

VANESSA PEREIRA DE ABREU

**BOTRYOSPHAERIALES ENDOFÍTICOS E FITOPATOGÊNICOS
CAUSADORES DE PODRIDÕES PÓS-COLHEITA EM FRUTOS DE GOIABA**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2015

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

T

A162b
2015
Abreu, Vanessa Pereira de, 1990-
Botryosphaeriales endofíticos e fitopatogênicos
causadores de podridões pós-colheita em frutos de goiaba /
Vanessa Pereira de Abreu. - Viçosa, MG, 2015.
viii, 30f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexos.

Orientador : Olinto Liparini Pereira.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. *Psidium guajava*. 2. *Phyllosticta*. 3. *Neofusicoccum*.
4. *Lasiodiplodia*. 5. Pinta-preta. I. Universidade Federal de
Viçosa. Departamento de Microbiologia Agrícola. Programa
de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola. II. Título.

CDD 22. ed. 579.56

VANESSA PEREIRA DE ABREU

**BOTRYOSPHAERIALES ENDOFÍTICOS E FITOPATOGÊNICOS
CAUSADORES DE PODRIDÕES PÓS-COLHEITA EM FRUTOS DE GOIABA**

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

APROVADA: 23 de fevereiro de 2015.

Maria Catarina Megumi Kasuya

Danilo Batista Pinho

Gleiber Quintão Furtado
(Presidente da Banca)

Agradecimentos

Agradeço a Deus, pelo dom da vida e por estar iluminando meu caminho e acompanhando meus passos durante todos esses anos de formação acadêmica.

Aos meus pais, Tânia e Damião, pelo apoio incondicional em todos os momentos, principalmente nos de incerteza, muito comuns para quem tenta trilhar novos caminhos.

Ao meu irmão Diego pela cumplicidade, incentivo e amizade.

Ao meu namorado Diogo, pelo amor, carinho e por ser tão importante na minha vida, tornando os meus dias mais felizes.

Aos demais familiares que de alguma forma contribuíram para esta conquista.

Ao professor Olinto Liparini Pereira, pela oportunidade de realização deste trabalho, pela confiança, profissionalismo, sabedoria e paciência.

Ao amigo Alexandre, pela enorme dedicação e espetacular ajuda durante a execução deste trabalho.

Aos demais amigos do Laboratório de Patologia de Sementes e de Pós-Colheita, Ana Paula, André Campos, André Firmino, André Gomes, Athus, Danilo, Fábio, Lucas, Oswaldo, Pricila e Simone, pela amizade e pelos bons momentos vividos.

Ao Departamento de Microbiologia Agrícola pela oportunidade de realização do curso e deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pela concessão da bolsa de estudos, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

Ao senhor Sebastião, produtor de goiabas do município de Piraúba, por fornecer material fundamental para realização deste trabalho.

Aos mercados de Viçosa: Amantino, Escola e ao Sacolão Center pela concessão de material para a realização deste trabalho.

Aos meus amigos de longa data, pela amizade, lealdade e pelos momentos felizes.

Obrigada a todos! Vocês foram a razão das minhas vitórias!

Biografia

VANESSA PEREIRA DE ABREU, filha de Damião Barbosa de Abreu e Tânia Maria Pereira Abreu, nasceu em Viçosa, Minas Gerais, no dia 02 de agosto de 1990.

Em 2009 ingressou no curso de Agroecologia no Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sudeste de Minas Gerais – Campus Rio Pomba, graduando-se em janeiro de 2013.

Em abril de 2013, iniciou no Programa de Pós-Graduação, em nível de Mestrado em Microbiologia Agrícola na Universidade Federal de Viçosa, concentrando seus estudos nas áreas de etiologia de doenças fúngicas de plantas e micologia (taxonomia e filogenia molecular de fungos fitopatogênicos).

Sumário

Resumo.....	v
Abstract.....	vii
Artigo	1
Abstract.....	2
Introdução	3
Material e métodos.....	5
Obtenção das amostras e isolamento.....	5
Extração de DNA, sequenciamento e análises filogenéticas.....	6
Caracterização morfológica.....	7
Teste de patogenicidade	7
Resultados.....	8
Sintomatologia e isolamento dos fungos	8
Extração de DNA, sequenciamento e análises filogenéticas.....	8
Teste de patogenicidade	9
Discussão.....	10
Agradecimentos.....	13
Referências.....	13
Conclusões Gerais	19
Anexos.....	20

Resumo

ABREU, Vanessa Pereira de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2015. **Botryosphaeriales endofíticos e fitopatogênicos causadores de podridões pós-colheita em frutos de goiabas.** Orientador: Olinto Liparini Pereira. Co-orientadora: Marisa Vieira de Queiroz.

A goiabeira (*Psidium guajava*) é uma cultura de grande importância, destacando-se como uma atividade econômica e social de grande expressão. Nativa da América Tropical, a goiabeira, é amplamente cultivada em todas as regiões do Brasil. A produção da goiabeira tem sido limitada por vários fatores, dentre eles, destacam-se as doenças, com especial ênfase às que ocorrem em pós-colheita. A pinta-preta da goiaba é a doença pós-colheita de maior incidência. As goiabas acometidas pela doença apresentam sintomas que constituem-se, inicialmente, de pontos deprimidos, os quais evoluem rapidamente na superfície dos frutos, de forma concêntrica e tornam-se lesões de coloração escura com diversos pontos negros correspondendo aos sinais do patógeno. Vários trabalhos associam a pinta-preta da goiaba ao fungo *Phyllosticta psidiicola* entretanto, ainda não existem trabalhos mais abrangentes com estudos taxonômicos mais apurados que investiguem qual o real agente etiológico dessa doença. Além da pinta-preta da goiaba, existem outras doenças de pós-colheita muito comuns causadas por fungos da ordem Botryosphaeriales como a podridão parda associada ao fungo *Dothiorella dominicana* e a podridão de *Lasiodiplodia* associada à *Lasiodiplodia theobromae*. Entretanto, também existe uma carência de estudos mais abrangentes associados a essas doenças. Nos últimos anos novas espécies têm sido propostas a partir de estudos moleculares, evidenciando a existência de um complexo de espécies. Assim, os objetivos deste trabalho foram estudar a etiologia da pinta-preta da goiaba baseada na combinação de características morfológicas e moleculares, verificar o relacionamento das espécies causadoras dessa doença com as espécies endofíticas, estabelecer o posicionamento filogenético das espécies encontradas, bem como comprovar a patogenicidade das espécies associadas. Foram realizadas coletas de goiabas com sintomas de podridões pós-colheita, frutos secos e mumificados nos mercados do município de Viçosa – Minas Gerais e em uma área de cultivo no município de Piraúba – Minas Gerais. Folhas, ramos e frutos sadios foram coletados nesta mesma área, a fim de obter os isolados endofíticos correspondentes a área com elevada ocorrência da doença na pós-colheita. Isolados monospóricos foram obtidos e armazenados. Estes tiveram o DNA extraído e a região *TEF1- α* amplificada e sequenciada. A partir dos resultados das análises filogenéticas, um isolado representativo de cada espécie foi selecionado para a caracterização morfológica e testes de patogenicidade. Seis espécies de Botryosphaeriales foram identificadas, entre elas, três pertencentes ao gênero *Neofusicoccum*, uma pertencente ao gênero *Phyllosticta* e duas espécies de *Lasiodiplodia*. Entre estas espécies, duas serão propostas como novas (*Neofusicoccum* sp. e *Lasiodiplodia* sp.). Todas as espécies foram comparadas morfológica e filogeneticamente, com exceção de *Lasiodiplodia* sp. que não esporulou em meio de cultura. Todas as espécies tiveram patogenicidade

comprovada. Os resultados deste trabalho serão fundamentais para futuros estudos envolvendo medidas de manejo da doença, programas de quarentena e especialmente, para o desenvolvimento de variedades de goiabas resistentes à pinta-preta e outras podridões de frutos.

Abstract

ABREU, Vanessa Pereira de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2015. **Endophytic and pathogenic Botryosphaeriales causing post-harvest fruit rot of guava.** Advisor: Olinto Liparini Pereira. Co-advisor: Marisa Vieira de Queiroz.

The guava (*Psidium guajava*) is a fruit crop of great importance, standing out as an economic and social activity of great expression. Native to tropical America, the guava, is widely cultivated in all regions of Brazil. The production of guava has been limited by several factors, specially the diseases, with special emphasis to those that occur in post-harvest. The guava black spot is a post-harvest higher incidence disease. Diseased guavas presents symptoms that are initially depressed points, which are changing rapidly on the surface of the fruit, concentrically and become dark-colored with many black spots corresponding to the signs of the pathogens in the lesions. Several studies associate the black guava spot with the fungus *Phyllosticta psidiicola* however, there are no more comprehensive work with more accurate taxonomic studies investigating the real causative agent of this disease. Besides the black guava spot, there are other very common post-harvest fungal diseases caused by the order Botryosphaeriales as the brown fruit rot disease associated with *Dothiorella dominicana* and the Lasiodiplodia rot associated with *Lasiodiplodia theobromae*. However there is also a lack of more comprehensive studies associated with these diseases. In recent years new species have been proposed based specially on molecular studies, showing the existence of a complex of species. The objectives of this study were to study the etiology of black spot of guava based on a combination of morphological and molecular characteristics, verify the relationship of the species that cause this disease with the endophytic species, establish the phylogenetic position of the species found, as well as prove the pathogenicity of the associated species. Guavas samples were collected with symptoms of post-harvest decay as also dried and mummified fruit disease in Viçosa local markets - Minas Gerais and in a farming area with a high occurrence of the disease after harvesting in the city of Piraúba - Minas Gerais. Healthy leaves, branches and fruits were collected in the same area, in order to get the endophytic isolates from this high incidence area. Single spore isolates were obtained and stored. These has the DNA extracted and *TEF1- α* region amplified and sequenced. Based on the results of the phylogenetic analysis one isolate of each species was selected for morphological characterization and pathogenicity test. Six species belonging to the Botryosphaeriales were identified, in which three belongs to *Neofusicoccum* genera, one belongs to the genera *Phyllosticta* and two species of *Lasiodiplodia*. Among these species, two will be proposed as new (*Neofusicoccum* sp. and *Lasiodiplodia* sp.). All species were compared morphologically and phylogenetically except *Lasiodiplodia* sp. since it was not sporulating in culture. All species proved to be pathogenic. Despite its importance, the etiology of black spot and other post-harvest fruit rot diseases has been neglected and remained obscure for a long time. The

results of this work will be critical for future studies involving disease management, quarantine programs and especially for the development of guava varieties resistant to the black spot and others post-harvest fruit rot diseases.

Artigo

De acordo com as normas da revista Fungal Diversity

Botryosphaeriales endofíticos e fitopatogênicos causadores de podridões pós-colheita em frutos de goiaba

Botryosphaeriales endofíticos e fitopatogênicos causadores de podridões pós-colheita em frutos de goiaba

Vanessa Pereira de Abreu¹

e-mail: nessa-mg@hotmail.com

Alexandre Reis Machado²

e-mail: alexandrerm.agro@yahoo.com.br

Marisa Vieira de Queiroz¹

e-mail: mvqueiro@ufv.br

Olinto Liparini Pereira²

e-mail: oliparini@ufv.br

¹Universidade Federal de Viçosa - Departamento de Microbiologia- 36570-900, Brasil

²Universidade Federal de Viçosa - Departamento de Fitopatologia- 36570-900, Brasil

Abstract

The guava (*Psidium guajava*) is an fruit crop of great importance. The guava black spot is a post-harvest disease high incidence. Studies associate the black guava spot with the fungus *Phyllosticta psidiicola* however, there are no more comprehensive work with more accurate taxonomic studies investigating the real causative agent of this disease. Besides the black guava spot, there are other very common post-harvest fungal diseases caused by the order Botryosphaeriales as the brown fruit rot disease associated with *Dothiorella dominicana* and the Lasiodiplodia rot associated with *Lasiodiplodia theobromae*. However there is also a lack of more comprehensive studies associated with these diseases. In recent years new species have been proposed based specially on molecular studies, showing the existence of a complex of species. The objectives of this study were to study the etiology of black spot of guava based on a combination of morphological and molecular characteristics, verify the relationship of the species that cause this disease with the endophytic species, establish the phylogenetic position of the species found, as well as prove the pathogenicity of the associated species. Six species belonging to the Botryosphaeriales were identified, in which three belongs to *Neofusicoccum* genera, one belongs to the genera *Phyllosticta* and two to *Lasiodiplodia*. Among these species, two will be proposed as new (*Neofusicoccum* sp. and *Lasiodiplodia* sp.). All species were compared morphologically and phylogenetically except *Lasiodiplodia* sp. since it was not sporulating in culture. All species proved their pathogenicity. This study demonstrate for the first time that *Phyllosticta capitalensis* is the causal agent of black spot of guava. This species was the most prevalent Botryosphaeriales during our survey, however *Neofusicoccum* sp. and *Lasiodiplodia* sp. were the most aggressive species. This is the first report of the occurrence of *Neofusicoccum* this host. This study provides new information for future studies on

disease management, quarantine programs and especially for the development of guava varieties resistant to the black spot and others post-harvest fruit rot diseases.

