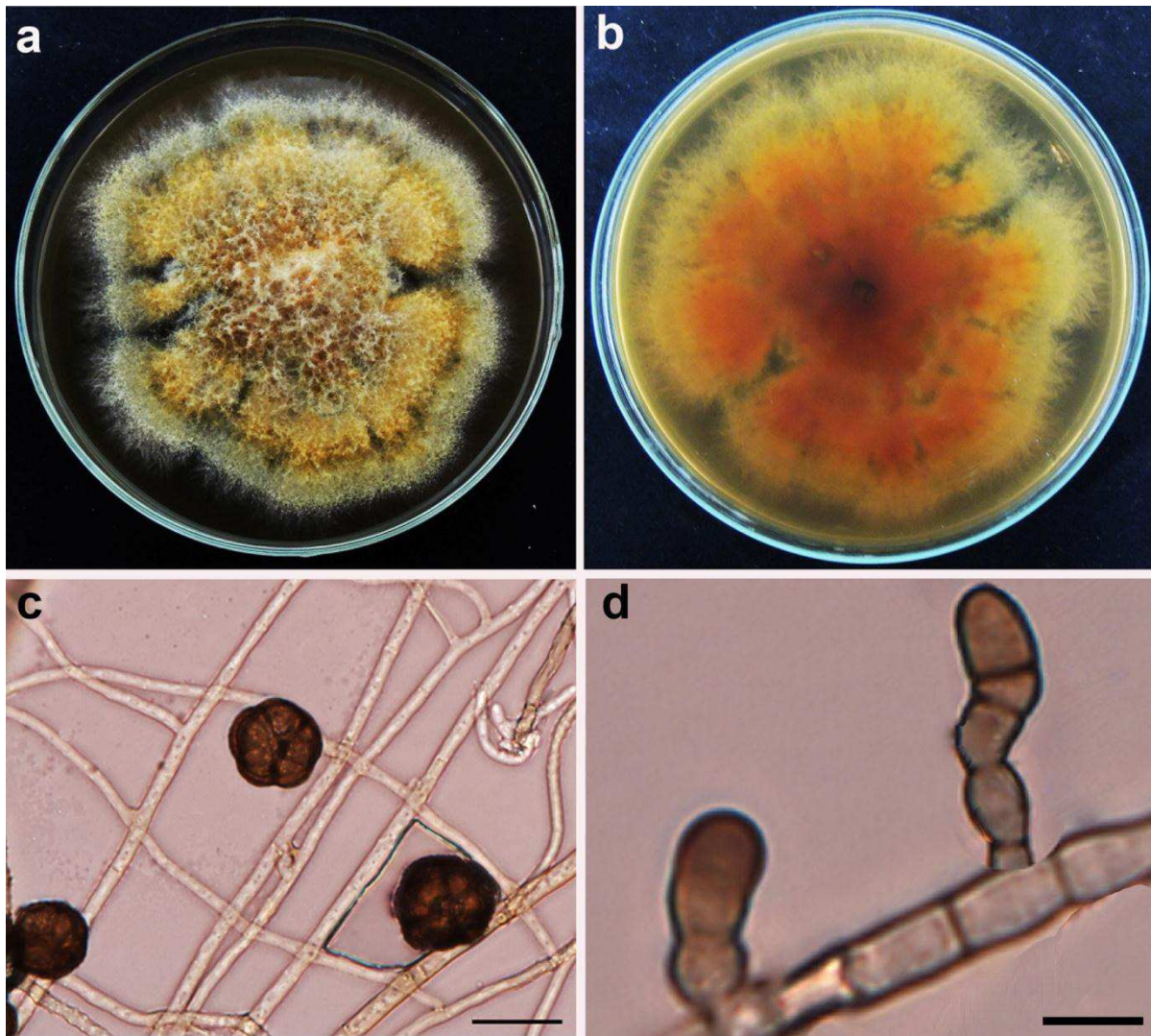


Figura 3. *Epicoccum nigrum*. **a.** Vista superior de colônia em BDA após 12 dias de crescimento; **b.** Vista inferior da mesma colônia; **c.** Clamidósporos globosos multicelulares, de coloração marrom. **d.** Fiálides. Barras = 20 μm

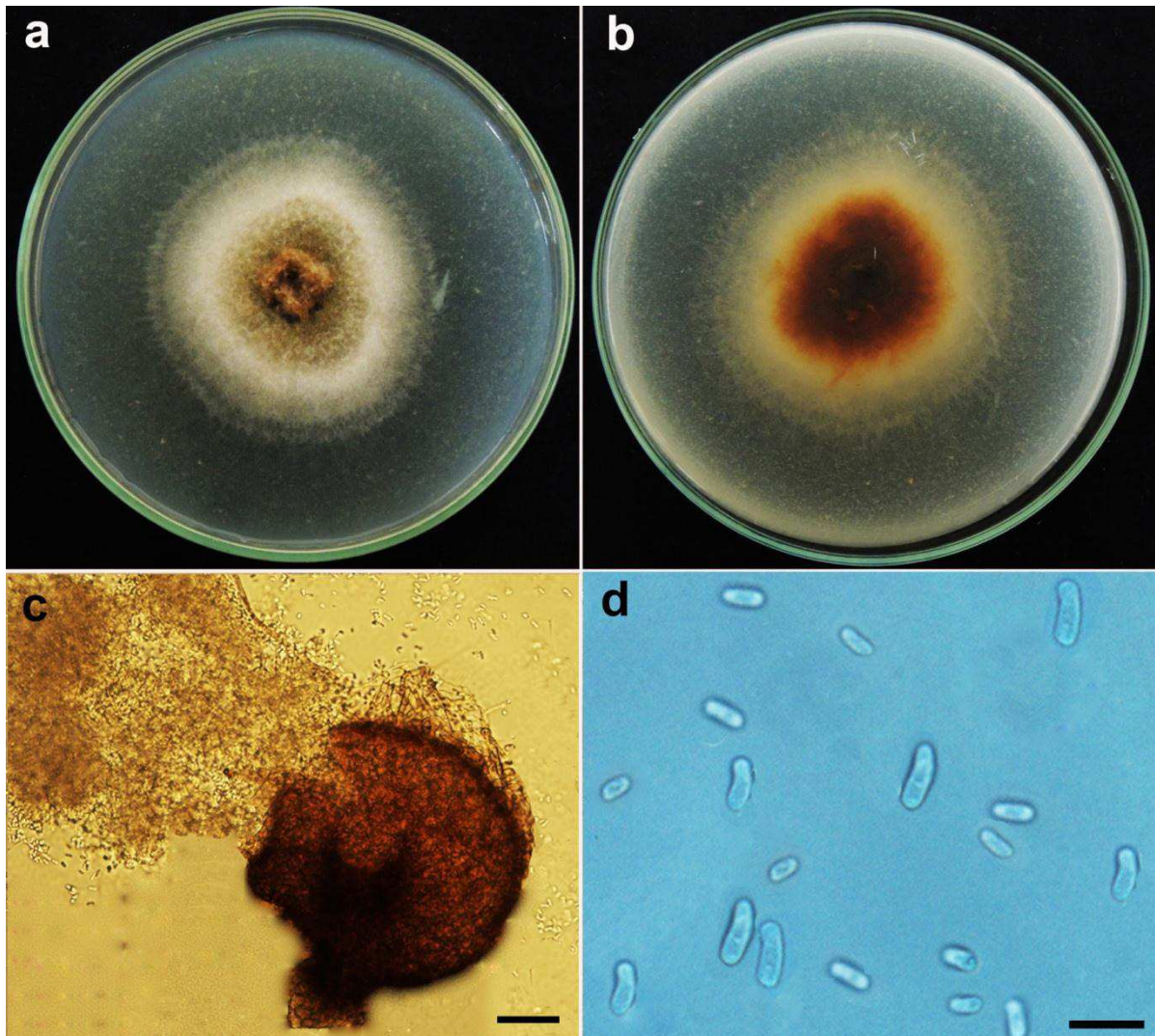


Figura 4. *Didymella adianticola*. **a.** Vista superior de colônia em BDA após 12 dias de crescimento; **b.** Vista inferior da mesma colônia; **c.** Picnídio globoso de coloração marrom com ruptura da parede pela pressão da cutícula; presença de um ostíolo em cada picnídio e **d.** Conídios hialinos com formato algumas vezes irregular. Barra = 5 μ m.

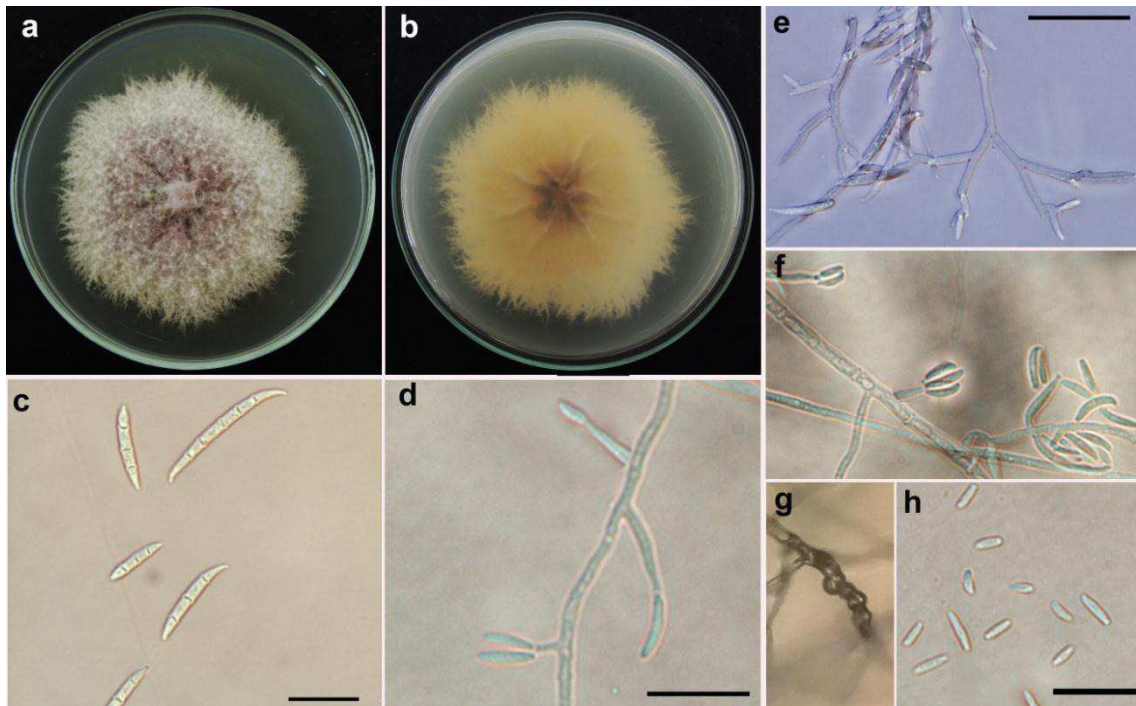


Figura 5. *Fusarium* sp. **a.** Vista superior da colônia em meio de cultura BDA após 12 dias de crescimento. **b.** Vista inferior da colônia em meio de cultura BDA após 12 dias de crescimento. **c.** Macroconídios contendo de 3 a 5 septos com célula apical ligeiramente curvada e célula pé evidente. **d-f.** Presença de mono e polifialides. **g.** Clamidósporos em cadeia e **h.** Microconídios unicelulares.

