

MARIANA APARECIDA DA SILVA

**FILOGENIA, IDENTIFICAÇÃO E PATOGENICIDADE DE
PESTALOTIOPSIDACEAE ASSOCIADAS COM A MANCHA-DE-
PESTALOTIOPSIS EM PALMEIRAS ORNAMENTAIS**

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
2016

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

T

S586f
2016
Silva, Mariana Aparecida da, 1989-
Filogenia, identificação e patogenicidade de
Pestalotiopsidaceae associadas com a mancha-de-pestalotiopsis
em palmeiras ornamentais / Mariana Aparecida da Silva. –
Viçosa, MG, 2016.
vi, 43f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui apêndices.

Orientador: Gleiber Quintão Furtado.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f.21-28.

1. Fungos fitopatogênicos - Filogenia. 2. Fungos
fitopatogênicos - Identificação. 3. Plantas ornamentais -
Doenças e pragas. 4. Palmeiras. 5. *Neopestalotiopsis*. 6.
Pestalotiopsis. 7. Arecaceae. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Fitopatologia. Programa de Pós-graduação em
Fitopatologia. II. Título.

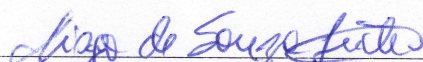
CDD 22. ed. 632.4

MARIANA APARECIDA DA SILVA

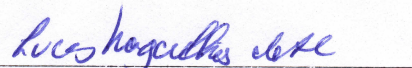
**FILOGENIA, IDENTIFICAÇÃO E PATOGENICIDADE DE
PESTALOTIOPSIDACEAE ASSOCIADAS COM A MANCHA-DE-
PESTALOTIOPSIS EM PALMEIRAS ORNAMENTAIS**

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*.

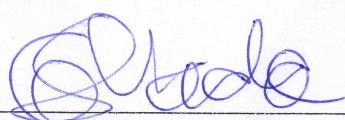
APROVADA: 23 de fevereiro de 2016.



Tiago de Souza Leite



Lucas Magalhães de Abreu



Gleiber Quintão Furtado
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pelo respaldo e pela oportunidade.

Aos meus pais e às minhas irmãs por todo amor, incentivo e orações.

Ao professor Doutor Gleiber Quintão Furtado pela orientação e pela oportunidade desde a graduação.

Ao professor Doutor Danilo Batista Pinho pelos ensinamentos.

Ao Professor Doutor Olinto Liparini Pereira e a toda equipe do Laboratório de Micologia e Etiologia de Doenças Fúngicas de Plantas pelo auxílio.

Aos membros da banca avaliadora, Tiago de Souza Leite e Lucas Magalhães Abreu, pela disponibilidade e valiosos conselhos.

Aos membros do Laboratório de Patologia Florestal, especialmente Daniela e Priscila, pelas contribuições na execução deste trabalho.

À Universidade Federal de Viçosa, ao Departamento de Fitopatologia e ao Programa de Pós-graduação em Fitopatologia por proporcionarem condições para realização deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro.

Ao proprietário Daniel e a todos os funcionários do viveiro Antuérpia Mineira (Paraíso, Viçosa – MG) pela ajuda e concessão das plantas.

Aos professores do Departamento de Fitopatologia, pelos ensinamentos e pela contribuição à minha formação profissional.

Aos colegas da Pós-graduação em Fitopatologia pelos momentos de estudo e descontração compartilhados.

Aos familiares e amigos que acompanharam esta trajetória.

E a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

Mariana Aparecida da Silva, filha de João Bosco da Silva e Conceição Aparecida dos Santos Silva, nasceu em 26 de janeiro de 1989, em Viçosa, Minas Gerais.

No decorrer do Ensino Médio (2004-2006), cursado na Escola Estadual Doutor Raimundo Alves Torres, em Viçosa-MG, foi bolsista do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica Júnior (UFV/CNPq/FAPEMIG) sob a orientação dos professores Efraim Lázaro Reis (Departamento de Química) e Maria do Carmo Fontes de Oliveira (Departamento de Nutrição).

Em 2008, ingressou no curso de Agronomia da Universidade Federal de Viçosa (UFV) onde lhe foi conferido o título de Engenheira Agrônoma. No decorrer da graduação foi monitora das disciplinas Extensão Rural e Construções Rurais e bolsista de Iniciação Científica no Departamento de Estatística sob orientação do professor Sebastião Martins Filho e no Departamento de Fitopatologia sob orientação do professor Gleiber Quintão Furtado.

Em março de 2014, iniciou o curso de Mestrado em Fitopatologia na mesma instituição.

SUMÁRIO

RESUMO	v
ABSTRACT	vi
1. INTRODUÇÃO	1
2. MATERIAL E MÉTODOS	3
2.1 Coleta, isolamento e preservação dos isolado	3
2.2 Extração, amplificação e sequenciamento de DNA	4
2.3 Análises filogenéticas	5
2.4 Caracterização morfológica	6
2.5 Testes de patogenicidade	7
2.6 Taxa de crescimento micelial	8
3. RESULTADOS	8
3.1 Isolamento de espécies de Pestalotiopsidaceae	8
3.2 Análises filogenéticas	8
3.3 Caracterização morfológica	9
3.4 Taxonomia	9
3.5 Testes de patogenicidade	15
3.6 Taxa de crescimento micelial	15
4. DISCUSSÃO	16
5. CONCLUSÕES	20
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	21
7. TABELAS E FIGURAS	28

RESUMO

SILVA, Mariana Aparecida, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2016. **Filogenia, identificação e patogenicidade de Pestalotiopsdaceae associadas a mancha-de-pestalotiopsis em palmeiras ornamentais.** Orientador: Gleiber Quintão Furtado.

Diversas espécies de palmeiras (Arecaceae) apresentam elevado valor ornamental na composição paisagística de parques e jardins. A mancha-de-pestalotiopsis é considerada um dos principais problemas fitossanitários em palmeiras, afetando principalmente sua comercialização. Amostras de folhas sintomáticas de mudas de *Cocos nucifera*, *Dypsis madagascariensis*, *Euterpe edulis*, *Licuala grandis*, *Phoenix roebelenii*, *Ptychosperma elegans*, *Trachycarpus fortunei* e *Wodyetia bifurcata* foram coletadas em viveiros de Minas Gerais, Brasil. A partir dos tecidos foliares com sintomas da mancha-de-pestalotiopsis, foram obtidos nove isolados monospóricos, dos quais o DNA total foi extraído. Os fragmentos da região ITS rDNA e dos genes beta tubulina (βt) e fator de alongação 1-alfa (TEF1- α) foram amplificados e sequenciados. As árvores filogenéticas multilocus (ITS+ βt +TEF1- α) foram construídas utilizando sequências adicionais do Genbank de *Neopestalotiopsis*, *Pestalotiopsis* e *Pseudopestalotiopsis*. Para as análises morfológicas um total de 30 conídios/isolado foram avaliados em relação a dimensão das células, o comprimento e o número dos apêndices basais e apicais e a pigmentação das células medianas (concolor ou versicolor). A taxa de crescimento micelial foi avaliada em seis meios de cultura (AA, AV, BCA, BDA, MA e V8). Para avaliar a patogenicidade, folhas destacadas das diferentes espécies de palmeiras foram inoculadas com discos de micélio sobre áreas intactas e com ferimento nas faces adaxial e abaxial das folhas. Foram identificadas quatro possíveis novas espécies pertencentes ao gênero *Neopestalotiopsis*. Um isolado foi identificado como *Pestalotiopsis* sp. Este estudo relata novos hospedeiros para *N. foedans* e *N. surinamensis*. Todas as espécies foram fitopatogênicas, exceto *Neopestalotiopsis* sp. COAD2020. *Neopestalotiopsis* spp. apresentaram taxas de crescimento micelial significativamente maior que *Pestalotiopsis* sp. nos meios BCA, BDA e V8. Este estudo proporcionou informações inéditas sobre a etiologia da mancha-de-pestalotiopsis em palmeiras ornamentais.

ABSTRACT

SILVA, Mariana Aparecida, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2016. **Phylogeny, identification and pathogenicity of Pestalotiopsidaceae associated with leaf spot in ornamental palm.** Adviser: Gleiber Quintão Furtado.

Several species of palms (Arecaceae) have high ornamental value in arborization of parks and gardens. Currently, the leaf spot is considered major pest problems in palm trees, mainly affecting their marketing. Samples symptomatic leaves of seedlings of *Cocos nucifera*, *Dypsis madagascariensis*, *Euterpe edulis*, *Licuala grandis*, *Phoenix roebelenii*, *Ptychosperma elegans*, *Trachycarpus fortunei* and *Wodyetia bifurcata* were collected in nurseries in the state of Minas Gerais, Brazil. From tissue showing symptoms of leaf spot were obtained nine single spore isolates of which the total DNA was extracted. The fragments of ITS (rDNA) and the genes beta-tubulin (β t) and elongation factor 1-alpha (α -TEF1) were amplified and sequenced. The multilocus phylogenetic trees (ITS+ β t+TEF1- α) were built using additional sequences of Genbank *Neopestalotiopsis*, *Pestalotiopsis* and *Pseudopestalotiopsis*. For morphological analysis a total of 30 conidia/species were evaluated for the size of the cells, the length and the number of basal and apical appendages and the pigmentation of median cell (versicolor or concolor). The mycelial growth rate (mm day^{-1}) was evaluated in six culture media (AA, AV, BCA, BDA, MA and V8). To evaluate the pathogenicity, detached leaves of different species of palm trees were inoculated with mycelial disks on intact areas and wound in adaxial and underside faces. Four possible new species belonging to the genus *Neopestalotiopsis*. One isolate was identified as *Pestalotiopsis* sp. This study reports new hosts for *N. foedans* and *N. surinamensis*. All species were phytopathogenic, except *Neopestalotiopsis* sp. COAD2020. *Neopestalotiopsis* spp. showed significantly higher mycelial growth rates than *Pestalotiopsis* sp. in BCA, BDA and V8 media. This study provided unpublished information on the etiology of *Pestalotiopsidaceae* leaf spot on ornamental palms.

1. INTRODUÇÃO

As palmeiras são um grupo de plantas monocotiledôneas, perenes e lenhosas, incluídas na Divisão das Angiospermas. Estas plantas pertencem à família *Arecaceae* e possui cerca de 2.500 espécies descritas e distribuídas, principalmente, nas regiões tropical e subtropical (Dransfield et al. 2008; Johnson 2010). As palmeiras fornecem inúmeros produtos de grande importância econômica no mercado mundial, os quais são empregados na alimentação, habitação, movelaria, indústria de cosméticos, produção de ceras, artesanato e ornamentação de ambientes (Clement et al. 2005; Kimati et al. 2005; Monteiro et al. 2010).

As diferentes espécies de palmeiras apresentam elevado valor ornamental com presença constante na composição paisagística de parques e jardins (Lorenzi 2004). O movimento ascendente de valorização do paisagismo contribui para o crescimento do segmento de flores e plantas ornamentais. No Brasil, este segmento comercial tem registrado altas de 8 a 15% em volume e de 15 a 17% em valor (IBRAFLOR 2014). O mercado de palmeiras ornamentais também cresceu consideravelmente nos últimos anos, incrementando a diversidade de plantas cultivadas pelos viveiristas, com algumas dessas espécies alcançando elevados preços no mercado (Silva et al. 2005; Russomanno et al. 2007).

O êxito na produção de mudas de espécies ornamentais e na elaboração de projetos paisagísticos depende, em grande parte, do padrão de qualidade das mudas, que inclui a condição fitossanitária (Gomes e Paiva 2006; Wendling et al. 2001). Diversas doenças comprometem a sanidade, o desenvolvimento e a longevidade de espécimes de palmeiras, desde plântulas até a fase adulta (Araújo e Silva 2010).