Keywords: Dothideomycetes, Guignardia, Lasiodiplodia, Neofusicoccum, Phyllosticta, taxonomia.

Introdução

A goiabeira (*Psidium guajava*) é uma cultura de grande importância, principalmente no Nordeste brasileiro, destacando-se como uma atividade econômica e social de grande expressão (Moura Neto et al. 2008). A espécie tem origem na América tropical, todavia é bem adaptada a diversas regiões do mundo, sendo que no Brasil essa cultura é difundida em todos os estados (Choudhury et al. 2001). O fruto possui alto valor nutritivo, apresentando grande quantidade de vitamina A, B1, C, cálcio, fósforo, ferro e fibras solúveis. Possuem formatos diferentes, coloração da casca verde-amarela variável de acordo com a maturação, polpa de coloração também variável podendo ser branca, rosada ou vermelha e o seu interior é preenchido por sementes (Carvalho 1994). Além disso, apresentam excelentes propriedades organolépticas, tornando-os aproveitáveis tanto para o consumo in natura quanto para a industrialização (Manica et al. 2001).

Atualmente, o cultivo comercial da goiaba é voltado principalmente para a industrialização, entretanto, o cultivo de mesa tem aumentado consideravelmente nos últimos anos (Piccinin et al. 2005). Em 2011, o Brasil produziu 342.528 toneladas de goiabas em uma área de 15.917 ha, sendo a região Nordeste a maior produtora, com um total de 151.903 toneladas, destacando-se o estado de Pernambuco. Já a região Sudeste é a segunda maior produtora com um total de 149.169 toneladas, destacando-se os estados de São Paulo e Minas Gerais como os maiores produtores, respectivamente (Agriannual 2014).

Apesar da grande expansão da cultura no Brasil, a produção da goiabeira tem sido limitada por vários fatores, dentre eles, as doenças ocupam lugar de destaque. Entre as doenças mais importantes estão a bacteriose, a ferrugem e a antracnose. Outras doenças também estão presentes, como por exemplo, podridão das raízes, tombamento de mudas, cancro, mancha foliar, verrugose e as podridões dos frutos (Piccinin et al. 2005).

Além das doenças que ocorrem no campo, as doenças pós-colheita têm se destacado na cultura por levarem a perdas expressivas. As doenças pós-colheita representam sério obstáculo à cultura da goiaba, uma vez que comprometem a qualidade e a quantidade dos frutos para a comercialização (Fischer et al. 2011). Os sintomas de doenças pós-colheita aparecem em diferentes graus de severidade, a medida que o fruto amadurece, impossibilitando assim, o consumo (Bergamin Filho e Amorim 2007). Martins et al. (2007) relataram que, a doença pós-colheita mais frequente em goiabas de mesa é a pinta-preta, corroborando com o levantamento realizado por Amaral et al. (2006) em duas regiões produtoras de Campinas-SP, nos quais a pinta-preta foi a doença de maior incidência. As goiabas acometidas pela doença apresentam sintomas

que se constituem, inicialmente, de pontos deprimidos, os quais evoluem rapidamente na superfície dos frutos, de forma concêntrica e tornam-se lesões de coloração escura com diversos pontos negros correspondendo aos sinais do patógeno (Junqueira et al. 2001; Tozetto 1995; Tozetto e Ribeiro 1998).

Vários trabalhos associam a pinta-preta da goiaba ao fungo *Phyllosticta psidiicola* Petrak (= *Guignardia psidii* Ullasa & Rawal) (Ullasa e Rawal 1984; Martins et al. 2007; Fischer et al. 2011) pertencente à ordem Botryosphaerales, família Phyllostictaceae (Wikee et al. 2013a). Entretanto, ainda não existem trabalhos mais abrangentes com estudos taxonômicos mais apurados que investiguem qual o real agente etiológico dessa doença. Atualmente vários trabalhos têm destacado a necessidade de associar técnicas moleculares aos estudos morfológicos de espécies do gênero *Phyllosticta*. A existência de poucos caracteres morfológicos torna a determinação das espécies uma tarefa muito difícil, principalmente quando da existência de espécies crípticas (Wikee et al. 2013a). Assim, estudos filogenéticos por concordância genealógica associados aos estudos morfológicos têm sido amplamente utilizados na discriminação de espécies do gênero *Phyllosticta* e têm revelado diversas espécies novas para a ciência (Glienke et al. 2011; Wang et al. 2012; Wong et al. 2012; Su e Cai 2012; Wikee et al. 2013a; Zhang et al. 2013).

Além da pinta-preta da goiaba, existem outras doenças de pós-colheita muito comuns causadas por fungos da ordem Botryosphaerales como a podridão parda associada ao fungo *Dothiorella dominicana* e a podridão de *Lasiodiplodia* associada à *Lasiodiplodia theobromae* (Piccinin et al. 2005). Entretanto, também existe uma carência de estudos mais abrangentes associados a essas doenças.

Fungos da ordem Botryosphaerales incluem espécies saprófitas, endofíticas e patogênicas de plantas com uma extensa gama de hospedeiros. Embora tenha sido conhecido há algum tempo que estes fungos podem infectar plantas saudáveis através de aberturas naturais, foi somente no final de 1980 que eles foram reconhecidos como fungos endofíticos (Slippers e Wingfield 2007). Há relatos de que fungos endofíticos podem se tornar patógenos, sob certas condições e vice-versa (Schulz e Boyle 2005; Kogel et al. 2006; Slippers e Wingfield 2007; Beier et al. 2015). Entretanto, para o gênero *Phyllosticta* esta hipótese ainda não é aplicável. Atualmente, existem diversos trabalhos taxonômicos envolvendo esse gênero que comparam espécies fitopatogênicas com espécies endofíticas em diversos hospedeiros (Glienke et al. 2011; Zhang et al. 2013; Wang et al. 2012; Wong et al. 2012; Su e Cai 2012; Wikee et al. 2013b), porém estes grupos sempre permaneceram em posições filogenéticas distintas, como no caso de *Phyllosticta capitalensis* endofítico, isolado frequentemente em espécies de citros, mas que é filogeneticamente distinta das espécies patogênicas *P. citricarpa*, *P. citriasiana*, *P. citribraziliensis* e *P. citrichinaensis* causadoras da pinta-preta dos citros (Wulandari et al. 2009; Glienke et al. 2011; Wang et al. 2012; Wikee et al. 2013a; 2013b).

Até o momento, sabe-se apenas que alguns patógenos causadores de doenças pós-colheita, como no caso da pinta-preta da goiaba, sobrevivem na forma de infecção quiescente nos frutos e que irão induzir a manifestação dos sintomas durante o

amadurecimento após a colheita (Martins et al. 2007; Fischer et al. 2011). Porém, ainda não se sabe se os patógenos causadores de doenças pós-colheita da goiaba sobrevivem como endofítico em outros órgãos da planta. Dessa forma, a realização de estudos que associem as espécies de Botryosphaeriales fitopatogênicas às espécies endofíticas em um hospedeiro fornecerão informações acerca das formas de sobrevivência e disseminação de patógenos desse grupo que serão importantes para a determinação de formas de manejo da doença.

Apesar da importância e das perdas ocasionadas pelas doenças em goiaba, como a pinta-preta, podridão parda e podridão de Lasiodiplodia, elas são negligenciadas e pouco estudadas. Assim, diante da importância que a cultura da goiabeira tem adquirido no Brasil e da carência de estudos relacionados à etiologia de doenças desta cultura, uma correta identificação seguida de estudos acerca da ecologia dos patógenos fornecerão informações de grande relevância para o estabelecimento de medidas fitossanitárias e de quarentena, além de auxiliar no desenvolvimento de variedades resistentes.

Material e métodos

Obtenção das amostras e isolamento

Para a obtenção das amostras foram coletadas goiabas com sintomas de podridões pós-colheita, frutos secos e mumificados nos mercados locais do município de Viçosa – Minas Gerais e em uma área de cultivo no município de Piraúba – Minas Gerais. Folhas, ramos e frutos sadios foram coletados nesta mesma área, a fim de obter os isolados endofíticos. As amostras foram levadas para o Laboratório de Patologia de Sementes e de Pós-Colheita, do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa, onde foram examinadas, para verificar a possível presença de estruturas reprodutivas dos fungos.

A partir de sinais dos patógenos sobre as lesões em frutos, foram realizados isolamentos diretos em cultura (Alfenas et al. 2007). Após o crescimento das culturas, foi realizado a metodologia de ponta de hifa (Wikee et al. 2013a). Alternativamente, uma massa de conídios foi transferida para uma placa de Petri contendo ágar - água a 2% (ágar ágar, tipo I Himedia[®]), espalhados com uma alça de Drigalsky, e um único conídio foi transferido, para uma placa de Petri contendo meio BDA, utilizando um microscópio estereoscópico [Motic[®] SMZ-168 (20X)]. As placas foram incubadas a 25 °C.

Para a obtenção dos isolados endofíticos, fragmentos de 5 mm de diâmetro de folhas, ramos e frutos sadios foram desinfestados em etanol 95% por 1 minuto, hipoclorito de sódio 3% por 1 minuto, etanol 95% por 30 segundos e lavados com água destilada esterilizada (Promputtha et al. 2007). Posteriormente, os fragmentos foram dispostos sobre o meio BDA, em placas de Petri e incubados a 25 °C. Após o crescimento das colônias, estas foram transferidas para placas de Petri contendo meio BDA e mantidas a 25 °C, no escuro.

Após a obtenção de todos os isolados, as culturas puras crescidas em BDA foram armazenadas em placas de Petri contendo meio BDA a 10 °C e pelo método Castellani (Castellani 1967).

Extração de DNA, sequenciamento e análises filogenéticas

As culturas puras monospóricas foram cultivadas em meio BDA a 25 °C durante uma semana. Aproximadamente 40 mg de micélio foram removidos da superfície do meio e dispostos em microtubos esterilizados de 1,5 mL. A extração do DNA genômico foi processada por congelamento com nitrogênio líquido e trituração para um pó fino usando um almofariz. A trituração prosseguiu após a adição de 100 µL de Nuclei Lysis Solution da Wizard® do kit de purificação de DNA genômico (Promega Corporation, WI, EUA). Depois da primeira trituração, mais 500 µL da solução anterior foi adicionada. A extração prosseguiu como descrito por Pinho et al. (2012).

As reações de PCR foram realizadas de acordo com Machado et al. (2014) utilizando a combinação de primers 728F (Carbone e Kohn 1999) e EF2R (Jacobs et al. 2004) para amplificação parcial da região do Fator de Elongação (TEF-1 α).

Os produtos de PCR foram purificados e sequenciados pela Macrogen Inc., Korea (<http://www.macrogen.com>). As sequências de nucleotídeos foram editadas com o software BioEdit (Hall 2012).

As sequências consenso foram comparadas com o banco de dados do GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) utilizando o programa Mega BLAST. As sequências das espécies dentro de cada gênero identificado foram baixadas no formato FASTA (Tabela 1) e alinhadas utilizando o programa de alinhamento de sequências múltiplas Muscle® (Edgar 2004), construído no software MEGA v. 6 (Tamura et al. 2011). Foram realizados ajustes manuais, quando necessário. O alinhamento resultante foi depositado em TreeBASE (<http://www.treebase.org/>).

As análises de Inferência Bayesiana (BI) foram realizadas empregando o método da cadeia de Markov Monte Carlo. O melhor modelo de substituição de nucleotídeos foi determinado para cada gene utilizando o MrMODELTEST 2.3 (Posada e Buckley 2004) e selecionados de acordo com o Akaike Information Criterion (AIC). O modelo de evolução HKY+G foi selecionado para a árvore de espécies de *Phyllosticta* e de *Lasiodiplodia*, GTR+G para a árvore de espécies de *Neofusicoccum*. A análise filogenética foi realizada no portal CIPRES (Miller et al. 2010) utilizando MrBayes v.3.2.3 (Ronquist e Huelsenbeck 2003). Quatro cadeias MCMC foram executadas simultaneamente, a partir de árvores aleatórias até 10 000 000 gerações. As árvores foram amostradas a cada 1000 gerações, resultando em 10 000 árvores. As primeiras 2 500 árvores foram descartadas de cada análise. Os valores de probabilidade posterior (Rannala e Yang 1996) foram determinados a partir da árvore consenso por meio das 7 500 árvores remanescentes. As árvores foram visualizadas no software FigTree (Rambaut 2009) e exportadas para programas gráficos. A árvore das espécies de *Phyllosticta* foi enraizada com *Guignardia rhodoriae* CBS901.69, a árvore das espécies

de *Neofusicoccum* foi enraizada com *Spencermartisia viticila* CBS117009 e a árvore das espécies de *Lasiodiplodia* foi enraizada com *Neoscytalidium hyalinum* CBS499.66.