Barras = 20 μ m

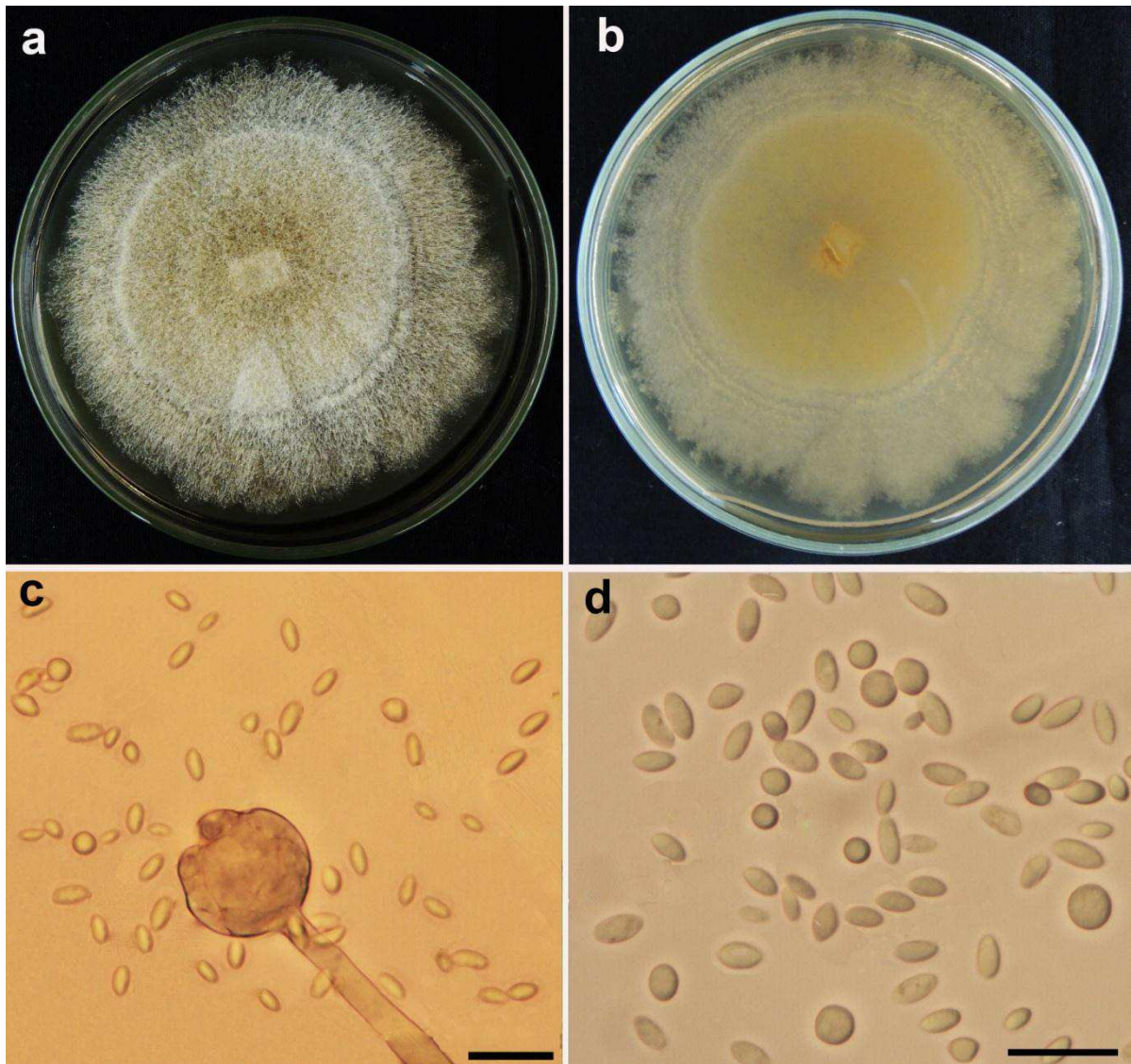


Figura 6. *Mucor* sp. **a.** Vista superior da colônia em BDA após 12 dias de crescimento; **b.** Vista inferior da mesma colônia; **c.** Esporângio com perídio rompido liberando esporangiósoros e **d.** esporangiósoros. Barras = 20 μ m.

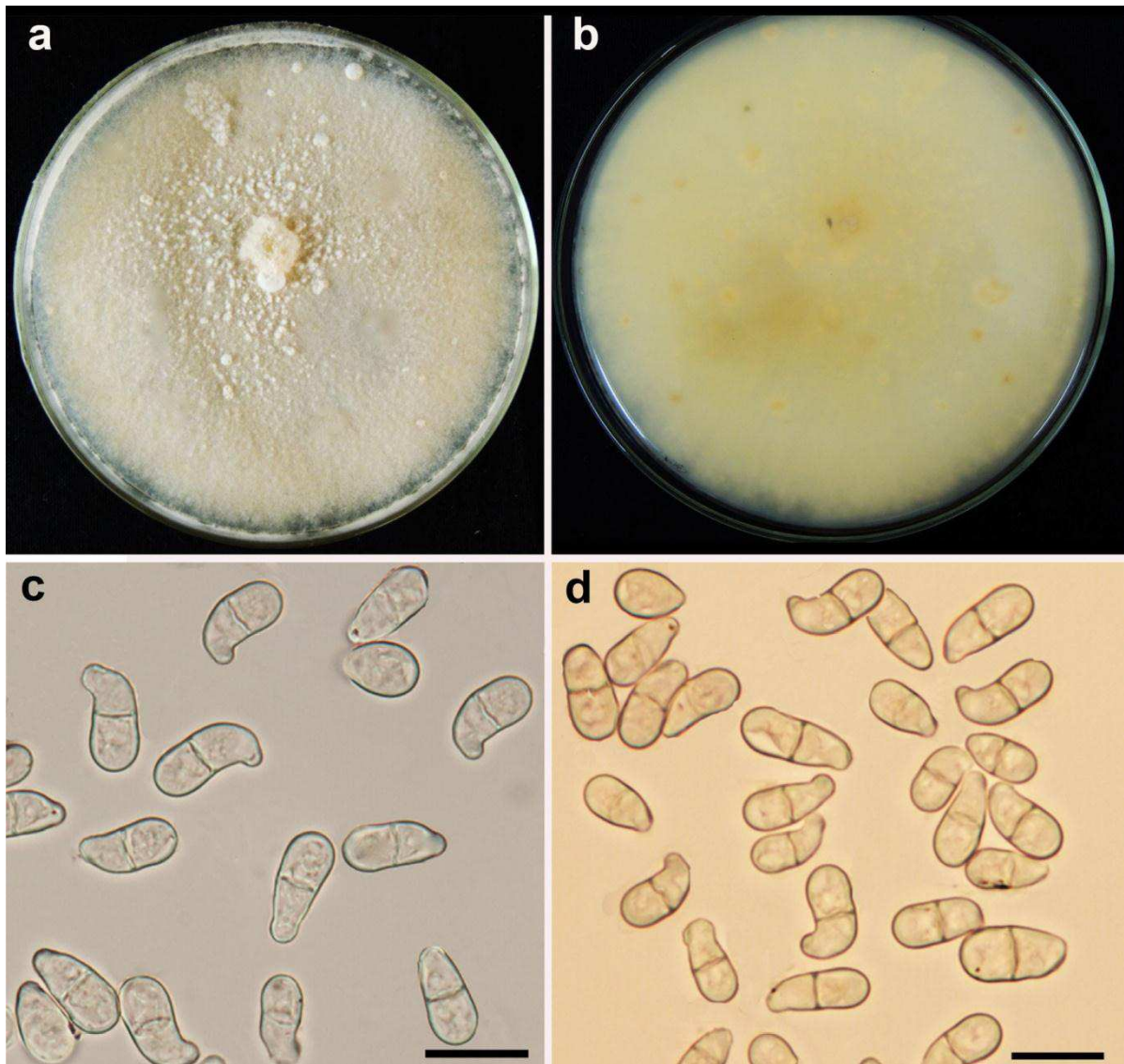


Figura 7. *Trichothecium roseum*. **a.** Vista superior da colônia em BDA após 12 dias de crescimento; **b.** Vista inferior da mesma colônia e **c-d.** Conídios hialinos bicelulares de formato elipsoides a piriformes, tipicamente encurvados na célula basal próximo ao hilo. Barras = 20 μm .