Entre as principais doenças que afetam o cultivo e a comercialização das palmeiras, destacam-se as manchas foliares causadas por fungos do gênero *Pestalotiopsis* (*Pestalotiopsidaceae*). Inicialmente os sintomas são lesões imperceptíveis ($\varnothing=2$ mm) que coalescem e formam manchas maiores esbranquiçadas com borda irregular preta e pontuações escuras no centro referentes aos acérvulos do patógeno (Russomanno et al. 2007). O progresso da doença pode provocar a seca das folhas e comprometer toda a planta. A mancha-de-*pestalotiopsis* já foi relatada em espécies de palmeiras dos gêneros *Arenga*, *Bismarckia*, *Bactris*, *Butia*, *Caryota*, *Chamaedorea*, *Chrysalidocarpus*, *Cocos*, *Elaeis*, *Licuala*, *Phoenix*, *Ptychosperma*,

Rhapis, Roystonea, Sabal, Trachycarpus, Veitchia e Washingtonia (Zhang et al. 2003; Elliott et al. 2004; Russomano et al. 2007; Pessoa et al. 2008; Geng et al. 2013; Jayawardena et al. 2015).

Espécies de *Pestalotiopsis* foram relatadas em regiões tropical e temperada afetando diversas culturas, tais como arroz (*Pestalotiopsis oryzae*), café (*P. kenyana*, *P. coffeae-arabicae*), tomate (*P. longisetula*), chá-da-Índia (*P. theae*), uva (*P. menezesiana*, *P. uvicola*), manga (*P. mangiferae*), goiaba (*P. psidii*, *P. clavispora*, *P. microspora*, *P. disseminata*), morango (*P. longisetula*), pêssego (*P. disseminata*, *P. longisetula*), coco (*P. papuana*), nozes (*P. clavispora*, *P. cocculi*), mirtilo (*P. clavispora*, *P. neglecta*), caqui (*P. diospyri*) e também plantas ornamentais (*P. ericacearum*, *P. gaultheriae*, *P. rhododendri*, *P. pauciseta*) (Xu et al 1999; Singh et al. 2000; Embaby 2007; Ko et al. 2007; Serra et al. 2007; Espinoza et al. 2008; Alves et al. 2011; Song et al. 2013; Zhang et al. 2012, 2013; Lazarotto et al. 2014; Rodrigues et al. 2014). Historicamente, a nomenclatura dessas espécies foi baseada em sua associação com os hospedeiros. Entretanto, estudos moleculares mostraram que o gênero *Pestalotiopsis* é monofilético e as espécies não são específicas, ou seja, uma mesma espécie ocorre em vários hospedeiros (Jeewon, 2002).

Pestalotiopsis spp. ocorrem como saprófitas na natureza e desempenham um importante papel nos ecossistemas florestais (Tejesv et al. 2005; Maharachchikumbura et al. 2013). Esses microrganismos também são encontrados como endofíticos e vem sendo amplamente estudado devido à produção de diversos metabólitos secundários com atividade antineoplástica, fitotóxica, antimicrobiana e antioxidante com potencial aplicação na agricultura, indústria e como agentes farmacológicos (Nagata et al. 1992; Strobel 2000, Strobel et al. 2002; Yuan et al. 2006; Xu et al. 2010; Ortega et al. 2014).

Em relação à taxonomia, as características morfológicas dos conídios (dimensão, número de septos, pigmentação das células e presença ou ausência de apêndices) e a conidiogênese foram inicialmente utilizadas no processo de diferenciação de espécies de *Pestalotiopsis* (Sutton 1980, Nag Raj 1993). Entretanto, o gênero é complexo e dispõe de uma considerável diversidade fenotípica. Assim, a identificação é complementada com dados de sequência de DNA e análise filogenética baseada em, pelo menos, duas regiões gênicas (Jeewon et al. 2003; Hu et al. 2007).

Desde que o gênero foi primeiramente descrito por Steyaert (1949), diversos estudos taxonômicos foram realizados em busca de uma classificação mais adequada (Serra et al. 2007). Análises filogenéticas têm demonstrado que as espécies de *Pestalotiopsis* agrupam-se em três clados bem suportados. A combinação entre as três regiões gênicas β -tubulina (β t), Espaçador Interno Transcrito (ITS) do rDNA e Fator de alongação 1- α (TEF1- α) proporciona a melhor delimitação entre essas espécies (Jeewon et al. 2003; Liu et al. 2010; Maharachchikumbura et al. 2011, 2012, 2013; Geng et al. 2013).

Recentemente, isolados de *Pestalotiopsis* spp. oriundos de diferentes regiões geográficas e hospedeiros foram caracterizados por meio de análise filogenética multilocus (ITS+ β t+TEF1- α) e pela morfologia. Com base neste estudo, os autores propuseram a segregação do gênero *Pestalotiopsis* em *Pestalotiopsis*, *Neopestalotiopsis* e *Pseudopestalotiopsis*, introduzindo 37 espécies e várias novas combinações em *Pestalotiopsidaceae* (Maharachchikumbura et al. 2014).

Levando em consideração os danos causados pela mancha-de-*pestalotiopsis* em palmeiras ornamentais e a nova classificação das espécies de *Pestalotiopsis*, tornam-se necessários estudos que buscam elucidar a etiologia da doença visando contribuir para o estabelecimento de estratégias de controle e a ampliação do conhecimento sobre a taxonomia e sistemática deste grupo de fungo (Júnior et al. 2001; Elliott et al. 2004).

Diante do supracitado, o objetivo deste trabalho foi identificar e caracterizar, baseado em dados morfológicos e moleculares, espécies de fungos da família *Pestalotiopsidaceae* isoladas de diferentes espécies de palmeiras ornamentais em viveiros.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Coleta, isolamento e preservação dos isolados

As coletas foram realizadas no mês de julho e outubro de 2014, em viveiros no município de Dona Euzébia e Viçosa, no estado de Minas Gerais. Amostras de folhas com sintomas típicos de mancha-de-*pestalotiopsis* foram coletadas em mudas de *Cocos nucifera*, *Dypsis madagascariensis*, *Euterpe edulis*, *Licuala grandis*,

Phoenix roebelenii, *Ptychosperma elegans*, *Trachycarpus fortunei* e *Wodyetia bifurcata* e examinadas no Laboratório de Patologia Florestal da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

Os fungos foram obtidos por meio do isolamento direto de estruturas do patógeno em manchas foliares. Estas foram removidas com o auxílio de uma agulha esterilizada, sob microscópio estereoscópico (40×), e depositadas em placas de Petri contendo meio de cultura batata-dextrose-ágar industrializado (BDA, Sigma-Aldrich®).

Após o crescimento dos fungos, discos de micélio foram repicados para placas de Petri contendo BDA e mantidas a 22 °C, sob escuro contínuo, em câmara de crescimento. Para obtenção de culturas monospóricas dos isolados, foi preparada uma suspensão de conídios em água destilada esterilizada para cada isolado e transferida uma alíquota de 5 µL da suspensão 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 BDA.

As culturas monospóricas foram preservadas em água destilada esterilizada, como descrito por Castellani (1967), em sílica-gel e em glicerol 15% (Alfenas e Mafia 2008). As culturas preservadas foram depositadas na Coleção Octávio de Almeida Drumond (COAD) da UFV. As folhas sintomáticas foram herborizadas em prensa botânica e depositadas no Herbário VIC/UFV/DBV.

2.2 Extração, amplificação e sequenciamento de DNA

Isolados monospóricos foram cultivados a 22 °C por 8 dias, em meio BDA coberto com papel celofane esterilizado e umedecido. O micélio dos isolados foi removido, com auxílio de palito de madeira esterilizado, e transferidos para tubo de microcentrífuga de 1,5 mL. O extravasamento do DNA das células foi realizado através do congelamento do micélio com nitrogênio líquido e trituração utilizando um pistilo esterilizado. Para a extração do DNA total foi utilizado o Kit Wizard® Genomic DNA Purification (Promega Corporation, WI, EUA), de acordo com Pinho et al. (2012).

Para a amplificação do DNA, os seguintes reagentes foram utilizados nas reações de PCR: 12,5 µL de Dream Taq™ PCR Master Mix 2X (MBI Fermentas, Vilnius, Lithuania), 1 µL de cada primer a 10 µM (senso e antisenso) sintetizados pela Invitrogen (Carlsbad, U.S.A), 1 µL de dimetil sulfóxido (DMSO, Sigma - Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A.), 5 µL de albumina de soro bovino (BSA, Sigma - Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A.) 100 × (10 mg/mL), 2 µL do DNA genômico do isolado (25 ng/µl) e 2,5 µL de água livre de nuclease para completar o volume total para 25 µL.

Os fragmentos da região ITS e dos genes βt e TEF1- α de todos os isolados obtidos foram amplificados e sequenciados, utilizando os pares de oligonucleotídeos iniciadores **T1/Bt-2b** (O'Donnell & Cigelnik 1997/ Glass & Donaldson 1995), **ITS1/ITS4** (White et al. 1990) e **983F/2218R** (Rehner 2001), respectivamente. As etapas da PCR, realizadas no termociclador C1000™ Thermal Cycler (BIO-RAD), consistiram de um ciclo de desnaturação inicial a 95 °C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos compostos cada um por: i) uma desnaturação a 94 °C por 1 minuto; ii) um anelamento a 55 °C por 1 minuto (βt e TEF1- α) ou a 52 °C por 1 minuto (ITS) e; iii) uma extensão a 72 °C por 2 minutos. A última etapa, a extensão final, consistiu de um ciclo a 72 ° por 10 minutos. Os produtos da PCR foram corados com GelRed™ (Biotium Inc., Hayward, CA, EUA), submetidos a uma eletroforese em gel de agarose (2%) em tampão TAE 1 × e as bandas resultantes visualizadas sob luz UV em um fotodocumentador (L-Pix Touch, Loccus Biotecnologia) para verificar o tamanho e qualidade das amplificações. Os amplicons foram purificados e sequenciados pela Macrogen Inc., Coréia do Sul (<http://www.Macrogen.com>).

2.3 Análises filogenéticas

As sequências de nucleotídeos obtidas foram manualmente editadas utilizando o software de bioinformática DNA Baser v4.20.0 e o arranjo dos nucleotídeos em posições ambíguas corrigidos por comparação das sequências senso e anti-senso para a montagem dos contigs. Os isolados foram inicialmente identificados pela verificação da região parcial do gene βt no banco de dados público GenBank, utilizando a ferramenta BLAST nucleotide (Basic Local Alignment Search Tool).

As análises filogenéticas multilocus, envolvendo os genes ITS, βt e TEF1- α , foram realizadas com base na identificação inicial do GenBank. Assim, sequências adicionais de espécies de *Pestalotiopsis*, *Neopestalotiopsis* e *Pseudopestalotiopsis* foram selecionadas a partir dos estudos de Maharachchikumbura et al. (2014), Liu et al. (2015), Crous et al. (2015) e Jayawardena et al. (2015, 2016) e recuperadas do GenBank (**Tabela 1**). As sequências dos isolados deste estudo foram alinhadas com as sequências adicionais utilizando o software Muscle® (Edgar, 2004), implementado no programa MEGA 6.06 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) (Tamura et al. 2011).

Para as análises de Inferência Bayesiana, primeiramente, foram escolhidos os melhores modelos de substituição de nucleotídeos para cada gene utilizando o MrMODELTEST v2 (Nylander 2004). Os valores de verossimilhança foram calculados e os modelos selecionados de acordo com o Critério de Informação Akaike.

As análises filogenéticas foram realizadas através da interface online do CIPRES Science Gateway (<https://www.phylo.org/portal2/>) (Miller et al. 2010) utilizando MrBayes on XSEDE v3.2.6 (Ronquist e Huelsenbeck 2003). As quatro cadeias MCMC foram conduzidas simultaneamente, iniciando as árvores aleatoriamente até 50.000.000 de gerações. As árvores foram amostradas a cada 5.000 gerações, resultando em 50.000 árvores. As primeiras 12.500 árvores, isto é 25%, foram descartadas da análise na fase de “burn *-in*”. Os valores de probabilidade posterior (Rannala e Yang 1996) foram determinados na árvore consenso através das 37.500 árvores remanescentes. As árvores foram visualizadas no software FigTree (Rambaut 2009) e editadas no programa gráfico CoreIDRAW X7 (64-Bit).