Caracterização morfológica

As culturas puras com ausência de esporulação referentes aos isolados representativos identificados nas análises filogenéticas foram cultivadas em placas de Petri contendo ágar - água a 2%, sobrepostos com palha de milho, folha de palmeira ou ramos de *Pinus* triplamente autoclavados e incubados a 25 °C sob um fotoperíodo de 12 horas com luz próxima à ultravioleta, para induzir a formação de estruturas reprodutivas (Machado et al. 2014). A partir destas estruturas foram preparadas lâminas em lactofenol para a observação das mesmas sob microscópio de luz OLYMPUS CX31. Foram realizadas trinta medições de todas as características morfológicas relevantes para identificação das espécies. As imagens das estruturas foram obtidas através de um microscópio de luz OLYMPUS BX53 equipado com uma câmara digital (OLYMPUS Q-Color5™), controlada por software (cellSens 1,9 DIGITAL software de imagem - OLYMPUS). Uma amostra representativa de cada táxon foi depositada no herbário local, na Universidade Federal de Viçosa (Herbário VIC), e todos os isolados serão posteriormente depositados na coleção de culturas Octávio Almeida Drummond (COAD) pertencente à Universidade Federal de Viçosa (Minas Gerais, Brasil).

Teste de patogenicidade

Para a inoculação, um isolado representativo de cada espécie foi cultivado em placas de Petri contendo meio BDA e incubados a 25 °C, durante sete dias, para fungos do gênero *Neofusicoccum* e *Lasiodiplodia*, e quinze dias, para fungos do gênero *Phyllosticta*. Foram selecionadas cinco goiabas assintomáticas para cada isolado, além do controle. Os frutos foram lavados em água corrente com sabão, enxaguados e secos à temperatura ambiente. Discos de sete milímetros de diâmetro contendo micélio foram obtidos com furador de cortiça esterilizado. O processo de inoculação consistiu no ferimento dos frutos com um conjunto de agulhas esterilizadas e sobre estes, foram dispostos os discos contendo micélio, com a parte micelial voltada para a superfície do fruto. Os frutos usados no controle também sofreram ferimentos e receberam apenas discos de BDA. Os frutos inoculados foram dispostos em bandejas plásticas juntamente com uma porção de algodão umedecido com água destilada e autoclavada. Estas bandejas foram envoltas com um filme plástico e acondicionadas em temperatura ambiente durante oito dias para os isolados de *Neofusicoccum* e de *Lasiodiplodia* e dez dias para os isolados de *Phyllosticta*. A agressividade dos isolados foi avaliada por medição do diâmetro da lesão em cada fruto a cada dois dias após a inoculação. Os fungos foram reisolados dos frutos sintomáticos experimentalmente inoculados.

Resultados

Sintomatologia e isolamento dos fungos

Em frutos sintomáticos, pintas pretas deprimidas apareceram na superfície dos mesmos e evoluíram formando lesões concêntricas maiores, as quais podem coalescer em estágios mais avançados da doença. Em lesões mais antigas, numerosos cirros podem ser formados sobre os picnídios. Em frutos mumificados, toda a superfície encontrava-se escura com sinais do patógeno e em frutos com podridões, o mesmo encontrava-se amolecido com uma grande parte do fruto mais escura. Entretanto nas folhas, ramos e frutos sadios, não foram observados esses sintomas (Figura 1).

Foram levados para o laboratório 51 frutos sintomáticos, 24 ramos e folhas e 7 frutos sadios. A partir destas amostras, foram obtidos 71 isolados pertencentes a ordem Botryosphaerales. Destes, 37 isolados pertencem ao gênero *Phyllosticta* (52%), 20 ao gênero *Lasiodiplodia* (28%) e 14 ao gênero *Neofusicoccum* (20%), mostrando uma maior frequência de fungos do gênero *Phyllosticta* (Figura 2).

Dos isolados de *Phyllosticta* obtidos, 9 foram isolados como endofíticos de folha, 5 foram isolados de frutos sadios e os demais de frutos sintomáticos. Já para *Lasiodiplodia*, um foi isolado como endofítico de folha e os demais de frutos sintomáticos. Para *Neofusicoccum*, um foi isolado como endofítico de ramo, um de fruto sadio e os demais de frutos sintomáticos.

Extração de DNA, sequenciamento e análises filogenéticas

Após o sequenciamento dos 71 isolados, os mesmos foram comparados com base nas sequências da região do fator de alongação (*TEF1- α*) para uma possível indicação da identidade de cada isolado (Marques et al. 2013; Hyde et al. 2014; Machado et al. 2014; Netto et al. 2014). As reações de PCR foram realizadas com êxito para todos os isolados. Os fragmentos de PCR de aproximadamente 700 pb foram gerados para a região *TEF1- α* .

A análise filogenética das espécies de *Phyllosticta* foi realizada com 52 taxa e o alinhamento das sequências resultou em um total de 245 caracteres, dos quais 62 eram parcimônia-informativo, 104 foram variáveis e 137 foram conservados (Figura 4). A análise filogenética das espécies de *Lasiodiplodia* foi realizada com 66 taxa e o alinhamento das sequências resultou em um total de 281 caracteres, dos quais 84 eram parcimônia-informativo, 126 foram variáveis e 150 foram conservados (Figura 5). A análise filogenética das espécies de *Neofusicoccum* foi realizada com 62 taxa e o alinhamento das sequências resultou em um total de 288 caracteres, dos quais 68 eram parcimônia-informativo, 109 foram variáveis e 174 foram conservados (Figura 6).

A partir das análises filogenéticas (Figuras 4, 5 e 6) e morfológicas (Tabela 2), foi possível identificar uma espécie de *Phyllosticta*, a qual agrupou formando um grande clado com a espécie *P. capitalensis* (Figuras 3K-O e 4), duas espécies de *Lasiodiplodia*, que separaram em 2 cladogramas (Figura 5). Quinze isolados formaram um

grande clado com a espécie de *Lasiodiplodia theobromae* (Figura 3A-E). Cinco isolados formaram um clado separado, próximo à espécie de *Lasiodiplodia gonubiensis*, com alto suporte (100%), que será proposta como uma possível espécie nova, e três espécies de *Neofusicoccum*, que separaram em 3 clados (Figura 6). Nove isolados formaram um grande clado dentro de um complexo de espécies (*Neofusicoccum batangarum*; *N. umdonicola*; *N. kwambonambiense*; *N. cordaticola*; *N. brasiliense*; *N. ribis*) (Figura 3F-J). Um isolado agrupou com a espécie *N. parvum* e, quatro isolados formaram um clado separado com alto suporte (94%), que será também posteriormente proposta como uma possível espécie.

***Neofusicoccum* sp.** (a ser proposta como uma nova espécie) (Figura 7)

Ascomata não observado. Conidiomata picnidial, erumpente, marrom escuro a preto, solitário, uniloculado formado sobre ramos de *Pinus* em cultura incubados a 25 °C e fotoperíodo de 12h durante 30 dias. Células conidiogênicas cilíndricas à ampuliformes, hialinas, holoblásticas, oriundas da parede interna do estroma, 9–13 × 1.5–2.5 µm. Conídios hialinos, parede lisa e delgada, fusiforme a elipsoidal, asseptados, ápice arredondado e base truncada, 16–24 × 4.5–6 µm. Espermásias e sinanamorfo semelhante a *Dichomera* não observados.

Material examinado: BRASIL, Viçosa, Minas Gerais, em frutos de *Psidium guajava*, 2014, V. P. de Abreu, Isolado 982. Outros isolados examinados estão listados na Tabela 1.

***Lasiodiplodia* sp.** (a ser proposta como uma nova espécie)

Até o presente momento não foi possível induzir a esporulação dos isolados. Entretanto com base na análise filogenética, esses isolados agruparam-se em um clado monofilético de elevado suporte de valor de probabilidade posterior. Sendo assim, estes serão futuramente propostos como uma possível nova espécie com base em caracteres moleculares.

Material examinado: BRASIL, Viçosa, Minas Gerais, em frutos de *Psidium guajava*, 2014, V. P. de Abreu. Os isolados examinados estão listados na Tabela 1.

Teste de patogenicidade

Todos os isolados foram patogênicos nos frutos de goiaba, resultando em lesões visíveis a partir do segundo dia após a inoculação para *Neofusicoccum* e *Lasiodiplodia* e a partir do sexto dia após a inoculação para *Phyllosticta* (Figura 8). No segundo dia, os sintomas de *Lasiodiplodia* e de *Neofusicoccum* foram lesões inicialmente de coloração castanha em torno dos locais de inoculação e micélio aéreo branco (Figura 8F e 8J). Com o passar dos dias as lesões evoluíram constituindo-se de coloração castanha mais escura e micélio aéreo um pouco mais escuro cobrindo todo o fruto no oitavo dia após a inoculação (Figura 8H e 8L). Durante o desenvolvimento da doença houve a formação de numerosos picnídios (Figura 8H e 8L). Em frutos inoculados com *Phyllosticta*, os sintomas apareceram no sexto dia, consistindo de uma lesão escura e deprimida (Figura 8O) e com o passar dos dias (10º dia), as lesões aumentaram de tamanho chegando a ter

em média 3,16 centímetros de comprimento e 3,25 centímetros de largura (Figura 8P). Foi possível reisolar os fungos inoculados a partir dos tecidos doentes.

Discussão

Diante da importância das doenças pós-colheita da goiaba causadas por fungos da ordem Botryosphaerales no Brasil, com base em análises filogenéticas aliadas aos estudos morfológicos, este trabalho apresenta uma identificação acurada dos seus agentes etiológicos além de permitir uma inferência sobre a ecologia destes patógenos.

Dentre as doenças estudadas neste trabalho, a pinta-preta da goiaba, associada pela primeira vez à espécie *Phyllosticta capitalensis*, foi a doença mais frequente (52%), tanto nos frutos obtidos dos mercados do município de Viçosa como também na área produtora de goiaba, no município de Piraúba. Estes dados corroboram com o levantamento realizado por Amaral et al. (2006) e Martins et al. (2007), nos quais a pinta-preta foi a doença de maior incidência. Também associado ao sintoma da pinta-preta da goiaba foram obtidos isolados do gênero *Neofusicoccum* (20%), entretanto com base nos resultados dos testes de patogenicidade, este gênero não é considerado como um dos agentes causais da pinta-preta, uma vez que não reproduziu os sintomas nos frutos experimentalmente inoculados. Além destas doenças, também foram encontradas goiabas com sintomas de podridão de *Lasiodiplodia* (28%).

Para uma primeira análise, foi utilizado apenas o gene do fator de alongação (*TEF1- α*) para separar as possíveis espécies (Marques et al. 2013; Hyde et al. 2014; Machado et al. 2014; Netto et al. 2014), uma vez que este gene utilizado é recomendado como marcador para identificação de espécies da ordem Botryosphaerales (Hyde et al. 2014). Porém, para estudos taxonômicos e a identificação de novas espécies, um único gene não apresenta suporte filogenético suficiente. Além da análise das sequências geradas do *TEF1- α* , outros genes e regiões gênicas (ITS, β t e ACT) estão sendo sequenciados para dar maior robustez aos resultados e serão posteriormente utilizados para se aumentar o suporte filogenético e também devido a necessidade da confirmação das novas espécies a serem propostas.

A identificação das espécies do gênero *Phyllosticta*, ainda é fonte de controvérsia (Okane et al. 2001; Baayen et al. 2002; Motohashi et al. 2008; 2009). A existência de poucas características morfológicas torna a determinação das espécies uma tarefa muito difícil, principalmente quando da existência de espécies crípticas (Glienke et al. 2011; Zhang et al. 2013; Wang et al. 2012; Wong et al. 2012; Su e Cai 2012; Wikee et al. 2013a). Recentemente, as análises filogenéticas baseadas em sequências multilocus aliadas aos estudos morfológicos tornaram-se uma importante ferramenta para resolver a taxonomia desse grupo. Dessa forma, um progresso significativo foi alcançado na diferenciação de espécies de *Phyllosticta* (Glienke et al. 2011; Wikee et al. 2011; Wang et al. 2012; Wong et al. 2012; Wikee et al. 2013a; Phillips et al. 2013). Seguindo esta abordagem, neste trabalho, todos os isolados de *Phyllosticta* foram identificados como *P. capitalensis*, devido formarem um grande clado com sequências

do tipo dessa espécie (CBS128856) (Figura 4) e por apresentarem as características morfométricas similares (Tabela 2).

Espécies de *Neofusicoccum* foram observadas causando podridões pós-colheita em vários hospedeiros, como por exemplo em morango (Lopes et al. 2014) e manga (Batista et al. 2012; Marques et al. 2013), porém existe uma carência de estudos envolvendo o gênero *Neofusicoccum* no Brasil. Neste estudo, baseado em análises de sequências parciais do gene TEF-1 α , nove isolados de *Neofusicoccum* formaram um grande clado dentro de um complexo de espécies (*Neofusicoccum batangarum*; *N. umdonicola*; *N. kwambonambiense*; *N. cordaticola*; *N. brasiliense*; *N. ribis*). Um isolado agrupou com a espécie *N. parvum*, entretanto não foi possível realizar uma análise da morfologia, devido à ausência de esporulação do isolado. E quatro isolados formaram um clado separado com alto suporte (94%) (Figura 6).