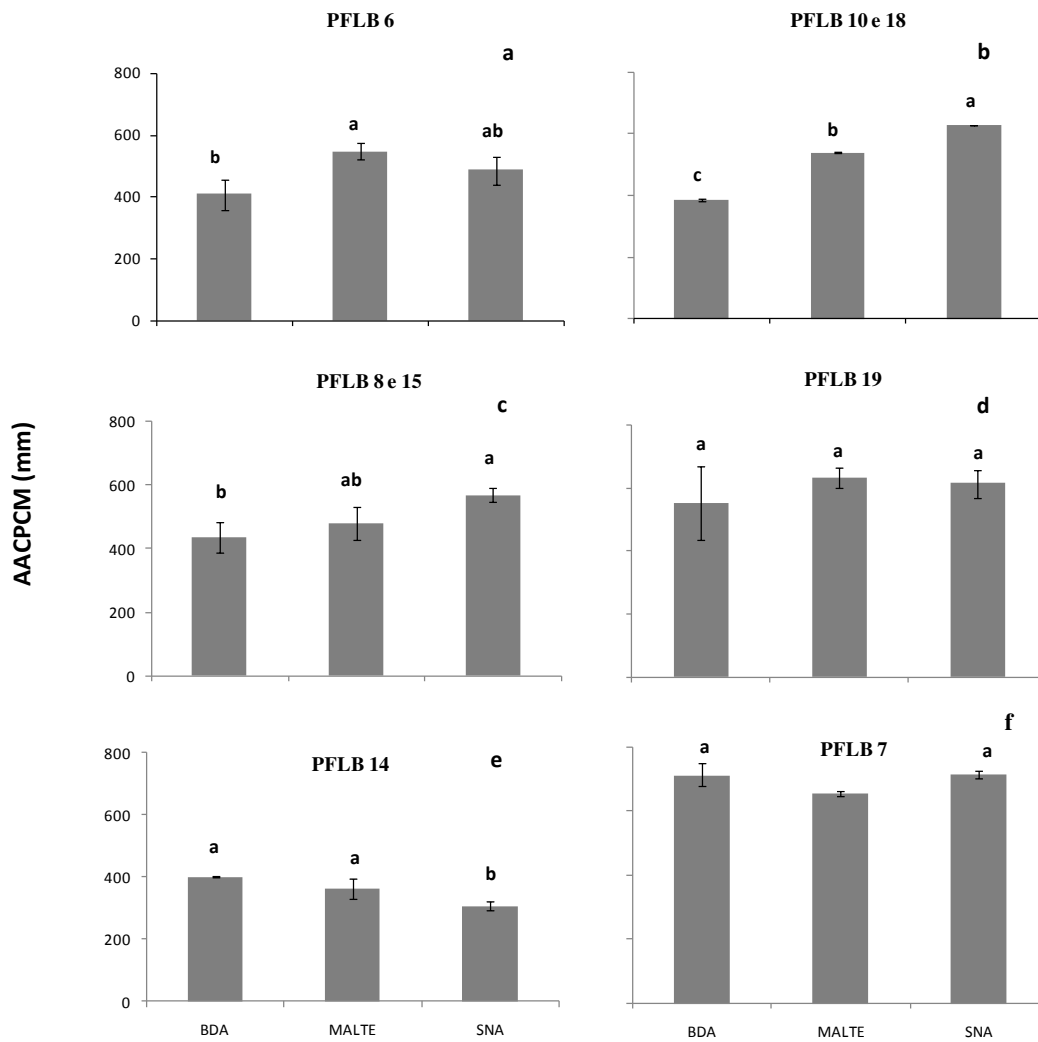


Figura 8. Área abaixo da curva de progresso do crescimento micelial (AACPCM) de fungos micoparasitas de *Austropuccinia psidii* em três diferentes meios de cultura (BDA, MEA e SNA) **a.** isolado PFLB 6 (*Mucor* sp.) **b.** isolados PFLB 10 e 18 (*Colletotrichum melonis*) **c.** PFLB 8 e 15 (*Fusarium* sp.) **d.** PFLB 19 (*Epicoccum nigrum*) **e.** PFLB 14 (*Didymella adianticola*) e **g.** PFLB 7 (*Trichotecium roseum*).

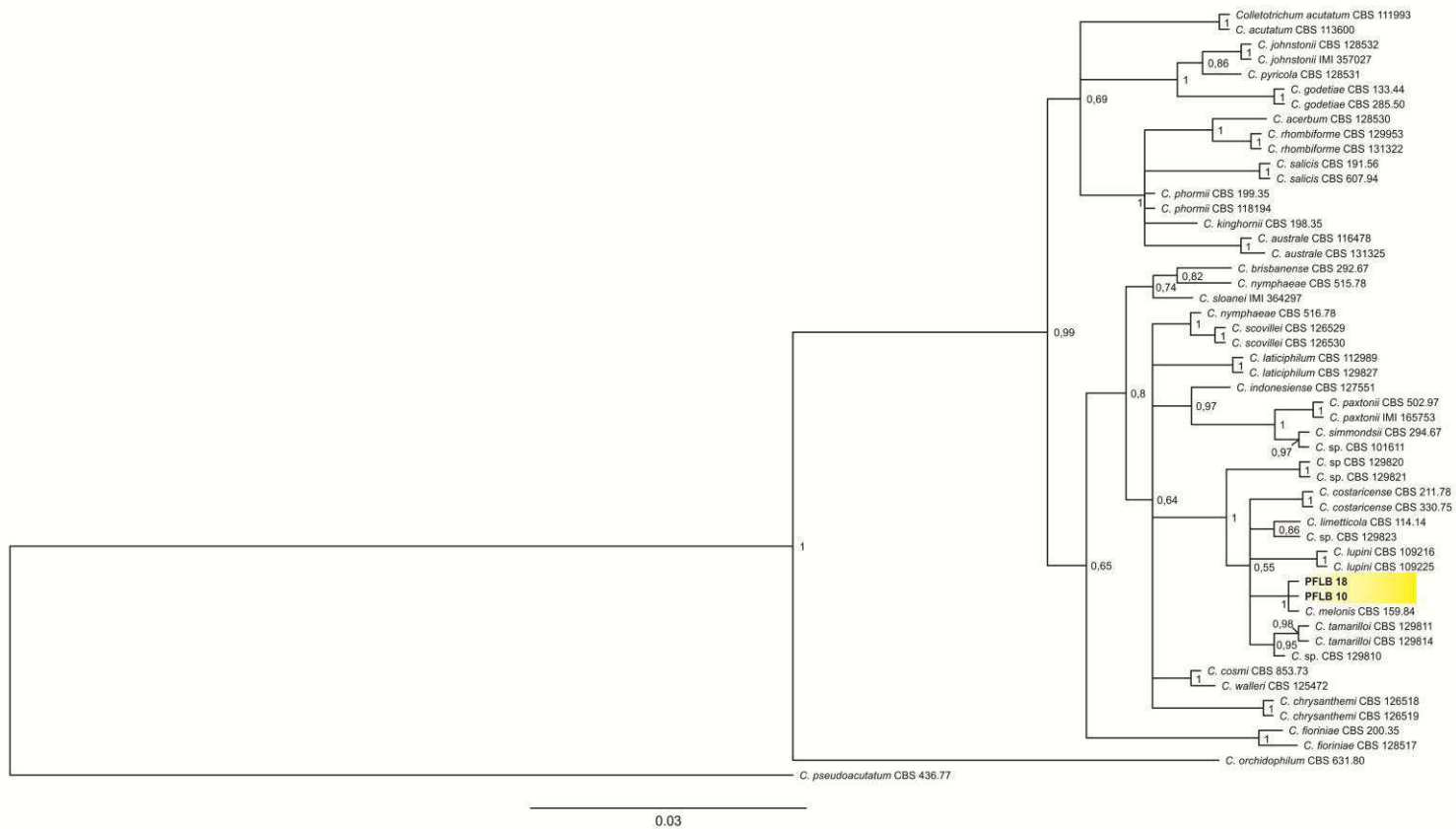


Figura 9. Árvore filogenética construída por meio de Inferência Bayesiana para espécies do complexo *Colletotrichum acutatum* baseada em sequências do gene beta-tubulina (TUB2), incluindo o grupo externo *C. pseudoacutatum*. A probabilidade posterior foi apresentada na topologia.

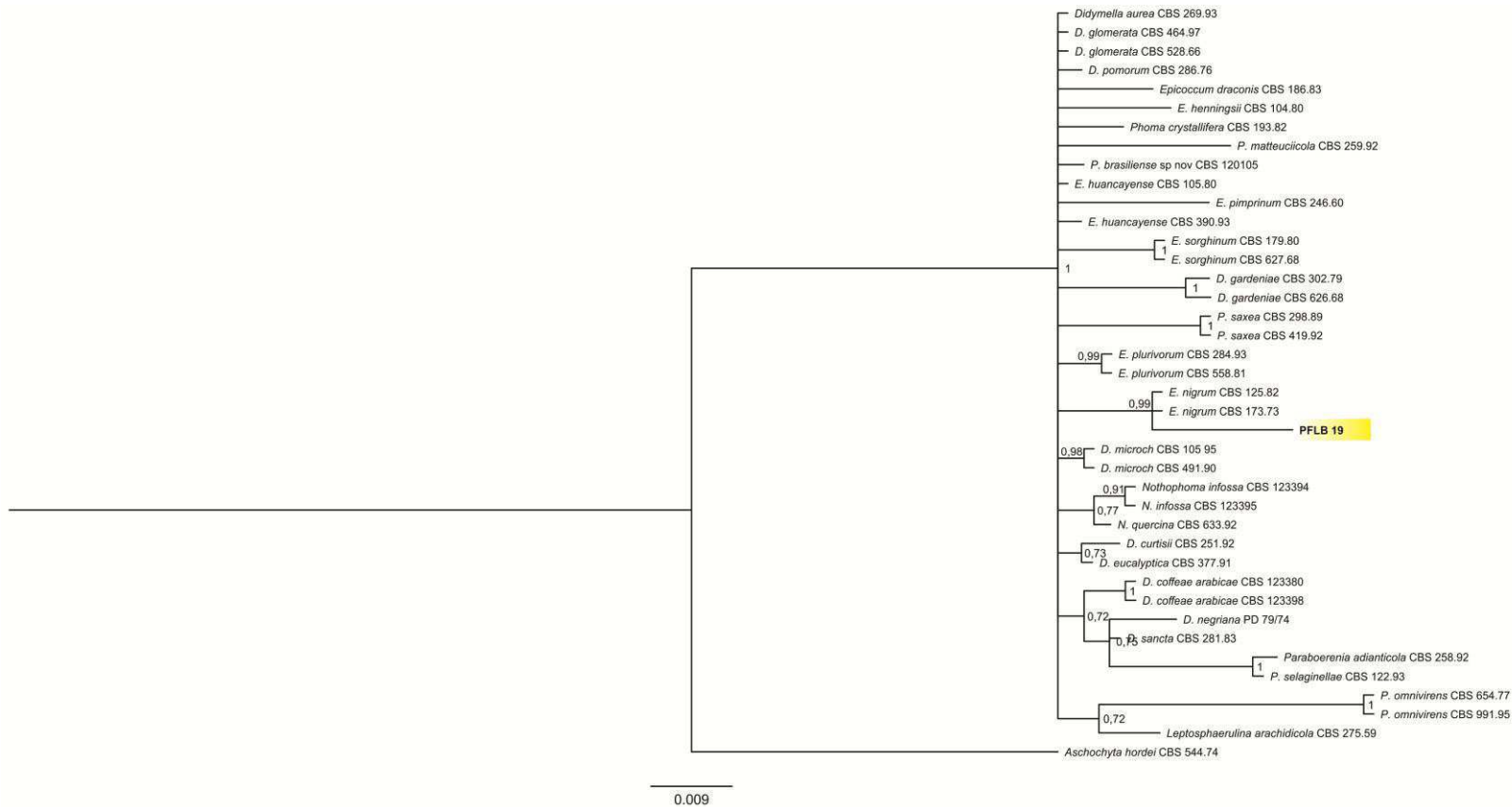


Figura 10. Árvore filogenética construída por meio de Inferência Bayesiana para a espécie *Epicoccum nigrum* baseada em sequências do gene ITS. A probabilidade posterior foi apresentada na topologia e a espécie *Aschochyta hordei* foi usada como grupo externo.