2.4 Caracterização morfológica

Para a análise da morfologia, os isolados foram cultivados por meio da técnica da microcultura (Kern e Blevins 1999). Para a realização desse procedimento, uma pequena porção de meio de cultura BDA foi transferido para uma lâmina de vidro depositada em uma placa de Petri contendo papel filtro umedecido. Em seguida, fragmentos do micélio dos isolados foram depositados na borda do meio de cultura e, cobertos com uma lamínula. Todos os componentes utilizados foram

previamente esterilizados. As microculturas foram incubadas a 22 °C em fotoperíodo de 12 horas sob luz branca e 12 horas no escuro.

Após o início da esporulação dos fungos, a lamínula foi retirada e colocada sobre uma lâmina limpa com uma gota de ácido láctico, selada e observada ao microscópio de luz (Olympus BX 53). Para as análises morfológicas um total de 30 conídios/espécie foram avaliados em relação a dimensão das células, o comprimento e o número dos apêndices basais e apicais e a pigmentação das células medianas (concolor ou versicolor). As imagens foram obtidas com uma câmera digital (Olympus Q-COLOR5) acoplada ao microscópio de luz e editadas utilizando o software Adobe Photoshop CS6 v13.0.

2.5 Teste de patogenicidade

O teste de patogenicidade consistiu na inoculação de folhas saudáveis destacadas de cada espécie de palmeira hospedeira com os seus respectivos isolados obtidos anteriormente, adaptado de Keith et al. (2006).

As folhas das mudas de *C. nucifera*, *D. madagascariensis*, *E. edulis*, *L. grandis*, *P. roebelenii*, *P. elegans*, *T. fortunei* e *W. bifurcata* foram superficialmente desinfestadas por imersão em solução de hipoclorito de sódio (NaClO 1%) por 2 minutos, enxaguadas em água destilada autoclavada e colocadas para secar em câmara de fluxo laminar vertical. Posteriormente, estas folhas foram acondicionadas em câmara úmida, sob 25°C, e a inoculação realizada através do depósito de discos de BDA ($\varnothing = 5$ mm) contendo micélio de culturas monospóricas dos isolados sobre as faces adaxial e abaxial das folhas. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente ao acaso, com 3 repetições. Cada repetição consistiu em uma folha inoculada com quatro discos de BDA com micélio, sendo dois sobre áreas com ferimentos e dois sobre a superfície intacta da folha. Os ferimentos foram obtidos com auxílio de um conjunto de agulhas esterilizadas. As folhas do tratamento controle receberam discos de BDA sem o patógeno, também sobre a superfície do tecido foliar com e sem ferimento.

As avaliações, considerando a presença ou ausência de sintomas, foram feitas diariamente até o vigésimo dia após a inoculação. Posteriormente, a partir das lesões esporulantes, foi realizado o reisolamento direto dos fungos em cultura pura, comparando-as com as culturas originais. O experimento foi repetido uma vez.

2.6 Taxa de crescimento micelial

Para a avaliação do crescimento micelial, discos ($\varnothing=5$ mm) da cultura monospórica de cada isolado foram repicados para o centro de placas de Petri ($\varnothing=90$ mm) contendo 20 mL dos diferentes meios de cultura: Aveia (AV, 30g de aveia, 16g de ágar e 1000 mL de água destilada), Ágar-Água 2% (AA, Himedia[®]), Batata-Cenoura-Ágar (BCA, Himedia[®]), Batata-Dextrose-Ágar (BDA, Sigma-Aldrich[®]), Milho-Ágar (MA, Acumedia[®]) e V8 (200 mL de suco V8, 3g de CaCO₃, 20g de ágar e 1000 mL de água destilada). As placas foram mantidas em câmara de crescimento a 22° C, sob escuro contínuo. As avaliações constaram da mensuração do diâmetro das colônias com régua milimetrada, nos dois sentidos perpendiculares da placa. As medições foram realizadas diariamente até quando o micélio de pelo menos um dos isolados atingiu a borda da placa. Posteriormente, foi calculada a taxa de crescimento micelial diário.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente ao acaso, com 3 repetições, sendo cada repetição representada por uma placa de Petri. O teste de Tukey ao nível de 5 % foi utilizado para a comparação das médias. As Análises estatísticas foram realizadas utilizando o software R Studio[®] v3.1.1.

3. RESULTADOS

3.1 Isolamento de espécies de Pestalotiopsis

Fungos com características morfológicas similares a *Pestalotiopsis* spp. foram isolados a partir de lesões esbranquiçadas com bordas negras e pontuações escuras no centro, apresentando colônias de crescimento micelial cotonoso, coloração esbranquiçada e produção de massas negras de conídios em meio BDA. Um total de nove isolados foram obtidos a partir de oito diferentes espécies de palmeiras ornamentais com sintomas de mancha-de-pestalotiopsis (**Tabela 2**).

3.2 Análises filogenéticas

A identificação inicial da sequência parcial do gene β t dos nove isolados mostrou que todos pertencem ao gênero *Neopestalotiopsis*, exceto o isolado COAD2019, identificado como *Pestalotiopsis*. Esses resultados corroboraram com as

características morfológicas encontradas que também evidenciaram que os isolados pertenciam a família Pestalotiopsidaceae.

A análise filogenética multilocus com os isolados identificados dentro do gênero *Neopestalotiopsis*, incluiu 37 taxas e o alinhamento concatenado resultante das sequências composto de 1522 caracteres (ITS: 1-551; β t: 552-976 e TEF1- α : 977-1522). A árvore filogenética resultante (**Figura 1**) identificou quatro possíveis novas espécies dentro do gênero *Neopestalotiopsis*: *Neopestalotiopsis* sp. COAD2017, *Neopestalotiopsis* sp. COAD2018 (COAD2067), *Neopestalotiopsis* sp. COAD2020 e *Neopestalotiopsis* sp. COAD2021. Os isolados COAD2022 e COAD2024 foram identificados como a mesma espécie, denominada *N. surinamensis*. O isolado COAD2023 agrupou-se com *N. foedans*.

A análise filogenética multilocus com o isolado COAD2019, identificado como pertencente ao gênero *Pestalotiopsis*, incluiu 28 taxas e o alinhamento concatenado resultante das sequências composto de 1478 caracteres (ITS: 1-541, β t: 542-989 e TEF1- α : 990-1478). A árvore filogenética decorrente (**Figura 2**) posicionou o isolado COAD2019 dentro de um complexo de espécies composto por *P. adusta*, *P. papuana* e outras espécies ainda não descritas. Considerando a baixa resolução do clado, o isolado COAD2019 será mantido como *Pestalotiopsis* sp. até que os limites entre as espécies estejam melhor definidos.

3.3 Caracterização morfológica

Todos os isolados apresentaram a morfologia característica de fungos da família Pestalotiopsidaceae: conídios com cinco células (quatro euseptos), sendo as células da base e do ápice hialinas e as três células medianas pigmentadas, e a presença de apêndices apicais e basais. Os parâmetros avaliados apresentaram variação intra e interespecífica (**Tabela 3**).

3.4 Taxonomia

***Neopestalotiopsis* sp. COAD2017** (Figura 3)

Descrição: Conidioma, conidióforos e células conidiogênicas não foram possíveis de observar em cultura. Formação de uma massa negra globosa de conídios em meio BDA. Conídios fusiformes, elipsoide, levemente curvado, 4 septos, (18,4–)20,3–

26,4(-28) × (5,5-)6,1-7,4(-7,7) μm, x = 22,4 × 6,6 μm; célula basal obcônica a cônica, hialina, lisa, 3,8-5,6 μm de comprimento; três células medianas doliformes, 15,5-17,5 μm de comprimento, x = 16,3 μm, lisas, versicolores, septos mais escuros que o restante das células (segunda célula da base para o ápice marrom claro, 4,5-6 μm de comprimento; terceira célula marrom escuro, 5-6,4 μm de comprimento; quarta célula marrom escuro, 4,7-5,7 μm de comprimento); célula apical 4,3-5,3 μm de comprimento, hialina, subcilíndrica a cilíndrica, lisa; 2-3 apêndices apicais surgindo do ápice celular, não-ramificados, filiformes, flexuosos, (15-)21-30(-33) μm de comprimento, x = 25 μm; único apêndice basal, central, não-ramificado, 4,4-6,3 μm de comprimento.

Características culturais: Colônias em BDA atingindo 80 mm de diâmetro após 5 dias sob 25°C, borda irregular, coloração branca, micélio aéreo cotonosos esporulação superficial formada por massas negras globosas de conídios.

Distribuição geográfica e gama de hospedeiros: Espécie ainda não relatada.

Material examinado: Brasil, Minas Gerais, Dona Euzébia, folhas de *Dypsis madagascariensis* (VIC42993), 18 de julho de 2014, isolado COAD2017. Coletores: Lisboa DO, Pinho DB e Furtado GQ.

***Neopestalotiopsis* sp. COAD2018** (Figura 4)

Descrição: Conidioma, conidióforos e células conidiogênicas não foram possíveis de observar em cultura. Formação de uma massa negra globosa de conídios em meio BDA. Conídios fusiformes, levemente curvado, 4 septos, (17-)18,6-24(-26) × (4,2-)5-6,4(-7,2) μm, x = 21 × 5,4 μm; célula basal cônica, hialina, lisa, 3,1-4,5 μm de comprimento; três células medianas doliformes, 14,5-16,5 μm de comprimento, x = 15,6 μm, lisas, versicolores, septos mais escuros que o restante das células (segunda célula da base para o ápice marrom claro, 4,3-5,5 μm de comprimento; terceira célula marrom escuro, 3,6-5 μm de comprimento; quarta célula marrom escuro, 4,3-5,5 μm de comprimento); célula apical 3,8-4,3 μm de comprimento, hialina, subcilíndrica, lisa; 2 apêndices apicais surgindo do ápice celular, não-ramificados, filiformes, flexuosos, (7,7-)8,2-17(-20) μm de comprimento, x = 14 μm; único apêndice basal, central, não-ramificado, 2,5-5,5 μm de comprimento.

Características culturais: Colônias em BDA atingindo 77 mm de diâmetro após 5 dias sob 25°C, borda regular, crescimento em setores, coloração branca, micélio

aéreo cotonoso, esporulação superficial formada por massas negras globosas de conídios.

Distribuição geográfica e gama de hospedeiros: Espécie ainda não relatada.

Material examinado: Brasil, Minas Gerais, Dona Euzébia, folhas de *Licuala grandis* (VIC42996), 18 de julho de 2014, isolado COAD2018. Coletores: Lisboa DO, Pinho DB e Furtado GQ.

***Pestalotiopsis* sp. COAD2019** (Figura 5)

Descrição: Conidioma, conidióforos e células conidiogênicas não foram possíveis de observar em cultura. Formação de uma massa negra globosa de conídios em meio BDA. Conídios fusiformes, levemente curvado, 4 septos, (21–) 22,5–29(–31) × (4,6–)5,5–7(–8) μm, $x = 24 \times 6,3$ μm; célula basal obcônica a cônica, hialina, lisa, 4–5,6 μm de comprimento; três células medianas doliformes, 17,4–19 μm de comprimento, $x = 18$ μm, lisas, versicolores a concolores, septos mais escuros que o restante das células (segunda célula da base para o ápice marrom claro, 4,9–6 μm de comprimento; terceira célula marrom, 5,7–7,7 μm de comprimento; quarta célula marrom a marrom claro, 6,1–7,2 μm de comprimento); célula apical 4–5,8 μm de comprimento, hialina, subcilíndrica, lisa; com 2–3 apêndices apicais, surgindo do ápice celular, não-ramificados, filiformes, flexuosos, (8–) 9,5–14(–19) μm de comprimento, $x = 12$ μm; único apêndice basal, central, não-ramificado, 3–5,5 μm de comprimento.