Neofusicoccum sp. foi claramente separado de *N. algeriense* formando um clado monofilético com alto suporte (Figura 6). Além disso, os conídios de *Neofusicoccum* sp. são maiores do que os de *N. algeriense* (Tabela 2). Apesar de outro *Neofusicoccum* sp. obtido durante as coletas estar dentro de um complexo de espécies, este apresentou dimensões de conídios semelhantes à *N. umdonicola* (Tabela 2). Entretanto, estes resultados mostram que apenas com sequências de TEF-1 α não é possível fazer a distinção de todas as espécies de *Neofusicoccum*. Posteriormente, serão necessárias a inclusão de outras sequências como ITS e beta tubulina à análise filogenética com a finalidade de fornecer um maior suporte para a distinção destas espécies (Hyde et al. 2014). Esta é a primeira descrição da ocorrência de *Neofusicoccum* neste hospedeiro.

Neste trabalho foram identificadas duas espécies de *Lasiodiplodia*, as quais se agruparam em dois cladogramas distintos. Quinze isolados formaram um grande clado com a espécie de *Lasiodiplodia theobromae*, e cinco isolados formaram um clado separado, próximo à espécie de *Lasiodiplodia gonubiensis*, com alto suporte filogenético (100%), separando das demais espécies, sendo uma possível nova espécie (Figura 5). Devido a ausência de esporulação dos isolados da nova espécie não foi possível realizar as análises morfológicas. Porém, outros métodos de esporulação serão posteriormente testados. Neste estudo, *L. theobromae* apresentou conídios de tamanho similar, porém apresentou paráfises com dimensões maiores do que as descrições anteriores (Tabela 2).

Todos os isolados foram patogênicos para a goiaba. Os isolados de *Neofusicoccum* e *Lasiodiplodia* foram mais agressivos do que os isolados de *Phyllosticta*. Dessa forma, observou-se que os isolados do gênero *Neofusicoccum* estavam apenas associados à pinta-preta e não reproduziram os mesmos sintomas observados no campo. *Phyllosticta capitalensis* é o agente causador da pinta-preta e reproduziu os mesmos sintomas nos frutos experimentalmente inoculados, porém os mesmos apareceram de forma mais lenta. Isto ocorre pelo fato de que esses patógenos normalmente infectam os frutos e ficam em estágio de quiescência até que os níveis de açúcares dos frutos aumentem durante o período de amadurecimento, surgindo então sintomas de podridões (Kim et al. 2001, Kim et al. 2004; Martins et al. 2007; Fischer et al. 2011). Dessa forma, este trabalho apresenta um novo relato de podridão causada por

espécies de *Neofusicoccum*. Além disso, a podridão de *Lasiodiplodia* pode ser causada por um complexo de espécies do gênero.

Este estudo também buscou avaliar a ocorrência de espécies de Botryosphaerales como endofíticos em folhas, ramos e frutos sadios. *Neofusicoccum* e *Lasiodiplodia* foram encontrados em menor proporção. Em folhas e frutos sadios foi possível encontrar *Phyllosticta capitalensis*, que apesar de ser considerado um típico endofítico ou um patógeno pouco agressivo (Wikee et al. 2013b), reproduziu os mesmos sintomas observados no campo, satisfazendo assim os postulados de Koch. Estes resultados corroboram com os relatos de que fungos endofíticos podem se tornar patógenos, sob certas condições e vice-versa (Schulz e Boyle 2005; Kogel et al. 2006; Slippers e Wingfield 2007). Já em outros trabalhos, *Phyllosticta capitalensis* é isolada frequentemente em espécies de citros como endofítico, mostrando-se incapaz de causar doença, e é filogeneticamente distinta das espécies patogênicas *P. citricarpa*, *P. citriasiana*, *P. citribraziliensis* e *P. citrichinaensis*, causadoras da pinta-preta dos citros (Wulandari et al. 2009; Glienke et al. 2011; Wang et al. 2012; Wikee et al. 2013a; 2013b). Isto pode ser explicado pelo fato de que a espécie *P. capitalensis* ocorre em uma ampla gama de hospedeiros, e que a biologia dessa espécie ainda carece de estudos.

Com base na ampla distribuição taxonômica e alta frequência de infecções de fungos endofíticos em plantas, acredita-se que a maioria, se não todos os fungos dessa ordem podem ter uma fase endofítica. Porém o uso do termo endofítico pode ser controverso quando refere-se ao papel ecológico do organismo, particularmente na descrição mutualista vs. patógenos latentes. Alguns fungos dessa ordem são claramente reconhecidos como patógenos e poderiam ser descritos como patógenos latentes (Slippers e Wingfield 2007).

A expressão de doenças causadas por espécies da ordem Botryosphaerales é quase que exclusivamente associada com algum tipo de estresse ou condições de crescimento não ideais por parte das plantas hospedeiras (Blodgett e Stanosz 1995; Ma et al. 2001; Paoletti et al. 2001; Schoeneweiss 1981; Smith et al. 1994; Stanosz et al. 2001). Dessa forma, especula-se que os fungos desse grupo sobrevivam como endofíticos no interior de seus hospedeiros sem causar sintomas aparentes e que nas condições de estresse, estes iniciem a sua fase patogênica (Slippers e Wingfield 2007). Porém, os aspectos relacionados à ecologia destes fungos ainda precisam ser estudados.

Diante disso, o aumento das áreas de cultivo de goiaba tem contribuído com o surgimento de várias doenças, sendo que, para *Phyllosticta*, *Lasiodiplodia* e *Neofusicoccum* em goiabas não existem dados sobre requerimentos ambientais para a infecção, bem como não existem trabalhos sobre a epidemiologia em campo para essas doenças, nem para o seu controle pós-colheita (Soares-Colletii 2012). Dessa forma, este trabalho fornece informações essenciais para estes estudos e para o estabelecimento de medidas fitossanitárias, de quarentena e auxílio no desenvolvimento de variedades resistentes.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais - FAPEMIG pelo apoio financeiro e aos mercados do município de Viçosa e ao produtor de goiabas do município de Piraúba, por fornecer material fundamental para realização deste trabalho.

Referências

- Agrianual (2014) Anuário da agricultura brasileira. Informa Economics/FNP South America. São Paulo, 463 p
- Alfenas AC, Ferreira FA, Mafia RG, Gonçalves RC (2007) Isolamento de Fungos Fitopatogênicos. In: Alfenas AC e Mafia RC (ed) Métodos em Fitopatologia, 1ª ed. Viçosa, Brasil, pp 53–90
- Alves A, Crous PW, Correia A, Phillips AJL (2008) Morphological and molecular data reveal cryptic speciation in *Lasiodiplodia theobromae*. *Fungal Diversity* 28: 1–13
- Amaral CS, Salvaia A, Angeli SS, Martins MC, Lourenço AS, Amorim L (2006) Incidência de patógenos pós-colheita em goiabas Kumagai. *Summa Phytopathologica* 32: 57
- Baayen R, Bonants P, Verkley G, Carroll G, Van Der Aa H, De Weerd M, Van Brouwershaven I, Schutte G, Maccheroni W. JR, De Blanco C (2002) Nonpathogenic isolates of the citrus black spot fungus, *Guignardia citricarpa*, identified as a cosmopolitan endophyte of woody plants, *G. mangiferae* (*Phyllosticta capitalensis*). *Phytopathology* 92: 464–477
- Batista DC, Lima Neto FP, Barbosa JS, Amorim CC, Barbosa MAG (2012) Avaliação da resistência de 47 acessos de mangueira aos fungos *Fusicoccum aesculis* e *Neofusicoccum parvum*. *Revista Brasileira de Fruticultura* 34: 823–831
- Bergamin Filho A, Amorim L (2007) Doenças pós-colheita. In: Simpósio Brasileiro de Pós-Colheita de frutas, hortaliças e flores, Viçosa. Palestras e resumos... Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2: 203
- Berraf-Tebbal A, Guereiro MA, Phillips AJL (2014) Phylogeny of *Neofusicoccum* species associated with grapevine trunk diseases in Algeria, with description of *Neofusicoccum algeriense* sp. nov. *Phytopathologia Mediterranea* 53: 416–427
- Blodgett JT, Stanosz GR (1995) *Sphaeropsis sapinea* and host water stress in a red pine plantation in central Wisconsin. *Phytopathology* 85: 1044
- Beier GL, Hokanson SC, Bates ST (2015) *Aurantioporthe corni* gen. et comb. nov., an endophyte and pathogen of *Cornus alternifolia*. *Mycologia* 107: 66–79

- Carbone I, Kohn LM (1999) A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia* 91: 553–556
- Carvalho VD (1994) Qualidade e conservação pós-colheita de goiabas. Informe Agropecuário, Belo Horizonte, 17: 48–54
- Castellani A (1967) A Maintenance and Cultivation of the common pathogenic fungi of man in sterile distilled water. Further researches. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 70: 181–184
- Choudhury MM (2001) Goiaba: pós-colheita. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, Frutas do Brasil 19, 45p
- Edgar RC (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* 32: 1792–1797
- Fischer IH, Almeida AM, Arruda MC, Bertani RMA, Garcia MJM, Amorim L (2011) Danos em pós-colheita de goiabas na Região do Centro-Oeste Paulista. *Bragantia*, Campinas, 70: 570–576
- Glienke C, Pereira OL, Stringari D, Fabris J, Kava-Cordeiro V, Galli-Terasawa L, Cunnington J, Shivas RG, Groenewald JZ, Crous PW (2011) Endophytic and pathogenic *Phyllosticta* species, with reference to those associated with Citrus Black Spot. *Persoonia* 26: 47–56
- Hall T (2012) BioEdit v7.0.9: Biological sequence alignment editor for Win95/98/2K/XP/7. Disponível em: <http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>. Acesso em 10 de outubro de 2014
- Hyde KD, Nilsson RH, Alias SA, Ariyawansa HA, Blair JE, Cai L, De Cock AWAM, Dissanayake AJ, Glockling SL, Goonasekara ID, Gorczak M, Hahn M, Jayawardena RS, van Kan JAL, Laurence MH, Lévesque CA, Li X, Liu JK, Maharachchikumbura SSN, Manamgoda DS, Martin FN, McKenzie EHC, McTaggart AR, Mortimer PE, Nair PVR, Pawłowska J, Rintoul TL, Shivas RG, Spies CFJ, Summerell BA, Taylor PJT, Terhem RB, Udayanga D, Vaghefi N, Walther G, Wilk M, Wrzosek M, Xu JC, Yan J, Zhou N (2014) One stop shop: backbone trees for important phytopathogenic genera: I. *Fungal Diversity* 67: 21–125
- Jacobs K, Bergdahl DR, Wingfield MJ, Halik S, Seifert KA, Bright DE, Wingfield BD (2004) *Leptographium wingfieldii* introduced into North America and found associated with exotic *Tomicus piniperda* and native bark beetles. *Mycological Research* 108:411–418.
- Junqueira NTV, Andrade LRM, Pereira M, Lima MM, Chaves RC (2001) Doenças da goiabeira no cerrado. Planaltina: EMBRAPA, 32p
- Kim KW, Park EW, Kim KS (2004) Glyoxysomal nature of microbodies complexed with lipid globules in *Botryosphaeria dothidea*. *Phytopathology* 94: 970–977

- Kim KW, Park EW, Kim YH, Anh K, Kim PG, Kim KS (2001) Latency-and-defense-related ultrastructural characteristics of apple fruit tissues infected with *Botryosphaeria dothidea*. *Phytopathology* 91: 165–172
- Kogel KH, Franken P, Huckelhoven R (2006) Endophyte or parasite – what decides? *Current Opinion in Plant Biology* 9: 358–363
- Liu JK, Phokamsak R, Doilom M, Wikee S, Li YM, Ariyawansa H, Boonmee S, Chomnunti P, Dai DQ, Bhat JD, Romero AI, Zhuang WY, Monkai J, Jones EBG, Chukeatirote E, Ko TWK, Zhao YC, Wang Y, Hyde KD (2012) Towards a natural classification of *Botryosphaeriales*. *Fungal Diversity* 57: 149–210
- Lopes UP, Zambolim L, Pinho DB, Barros AV, Costa H, Pereira OL (2014) Postharvest rot and mummification of strawberry fruits caused by *Neofusicoccum parvum* and *N. kwambonambiense* in Brazil. *Tropical Plant Pathology* 39: 178–183
- Ma Z, Morgan DP, Michailides TJ (2001) Effects of water stress on *Botryosphaeria* blight of pistachio caused by *Botryosphaeria dothidea*. *Plant Disease* 85: 745–749
- Machado AR, Pinho DB, Pereira OL (2014) Phylogeny, identification and pathogenicity of the *Botryosphaeriaceae* associated with collar and root rot of the biofuel plant *Jatropha curcas* in Brazil, with a description of new species of *Lasiodiplodia*. *Fungal Diversity* 67: 231–247
- Manica I, Icuma IM, Junqueira NTV, Salvador JO, Moreira A, Malavolta E (2001) *Goiaba do plantio ao consumidor: tecnologia de produção, pós-colheita, comercialização*. Porto Alegre: Cinco Continentes, 124p
- Marques MW, Lima NB, Morais JR MA, Barbosa MAG, Souza BO, Michereff SJ, Phillips AJL, Camara MPS (2013) Species of *Lasiodiplodia* associated with mango in Brazil. *Fungal Diversity* 61: 181–193
- Martins MC, Amorim L, Lourenço AS, Gutierrez ASD, Watanabe HS (2007) Incidência de danos pós-colheita em goiabas no mercado atacadista de São Paulo e sua relação com a prática de ensacamento dos frutos. *Revista Brasileira de Fruticultura* 29: 245–248
- Miller MA, 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 LA, USA. pp. 1–8
- Motohashi K, Araki I, Nakashima C (2008) Four new species of *Phyllosticta*, one new species of *Pseudocercospora*, and one new combination in *Passalora* from Japan. *Mycoscience* 49: 138–146
- Motohashi K, Inaba S, Anzai K, Takamatsu S, Nakashima C (2009) Phylogenetic analyses of Japanese species of *Phyllosticta sensu stricto*. *Mycoscience* 50: 291–302