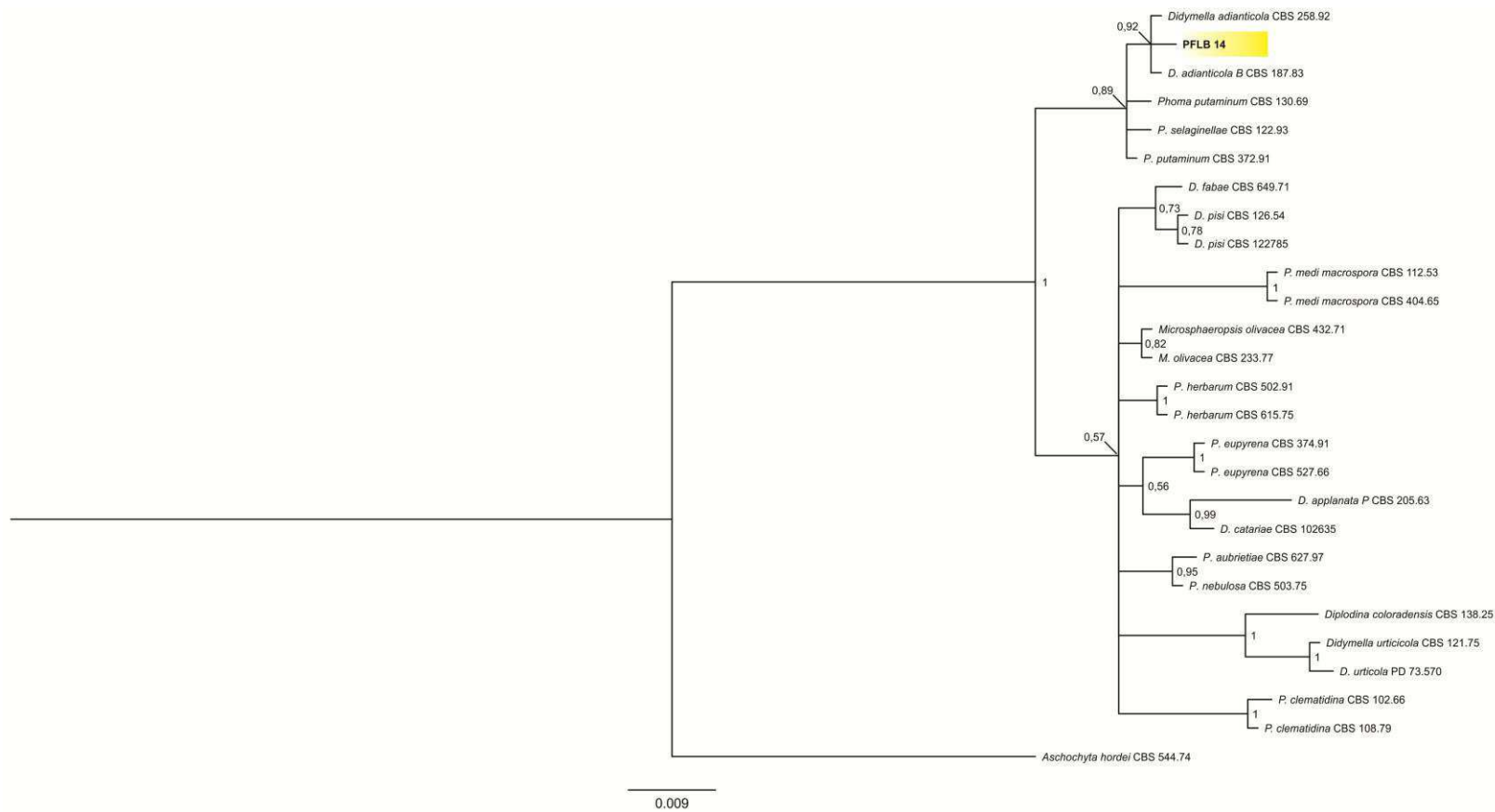


Figura 11. Árvore filogenética construída por meio de Inferência Bayesiana para espécies *Didymella adianticola* baseada em sequências do gene ITS. A probabilidade posterior foi apresentada na topologia e a espécie *Aschochyta hordei* foi usada como grupo externo.

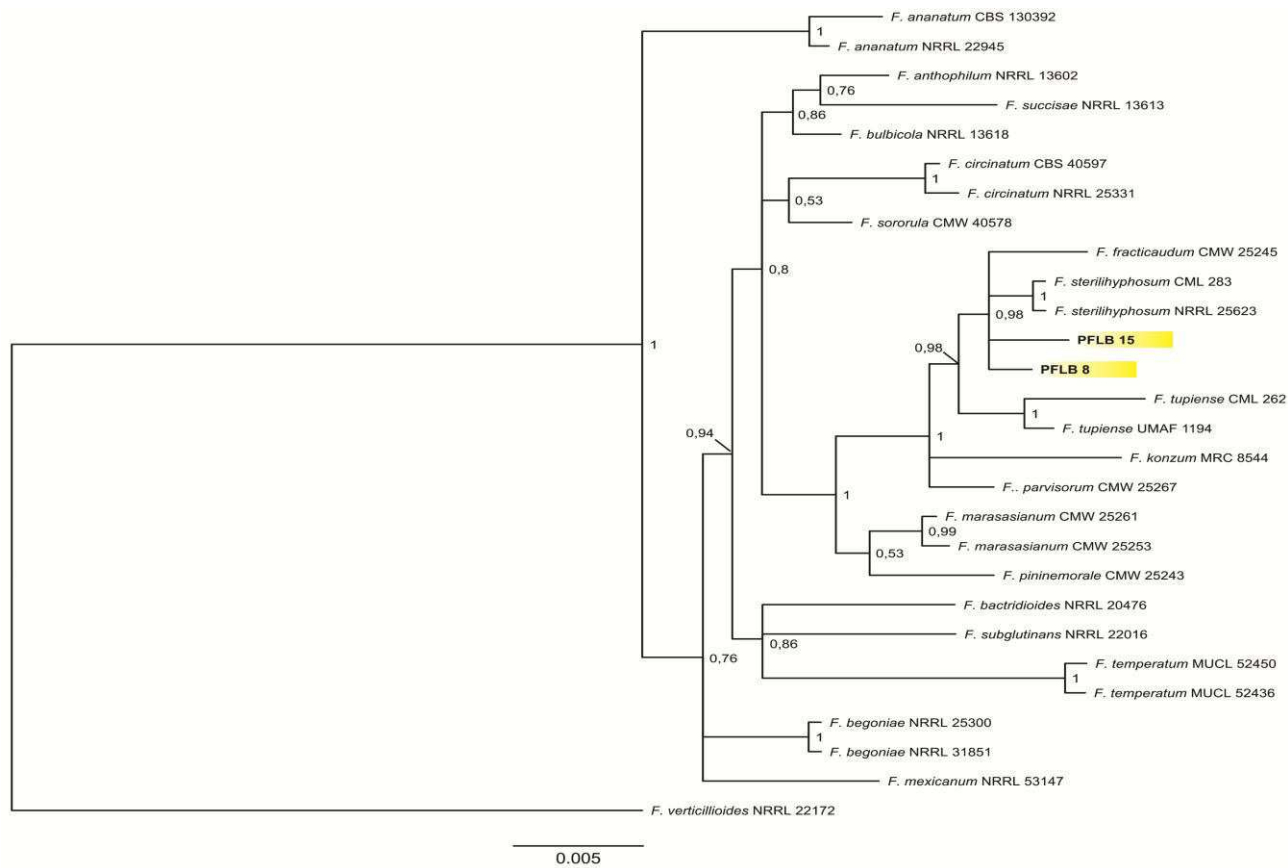


Figura 12. Árvore filogenética de Inferência Bayesiana obtida pela análise concatenada de sequências de duas regiões gênicas (TUB e TEF) para o complexo de espécies *F. fujikuroi*, incluindo o grupo externo *Fusarium verticillioides*. A probabilidade posterior foi apresentada na topologia.

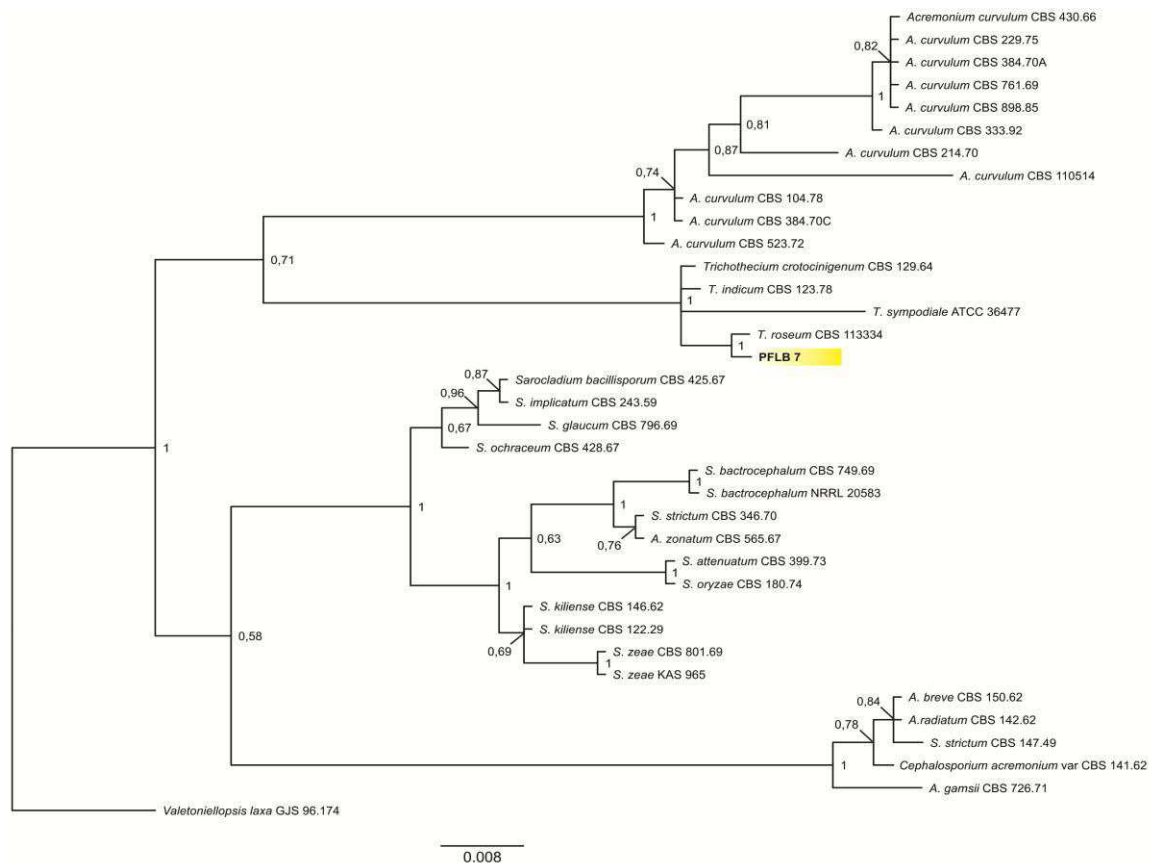


Figura 13. Árvore filogenética de Inferência Bayesiana obtida pela análise da região gênica LSU para a espécie *Trichothecium roseum*, incluindo o grupo externo *Valetoniellopsis laxa*. A probabilidade posterior foi apresentada na topologia.