Características culturais: Colônias em BDA atingindo 43 mm de diâmetro após 5 dias sob 25°C, borda regular, coloração branca a rosa clara, micélio aéreo cotonoso, esporulação superficial formada por massas negras globosas de conídios.

Distribuição geográfica e gama de hospedeiros: Espécie ainda não relatada.

Material examinado: Brasil, Minas Gerais, Dona Euzébia, folhas de *Trachycarpus fortunei* (VIC42991), 18 de julho de 2014, isolado COAD2019. Coletores: Lisboa DO, Pinho DB e Furtado GQ.

***Neopestalotiopsis* sp. COAD2020** (Figura 6)

Descrição: Conidioma, conidióforos e células conidiogênicas não foram possíveis de observar em cultura. Formação de uma massa negra globosa de conídios em meio BDA. Conídios elipsoides, levemente curvado, 4 septos, 21,5–27(–29) × 6–7,5 μm, $x = 23,8 \times 6,6$ μm; célula basal obcônica a cônica, hialina, lisa, 4–5,5 μm de

comprimento; três células medianas doliformes, 14,2–17,5 µm de comprimento, $x = 14,7$ µm, lisas, versicolores, septos mais escuros que o resto das células (segunda célula da base para o ápice marrom claro, 4–5,5 µm de comprimento; terceira célula marrom escuro, 4,5–6 µm de comprimento; quarta célula marrom escuro, 4,7–5,6 µm de comprimento); célula apical 3,2–4,2 µm de comprimento, hialina, subcilíndrica a subglobosa, lisa; com 2–3 apêndices apicais, surgindo do ápice celular, não-ramificados, filiformes, flexuosos, 2,5–4,5(–6) µm de comprimento, $x = 3,5$ µm; único apêndice basal, central, não-ramificado, 2–6,5 µm de comprimento.

Características culturais: Colônias em BDA atingindo 73 mm de diâmetro após 5 dias sob 25°C, borda irregular, coloração branca, micélio aéreo cotonoso, esporulação superficial formada por massas negras globosas de conídios.

Distribuição geográfica e gama de hospedeiros: Espécie ainda não relatada.

Material examinado: Brasil, Minas Gerais, Dona Euzébia, folhas de Phoenix roebelenii, (VIC42997), 18 de julho de 2014, isolado COAD2020. Coletores: Lisboa DO, Pinho DB e Furtado GQ.

Neopestalotiopsis sp. COAD2021 (Figura 7)

Descrição: Conidioma, conidióforos e células conidiogênicas não foram possíveis de observar em cultura. Formação de uma massa negra globosa de conídios em meio BDA. Conídios elipsoides, não-curvado, 4 septos, (19–) 21–26(–27) × 5,5–6,5(–7) µm, $x = 22 \times 6$ µm; célula basal obcônica a cônica, hialina, lisa, 3,5–5,5 µm de comprimento; três células medianas doliformes, 13,5–16,5 µm de comprimento, $x = 15$ µm, lisas, versicolores, septos mais escuros que o restante das células (segunda célula da base para o ápice marrom claro, 4–5,5 µm de comprimento; terceira célula marrom, 4,5–6 µm de comprimento; quarta célula marrom, 4,5–6 µm de comprimento); célula apical 3,5–5 µm de comprimento, hialina, subcilíndrica a cilíndrica, lisa; com 2–3 apêndices apicais, surgindo do ápice celular, não-ramificados, filiformes, flexuosos, (7–) 11–16,5(–19) µm de comprimento, $x = 14$ µm; único apêndice basal, central, não-ramificado, 2–4 µm de comprimento.

Características culturais: Colônias em BDA atingindo 69 mm de diâmetro após 5 dias sob 25°C, borda regular com crescimento em setores, coloração branca, micélio aéreo cotonoso, esporulação formada por massas negras globosas de conídios na superfície.

Distribuição geográfica e gama de hospedeiros: Espécie ainda não relatada.

Material examinado: Brasil, Minas Gerais, Dona Euzébia, folhas de *Ptychosperma elegans* (VIC42992), 18 de julho de 2014, isolado COAD2021. Coletores: Lisboa DO, Pinho DB e Furtado GQ.

Neopestalotiopsis surinamensis Maharachch., K.D. Hyde & Crous. MycoBank MB809781 (Figura 8)

Descrição: Conidioma, conidióforos e células conidiogênicas não foram possíveis de observar em cultura. Formação de uma massa negra globosa de conídios em meio BDA. Conídios elipsoides, não-curvado, 4 septos, (19–) 20–24(–25) × (5,5–)6–7(–7,5) µm, x = 23 × 6,5 µm; célula basal obcônica, hialina, lisa, 3–4,5 µm de comprimento; três células medianas doliformes, 12,5–14,5 µm de comprimento, x = 13,5 µm, lisas, versicolores a concolores, septos mais escuros que o restante das células (segunda célula da base para o ápice marrom claro, 3,8–5,3 µm de comprimento; terceira célula marrom claro, 4–5 µm de comprimento; quarta célula marrom, 4–6 µm de comprimento); célula apical 3,7–4,8 µm de comprimento, hialina, cilíndrica, lisa; com 2–3 (maioria 2) apêndices apicais, surgindo do ápice celular, não-ramificados, filiformes, flexuosos, (12–) 14–21(–26) µm de comprimento, x = 19 µm; único apêndice basal, central, não-ramificado, 2–5 µm de comprimento.

Características culturais: Colônias em BDA atingindo 80 mm de diâmetro após 5 dias sob 25°C, borda regular, coloração branca, micélio aéreo cotonoso, esporulação formada por massas negras globosas de conídios na superfície.

Distribuição geográfica e gama de hospedeiros: Espécie ainda não relatada.

Material examinado: Brasil, Minas Gerais, Dona Euzébia, folhas de *Wodyetia bifurcata* (VIC42994), 18 de julho de 2014, isolado COAD2022. Coletores: Lisboa DO, Pinho DB e Furtado GQ.

Neopestalotiopsis foedans (Sacc. & Ellis) Maharachch., K.D. Hyde & Crous. MycoBank MB809768 (Figura 9)

Descrição: Conidioma, conidióforos e células conidiogênicas não foram possíveis de observar em cultura. Formação de uma massa negra globosa de conídios em meio BDA. Conídios elipsoides, não-curvado, 4 septos, (18–) 20,5–23,5(–24) × (5–)5,5–6,5 µm, x = 22 × 6 µm; célula basal obcônica, hialina, lisa, 3,2–4,4 µm de comprimento; três células medianas doliformes, 12,6–14,5 µm de comprimento, x =

14 µm, lisas, versicolores, septos mais escuros que o restante das células (segunda célula da base para o ápice marrom claro, 4–5,5 µm de comprimento; terceira célula marrom, 4,3–5,3 µm de comprimento; quarta célula marrom, 4–5,2 µm de comprimento); célula apical 3,6–5,0 µm de comprimento, hialina, cilíndrica, lisa; com 2–3 apêndices apicais, surgindo do ápice celular, não-ramificados, filiformes, flexuosos, (13–) 15–20(–24) µm de comprimento, $x = 16$ µm; único apêndice basal, central, não-ramificado, 3–6,5 µm de comprimento.

Características culturais: Colônias em BDA atingindo 70 mm de diâmetro após 5 dias sob 25°C, borda regular, coloração branca, micélio aéreo cotonoso, esporulação formada por massas negras globosas de conídios na superfície.

Distribuição geográfica e gama de hospedeiros: China e Estados Unidos em folhas de *Calliandra haematocephala* e *Thuja occidentalis*, respectivamente.

Material examinado: Brasil, Minas Gerais, Dona Euzébia, folhas de *Cocos nucifera* (VIC42995), 18 de julho de 2014, isolado COAD2023. Coletores: Lisboa DO, Pinho DB e Furtado GQ.

Neopestalotiopsis surinamensis Maharachch., K.D. Hyde & Crous. MycoBank MB809781 (Figura 10)

Descrição: Conidioma, conidióforos e células conidiogênicas não foram possíveis de observar em cultura. Formação de uma massa negra globosa de conídios em meio BDA. Conídios elipsoide, não-curvado, 4 septos, $23–25,0 \times 5,2–6$ µm, $x = 22,5 \times 5,5$ µm; célula basal cônica a obcônica, hialina, lisa, 4–5,5 µm de comprimento; três células medianas doliformes, 14–17 µm de comprimento, $x = 15,5$ µm, lisas, versicolores, septos mais escuros que o restante das células (segunda célula da base para o ápice marrom claro, 4,5–6 µm de comprimento; terceira célula marrom, 4,3–5,5 µm de comprimento; quarta célula marrom, 4–5,8 µm de comprimento); célula apical 3–4,0 µm de comprimento, hialina, cilíndrica, lisa; com 2–3 apêndices apicais, surgindo do ápice celular, não-ramificados, filiformes, flexuosos, (11–)12–19(–20) µm de comprimento, $x = 16,5$ µm; único apêndice basal, central, não-ramificado, 3–9,5 µm de comprimento.

Características culturais: Colônias em BDA atingindo 82 mm de diâmetro após 5 dias sob 25°C, borda levemente desregular, coloração branca, micélio aéreo

cotonoso, esporulação abundante formada por massas negras globosas de conídios na superfície.

Distribuição geográfica e gama de hospedeiros: Suriname (América do Sul) e Zimbabwe (África) em solos sob *Elaeis guineenses* e folhas de *Protea eximia*, respectivamente.

Material examinado: Brasil, Minas Gerais, Viçosa, folhas de *Euterpe edulis* (VIC42990), 20 de outubro de 2014, isolado COAD2024. Coletor: Furtado GQ.

3.5 Testes de patogenicidade

Todas as espécies identificadas foram patogênicas quando inoculadas artificialmente, exceto *Neopestalotiopsis* sp. COAD2020. Os primeiros sintomas em folhas de *D. madagascariensis*, *L. grandis*, *P. elegans*, *W. bifurcata*, *C. nucifera*, *E. edulis* e *T. fortunei*, foram observados cinco dias após a inoculação, em ambas as faces foliares, mas somente em áreas previamente feridas. Os sintomas consistiram em lesões marrom escuras circundadas por um halo amarelo que progrediram para manchas com o centro esbranquiçado contendo pontuações negras referentes a estruturas reprodutivas dos fungos. Os controles permaneceram assintomáticos. A espécie *P. roebelenii* também permaneceu assintomática até avaliação final, ao 30º dia após a inoculação.

No término das avaliações, os isolados patogênicos foram reisolados em cultura pura e possuíam as características culturais e dos conídios idênticas à cultura monospórica original.

3.6 Taxa de crescimento micelial

A mensuração foi realizada até o quinto dia. Houve diferença significativa entre as taxas de crescimento micelial apresentada pelos isolados (Tabela 4). A taxa de crescimento micelial foi significativamente menor para *Pestalotiopsis* sp. COAD2019 em relação aos demais isolados pertencentes ao gênero *Neopestalotiopsis*. Entretanto, alguns isolados de *Neopestalotiopsis* não apresentaram

taxa de crescimento micelial estatisticamente diferente de *Pestalotiopsis* sp. COAD2019 nos meios MA e AA.

4. DISCUSSÃO

As análises filogenéticas e comparações morfológicas identificaram sete diferentes espécies de fungos associados à mancha-de-pestalotiopsis nas palmeiras ornamentais *Cocus nucifera*, *Dypsis madagascariensis*, *Euterpe edulis*, *Licuala grandis*, *Phoenix roebelenii*, *Ptychosperma elegans*, *Trachycarpus fortunei* e *Wodyetia bifurcata*. Os dados moleculares mostram que as espécies deste estudo, denominadas *Neopestalotiopsis* sp. COAD2017, *Neopestalotiopsis* sp. COAD2018, *Neopestalotiopsis* sp. COAD2020, *Neopestalotiopsis* sp. COAD2021 não agruparam com nenhuma outra espécie relatada na literatura. Conseqüentemente, essas espécies serão propostas como novas espécies, de acordo com as normas do Código Internacional de Nomenclatura para algas, fungos e plantas. As demais espécies de *Pestalotiopsis* identificadas, *N. foedans* (COAD2023) e *N. surinamensis* (COAD 2022 e COAD2024), ainda não foram relatadas nos hospedeiros em estudo e, para nosso conhecimento, também consistem em novos relatos de ocorrência no Brasil. O isolado COAD2019 não apresentou um posicionamento filogenético definido e até que mais culturas e coleções estejam disponíveis, será mantido como *Pestalotiopsis* sp.