- Moura Neto LG, Amaral DS, Moura SMA, Peixoto LG (2008) Qualidade pós-colheita de goiabas cv. “Paluma” submetidas à aplicação de cloreto de cálcio armazenadas em temperaturas ambiente. *Agropecuária Científica no Semi-Árido* 4: 27–31
- Netto MSB, Assunção IP, Lima GSA, Marques MW, Lima WG, Monteiro JHA, Balbino VQ, Michereff SJ, Phillips AJL, Câmara MPS (2014) Species of *Lasiodiplodia* associated with papaya stem-end rot in Brazil. *Fungal Diversity* 67: 127–141
- Okane I, Nakagiri A, Ito T (2001) Identity of *Guignardia* sp. inhabiting ericaceous plants. *Canadian Journal of Botany* 79: 101–109
- Paoletti E, Danti R, Strati S (2001) Pre-and post-inoculation water stress affects *Sphaeropsis sapinea* canker length in *Pinus halepensis* seedlings. *Forest Pathology* 31: 209–218
- Phillips AJL, Alves A, Abdollahzadeh J, Slippers B, Wingfield MJ, Groenewald JZ, Crous PW (2013) The Botryosphaeriaceae: genera and species known from culture. *Studies in Mycology* 76: 51–167
- Piccinin E, Pascholati SF, Piero RM (2005) Doenças da goiabeira (*Psidium guajava*). In: Kimati H, Amorim L, Rezende JAM, Bergamim Filho A, Camargo LEA (eds.) *Manual de Fitopatologia*. São Paulo: Editora Agronômica Ceres Ltda., 2: 401–405
- Pinho DB, Firmino AL, Pereira OL, Ferreira Junior WG (2012) An efficient protocol for DNA extraction from *Meliolales* and the description of *Meliola centellae* sp. nov. *Mycotaxon* 122: 333–345
- Posada D, Buckley TR (2004) Model selection and model averaging in phylogenetics: advantages of Akaike information criterion and Bayesian approaches over likelihood ratio tests. *Systematic Biology* 53: 793–808
- Promptutha I, Lumyong S, Dhanasekaran V, McKenzie EHC, Hyde KD, Jeewon R (2007) A Phylogenetic Evaluation of Whether Endophytes Become Saprotophs at Host Senescence. *Microbial Ecology* 53: 579–590
- Rambaut A (2009) FigTree 1.2.2. Disponível em: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>. Acesso em 10 de Outubro de 2014
- Rannala B, Yang Z (1996) Probability distribution of molecular evolutionary trees: a new method of phylogenetic inference. *Journal of Molecular Evolution* 43: 304–311
- Ronquist F, Heulsenbeck JP (2003) MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19: 1572–1574
- Schoeneweiss DF (1981) The role of environmental stress in diseases of woody plants. *Plant Disease* 65: 308–314

- Schulz B, Boyle C (2005) The endophytic continuum. *Mycological Research* 109: 661–686
- Slippers B, Wingfield MJ (2007) Botryosphaeriaceae as endophytes and latent pathogens of woody plants: diversity, ecology and impact. *Fungal Biology Review* 21: 90–106
- Smith H, Kemp GHJ, Wingfield MJ (1994) Canker and die-back of Eucalyptus in South Africa caused by Botryosphaeria dothidea. *Plant Pathology* 43: 1031–1034
- Soares-Colletti AR (2012) Doenças quiescentes em goiabas: quantificação e controle pós-colheita. Tese de Doutorado, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”
- Stanosz GR, Blodgett JT, Smith DR, Kruge EL (2001) Water stress and Sphaeropsis sapinea as a latent pathogen of red pine seedlings. *New Phytologist* 149: 531–538
- Su YY, Cai L (2012) Polyphasic characterization of three new Phyllosticta spp. *Persoonia* 28: 76–84
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011) MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* 28: 2731–2739
- Tozetto LJ (1995) Caracterização, biologia e controle em pós-colheita de Guignardia psidii Ullasa & Rawal [Phyllosticta psidiicola (Petr) van der Aa], agente causal de podridão em frutos de goiabeira. Dissertação de Mestrado, Universidade de Brasília
- Tozetto LJ, Ribeiro WRC (1998) Tratamento pós-colheita de goiaba (Psidium guajava, L.) contra podridão de Guignardia psidii. *Revista Brasileira de Fruticultura* 20: 229–234
- Ullasa BA, Rawal RD (1984) Guignardia fruit rot of guava - a new disease from Bangalore. *Current Science, Bangalore* 53: 435–436
- Wang X, Chen G, Huang F, Zhang J, Hyde KD, Li H (2012) Phyllosticta species associated with citrus diseases in China. *Fungal Diversity* 52: 209–224
- Wikee S, Udayanga D, Crous PW, Chukeatirote E, McKenzie EHC, Bahkali AH, Dai DQ, Hyde KD (2011) Phyllosticta- uma visão geral do status atual de reconhecimento de espécies. *Fungal Diversity* 51: 43–61
- Wikee S, Lombard L, Nakashima C, Motohashi K, Chukeatirote E, Cheewangkoon R, McKenzie EHC, Hyde KD, Crous PW (2013a) A phylogenetic re-evaluation of Phyllosticta (Botryosphaeriales). *Studies in Mycology* 76: 1–29

- Wikee S, Lombard L, Crous PW, Nakashima C, Motohashi K, Chukeatirote E, Alias SA, Mckenzie EHC, Hyde KD (2013b) *Phyllosticta capitalensis*, a widespread endophyte of plants. *Fungal Diversity* 60: 91–105
- Wong MH, Crous PW, Henderson J, Groenewald JZ, Drenth A (2012) *Phyllosticta* species associated with freckle disease of banana. *Fungal Diversity* 56: 173–187
- Zhang K, Su YY, Cai L (2013) Morphological and phylogenetic characterization of two new species of *Phyllosticta* from China. *Mycological Progress* 12: 547–556

Conclusões Gerais

- Seis espécies de Botryosphaeriales estão associadas às podridões pós-colheita da goiaba;
- *Phyllosticta capitalensis*, apesar de ser considerado um típico endofítico ou um patógeno pouco agressivo, é o agente causador da pinta-preta em goiaba, principal doença pós-colheita da cultura;
- Esta é a primeira descrição da ocorrência de *Neofusicoccum* causando doença neste hospedeiro;
- A podridão de *Lasiodiplodia* pode ser causada por um complexo de espécies do gênero;
- Todas as espécies encontradas são patogênicas, *Lasiodiplodia* spp. e *Neofusicoccum* spp. são mais agressivas, entretanto *P. capitalensis* ocorre em maior incidência.

Anexos

Tabela 1. Número de acesso das sequências de DNA de Botryosphaeriales utilizadas nas análises filogenéticas. Os isolados obtidos neste estudo estão destacados em negrito.

Espécies	Isolados	Hospedeiro/Substrato	Número de acesso do Genbank
			TEF1-α
Guignardia mangiferae	IMI 260576	Mangifera indica	JF261501
Guignardia rhodoraе	CBS 901.69	Rhododendron sp.	KF289230
Phyllosticta aloecola	CPC 21020	Aloe ferox	KF289193
Phyllosticta aloecola	CPC 21021	Aloe ferox	KF289194
Phyllosticta beaumarisii	CBS 535.87	Muehlenbekia adpressa	KF289170
Phyllosticta brazillianaе	CBS 126270	Mangifera indica	JF343593
Phyllosticta capitalensis	CBS 128856	Stanhopea sp.	JF261507
Phyllosticta capitalensis	CBS 123404	Musa paradisiaca	FJ538391
Phyllosticta capitalensis	CBS 115049	Bowdichia nitida	FJ538382
Phyllosticta cordylinophila	CPC 20261	Cordyline fruticosa	KF289172
Phyllosticta foliorum	CBS 447.68	Taxus baccata	KF289201
Phyllosticta mínima	CBS 585.84	Acer rubrum	KF289204
Phyllosticta rubra	CBS 111635	Acer rubrum	KF289198
Phyllosticta sphaeropsoidеa	CBS 756.70	Aesculus hippocastanum	KF289202
Phyllosticta capitalensis	1046	Psidium guajava	-
Phyllosticta capitalensis	1041	Psidium guajava	-
Phyllosticta capitalensis	1029	Psidium guajava	-
Phyllosticta capitalensis	1050	Psidium guajava	-
Phyllosticta capitalensis	1023	Psidium guajava	-
Phyllosticta capitalensis	1051	Psidium guajava	-
Phyllosticta capitalensis	1036	Psidium guajava	-
Phyllosticta capitalensis	1038	Psidium guajava	-
Phyllosticta capitalensis	1016	Psidium guajava	-
Phyllosticta capitalensis	1020	Psidium guajava	-
Phyllosticta capitalensis	1019	Psidium guajava	-
Phyllosticta capitalensis	1017	Psidium guajava	-
Phyllosticta capitalensis	1011	Psidium guajava	-
Phyllosticta capitalensis	1018	Psidium guajava	-
Phyllosticta capitalensis	1021	Psidium guajava	-
Phyllosticta capitalensis	1024	Psidium guajava	-
Phyllosticta capitalensis	1027	Psidium guajava	-
Phyllosticta capitalensis	1028	Psidium guajava	-
Phyllosticta capitalensis	1030	Psidium guajava	-
Phyllosticta capitalensis	1034	Psidium guajava	-
Phyllosticta capitalensis	1037	Psidium guajava	-
Phyllosticta capitalensis	1040	Psidium guajava	-
Phyllosticta capitalensis	1031	Psidium guajava	-
Phyllosticta capitalensis	1045	Psidium guajava	-
Phyllosticta capitalensis	1047	Psidium guajava	-
Phyllosticta capitalensis	1044	Psidium guajava	-
Phyllosticta capitalensis	1043	Psidium guajava	-
Phyllosticta capitalensis	1042	Psidium guajava	-
Phyllosticta capitalensis	1039	Psidium guajava	-
Phyllosticta capitalensis	1035	Psidium guajava	-
Phyllosticta capitalensis	1033	Psidium guajava	-
Phyllosticta capitalensis	1032	Psidium guajava	-
Phyllosticta capitalensis	1026	Psidium guajava	-
Phyllosticta capitalensis	1025	Psidium guajava	-
Phyllosticta capitalensis	1022	Psidium guajava	-
Phyllosticta capitalensis	1015	Psidium guajava	-
Phyllosticta capitalensis	1004	Psidium guajava	-
Neofusicoccum parvum	CMW9081	Populus nigra	AY236888

Neofusicoccum parvum	CBS110301	Vitis vinifera	AY573221
Neofusicoccum algeriense	ALG1	-	KJ657715
Neofusicoccum algeriense	ALG11	-	KJ657722
Neofusicoccum algeriense	ALG9	-	KJ657721
Neofusicoccum andinum	CMW13446	-	DQ306264
Neofusicoccum andinum	CMW13455	-	AY693977
Neofusicoccum arbuti	CBS116131	Arbutus menziesii	KF531792
Neofusicoccum arbuti	CBS117090	Arbutus menziesii	KF531791
Neofusicoccum australe	CMW6837	Acacia sp.	AY339270
Neofusicoccum australe	CMW6853	-	AY339271
Neofusicoccum batangarum	CMW28320	Terminalia catappa	FJ900654
Neofusicoccum batangarum	CMW28363	Terminalia catappa	FJ900653
Neofusicoccum brasiliense	CMM1269	Mangifera indica	JX513609
Neofusicoccum brasiliense	CMM1285	Mangifera indica	JX513608
Neofusicoccum brasiliense	CMM1338	Mangifera indica	JX513610
Neofusicoccum cordaticola	CMW13992	Syzygium cordatum	EU821868
Neofusicoccum cordaticola	CMW14056	Syzygium cordatum	EU821873
Neofusicoccum cryptoaustrale	CMW23786	-	FJ752714
Neofusicoccum cryptoaustrale	CMW23787	-	FJ752711
Neofusicoccum eucalypticola	CMW6539	Eucalyptus grandis	AY615133
Neofusicoccum eucalyptorum	CMW10125	Eucalyptus grandis	AY236891
Neofusicoccum kwambonambiense	CMW14023	Syzygium cordatum	EU821870
Neofusicoccum kwambonambiense	CMW14140	Syzygium cordatum	EU821889
Neofusicoccum luteum	CBS110299	Vitis vinifera	AY573217
Neofusicoccum luteum	CBS110497	Vitis vinifera	EU673277
Neofusicoccum macroclavatum	WAC12444	Eucalyptus globulus	DQ093217
Neofusicoccum macroclavatum	WAC12446	Eucalyptus globulus	DQ093218
Neofusicoccum mangiferae	CMW7024	Mangifera indica	DQ093221
Neofusicoccum mangiferae	CMW7797	Mangifera indica	DQ093220
Neofusicoccum mediterraneum	CBS121558	-	GU799462
Neofusicoccum mediterraneum	PD312	Eucalyptus	GU251308
Neofusicoccum nonquaesitum	PD301	blueberry	GU251296
Neofusicoccum nonquaesitum	PD484	bay laurel	GU251295
Neofusicoccum occulatum	CBS128008	Eucalyptus grandis hybrid	EU339509
Neofusicoccum occulatum	MUCC286	Eucalyptus pellita	EU339511
Neofusicoccum parvum	CBS110301	Vitis vinifera	AY573221
Neofusicoccum parvum	CMW9081	Populus nigra	AY236888
Neofusicoccum pennatisporum	MUCC510	Allocasuarina fraseriana	EF591976
Neofusicoccum ribis	CMW7054	Ribes sp.	AY236879
Neofusicoccum ribis	CMW7772	Ribes sp.	AY236877
Neofusicoccum umdonicola	CMW14058	Syzygium cordatum	EU821874
Neofusicoccum umdonicola	CMW14060	Syzygium cordatum	EU821875
Neofusicoccum ursorum	CMW23790	Eucalyptus sp.	FJ752708
Neofusicoccum ursorum	CMW24480	Eucalyptus sp.	FJ752709
Neofusicoccum viticlavatum	STEU5041	-	AY343341
Neofusicoccum viticlavatum	STEU5044	-	AY343342
Neofusicoccum vitifusiforme	STEU5050	-	AY343344
Neofusicoccum vitifusiforme	STEU5252	-	AY343343
Spencermartisia viticola	CBS117009	-	AY905559
Neofusicoccum	1054	Psidium guajava	-
Neofusicoccum sp.	1006	Psidium guajava	-
Neofusicoccum sp.	1002	Psidium guajava	-
Neofusicoccum sp.	1008	Psidium guajava	-
Neofusicoccum sp.	982*	Psidium guajava	-
Neofusicoccum sp.	977	Psidium guajava	-
Neofusicoccum sp.	1010	Psidium guajava	-
Neofusicoccum sp.	973	Psidium guajava	-
Neofusicoccum sp.	978	Psidium guajava	-