Capítulo 2 - (De acordo com a norma da revista *European Journal of Plant Pathology*)

**Development and validation of a standard area diagram set to assess rust severity
on eucalyptus leaves**

**Development and validation of a standard area diagram set to assess rust severity
on eucalyptus leaves**

**Luísa Salvador Borges¹, Jonas Alberto Rios¹, Carlos Eduardo Aucique Pérez¹,
Renata Belisário¹ and Gleiber Quintão Furtado^{1*}**

¹Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, *Campus*
Universitário. Avenida Peter Henry Rolfs, s/n, Viçosa, MG. 36570900, Brazil

*Correspondence to G. Q. Furtado, E-mail: gfurtado@ufv.br

Abstract

A standard area diagram set (SADs) to aid assessment of eucalyptus rust severity, caused by *Austropuccinia psidii* on *Eucalyptus* spp. leaves, was developed and validated to improve accuracy, precision, and reliability of visual estimates. The SAD has eight colour images of diseased leaves with severity values ranging from 0.97 to 37.3 %. The SADs were validated by a group of 20 raters, ten experienced and ten inexperienced, who assessed the same set of 50 images twice: the first without the standard area diagrams and the second using them as an aid. The SADs significantly improved accuracy (coefficients of bias were 0.90 and 0.97 for experienced raters and 0.56 and 0.99 for inexperienced raters, with and without standard area diagrams, respectively); precision (correlation coefficients were 0.86 and 0.94 for experienced raters and 0.83 and 0.92 for inexperienced raters, with and without SAD, respectively); and overall agreement (Lin's concordance correlation coefficients were 0.91 and 0.90 for experienced raters and 0.46 and 0.77 for inexperienced raters, with and without SAD, respectively). The estimates of severity of eucalyptus rust were more reliable when using SAD. The inter-rater reliability (coefficient of determination) was significantly increased by using SAD. Therefore, the proposed SAD will be a useful tool to improve accuracy, precision, and reliability of estimates of rust severity on eucalyptus leaves, mainly for inexperienced raters.

Keywords *Austropuccinia psidii*. Epidemiology. Myrtle rust. Phytopatometry. *Puccinia psidii*

1. Introduction

Brazil is the leader in the global rankings of forest productivity, with emphasis on eucalyptus culture. Approximately 5.6 million hectares are planted with eucalyptus and the mean of annual productivity of Brazilian plantations reached 39 cubic meters (Ibá, 2015).

Rust, caused by the fungus *Austropuccinia psidii*, is one of the most important diseases of eucalyptus (Coutinho et al., 1998). The fungus infects *Eucalyptus* spp. with different degrees of severity, as well as several other species of the Myrtaceae family (Zauza et al., 2010; Morin et al., 2012). In Brazil, the disease has caused up to 41% wood-volume losses in some plantations (Takahashi, 2002).

The eucalyptus rust is initially characterized by the formation of small, light-green, slightly raised pustules that develop on young leaves or shoots in nursery seedlings, plants in clonal hedges, plants up to two years old in the field, and in young coppice (Xavier et al., 2001). The higher susceptibility of younger leaves is explained by the greater development of infective structures of the pathogen on those leaves. In addition, thickness and amount of wax is lower in younger leaves. It suggests that resistance to *A. psidii* infection in older *Eucalyptus* leaves occurs at the pre-penetration stage (Xavier et al., 2015).

The main strategies used in eucalyptus rust management are the use of resistant clones, progenies or species; selection of plants with characteristics of rapid growth (evasion), because at higher altitudes, the pathogen does not find a favorable microenvironment to infection. In addition, in the case of susceptible genetic material of high commercial value, the rust can be controlled with fungicides (Alfenas et al., 2009).

In relation to rust quantification in order to obtain resistant eucalyptus genotypes, Junghans et al. (2003) developed a simple and precise rating scale in artificially inoculated seedlings, considering the severity class according to the rust pustule grade. That scale was verified in a segregating progeny of *E. grandis* using the RAPD marker AT9 / 917, strongly linked to a rust resistance locus. However, from a practical point of view, this diagrammatic scale does not present a validation test and it only evaluates the plant resistance to rust. In addition, there are limitations on the assessment of total severity and disease distribution on the leaves. Taking into consideration the importance of eucalyptus rust disease, we have noticed the need to develop an available standard area diagram (SAD) suitable to overcome the abovementioned limitations.

Standard area diagrams (SADs) are important for quantification of disease severity in epidemiological studies. They are important to obtain accurate and reliable data on critical plant diseases for evaluation of disease management procedures. SADs have been demonstrated to improve the accuracy and reliability of estimates of several crop diseases including asian rust (Godoy et al., 2006) and frog-eye leaf spot on soybean (Debona et al., 2015), blast on wheat (Rios et al., 2013), brown spot on rice (Lenz et al., 2010), brown spot on wheat (Domiciano et al., 2014), early blight on potato (Duarte et al., 2013) and rust on coffee (Capucho et al., 2011). SADs improve both accuracy (how close the estimated values are to the true values) (Nutter & Schultz, 1995) and reliability (the extent in which the same estimate obtained under different conditions produces similar results) (Nutter et al., 1991) during disease severity evaluations by reducing subjectivity (Martins et al., 2004). Before being proposed as a standard method to quantify a certain plant disease, the SAD must be validated (Martins et al., 2004).

Therefore, this study aimed to develop and validate the SAD to measure the intensity of eucalyptus rust with precision and reliability.

2. Materials and methods

2.1 Diseased eucalyptus leaves

Austropuccinia psidii isolate, UFV-2, was obtained from a single pustule from *Eucalyptus grandis* in Itapetininga, Brazil. Spores from this pustule were transferred to young leaves of *Syzygium jambos* (L) Alston (= *Eugenia jambos* L.) and were multiplied as previously described by Ruiz et al., (1989). The spores were collected ten days after inoculation using a fine brush. Spore suspensions at 10^5 urediniospores-ml, in 0.05% Tween 20 (Xavier et al., 2001) were prepared for inoculations of eucalyptus seedlings (clone CNB 019, *Eucalyptus grandis* × *Eucalyptus urophylla*), which is known to be susceptible to eucalyptus rust. The inoculum was applied on adaxial and abaxial leaves surfaces using an atomizer (Paasche Airbrush Co., Chicago). After inoculation, seedlings were moved into growth chamber under 24 hours of dark conditions at 25°C and maintained at 22°C with 12 hours photoperiod (Ruiz et al., 1989). The maximum natural photon flux density at plant canopy height was approximately $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

2.2 Development and evaluation of the SAD

A total of 130 leaves with a range of severities of eucalyptus rust were collected 15 days after inoculation and were individually scanned into a printer (HP Photosmart C4600 series) to obtain images with a resolution of 300 dpi. The images were processed and the actual severity of eucalyptus rust was measured using QUANT

software (Vale et al., 2003). The minimum and maximum true severity of eucalyptus rust obtained after image processing were 0.97 and 37.3%, respectively, following an approximately linear increase. Six additional intermediate diagrams were chosen resulting in a set of eight images. A group of 20 raters, ten inexperienced and ten experienced, assessed the images. Fifty images of leaves with a range of severity were pasted on individual slides to be viewed in a PowerPoint presentation file. In the first assessment, the raters did not use the SAD as an aid to estimate eucalyptus rust. In the second assessment, the raters used the SAD in the same set of images but in a different order. While evaluating each infected leaf, each rater compared the image shown with the SAD. A new estimated percentage of diseased area was produced. Before performing both evaluations, raters were told to consider only the symptoms of yellow pustules to base their visual estimate on proportion of diseased area related to total leaf area as a percentage.

2.3 Data analyses

The analysis was performed separately using data obtained with and without the use of the SAD for both inexperienced and experienced raters. Based on data obtained during SAD validation, the agreement between estimates and actual values for each rater was determined with Lin's concordance correlation coefficient (LCCC) (ρ_c) (Lin, 1989). The analysis was performed separately using data obtained with and without the use of SAD for both inexperienced and experienced raters. This analysis is the most appropriate for gauging agreement because it combines measures of accuracy and precision to assess the fit of pairs of observations to the line of concordance (45°). The LCCC comprises two statistics, represented by $\rho_c = Cb. r$, where Cb is a measure of

bias or accuracy of the best-fit, and r is the correlation coefficient between the estimated severity (Y) and the actual severity (X), which measures, in this case, the precision of the best fit line. Cb is derived from the following: $Cb = 2/[(v+1/v+\mu^2)]$, where $v = \sigma_y / \sigma_x$, and σ_y and σ_x are the standard deviations of Y and X, respectively, where $\mu = (\mu_y - \mu_x) / \sqrt{(\sigma_y \cdot \sigma_x)}$ and μ_y and μ_x are the mean values of Y and X, respectively. The term v (scale shift or systematic bias) describes the dependency of over or underestimation on the magnitude of X (it can be described as the difference in the slopes of the fitted line and the line of concordance). Slopes of 45° would have a v of one. The term μ (location shift or constant bias) is the tendency, on average, to over or underestimate severity. Equal heights would have a μ of zero. A perfectly accurate measurement occurs when estimates equal actual values, and all points fall on the concordance line e.g., $r = 1$, $Cb = 1$, $v = 1$, $\mu = 0$ and thus, $\rho_c = 1$ (Bock et al., 2010; Nita et al., 2003). For all parameters (v , μ , Cb , ρ_c and r), the differences between the means (i.e., with SAD minus without SAD) were calculated and an equivalence test was used to test their significance (Bardsley & Ngugi, 2013; Yadav et al., 2013). The equivalence test was used to calculate 95 % confidence intervals (CIs) for each statistic (the difference between the means) by bootstrapping, using the percentile method (with an equivalence test, the null hypothesis is the converse of H_0 , i.e., the null hypothesis is non-equivalence). All analyses were based on 2,000 balanced bootstrap samples using 95 % CIs that were calculated as the difference between the means of the groups. If the CIs spanned zero, there was no significant difference ($P = 0.05$). Precision was also determined using analysis of the absolute error (estimated minus actual severity of myrtle rust). The inter-rater reliability of the estimates was determined in two ways. First, the coefficient of determination (R^2) from linear regression analyses of relationships between severity

estimates for all pairs of raters was used (Nutter & Schultz, 1995). Second, the inter-rater reliability was assessed based on the intra-class correlation coefficient (ICC, ρ) (Shrout & Fleiss, 1979), which, unlike most other correlation measures, operates on data structured as groups rather than data structured as paired observations, which provide only relative measures. For the ICC analysis, the model was assumed to be two-way, with absolute agreement and single measures (Shrout & Fleiss, 1979). The effect of SAD use on the inter-rater reliability for each assessment time was measured based on the confidence interval of the ICC estimated by the model.