As características morfológicas utilizadas mostraram uma faixa de variação entre e dentro das espécies estudadas. A dimensão dos conídios ($\pm 18-29 \mu\text{m}$ no comprimento e $\pm 5-7,5 \mu\text{m}$ na largura) e o número de apêndices (2-3 unidades) foram os atributos que menos variaram entre os isolados. O comprimento dos apêndices apical e basal foi o que apresentou maiores oscilações variando $\pm 2-30 \mu\text{m}$ e $\pm 2-9,5 \mu\text{m}$, respectivamente. Essa variabilidade também foi observada por Ayoubi et al. (2015) em *N. iranensis*, agente causal de podridão em frutos de morango, no qual o comprimento dos apêndices apicais variou de 24-67 μm e do apêndice basal de 1,5-14 μm .

Jeewon (2003), com base em análises do rDNA, inferiu que a pigmentação das células medianas é um importante marcador filogenético para a delimitação das espécies dentro de *Pestalotiopsis*. Maharachchikumbura et al. (2014) definiram que

as espécies do gênero *Neopestalotiopsis* possuem as células medianas versicolores (coloração desuniforme) enquanto que a coloração nas espécies do gênero *Pestalotiopsis* é uniforme (concolor). Entretanto, para este estudo, esta característica fenotípica não foi fidedigna, uma vez que *Pestalotiopsis* sp. COAD2019 apresentou os conídios com a pigmentação das células medianas. Maharachchikumbura et al. (2014) relataram, ao descrever *N. natalensis*, que as células medianas dos conídios apresentaram coloração uniforme ou com as duas células superiores mais escuras que a célula inferior, mostrando que a pigmentação pode variar dentro de uma mesma espécie.

Os parâmetros morfológicos mais usados na diferenciação de espécies de *Pestalotiopsis* foram avaliados no presente trabalho. Entretanto, similar a outros estudos, devido a plasticidade fenotípica, somente as espécies filogeneticamente próximas foram comparadas (Hu et al. 2007; Liu et al. 2007; Tejesvi et al. 2007; Maharachchikumbura et al. 2012, 2013, 2014).

Neopestalotiopsis sp. COAD2017 e *Neopestalotiopsis* sp. COAD2021 formaram um agrupamento que não foi filogeneticamente próximo a nenhuma outra espécie já descrita. Pela topologia da árvore, podemos notar uma expressiva distância filogenética entre as duas espécies, que apresentam, a nível de DNA, diferenças em suas sequências de ITS (2 pares de bases) e TEF1- α (5 pares de base). Em relação a dimensão dos conídios, *Neopestalotiopsis* sp. COAD2017 possui os apêndices apicais (21-30 μm) e basais (4,4-6,3 μm) mais longos que *Neopestalotiopsis* sp. COAD2021 (11-16,5 μm / 2-4,0 μm). Levando em consideração o precedente criado por Maharachchikumbura et al. (2014) para o reconhecimento de espécies deste gênero, comparando os dados morfológicos e de sequência dos genes, consideramos que essas espécies são distintas.

Neopestalotiopsis sp. COAD2018, isolada a partir de folhas de *Licuala grandis*, formou um agrupamento que caracteriza uma nova espécie dentro do gênero *Neopestalotiopsis*. Essa espécie não apresentou nenhum parentesco filogenético. Morfologicamente, apresenta a predominância de conídios com dois apêndices apicais, variando o comprimento de 8,2–17 μm .

Pestalotiopsis sp. COAD2019 é geneticamente relacionada a *P. papuana*, *P. adusta* e a dois isolados identificados como *Pestalotiopsis* sp. (CBS263.33 e

CBS264.33). Estes dois últimos isolados ainda não foram morfológicamente descritos por apresentarem colônias estéreis (Maharachchikumbura et al. 2014). Pela análise filogenética, podemos observar que essas espécies formam um complexo, cuja a resolução entre elas não permite uma delimitação nítida de uma espécie. Entretanto, os isolados já descritos como a mesma espécie formam subclados com valores de probabilidade superior a 80%. Diante do supramencionado, o isolado COAD2019 permanecerá identificado como *Pestalotiopsis* sp. até que mais informações estejam disponíveis para sua definição como uma possível nova espécie.

O isolado COAD2020 também formou um complexo de espécies, sendo filogeneticamente próximo a *N. aotearoa*, *N. piceana*, *N. ellipsospora* e *N. samaragensis*. Entretanto, morfológicamente, esse isolado se difere das demais espécies, possuindo os apêndices apicais extremamente curtos, variando de 2,5-4,5 µm (Maharachchikumbura et al. 2014).

Neopestalotiopsis foedans, isolada neste estudo a partir de *Cocus nucifera*, foi relatada em *Cupressus thuyoides* em Nova Jersey (EUA), *Cryptomeria japonica* na Filadélfia, Princeton e no Japão e em pinheiro (*Pinus mugo*) em Pennington. Essa espécie possui uma ampla gama de hospedeiro e ocorre em diferentes regiões geográficas. Para nosso conhecimento, esse é o primeiro relato de *N. foedans* em coqueiro e uma nova ocorrência no Brasil.

Os isolados COAD2022 e COAD2024 foram identificados como *N. surinamensis*. Esta espécie foi descrita em Suriname, obtida a partir de solo sob *Elaeis guineensis* (Arecaceae) e é filogeneticamente próxima a *N. protearum*. Este estudo consiste no primeiro relato de ocorrência de *N. surinamensis* no Brasil e em *W. bifurcata* e *E. edulis*, como plantas hospedeiras.

A patogenicidade das espécies foi confirmada cinco dias após a inoculação. Todas as folhas inoculadas apresentaram sintomas iguais aos observados em viveiros. Ferimentos no tecido foliar antes da inoculação foi necessário em todos os tratamentos para o desenvolvimento da doença. Estudos com outras espécies de *Pestalotiopsis* também observaram que as plantas sem ferimento permaneciam assintomáticas (Hopkins et al.2000; Rivera et al. 2000; Sousa et al. 2004). Rodrigues et al. (2014) ao estudarem o processo infeccioso de *P. longisetula* em folhas de morango mostraram que não houve formação de apressório e nenhuma evidência de

penetração direta do tubo germinativo no hospedeiro. Tal resultado ilustra a necessidade de uma abertura prévia para a entrada do patógeno. Em outros grupos de fungos, como os Botryosphaeriaceae, esse comportamento de infectar somente áreas previamente feridas também já foi constatado (Damm et al. 2007, Machado et al. 2014).

Neopestalotiopsis sp. COAD2020 é um patógeno oportunista porque não reproduziu os sintomas nas inoculações artificiais. Muitas espécies de fungos de *Pestalotiopsis* relatadas em plantas da família *Arecaceae* são consideradas patógenos fracos e ocorrem associados a outros microrganismos patogênicos ou a danos causados por deficiências nutricionais, insetos ou atividade humana (Ram 1989, Araújo et al. 1991, Cardoso et al. 2003, Elliott 2012).

Em relação a taxa de crescimento micelial, considerando os meios BDA, V8 e CMA, os isolados formaram dois grupos distintos. O grupo A, composto por todas as espécies identificadas dentro de *Neopestalotiopsis*, caracterizou-se por apresentar crescimento significativamente maior de colônia ($10,4-15,1 \text{ mm dia}^{-1}$) em relação ao grupo B, composto pelo único isolado (COAD2019) identificado como *Pestalotiopsis* sp. ($6,4-7,7 \text{ mm dia}^{-1}$). Isto sugere, similar a pigmentação das células medianas dos conídios, que a taxa de crescimento micelial pode ser empregada na diferenciação destes dois gêneros de *Pestalotiopsidaceae*. Jayawardena et al. (2015) ao estudarem a agressividade de diferentes isolados de *N. vitis* e *Pestalotiopsis trachicarpicola* em videira, também observaram um comportamento diferencial entre esses gêneros. Os isolados de *N. vitis* causaram lesões significativamente maiores ($\pm 5,5 \text{ cm}$) no hospedeiro do que o isolado de *P. trachicarpicola* ($\pm 2,4 \text{ cm}$).

Os estudos sobre fungos vinculados à família *Arecaceae* iniciaram tardiamente em relação a outras famílias botânicas e desde então, vêm revelando uma grande diversidade de microrganismos, incluindo muitas espécies novas (Hyde et al. 2007, Monteiro et al. 2010). O coqueiro (*C. nucifera*), considerada uma das mais importantes culturas perenes, é a palmeira mais pesquisada e com o maior número de relatos de fungos na literatura devido ao seu elevado potencial econômico (Farr et al. 2016, Medeiros et al. 2014). Ao se considerar somente a família *Pestalotiopsidaceae*, as únicas espécies nesta cultura já relatadas no Brasil são *P. adusta* e *P. guepinii*, causando podridão em pós-colheita em cocos imaturos e mancha foliar, respectivamente (Rosado et al. 2015, Mendes et al. 2016). As demais espécies de

palmeiras estudadas neste trabalho, apesar do elevado potencial econômico, são pouco exploradas comercialmente, sendo essencialmente empregadas nas composições paisagísticas e não possuem nenhum registro no país em relação aos fungos da família Pestalotiopsidaceae. Ao considerar as espécies *D. madagascariensis* e *W. bifurcata*, temos que ainda não foram encontrados nenhum registro em escala mundial sobre este grupo de fungos nessas plantas (Farr et al. 2016, Mendes et al. 2016).

Este estudo proporcionou informações inéditas sobre a etiologia da mancha-de-pestalotiopsis em palmeiras, o que contribuirá para o desenvolvimento de estratégias de controle desta doença.

5. CONCLUSÕES

- A mancha-de-pestalotiopsis em palmeiras ornamentais é causada por diferentes agentes fúngicos;
- Foram identificadas quatro possíveis espécies novas de Pestalotiopsidaceae pertencente ao gênero *Neopestalotiopsis*, a serem propostas de acordo com o Código Internacional de Nomenclatura para algas, fungos e plantas;
- Foram relatadas duas novas ocorrências de espécies no Brasil: *Neopestalotiopsis foedans* e *N. surinamensis*;
- Ferimentos consistiram em um pré-requisito para a infecção dos patógenos e desenvolvimento da doença;
- *Neopestalotiopsis* spp. apresentaram taxas de crescimento micelial significativamente maior que *Pestalotiopsis* sp. 1 nos meios CMA, BDA e V8.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alfenas AC, Mafia RG (2008). Métodos em Fitopatologia. Editora UFV, Viçosa, 382p.
- Alves G, Verbiski FS, Michaelides TJ, May LL (2011). First report of *Pestalotiopsis diospyri* causing canker on persimmon trees. Rev. Bras. Frutic. 33: 1019-1022.