Neofusicoccum sp.	983	Psidium guajava	-
Neofusicoccum sp.	984	Psidium guajava	-
Neofusicoccum sp.	988	Psidium guajava	-
Neofusicoccum sp.	989	Psidium guajava	-
Neofusicoccum sp.	998	Psidium guajava	-
Lasiodiplodia exigua	CBS 137785	Retama raetam	KJ638336
Lasiodiplodia exigua	BL184	broom bush	KJ638337
Lasiodiplodia mahajangana	CMW27820	Terminalia catappa	FJ900643
Lasiodiplodia mahajangana	CMW27801	Terminalia catappa	FJ900641
Lasiodiplodia theobromae	CBS124.13	-	DQ458858
Lasiodiplodia theobromae	CBS164.96	-	AY640258
Lasiodiplodia theobromae	CBS111530	-	EF622054
Lasiodiplodia theobromae	979	Psidium guajava	-
Lasiodiplodia theobromae	981	Psidium guajava	-
Lasiodiplodia theobromae	986	Psidium guajava	-
Lasiodiplodia theobromae	985	Psidium guajava	-
Lasiodiplodia theobromae	993	Psidium guajava	-
Lasiodiplodia theobromae	994	Psidium guajava	-
Lasiodiplodia theobromae	990	Psidium guajava	-
Lasiodiplodia theobromae	991	Psidium guajava	-
Lasiodiplodia theobromae	992	Psidium guajava	-
Lasiodiplodia theobromae	996	Psidium guajava	-
Lasiodiplodia theobromae	999	Psidium guajava	-
Lasiodiplodia theobromae	1001	Psidium guajava	-
Lasiodiplodia theobromae	987	Psidium guajava	-
Lasiodiplodia theobromae	980	Psidium guajava	-
Lasiodiplodia theobromae	995	Psidium guajava	-
Lasiodiplodia brasiliense	CMM4015	Mangifera indica	JX464049
Lasiodiplodia brasiliense	CMM2255	Carica papaya	KC481523
Lasiodiplodia viticola	UCD2553AR	Vitis vinifera	HQ288269
Lasiodiplodia viticola	UCD2604MO	Vitis vinifera	HQ288270
Lasiodiplodia jatrophiicola	CMM3610	Jatropha curcas	KF226690
Lasiodiplodia iraniensis	IRAN1517C	Citrus sp.	GU945337
Lasiodiplodia iraniensis	IRAN1519C	Mangifera indica	GU945338
Lasiodiplodia missouriana	UCD2193MO	Vitis vinifera	HQ288267
Lasiodiplodia missouriana	UCD2199MO	Vitis vinifera	HQ288268
Lasiodiplodia gilanensis	IRAN1523C	-	GU945342
Lasiodiplodia gilanensis	IRAN1501C	-	GU945341
Lasiodiplodia plurivora	STEU5803	Vitis vinifera	EF445395
Lasiodiplodia mediterranea	CBS137783	Quercus ilex	KJ638331
Lasiodiplodia mediterranea	CBS137784	Vitis vinifera	KJ638330
Lasiodiplodia pseudotheobromae	CBS116459	Gmelina arborea	EF622057
Lasiodiplodia pseudotheobromae	CMM3887	Jatropha curcas	KF226722
Lasiodiplodia macrospora	CMM3833	Jatropha curcas	KF226718
Lasiodiplodia hormozganensis	IRAN1500C	Olea sp.	GU945343
Lasiodiplodia hormozganensis	IRAN1498C	Mangifera indica	GU945344
Lasiodiplodia parva	CBS456.78	Cassava-field soil	EF622063
Lasiodiplodia parva	CBS495.78	Cassava-field soil	EF622065
Lasiodiplodia citricola	IRAN1522C	Citrus sp.	GU945340
Lasiodiplodia citricola	IRAN1521C	Citrus sp.	GU945339
Lasiodiplodia egyptiaca	BOT10	Mangifera indica	JN814424
Lasiodiplodia egyptiaca	BOT29	Mangifera indica	JN814428
Lasiodiplodia euphorbiicola	CMM3651	Jatropha curcas	KF226711
Lasiodiplodia euphorbiicola	CMM3609	Jatropha curcas	KF226689
Lasiodiplodia euphorbiicola	CMM3652	Jatropha curcas	KF226715
Lasiodiplodia subglobosa	CMM4046	Jatropha curcas	KF226723
Lasiodiplodia subglobosa	CMM3872	Jatropha curcas	KF226721
Lasiodiplodia margaritaceae	CBS122519	Adansonia gibbosa	EU144065
Lasiodiplodia venezuelensis	WAC12539	Acacia mangium	DQ103568
Lasiodiplodia venezuelensis	CMW13513	Acacia mangium	DQ103570
Lasiodiplodia crassispora	CBS110492	-	EF622066
Lasiodiplodia crassispora	CMW22653	Pterocarpus angolensis	FJ888452

Lasiodiplodia rubropurpurea	WAC12536	Eucalyptus grandis	DQ103572
Lasiodiplodia gonubiensis	CBS115812	Syzygium cordatum	DQ458877
Lasiodiplodia gonubiensis	CMW14078	Syzygium cordatum	DQ103567
Lasiodiplodia sp.	974	Psidium guajava	-
Lasiodiplodia sp.	975	Psidium guajava	-
Lasiodiplodia sp.	976*	Psidium guajava	-
Lasiodiplodia sp.	1013	Psidium guajava	-
Lasiodiplodia sp.	1007	Psidium guajava	-
Neoscytalidium hyalinum	CBS499.66	Mangifera indica	EU144063

*Isolado ex-tipo.

Tabela 2. Características morfológicas de *Lasiodiplodia* spp., *Neofusicoccum* spp. e *Phyllosticta* spp. examinadas no presente estudo e em estudos anteriores.

Espécies	Conídios (µm)	Paráfises (µm)	Células Conidiogênicas (µm)	Referência
<i>L. theobromae</i>	21–31 × 13–15.5	55 × 3–4	-	Alves et al. 2008
<i>L. theobromae</i>	21.5–27 × 10.5–14.5	21.5–64 × 2.5–7	11.5–19.5 × 5–9	Neste estudo
Espécies	Conídios (µm)		Células Conidiogênicas (µm)	Referência
<i>N. algeriense</i>	14.5–21 × 4.5–6.5		11.5–16.5 × 2.5–5	Berraf-Tebbal et al. 2014
<i>Neofusicoccum</i> sp.	16–24 × 4.5–6		9–13 × 1.5–2.5	Neste estudo
<i>Neofusicoccum</i> sp.	17.5–25 × 4.5–6.5		8–14 × 1.5–2.5	Neste estudo
<i>N. batangarum</i>	12–20 × 4–6.5		11–27 × 2–3.5	Phillips et al. 2013
<i>N. umdonicola</i>	15–23.5 × 4.5–6.5		-	Phillips et al. 2013
<i>N. kwambonambiense</i>	16–28 × 5–8		-	Phillips et al. 2013
<i>N. cordaticola</i>	18–28 × 4.5–7		-	Phillips et al. 2013
Espécies	Conídios (µm)		Células Conidiogênicas (µm)	Referência
<i>P. capitalensis</i>	9–11.5 × 5.5–6.5		-	Liu et al. 2012
<i>P. capitalensis</i>	7–12 × 5.5–8		5–12 × 2–4.5	Neste estudo

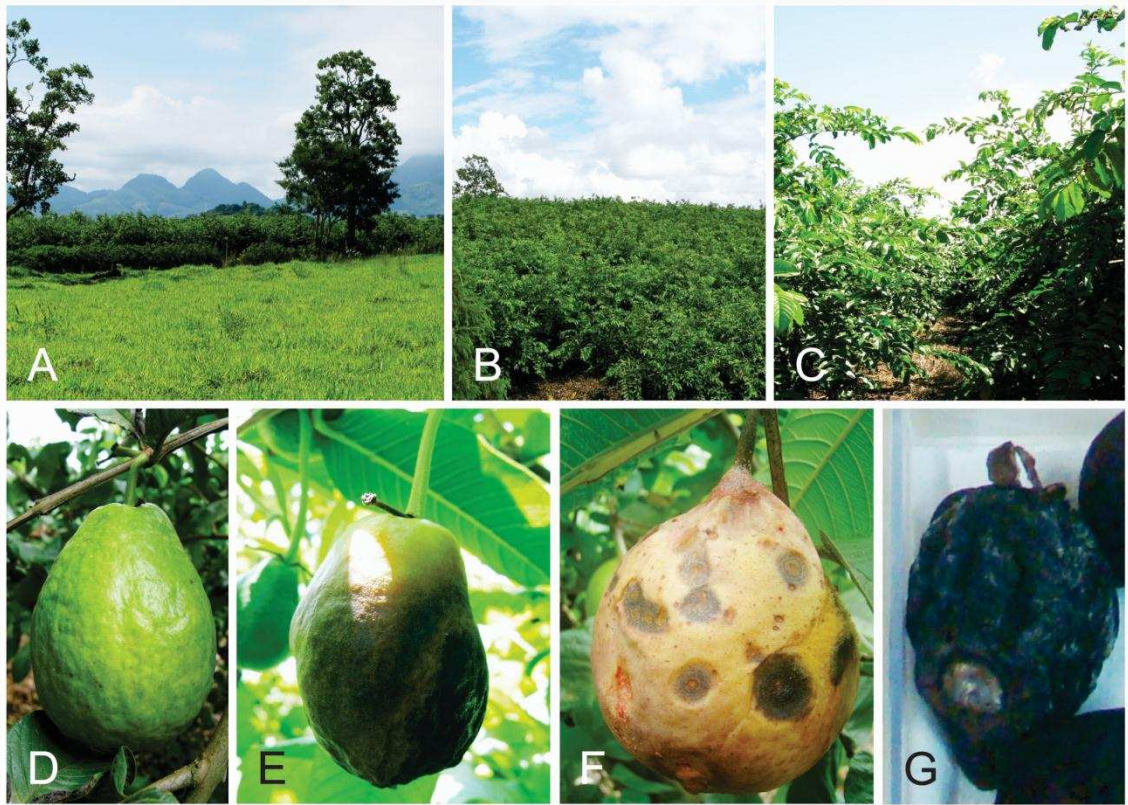


Figura 1. Local de coleta, hospedeiro e sintomatologia em campo de podridões causadas por Botryosphaeriales em goiaba. **A-C**, plantio comercial convencional no município de Piraúba – Minas Gerais. **D**, folhas, ramos e frutos saudáveis amostrados para isolamento de endofíticos. **E**, frutos com sintomas de podridão. **F**, frutos com sintomas de pinta-preta. **G**, frutos secos e mumificados.