3. Results

Eucalyptus leaves developed rust symptoms that began with chlorotic specks that turned into pustules producing masses of yellow spores (Figure 1). The SAD developed in the present study comprised eight rust-diseased leaves images, each of a known severity value ranging from 0.97 to 37.3 % (Figure 2). Lin's concordance analysis revealed that the raters' estimates of severity of rust approached the actual severity when they used SAD, irrespective of their experience. There was a linear relationship between estimated and actual severity of rust for all raters. The use of the SAD resulted in significant improvement for all bias and accuracy statistics of Lin's concordance correlation coefficient (v , u , C_b , ρ_c and r) for inexperienced raters and for v , C_b , ρ_c , and r for experienced raters (Table 1). The use of SAD significantly reduced scale shift (v) for inexperienced raters (Table 1), which ranged from 1.53 to 2.74 (mean of 2.04) and from 0.82 to 1.03 (mean of 0.95) without and with SAD, respectively. Similarly, the v values for experienced raters ranged from 0.92 to 1.93 (mean of 1.24) and from 0.92 to 1.07 (mean of 0.97) without and with SAD, respectively. The higher

proportion of raters who had v values close to one increased significantly with the use of SAD, indicating that the slope of the best fitting line was closer to the concordance line when SAD was used (Figure 3a). Location shift (μ) for inexperienced raters was significantly reduced by using SAD (Table 1). Inexperienced raters overestimated severity of rust without SAD [μ ranged from 0.58 to 1.67 (mean of 1.08)]. In contrast, μ values ranged from -0.07 to 0.30 (mean of 0.08) when inexperienced raters used SAD. The proportion of inexperienced raters with μ close to zero also increased when SAD was used, indicating a reduction in overestimation when SAD is used as an aid to assess severity of rust (Figure 3b).

Accuracy (C_b) was significantly increased when either experienced or inexperienced raters used SADs (Table 1). Accuracy without SAD ranged from 0.38 to 0.79 (mean of 0.56) for inexperienced raters and from 0.73 to 0.99 (mean of 0.90) for experienced raters. In contrast, accuracy when using SAD for inexperienced raters ranged from 0.96 to 1.00 (mean of 0.99) and for experienced raters from 0.92 to 1.00 (mean of 0.97). The use of SAD also increased the proportion of all raters with accuracy >0.90 from 40 to 100% (Figure 3c). Without the SAD aid, precision (r) ranged from 0.72 to 0.89 (mean of 0.83) and from 0.74 to 0.91 (mean of 0.86) for inexperienced and experienced raters, respectively (Table 1). When assessments were made using SAD, precision improved for both inexperienced [0.88 to 0.94 (mean of 0.92)] and experienced raters [0.90 to 0.96 (mean of 0.94)]. The proportion of raters with precision (r) >0.90 was 25 and 95% without and with using the SAD aid, respectively, which indicates an increase in precision using the SAD (Figure 3d). Agreement (ρ_c), which combines measures of both accuracy and precision, was significantly improved for all raters, irrespective of experience, when SAD was used (Table 1). In the absence of

SAD, ρ_c for inexperienced raters ranged from 0.30 to 0.70 (mean of 0.46) and for experienced raters, from 0.57 to 0.90 (mean of 0.77). Conversely, when raters assessed a set of images using SAD, inexperienced raters had a ρ_c ranging from 0.87 to 0.95 (mean of 0.91) while experienced raters showed a ρ_c ranging from 0.86 to 0.96 (mean of 0.90). The improvement in agreement was reflected in the increase in the proportion of raters with a ρ_c value >0.90 (5 and 80% without and with the SAD aid, respectively) (Figure 3e). The increase in precision was reflected in the reduction in absolute errors when raters used SAD, and was particularly evident for inexperienced raters (Figure 4).

When estimates were made without SAD, 75 % of the raters had error $>25\%$. When SAD was used as an aid to estimate severity, the errors were consistently $<25\%$. Without SADs, experienced raters had less bias and better accuracy, precision and agreement (v , u , C_b and ρ_c , respectively) compared to inexperienced raters (Table 2). However, when the experienced raters used SAD, there was no improvement in the assessment of the rust severity in comparison to inexperienced raters. Although estimates of severity were improved for all raters regardless of their experience, the biggest reduction in bias and gains in accuracy, precision, and agreement were obtained for inexperienced raters (Figure 5). The equivalence test revealed that inter-rater reliability measured by the coefficient of determination (R^2) was significantly improved when the raters used SAD (Table 2). The mean coefficient determination (R^2) among inexperienced raters increased from 0.62 to 0.76 when using SAD and for experienced raters from 0.62 to 0.79. Without the use of SAD, 12% of the rater pairwise comparisons had a coefficient of determination <0.75 ; when SAD was used, only 65% of the pairwise comparisons had a coefficient of determination <0.75 (Figure 3f).

4. Discussion

This is the first report of SAD developed for estimating eucalyptus rust severity. The use of SAD developed and validated in this study fostered excellent improvements in the accuracy and reliability of severity estimates by experienced and inexperienced raters.

The SAD proposed in this study have eight color images of leaves with severity values ranging from 0.97 to 37.3 %. This severity range is considered sufficient to embrace the range of rust severities observed in the field. Furthermore, severity values <0.97 % can be difficult to identify and have little epidemiological value. Leaves senescence was found to occur at severities near 40 %. The eight severities followed an approximately linear arrangement, in contrast to some SADs produced in the past that used a logarithmic structure based on the Weber Fechner law, which assumes a logarithmic relationship between estimates and actual severity (Godoy et al., 2006; Lenz et al., 2010; Bock et al., 2010). However, this law was never substantiated, and recent studies have questioned its usefulness for providing good estimates of disease severity (Nutter & Esker, 2006; Bock et al., 2010). In the present study, the raters tended to overestimate the disease severity; a similar phenomenon was observed in previous studies (Parker et al., 1995; Capucho et al., 2010; Lenz et al., 2010).

The equivalent test (based on 95 % CIs by bootstrapping of the difference between the means) demonstrated that values for all statistics parameters (r , Cb , v , u , ρc) were greatly improved when using the SAD to estimate rust severity compared to not using them. For most raters, scale shift (v) and location shift (μ) were closer to one and zero, respectively, when using SAD, indicating that the slope and height of the fitted line approached the line of concordance. However, the gain in these parameters

for experienced raters who used SAD was negligible, as noted before (González-Domínguez et al., 2014). However, the other measures of precision, accuracy and agreement (r , Cb and ρc) were all improved by using SAD for all raters (irrespective of experience). It suggests that the estimates of rust severity were more accurate and precise when raters used SAD as an aid to assess severity of rust. These results demonstrate the value of the SAD as an aid for estimating rust severity, even for experienced raters.

Many studies showed that rater experience, familiarity with symptoms and training in disease assessment, influence the reliability and accuracy of disease estimates (Bardsley & Ngugi, 2013). In general, experienced raters produced estimates that were more accurate and precise than inexperienced raters, which is consistent with previous results (Nita et al., 2003; Yadav et al., 2013; González-Domínguez et al., 2014). According to Yadav et al., (2013), an inexperienced rater may inherently have a high degree of accuracy and precision, but most often the estimates of inexperienced raters deviate more from the actual severity compared to experience rater estimates. Thus, inexperienced raters are expected to benefit most from using SADs, which also improve inter-rater reliability (Yadav et al., 2013).

In conclusion, the proposed SAD is a potentially useful tool for accurate estimatives of levels. It may be applied for experiments comparing disease treatments, epidemiological studies, disease monitoring, decision-making in eucalyptus rust management measures among others.

5. References

- Alfenas, A. C., Zauza, E. Â. V., Mafia, R. G. & Assis, T. F. (2009). *Clonagem e doenças do eucalipto*. (Editora UFV: Viçosa, MG)
- Bardsley, S. J. & Ngugi, H. K. (2013). Reliability and accuracy of visual methods used to quantify severity of foliar bacterial spot symptoms on peach and nectarine. *Plant Pathology*, 62, 460-74
- Bock, C. H., Poole, G., Parker, P. E. & Gottwald, T. R. (2010). Plant disease severity estimated visually, by digital photography and image analysis, and by hyperspectral imaging. *Critical Reviews in Plant Science*, 29, 59-107
- Capucho, A. S., Zambolim, L., Duarte, H. S. S., Parreira, D. F., Ferreira, P. A. & Lanza, F. E. (2010). Influence of leaf position that correspond to whole plant severity and diagrammatic scale for white spot of corn. *Crop Protection*, 29, 1015-1020
- Capucho, A. S., Zambolim, L., Duarte, H. S. S. & Vaz, G. R. O. (2011). Development and validation of a standard area diagram set to estimate severity of leaf rust in *Coffea arabica* and *C. canephora*. *Plant Pathology*, 60, 1144-1150
- Coutinho, T. A., Wingfield, M. J., Alfenas, A. C. & Crous, P. W. (1998). Eucalyptus rust: a disease with the potential for serious international implications. *Plant Disease*, 82, 819-825
- Debona, D., Nascimento, K. J. T., Rezende, D., Rios, J. A., Bernardeli, A. M. A., Silva, L. C. & Rodrigues, F. A. (2015). A set of standard area diagrams to assess severity of frog-eye leaf spot on soybean. *European Journal of Plant Pathology*, 142, 603-614

- Domiciano, G. P., Duarte, H. S. S., Moreira, E. N. & Rodrigues, F. A. (2014). Development and validation of a set of standard area diagrams to aid in estimation of spot blotch severity on wheat leaves. *Plant Pathology*, 63, 922-928
- Duarte, H. S. S., Zambolim, L., Capucho, A. S., Nogueira Júnior, A. F., Rosado, A. W. C., Paul P. A., Cardoso, C. R. & Mizubuti, E. S. G. (2013). Development and validation of a set of standard area diagrams to estimate severity of potato early blight. *European Journal of Plant Pathology*, 137, 249-257
- Godoy, C. V., Koga, L. J. & Canteri, M. G. (2006). Diagramatic scale for assessment of soybean rust severity. *Fitopatologia Brasileira*, 31, 63-68
- González-Domínguez, E., Martins, R. B., Del Ponte, E. M., Michereff, S. J., García-Jiménez, J. & Armengol, J. (2014). Development and validation of a standard area diagram set to aid assessment of severity of loquat scab on fruit. *European Journal of Plant Pathology*, 139, 413-422
- Ibá - Indústria Brasileira de Árvores. (2015). Relatório Ibá 2015. Retrieved January 25, 2018, from http://iba.org/images/shared/iba_2015.pdf
- Junghans, D. T., Alfenas, A. C. & Maffia, L. A. (2003). Escala de notas para quantificação da ferrugem em *Eucalyptus*. *Fitopatologia Brasileira*, 28, 184-188
- Lenz, A., Balardin, R. S., Corte, G. D., Marques, L. N. & Debona, D. (2010). Escala diagramática para a avaliação de severidade de mancha-parda em arroz. *Ciência Rural*, 40, 752-758
- Lin, L.I.K. (1989). A concordance correlation coefficient to evaluate reproducibility. *Biometrics*, 45, 255-268