- Araújo JCA, Gasparotto L, Garcia MVB (1991). Epidemiologia de *Pestalotiopsis* spp em dendzeneiro. *Fitopatologia Brasileira* 16: 33.
- Araújo JSP, Silva MAS (2010). A palmeira imperial: da introdução no Brasil-Colônia às doenças e pragas no século XXI. *Ciência e Cultura* 62: 26 - 28.
- Ayoubi N, Soleimani MJ (2015). Strawberry Fruit Rot Caused by *Neopestalotiopsis iranensis* sp. nov., and *N. mesopotâmica*. *Current Microbiology* 71:1-8.
- Cardoso GD, Barreto AF, Araújo E, Almeida FA, Carvalho RAG (2003). Etiologia e progresso da mancha de pestalotia do coqueiro (*Cocos nucifera* L.), em São Gonçalo, Paraíba. *Revista Brasileira de Fruticultura* 25: 335-336.
- Clement CR, Leras PE, Van Leeuwen J (2005). O potencial das palmeiras tropicais no Brasil: acertos e fracassos das últimas décadas. *Agrociências* 9(1-2): 67-71.
- Crous PW, Wingfield MJ, Le Roux et al (2015). Fungal Planet description sheets: 371–399. *Persoonia* 35: 264 – 327.
- Damm U, Crous PW, Fourie PH (2007). Botryosphaeriaceae as potential pathogens of *Prunus* species in South Africa, with descriptions of *Diplodia africana* and *Lasiodiplodia plurivora* sp. nov. *Mycologia* 99: 664–680.
- Dransfield J, Uhl NW, Asmussen CB, Baker WJ, Haley MM, Lewis CE (2008) *Genera Palmarum: The Evolution and Classification of Palms*. Kew Publishing, Royal Botanical Gardens, Kew. 744p.
- Edgar RC (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* 32:1792-1797.
- Elliott ML, Uchida JY, Broschat TK, Simone GW (2004). *Diseases and Disorders of Ornamental Palms*. American Phytopathological Society. St Paul, Minnesota, USA.
- Elliott ML (2012). *Pestalotiopsis (Pestalotia) Diseases of Palm*. Disponível em: <http://edis.ifas.ufl.edu> . Acesso em 07 de janeiro de 2016.
- Embaby EM (2007). Pestalotia fruit rot on strawberry plants in Egypt. *Egypt Journal Phytopathology* 35:99–110.
- Espinoza JG, Bricenõ EX, Keith LM, Latorre BA (2008). Canker and Twig Dieback of Blueberry Caused by *Pestalotiopsis* spp. and *Truncatella* sp. in Chile. *Plant Disease* 92: 1407-1414.
- Farr DF, Rossman AY (2016). *Fungal Databases, Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS, USDA*. Atualizado em janeiro de 2016.

- Disponível em: <http://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/> . Acesso em 20 de janeiro de 2016.
- Geng K, Zhang B, Song Y, Hyde KD, Kang JI, Wang Y (2013). A new species of *Pestalotiopsis* from leaf spots of *Licuala grandis* from Hainan, China. *Phytotaxa* 88 (3): 49–54.
- Glass NL, Donaldson GC (1995). Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Applied and Environmental Microbiology* 61:1323-1330.
- Gomes JM, Paiva HN (2006). *Viveiros florestais (Propagação Sexuada)*. 3. ed. UFV, Viçosa.
- Hu HL, Jeewon R, Zhou DQ, Zhou TX, Hyde KD (2007). Phylogenetic diversity of endophytic *Pestalotiopsis* species in *Pinus armandii* and *Ribes* spp.: evidence from rDNA and β -tubulin gene phylogenies. *Fungal Diversity* 24:1–22.
- Hyde KD, Bussaban B, Paulus B, Crous PW, Lee S, McKenzie EHC, Photita W, Lumyong S (2007). Diversity of saprobic microfungi. *Biodiversity and Conservation* 16(1): 7–35.
- Hopkins KE, McQuilken MP (2000). Characteristics of *Pestalotiopsis* associated with hardy ornamental plants in the UK. *Eur. J. Plant Pathol* 106:77-85.
- IBRAFLOR (2014) Instituto Brasileiro de Floricultura. Dados gerais do setor. Disponível em: <http://www.ibraflor.com/publicacoes/vw.php?cod=213>. Acesso em 27 de dezembro de 2015.
- Jayawardena RS, Zhang W, Liua M, Maharachchikumbura SSN, Zhou Y, Huanga J, Nilthong S, Wang Z, Lia X, Yana J, Hyde KD (2015). Identification and characterization of *Pestalotiopsis*-like fungi related to grapevine diseases in China. *Fungal Biology* 119: 348–361
- Jayawardena RS, Liu M, Yan J, Maharachchikumbura SSN (2016). *Neopestalotiopsis vitis* sp. nov. causing grapevine leaf spot in China. *Phytotaxa* 258(1):063–074.
- Jeewon R, Liew ECY, Hyde KD (2002). Phylogenetic relationships of *Pestalotiopsis* and allied genera inferred from ribosomal DNA sequences and morphological characters. *Molecular Phylogenetic Evolution* 25: 378– 392.
- Jeewon R, Liew ECY, Hyde KD (2003). Phylogenetic significance of morphological characters in the taxonomy of *Pestalotiopsis* species. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 27: 372–383.

- Johnson DV (2010). Tropical Palms. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/012/i1590e/i1590e.pdf> . Acesso em 27 de dezembro de 2015.
- Júnior AJ, Auer CG, Santos AF (2001). Estratégias de manejo de doenças em viveiros florestais. Disponível em <http://www.sifloresta.ufv.br/> . Acesso em 27 de dezembro de 2015.
- Keith LM, Velasquez ME, Zee FT (2006). Identification and characterization of *Pestalotiopsis* spp. causing scab disease of guava, *Psidium guajava*, in Hawaii. *Plant Disease* 90:16-23.
- Kern ME, Blevins KS (1999). *Micologia Médica*. 2ª ed. São Paulo: Editora Premier, p. 256.
- Kimati H et al (2005). *Manual de fitopatologia*. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, v. 2, 623 p.
- Ko Y, Yao KS, Chen CY, Lin CH (2007). First report of gray leaf spot of mango (*Mangifera indica*) Caused by *Pestalotiopsis mangiferae* in Taiwan. *Plant Disease* 91: 1684.
- Lazarotto M, Bovolini MP, Muniz MFB, Rarakawa R, Reiniger LRS, Santos AF (2014). Identification and characterization of pathogenic *Pestalotiopsis* species to pecan tree in Brazil. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira* 49: 440-448.
- Liu AR, Chen SC, Wu SY, et al. (2010). Cultural studies coupled with DNA based sequence analyses and its implication on pigmentation as a phylogenetic marker in *Pestalotiopsis* taxonomy. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 57:528–535.
- Liu, JK et al. (2015). Fungal diversity notes 1–110: taxonomic and phylogenetic contributions to fungal species. *Fungal Diversity* 72: 1-197.
- Lorenzi H et al. (2004). *Palmeiras brasileiras e exóticas cultivadas*. Nova Odessa, SP: Ed. Plantarum, 432p.
- 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.
- Maharachchikumbura SSN, Guo LD, Chukeatirote E, Bahkali AH, Hyde KD (2011). *Pestalotiopsis*—morphology, phylogeny, biochemistry and diversity. *Fungal Diversity* 50: 167–187.

- Maharachchikumbura SSN, Guo L, Cai L, Chukeatirote E, Wu WP, Sun X, Crous PW, Bhat DJ, McKenzie EHC, Bahkali AH, Hyde KD (2012). A multi-locus backbone tree for *Pestalotiopsis*, with a polyphasic characterization of 14 new species. *Fungal Diversity* 56: 95–129.
- Maharachchikumbura SSN, Chukeatirote E, Hyde KD (2013). Improving the backbone tree for the genus *Pestalotiopsis*; addition of *P. steyaertii* and *P. magna* sp. nov. *Mycological Progress* 13: 617–624.
- Maharachchikumbura SSN, Hyde KD, Groenewald JZ, Xu J, Crous PW (2014) *Pestalotiopsis* revisited. *Studies in Mycology* 79: 121 –186.
- Medeiros RD, Mesquita JB (2014). Criação de indicadores para a avaliação da ação da resinose do estipe (*Ceratocystis paradoxa* (De Seynes) Moreau) em coqueiro (*Cocos nucifera* L.). *Scientia Plena*, 10:1-5.
- Mendes MAS, Urben AF (2016). Fungos relatados em plantas no Brasil, Laboratório de Quarentena Vegetal. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Disponível em: <http://pragawall.cenargen.embrapa.br/aiqweb/michtml/fgbanco01.asp>. Acesso em 22 de janeiro de 2016.
- Miller MA, Pfeiffer W, Schwartz T (2010). Creating the CIPRES science gateway for inference of large phylogenetic trees. Disponível em http://www.phylo.org/sub_sections/portal/sc2010_paper.pdf . Acesso em 22 de janeiro de 2016.
- Monteiro JS, Gutierrez AH, Sotao HMP (2010). Fungos anamorfos (hyphomycetes) da Floresta Nacional de Caxiuanã, Pará, Brasil: novos registros para o Neotrópico. *Acta Bot. Bras.* 24: n.3.
- Nag Rag TR (1993). *Coelomycetous anamorphs with appendage bearing conidia*. Mycologue, Waterloo.
- Nagata T, Ando Y, Hirota A (1992). Phytotoxins from tea gray blight fungi, *Pestalotiopsis longiseta* and *Pestalotiopsis theae*. *Biosci Biotechnol Biochem* 56:810–811.
- Nylander, JAA (2004). MrModeltest2. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University.
- Pessoa WLRS, Barguil BM, Oliveira SMA, Coelho RSB (2008) .Ocorrência de *Pestalotiopsis palmarum* em *Caryota mitis*. *Summa Phytopathologica*. 34(1): 95.

- 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.
- 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.
- Ortega, HE, Shen YY, TenDyke K, Ríos N, Ríos LC (2014). Polyhydroxylated macrolide isolated from the endophytic fungus *Pestalotiopsis mangiferae*. *Tetrahedron Letters* 55: 2642–2645.
- RAM C (1989). Microflora associada à queima-das-folhas do coqueiro. *Fitopatologia Brasileira* 14: 36-38.
- Rambaut A (2009) FigTree 1.2.2. Disponível em <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>. Acesso em 27 de dezembro de 2015.
- Rannala B, Yang Z (1996). Probability distribution of molecular evolutionary trees: a new method of phylogenetic inference. *Journal of Molecular Evolution* 43:304-311.
- Rehner SA (2001). Primers for Elongation Factor 1- α (EF1- α). Online publication. Disponível em <http://ocid.nacse.org/research/deephyphae/EF1primer.pdf>. Acesso em 27 de dezembro de 2015.
- Rivera MC, Wright ER (2000). First report of azalea petal blight caused by *Pestalotiopsis guepini* in Argentina. *Plant Disease* 84:100.
- Rodrigues FA, Silva IT, Cruz MFA, Carré-Missio V (2014). The infection process of *Pestalotiopsis longisetula* leaf spot on strawberry leaves. *Journal of Phytopathology* 162: 690–692.
- Ronquist F, Heulsenbeck JP (2003). MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19:1572-1574.
- Rosado AWC, Machado AR, Pereira OL (2015). Postharvest stem-end on immature coconut caused by *Pestalotiopsis adusta* in Brazil. *Plant Disease* 99: 1036.
- Russomanno OMR, Kruppa PC, Coutinho LN (2007). Doenças fúngicas em palmeiras ornamentais. *Biológico* 69: 9-15.
- Serra IMRS, Coelho RSB (2007). Mancha de pestalotiopsis em helicônia: caracterização da doença e potenciais fontes de resistência. *Fitopatologia brasileira* 32: 44-49.