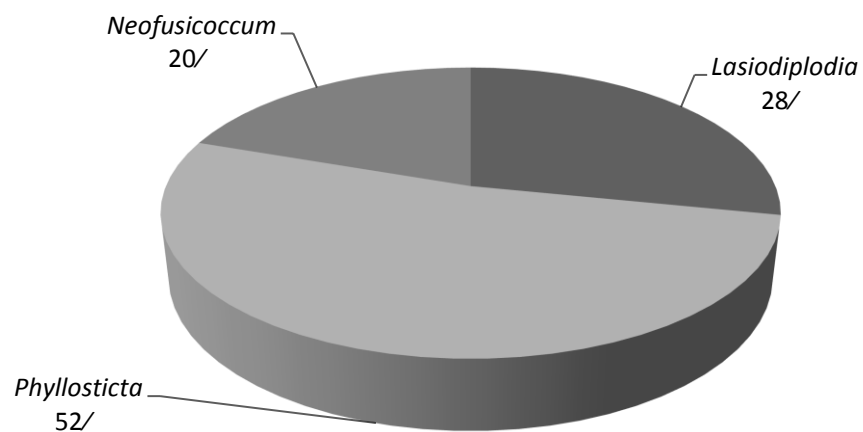


Figura 2. Frequência (%) de Botryosphaeriales associados às podridões pós-colheita em goiabas.

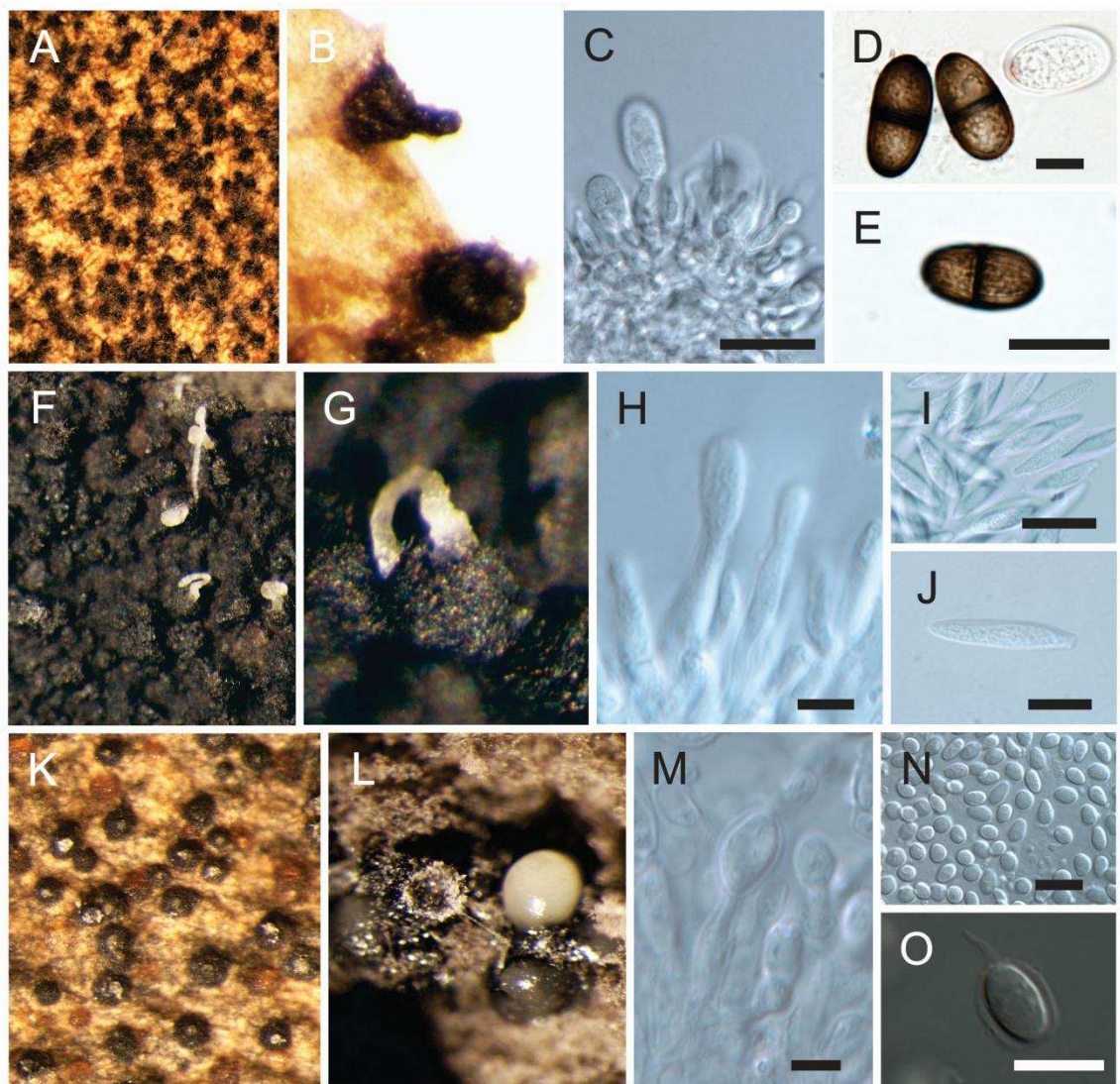


Figura 3. Características morfológicas dos gêneros de Botryosphaeriales associados às podridões de frutos de goiaba. *Lasiodiplodia* (A-E). A-B, picnídios formados sobre frutos de goiaba; C, paráfises e formação de conídios em células conidiogênicas; D, conídio imaturo (hialino) e desenvolvido (pigmentado); E, conídio com estrias longitudinais. *Neofusicoccum* (F-J). F-G, picnídios formados sobre frutos de goiaba e formação de longos cirros hialinos; H, formação de conídios em células conidiogênicas; I-J, conídios fusiformes hialinos e asseptados. *Phyllosticta* (K-O). K-L, picnídios formados sobre frutos de goiabas e formação de cirros hialinos na região do ostíolo; M, formação de conídios em células conidiogênicas; N, conídios hialinos, asseptados, elipsoides a obovoides; O, detalhe da mucilagem ao redor do conídio e do apêndice mucilaginoso na base do conídio. Barras: C, E, I, N = 20 µm; D, H, J, M, O = 10 µm.

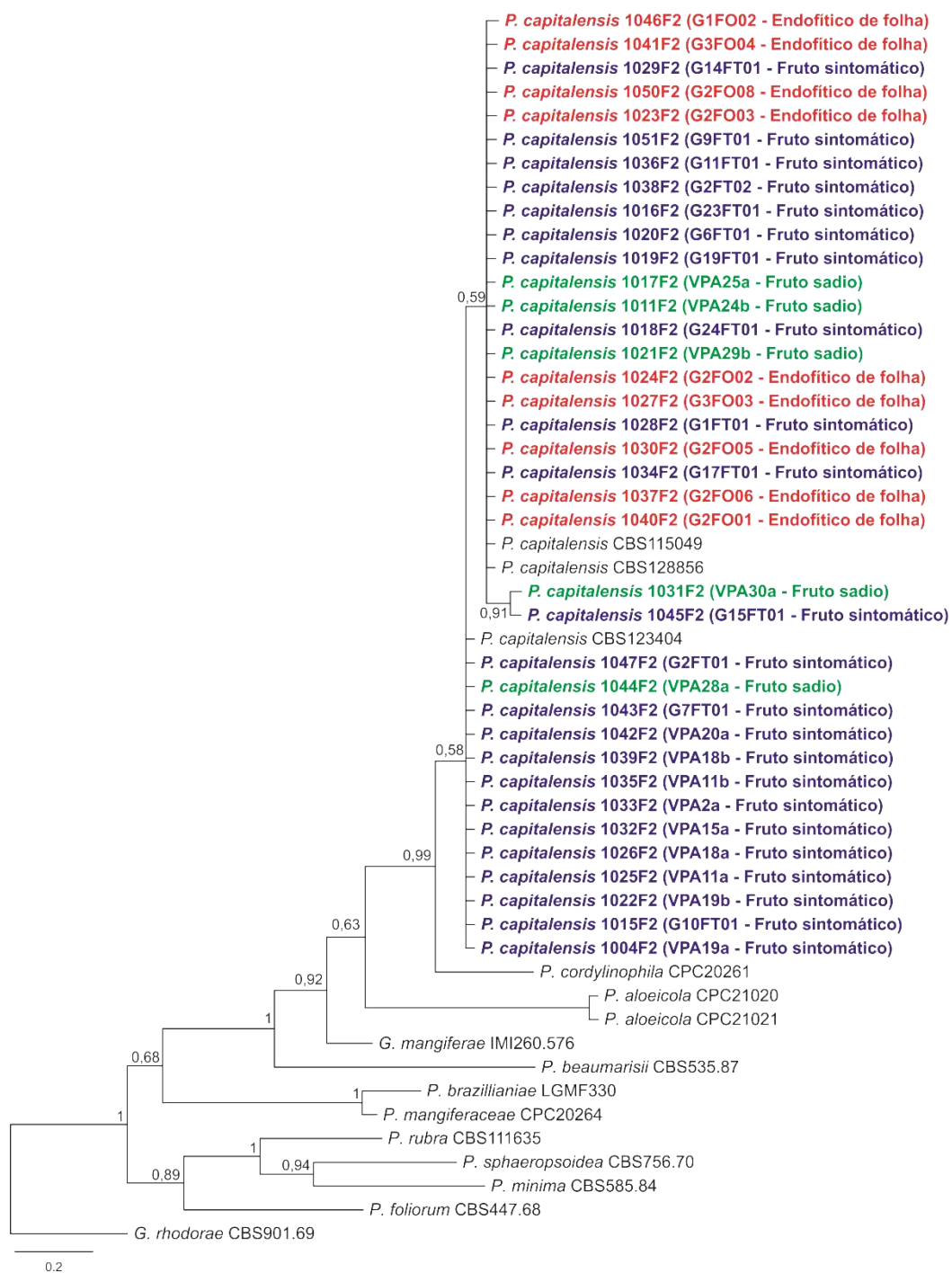


Figura 4. Árvore filogenética obtida a partir da Inferência Bayesiana usando sequências da região TEF. Valores de probabilidade posterior são indicados nos clados. A árvore foi enraizada com *Guignardia rhodoraе* CBS901.69. Os isolados obtidos nesse estudo estão destacados em negrito. Os nomes entre parênteses referem-se à sigla de identificação e o tecido de origem dos isolados.

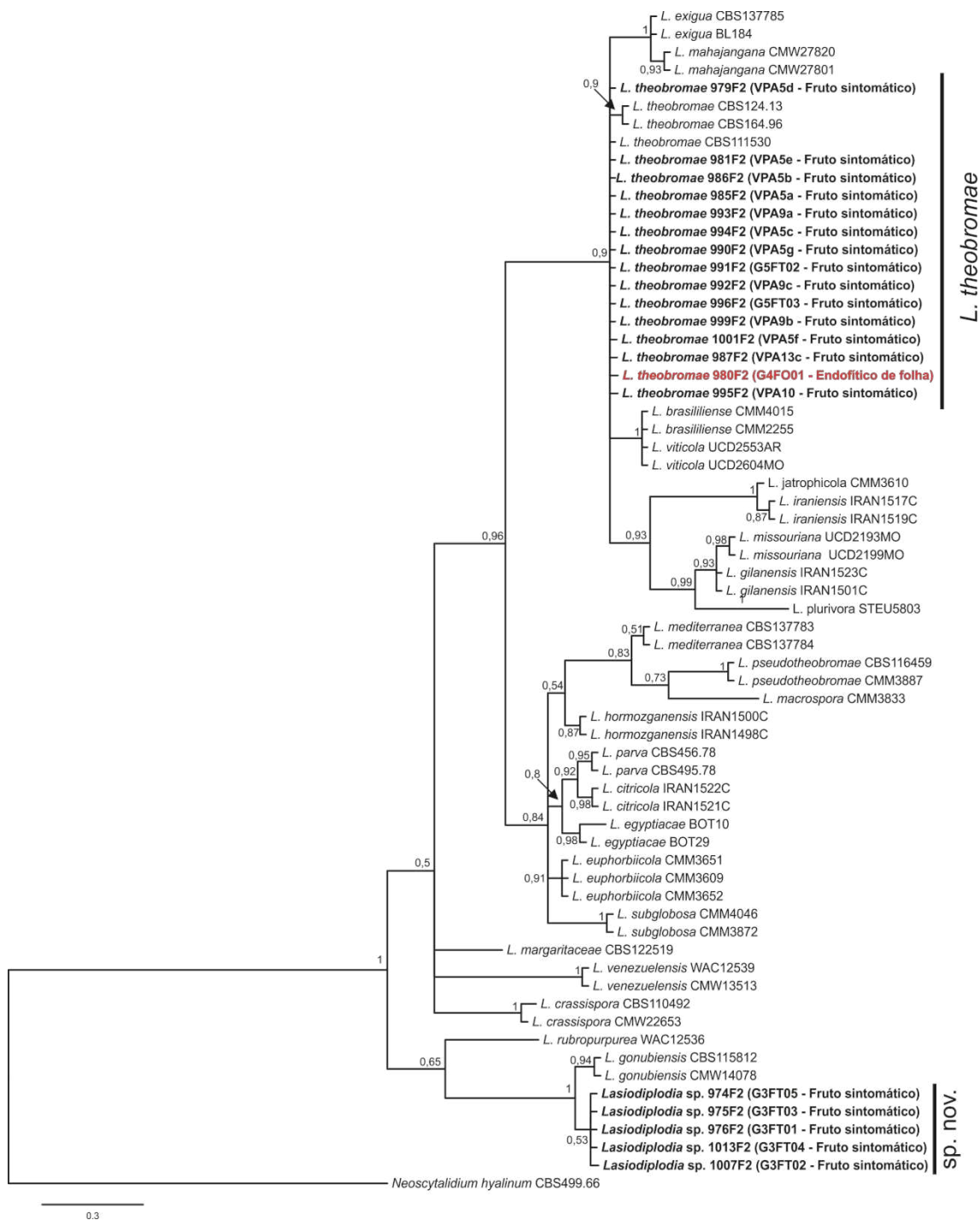


Figura 5. Árvore filogenética obtida a partir da Inferência Bayesiana usando sequencias da região TEF. Valores de probabilidade posterior são indicados nos clados. A árvore foi enraizada com *Neoscytalidium hyalinum* CBS499.66. Os isolados obtidos nesse estudo estão destacados em negrito. Os nomes entre parênteses referem-se à sigla de identificação e o tecido de origem dos isolados.