- Martins, M. C., Guerzoni, R. A., Câmara, G. M. S., Mattiazzi, P., Lourenço, S. A. & Amorim, L. (2004). Escala diagramática para a quantificação do complexo de doenças foliares de final de ciclo em soja. *Fitopatologia Brasileira*, 29, 179-184
- Morin, L., Aveyard, R., Lidbetter, J. R. & Wilson, P. G. (2012). Investigating the host-range of the rust fungus *Puccinia psidii sensu lato* across tribes of the family *Myrtaceae* present in Australia. *Plos one* 7(4): e35434. DOI 10.1371/journal.pone.00354347
- Nita, M., Ellis, M. A. & Madden, L. V. (2003). Reliability and accuracy of visual estimation of *Phomopsis* leaf blight of strawberry. *Phytopathology*, 93, 995-1005
- Nutter, F. W. & Schultz, P. M. (1995). Improving the accuracy and precision of disease assessments: selection of methods and use of computer-aided training programs. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 17, 174-84
- Nutter, F. W., Teng, P. S. & Shokes, F. M. (1991). Disease assessment term and concepts. *Plant Disease*, 75, 1187-1188
- Nutter, F. W. & Esker, P. D. (2006). The role of psychophysics in phytopathology. *European Journal of Plant Pathology*, 114, 199-213
- Parker, S. R., Shaw, M. W. & Royle, D. J. (1995). The reliability of visual estimates of disease severity on cereal leaves. *Plant Pathology*, 43, 856-865
- Rios, J. A., Debona, D., Duarte, H. S. S. & Rodrigues, F. A. (2013). Development and validation of a standard area diagram set to assess blast severity on wheat leaves. *European Journal of Plant Pathology*, 136, 603-611
- Ruiz, R. A. R., Alfenas, A. C., Ferreira, F. A. & Valle, F. X. R. (1989). Influência de temperatura, do tempo de molhamento foliar, fotoperíodo e da intensidade de luz

- sobre a infecção de *Puccinia psidii* em eucalipto. *Fitopatologia Brasileira*, 14, 55-61
- Shrout, P. E. & Fleiss, J. L. (1979). Intraclass correlations: uses in assessing rater reliability. *Psychological Bulletin*, 86, 420-428
- Takahashi, S. S. (2002). Ferrugem do eucalipto: Índice de infecção, análise temporal e estimativas de danos relacionadas a intensidade da doença no campo. Dissertação, Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho
- Vale, F. X. R., Fernandes Filho, E. I. & Liberato, J. R. (2003). *A software plant disease severity assessment*. (Paper presented at the 8th International Congress of Plant Pathology, New Zealand)
- Xavier, A. A., Alfenas, A. C., Matsuoka, K. & Hodges, C. S. (2001). Infection of resistant and susceptible *Eucalyptus grandis* genotypes by urediniospores of *Puccinia psidii*. *Australasian Plant Pathology*, 30, 277-281
- Xavier, A. A., da Silva, A. C., Guimarães, L. M. S., Matsuoka, K., Hodges, C. S. & Alfenas, A. C. (2015). Infection process of *Puccinia psidii* in *Eucalyptus grandis* leaves of different ages. *Tropical Plant Pathology*, 40, 318-325
- Yadav, N. V., Vos, S. M., Bock, C. H. & Wood, B. W. (2013). Development and validation of standard area diagrams to aid assessment of pecan scab symptoms on fruit. *Plant Pathology*, 62, 325-35
- Zauza, E. A. V., Alfenas, A. C., Old, K., Couto, M. M. F., Graça, R. N. & Maffia, L. A. (2010). Myrtaceae species resistance to rust caused by *Puccinia psidii*. *Australasian Plant Pathology*, 39, 406-411



Figure 1 Rust symptoms on eucalyptus leaves inoculated with *Austropuccinia psidii*. Characteristic lesions have chlorotic specks which become pustules producing masses of yellow spores. At high rust severity (~40%), the leaves become chlorotic and senesce prematurely.

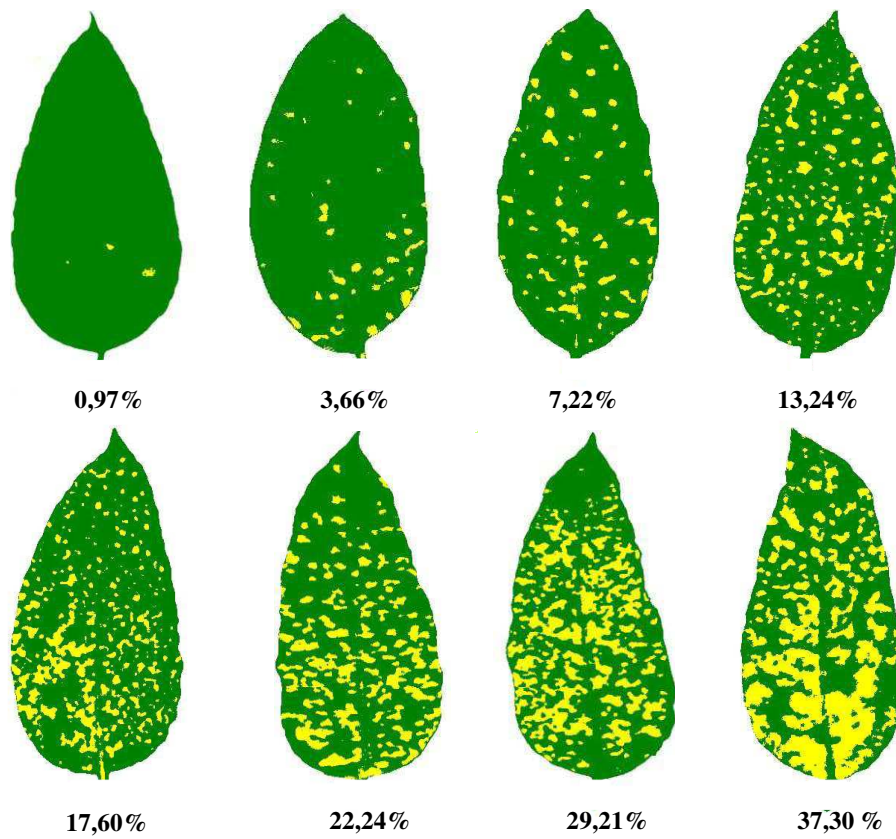


Figure 2 The standard area diagram set (SADs) to evaluate rust severity on eucalyptus leaves. Data are presented as the percentage (%) of leaf area with rust symptoms.

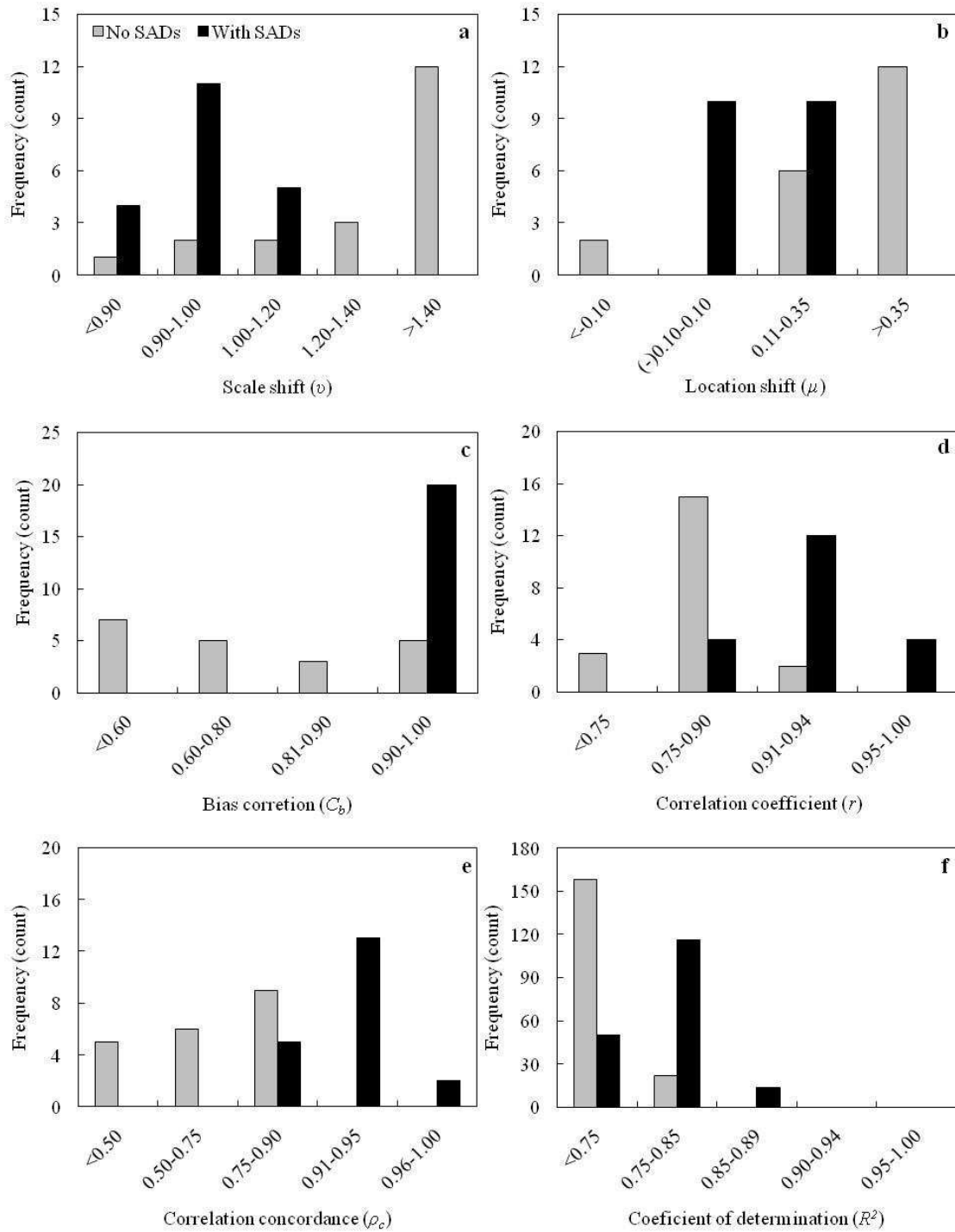


Figure 3 Frequency of bias, precision, agreement, and inter-rater reliability with and without using a set of 50 images of eucalyptus leaves with rust - standard area diagrams (SADs) as an assessment aid by 20 raters. (a) Scale shift (or systematic bias, v), (b) location shift (or constant bias, μ), (c) bias correction factor (C_b), (d) correlation

coefficient (r), (e) Lin's concordance correlation coefficient (ρ_c), and (f) coefficient of determination (R^2).