- Silva GS, Alfenas AC, Alfenas RF, Zauza EV (2005). *Cylindrocladium pteridis* em Palmeiras Ornamentais. *Fitopatologia brasileira* 30:313.
- Singh NI, RK, Devi RKT, Imotomba PK (2000). Peach gummosis : A new disease of peach fruit caused by *Pestalotiopsis disseminata*. *Indian Phytopathology* 53: 335-336.
- Song Y, Geng K, Zhang B, Hyde Kd, Zhao W , Wei J, Kang J, Wang Y (2013). Two new species of *Pestalotiopsis* from Southern China. *Phytotaxa* 126: 22–30.
- Sousa MF, Tavares, RM, Geros H, Lino-Neto T (2004). First report of *Hakea sericea* leaf infection caused by *Pestalotiopsis funerea* in Portugal. *Plant Pathology* 53:535.
- Steyaert RL (1949). Contributions à l'étude monographique de *Pestalotia* de Not. et *Monochaetia* Sacc. (*Truncatella* gen. nov. et *Pestalotiopsis* gen. nov.). *Bull. Jard. Bot. Bruxelles* 19:285–354.
- Strobel GA, Metz AM, Haddad A, Worapong J, Long DM, Ford EJ, Hess WM (2000). Induction of the sexual stage of *Pestalotiopsis microspora*, a taxol-producing fungus. *Microbiology* 146: 2079-2089.
- Strobel G. et al. (2002). Isopestacin, an isobenzofuranone from *Pestalotiopsis microspora*, possessing antifungal and antioxidant activities. *Phytochemistry* 60: 179-183.
- Sutton BC (1980). *The Coelomycetes: Fungi Imperfecti with Pycnidia, Acervuli and Stromata*. Kew: Commonwealth Mycological Institute, 960p.
- 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.
- Tejesvi MV, Mahesh B, Nalini MS, Prakash HS, Kini KR, Subbiah V, Shetty HS (2005). Endophytic fungal assemblages from inner bark and twig of *Terminalia arjuna* W and A. (Combretaceae). *World Journal Microbiology Biotechnology* 21:1535–1540.
- Wendling I et al (2001). *Planejamento e instalações de viveiros*. Editora Aprenda Fácil, Viçosa, 122p.
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor JW (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (Eds) *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic

Press: New York. pp.315-322.

Xu L, Kusakari S, Hosomi A, Toyoda H, Ouchi S (1999). Postharvest diseases of grapes caused by *Pestalotiopsis* spp. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* 65:305–311.

Xu J, Ebada SS, Proksch P (2010). *Pestalotiopsis* a highly creative genus: chemistry and bioactivity of secondary metabolites. *Fungal Diversity* 44: 15-31.

Yuan JI, Jian-Nan BI, Zhu X-D (2006). Taxol producing fungi: a new approach to industrial production of taxol. *Chinese Journal Biotechnology* 22:1-6.

Zhang J, Xu T, Ge Q (2003). Notes on *Pestalotiopsis* from southern China. *Mycotaxon* 85: 91-99.

Zhang Y, Maharachchikumbura SSN, Mckenzie E, Hyde KD (2012). A novel species of *Pestalotiopsis* causing leaf spots of *Trachycarpus fortunei*. *Cryptogamie Mycologie* 33:311-318.

Zhang Y, Maharachchikumbura SSN, Tian Q, Hyde KD (2013). *Pestalotiopsis* species on ornamental plants in Yunnan Province, China. *Sydowia* 65: 113-128.

7. TABELAS E FIGURAS

TABELA 1. Números de acesso do GenBank de sequências de DNA dos isolados utilizados na análise filogenética.

Espécie	Isolado	Hospedeiro/Substrato	Número de acesso do GenBank		
			ITS	βt	TEF1- α
<i>Neopestalotiopsis aotearoa</i>	CBS 367.54*	Lona	KM199369	KM199454	KM199526
<i>N. australis</i>	CBS 114159*	Telopea sp.	KM199348	KM199432	KM199537
<i>N. egyptiaca</i>	CBS 140162	Mangifera indica	KP943747	KP943746	KP943748
<i>N. ellipsospora</i>	MFLUCC 12-0283*	Folhas mortas	JX398980	JX399016	JX399047
	MFLUCC 12-0284	Folhas mortas	JX398981	JX399015	JX399046
<i>N. foedans</i>	CGMCC 3.9123*	Planta de manguezal	JX398987	JX399022	JX399053
	CGMCC 3.9202	Calliandra hemaethocephala	JX398988	JX399023	JX399054
<i>N. javaensis</i>	CBS 257.31	Cocus nucifera	KM199357	KM199437	KM199543
<i>N. mesopotamica</i>	CBS 336.86*	Pinus brutia	KM199362	KM199441	KM199555
	CBS 299.74	Eucalyptus sp.	KM199361	KM199435	KM199541
<i>N. piceana</i>	CBS 394.48*	Picea sp.	KM199368	KM199453	KM199527
	CBS 254.32	Cocos nucifera	KM199372	KM199452	KM199529
<i>N. protearum</i>	CBS 114178	Leucospermum cuneiforme	JN712498	KM199463	KM199542
<i>N. rosae</i>	CBS 101057*	Rosa sp.	KM199359	KM199429	KM199523
	CBS 124745	Paeonia suffruticosa	KM199360	KM199430	KM199524
<i>N. samarangensis</i>	MFLUCC 12-0233*	Syzygium samarangense	JQ968609	JQ968610	JQ968611

	CBS 115451	Árvore não identificada.	KM199365	KM199447	KM199556
N. surinamensis	CBS 450.74*	Solo sob Elaeis guineenses	KM199351	KM199465	KM199518
	CBS 111494	Protea eximia	JX556232	KM199462	KM199530
Neopestalotiopsis sp.	CBS 233.79	Crotalaria juncea	KM199373	KM199464	KM199528
Neopestalotiopsis sp.	CBS 177.25	Dalbergia sp.	KM199370	KM199445	KM199533
Neopestalotiopsis sp.	CBS 274.29	Cocus nucifera	KM199375	KM199448	KM199534
Neopestalotiopsis sp.	CBS 119.75	Achras sapota	KM199356	KM199439	KM199531
N. vitis.	MFLUCC 15-1265	Vitis vinifera	KU140694	KU140685	KU140676
	MFLUCC 15-1266	Vitis vinifera	KU140695	KU140686	KU140677
Pestalotiopsis adusta	ICPM 6088*	-	JX399006	JX399037	JX399070
	MFLUCC 10-0146	Syzygium sp.	JX399007	JX399038	JX399071
	COAD1781	Cocus nucifera	KP308461	KP308539	JX399070
P. digitalis	MFLUCC 14-0208		KP781879	KP781883	-
P. diploclisiae	CBS 115585	Diploclisia glaucescens	KM199315	KM199417	KM199483
	CBS115587*	Diploclisia glaucescens	KM199320	KM199419	KM199486
P. dracontomelon	MFLUCC 14-0207		KP781877	-	KP781880
P. colombiensis	CBS 118553	Eucalyptus eurograndis	KM199307	KM199421	KM199488
P. humus	CBS 336.97*	Solo	KM199317	KM199420	KM199484
	CBS 115450	Iex cinerea	KM199319	KM199418	KM199487
P. inflexa	MFLUCC 12-0270*	Árvore não-identifica	JX399008	JX399039	JX399072
P. kenyana	CBS 442.67*	Coffea sp.	KM199302	KM199395	KM199502
P. malayana	CBS 102220*	Macaranga triloba	KM199306	KM199411	KM199482
P. orizae	CBS 353.69*	Oryza sativa	KM199299	KM199398	KM199496
P. papuana	CBS 331.96*	Solo	KM199321	KM199413	KM199491

	CBS 887.96	Cocos nucifera	KM199318	KM199415	KM199492
P. parva	CBS 265.37*	Delonix regia	KM199312	KM199404	KM199508
	CBS 278.35	Leucothoe fontanesiana	KM199313	KM199405	KM199509
P. rosea	MFLUCC 12-0258	Pinus sp.	JX399005	JX399036	JX399069
P.trachicarpicola	OP068*	Trachycarpus fortunei	JQ845947	JQ845945	JQ845946
Pestalotiopsis sp.	CBS 264.33	Cocus sp.	KM199322	KM199412	KM199490
Pestalotiopsis sp.	CBS 263.33	Rhododendron ponticun	KM199316	KM199414	KM199489
Pseudopestalotiopsis cocos	CBS 272.29*	Cocos nucifera	KM199378	KM199467	KM199553
Ps. indica	CBS 459.78*	Hibiscus rosa-sinensis	KM199381	KM199470	KM199560
Ps. theae	SC011	Camellia sinensis	JQ683726	JQ683710	JQ683742
	MFLUCC 12-0055	Camellia sinensis	JQ683727	JQ683711	JQ683743

*Culturas Ex-tipo.

TABELA 2. Relação dos isolados obtidos de folhas de palmeiras com sintoma de mancha-de-pestalotiopsis.

ISOLADO	HOSPEDEIRO (NOME COMUM)	HERBÁRIO	LOCAL
COAD2017	Dypsis madagascariensis G.Nicholson (Areca de Locuba)	VIC42993	Dona Euzébia
COAD2018	Licuala grandis H.Wendl (Palmeira-leque)	VIC42991	Dona Euzébia
COAD2019	Trachycarpus fortunei (Hook) H.Wendl (Palmeira chinesa)	VIC42996	Dona Euzébia
COAD2020	Phoenix roebelenii O'Brien (Tamareira)	VIC42997	Dona Euzébia
COAD2021	Ptychosperma elegans (R.Br.) Blume (Palmeira solitária)	VIC42992	Dona Euzébia
COAD2022	Wodyetia bifurcata A.K.Irvine (Rabo-de- raposa)	VIC 42994	Dona Euzébia
COAD2023	Cocus nucifera L. (Coqueiro)	VIC 42995	Dona Euzébia
COAD2024	Euterpe edulis Mart. (Palmito Juçara)	VIC 42990	Viçosa
COAD2067	Licuala grandis H.Wendl (Palmeira-leque)	VIC42991	Dona Euzébia

TABELA 3. Características morfológicas de isolados de Neopestalotiopsis e Pestalotiopsis.

Espécie	Forma	Tamanho (µm)	Conídios		Apêndices	
			Células medianas	Apicais	Basal	
COAD2017	Elipsoide, fusiforme	20,3–26,4 x 6-7,4	Versicolores	2-3 un, 21-30 µm	4,4-6,3µm	
COAD2018	Fusiforme	18,6-24 x 5-6,4	Versicolores	2 un, 8,2–17µm	2,5-5,5 µm	
COAD2019	Fusiforme	22,5-29 x 5,5-7	Concolores/Versicolores	2-3 un, 9,5-14µm	3-5,5 µm	
COAD2020	Elipsoide	21,5-27 x 6-7,5	Versicolores	2-3 un, 2,5-4,5 µm	2-6,5 µm	
COAD2021	Elipsoide	21-26 x 5,5-6,5	Versicolores	2-3 un, 11-16,5 µm	2-4,0 µm	
COAD2022	Elipsoide	20-24 x 6-7	Concolores/Versisolores	2 un, 14-21,0 µm	2-5,0 µm	
COAD2023	Elipsoide,fusiforme	20,5-23,5 x 5,5-6,5	Versicolores	2-3 un, 15-20,0 µm	3,0-6,5 µm	
COAD2024	Fusiforme	23-25,0 x 5,2-6,0	Versicolores	2-3 un, 12-19,0 µm	3,5-9,5 µm	

TABELA 4. Taxa de crescimento micelial (mm dia⁻¹) de Pestalotiopsisdaceae em diferentes meios de cultura.