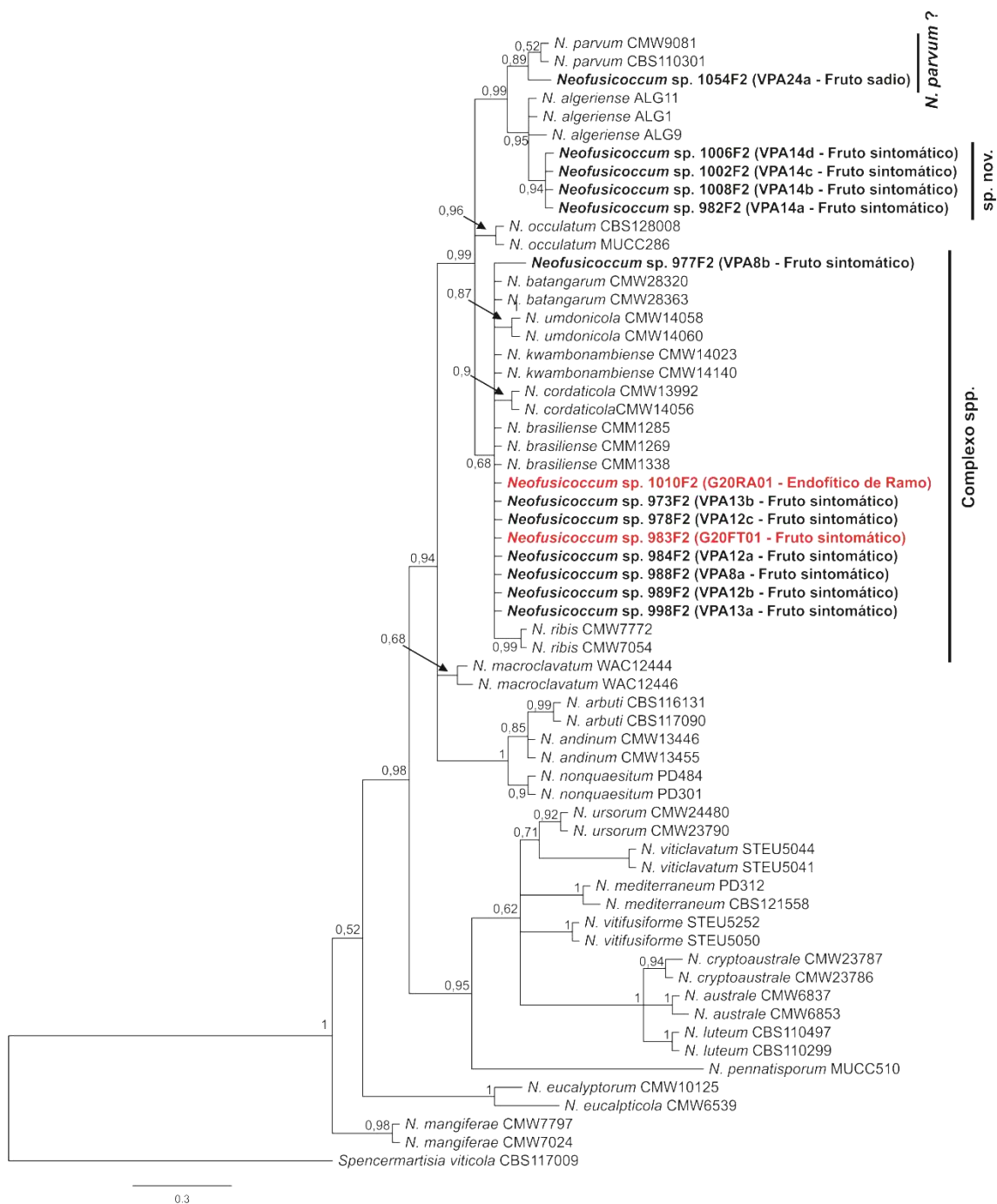


Figura 6. Árvore filogenética obtida a partir da Inferência Bayesiana usando sequencias da região TEF. Valores de probabilidade posterior são indicados nos clados. A árvore foi enraizada com *Spencermartisia viticola* CBS117009. Os isolados obtidos nesse estudo estão destacados em negrito. Os nomes entre parênteses referem-se à sigla de identificação e o tecido de origem dos isolados.

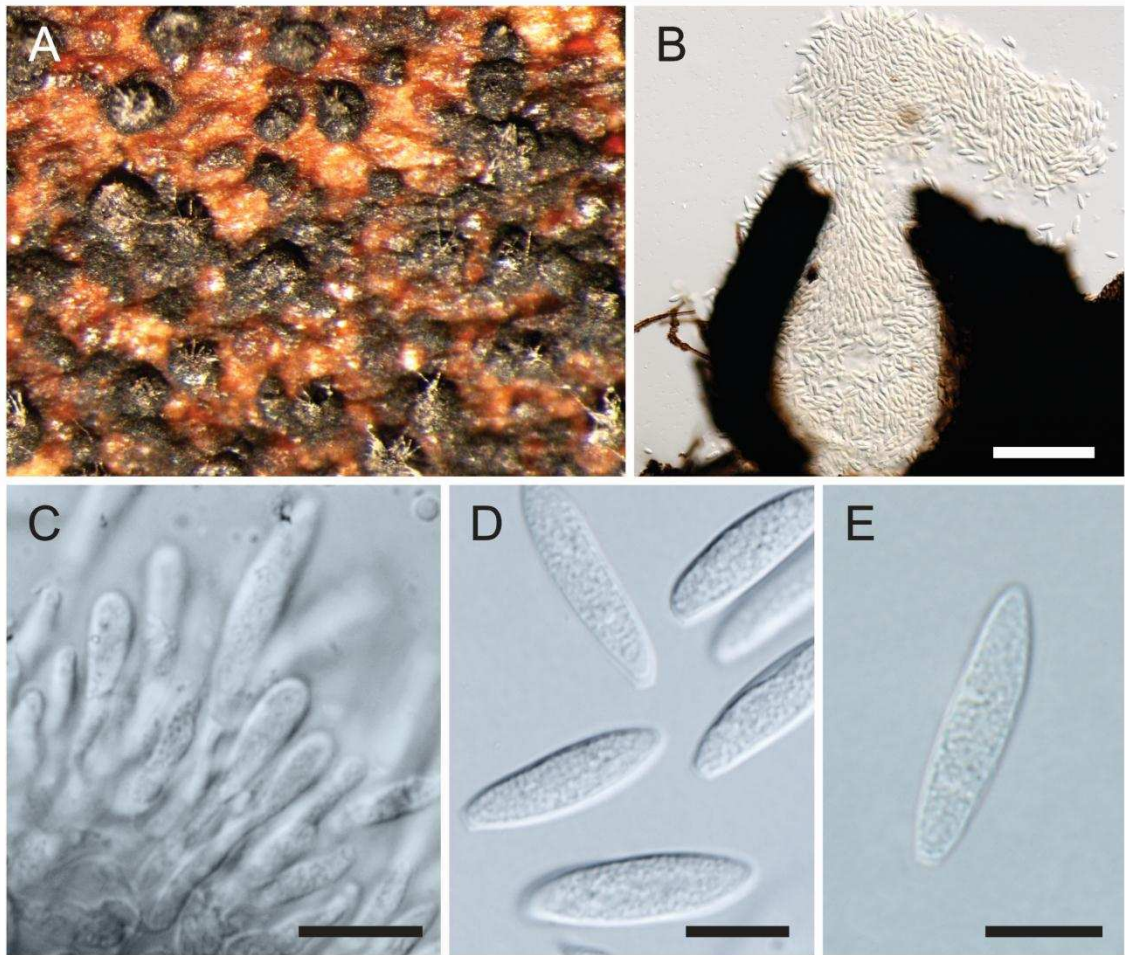


Figura 7. *Neofusicoccum* sp. Isolado 982. **A**, picnídios negros formados sobre frutos de goiabas. **B**, corte transversal de um picnídio com liberação de conídios. **C**, formação de conídios em células conidiogênicas. **D-E**, conídios fusiformes hialinos. Barras: **B** = 100 μ m; **C-E** = 10 μ m.

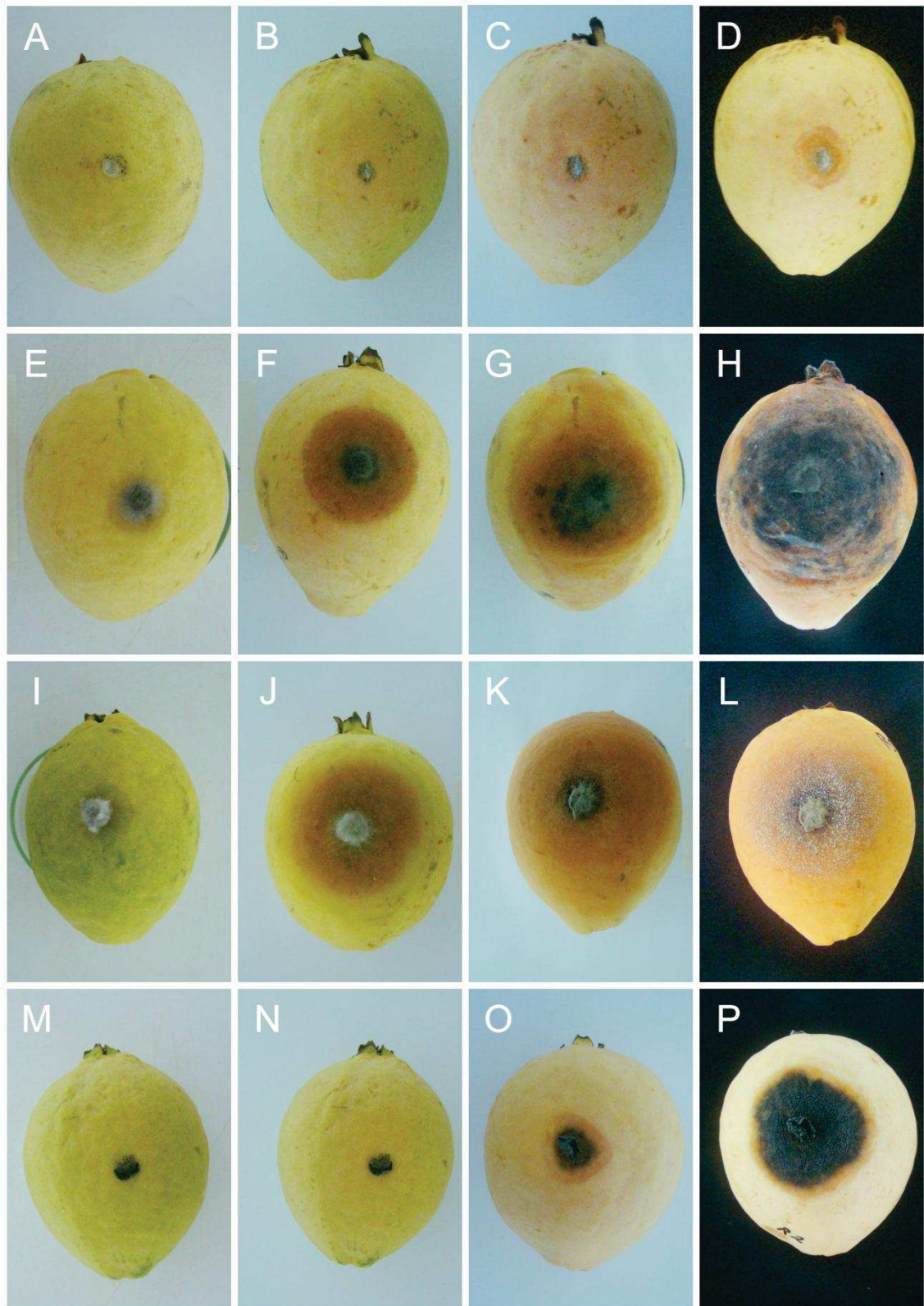


Figura 8. Teste de patogenicidade para um isolado representativo de cada gênero. **A-D**, frutos com discos de BDA dispostos no local da injúria, utilizados como controle. **E-H**, sintomas causados por *Lasiodiplodia* sp. ao longo do tempo. **I-L**, sintomas causados por *Neofusicoccum* sp. ao longo do tempo. **M-P**, sintomas causados por *Phyllosticta capitalensis* ao longo do tempo.