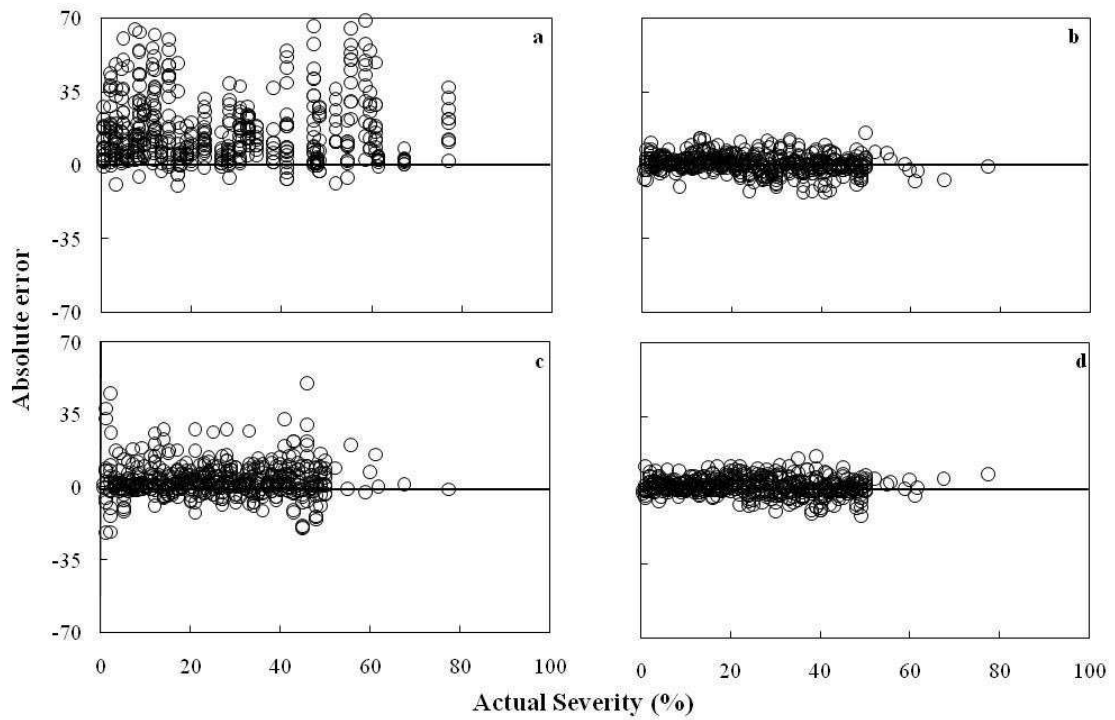


Figure 4 Estimates of the absolute error (estimated severity minus actual severity) for assessment of rust severity of 50 diseased eucalyptus leaves by each of the ten inexperienced (**a, b**) and ten experienced raters (**c, d**), without (**a, c**) and with (**b, d**) the use of a set of standard area diagrams (SADs). Low absolute errors indicate that the estimated severity is similar to the actual severity.

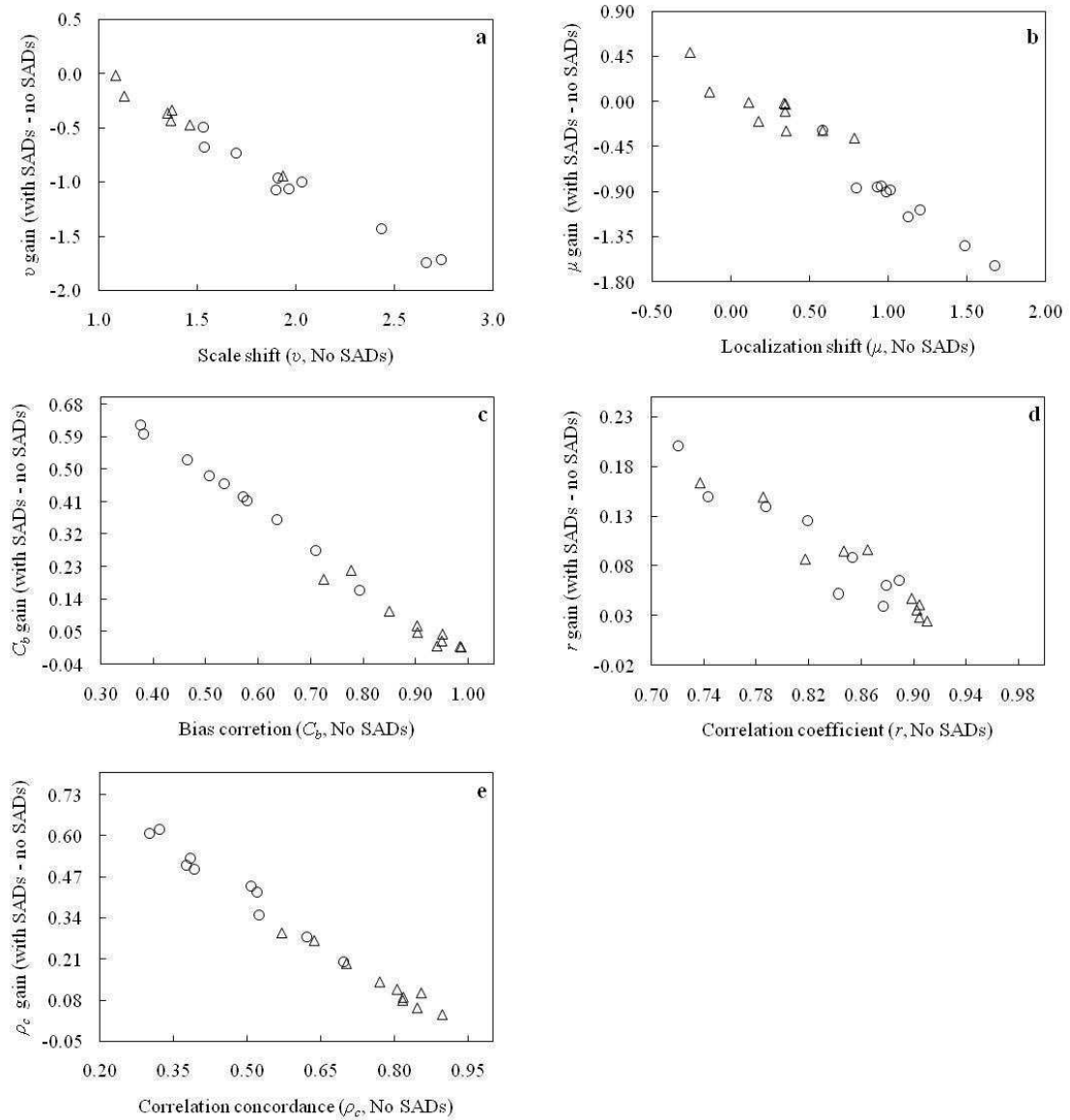


Figure 5 The relationship between gain [difference between the estimate with and without using a set of standard area diagrams (SADs)] for (a) location shift (or systematic bias, v), (b) scale shift (or constant bias, μ), (c) bias correction factor (C_b), (d) correlation coefficient (r), and (e) Lin's concordance correlation coefficient (ρ_c) of visual severity estimates by ten inexperienced (circles) and ten experienced (triangles) raters for a set of 50 images from eucalyptus leaves with rust.

Table 1 Effect of using a set of standard area diagrams (SADs) as an assessment aid on the bias, precision, and estimates agreement of rust severity on 50 diseased eucalyptus leaves estimated by 20 raters.

| Experience | LCC statistic | Means | | 95 % CI ^a of the difference between means |
|---------------|---|---------|-----------|--|
| | | No SADs | With SADs | |
| Inexperienced | Scale shift (v) ^b | 2.04 | 0.95 | -1.339; -0.856 |
| | Location shift (μ) ^c | 1.08 | 0.08 | -1.202; -0.769 |
| | Bias correction factor (C_b) ^d | 0.56 | 0.99 | 0.345; 0.512 |
| | Correlation coefficient (r) ^e | 0.83 | 0.92 | 0.051; 0.128 |
| | Concordance coefficient (ρ_c) ^f | 0.46 | 0.91 | 0.364; 0.519 |
| | Coefficient of determination (R^2) ^g | 0.62 | 0.76 | 0.119; 0.172 |
| Experienced | Scale shift (v) ^b | 1.24 | 0.97 | -0.477; -0.090 |
| | Location shift (μ) ^c | 0.26 | 0.19 | -0.207; 0.081 |
| | Bias correction factor (C_b) ^d | 0.90 | 0.97 | 0.029; 0.121 |
| | Correlation coefficient (r) ^e | 0.86 | 0.93 | 0.048; 0.107 |
| | Concordance coefficient (ρ_c) ^f | 0.77 | 0.91 | 0.084; 0.190 |
| | Coefficient of determination (R^2) ^g | 0.62 | 0.79 | 0.140; 0.190 |

Table 2 Effect of using a set of standard area diagrams (SADs) as an assessment aid on the bias, precision, and estimates agreement of rust severity on 50 diseased eucalyptus leaves estimated by 20 raters.

| Assessment | LCC statistic | Means | | 95 % CI ^a of the difference between means |
|------------|---|--------|-------|--|
| | | Inexp. | Exp. | |
| No SADs | Scale shift (v) ^b | 2.04 | 1.24 | -1.157; -0.402 |
| | Location shift (μ) ^c | 1.08 | 0.26 | -1.073; -0.534 |
| | Bias correction factor (Cb) ^d | 0.56 | 0.90 | 0.219; 0.454 |
| | Correlation coefficient (r) ^e | 0.83 | 0.86 | -0.033; 0.082 |
| | Concordance coefficient (ρ_c) ^f | 0.46 | 0.77 | 0.178; 0.424 |
| | Coef. of determination (R^2) ^g | 0.62 | 0.63 | -0.041; 0.027 |
| With SADs | Scale shift (v) ^b | 0.95 | 0.97 | -0.052; 0.062 |
| | Location shift (μ) ^c | -0.08 | -0.23 | -0.034; 0.243 |
| | Bias correction factor (Cb) ^d | 0.99 | 0.97 | -0.034; 0.007 |
| | Correlation coefficient (r) ^e | 0.92 | 0.94 | -0.009; 0.033 |
| | Concordance coefficient (ρ_c) ^f | 0.91 | 0.90 | -0.026; 0.021 |
| | Coef. of determination (R^2) ^g | 0.76 | 0.79 | 0.010; 0.036 |

Conclusões Gerais

- Foram obtidos oito isolados de possíveis fungos micoparasitas de *Austropuccinia psidii*, agente causal da ferrugem das mirtáceas, pertencentes aos gêneros e espécies: *Colletotrichum melonis*, *Epicoccum nigrum*, *Didymella adianticola*, *Fusarium* sp. (complexo *Fusarium fujikuroi*), *Mucor* sp. e *Trichothecium roseum*.
- A escala diagramática validade foi composta de oito imagens de folhas de eucalipto com valores de severidade de ferrugem variando de 0,97% a 37,3%.