ESPÉCIE	MEIO DE CULTURA					
	BDA	V8	MA	CMA	AV	AA
Neopestalotiopsis sp. COAD2017	15,13 ¹ _a	13,23a	10,9abc	11,2ab	12,0ab	10,0abc
Neopestalotiopsis sp. COAD2018	14,5a	14,8a	11,9a	12,1a	13,8a	11,0ab
Pestalotiopsis sp. COAD2019	7,76b	7,1b	7,5d	6,4c	8,5d	8,4c
Neopestalotiopsis sp. COAD2020	13,7a	12,3a	8,3cd	10,4b	13,5a	9,1bc
Neopestalotiopsis sp. COAD2021	12,7a	13,2a	9,8c	10,8ab	10,9bc	11,3ab
N. surinamensis COAD2022	14,63a	12,9a	10,6abc	11,2ab	11,9ab	12,5a
N. foedans COAD2023	13,0a	13,9a	11,4ab	11,1ab	10,2bcd	11,8a
N.. surinamensis COAD2024	13,2a	12,8a	10,2bc	11,0ab	8,8cd	12,6abc

BDA=Batata-dextrose-ágar; V8= suco V8; MA= milho-ágar; CMA=Cenoura-milho-ágar; AV=Aveia; AA=Ágar-água

¹ Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

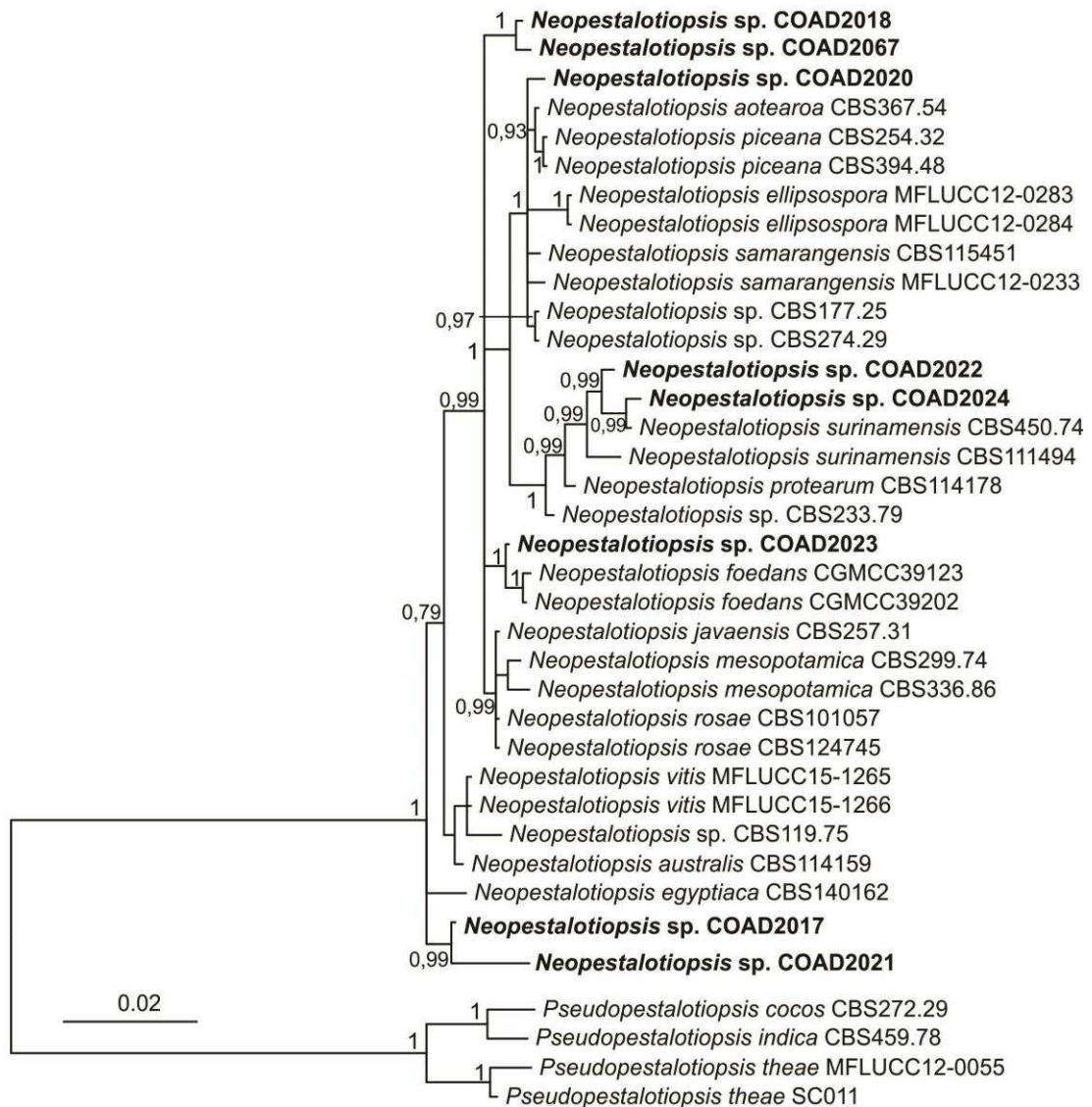


Figura 1. Árvore filogenética multilocus inferida a partir da análise Bayesiana do alinhamento das sequências combinadas (ITS+ β t+TEF1- α) de *Neopestalotiopsis* e *Pseudopestalotiopsis*. Os valores de probabilidade posterior são indicados próximos aos nós. A árvore foi enraizada com *Pseudopestalotiopsis* spp.. Os isolados deste estudo estão destacadas em negrito.

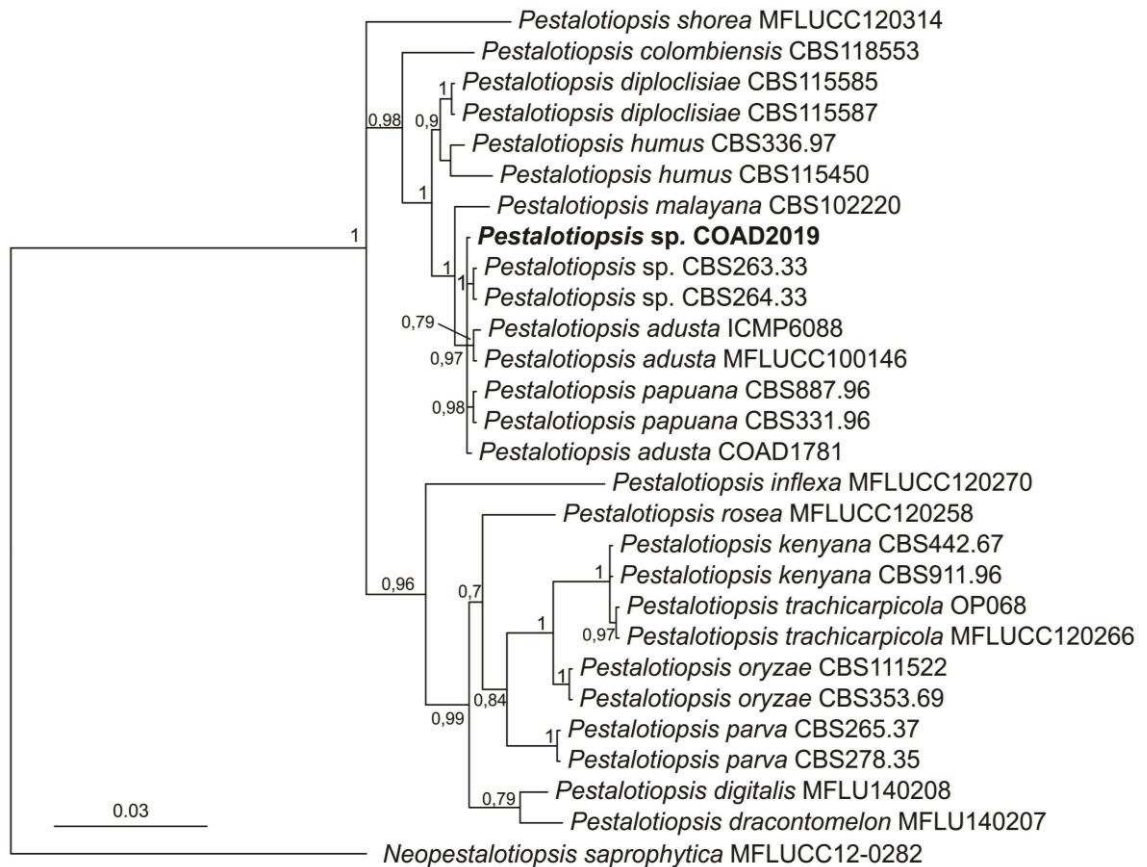


Figura 2. Árvore filogenética multilocus inferida a partir da análise Bayesiana do alinhamento das sequências combinadas (ITS+ β t+TEF1- α) de *Pestalotiopsis*. Os valores de probabilidade posterior são indicados próximos aos nós. A árvore foi enraizada com *Neopestalotiopsis saprophytica* MFLUCC 12-0282. A espécie deste estudo está destacada em negrito.

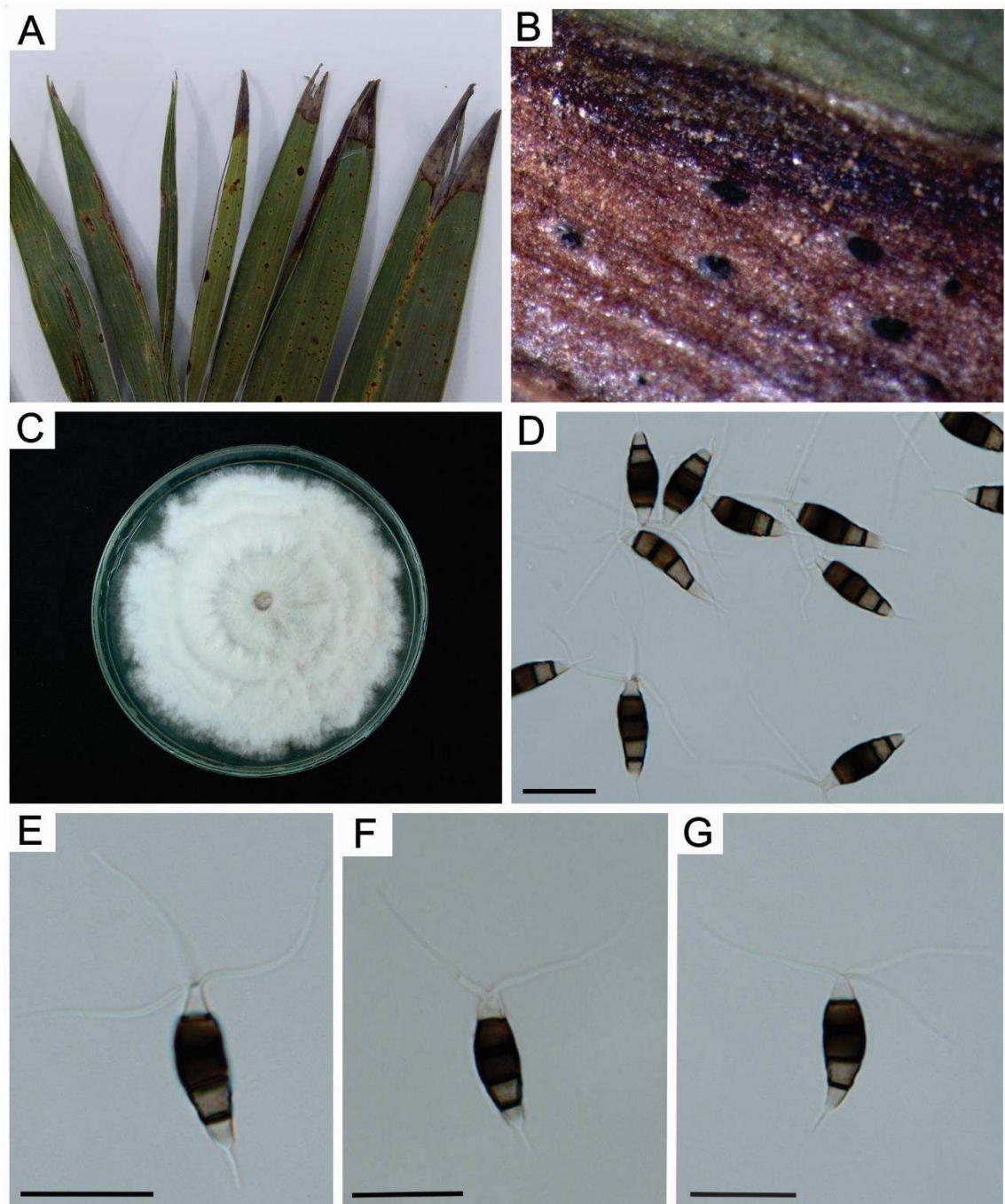


Figura 3. *Neopestalotiopsis* sp. COAD2017. **A.** Folhas de *Dypsis madagascariensis* com sintoma de mancha-de-pestalotiopsis; **B.** Detalhe da lesão; **C.** Cultura em BDA com 5 dias de crescimento; **D-G.** Conídios. Barras = 20 μ m.

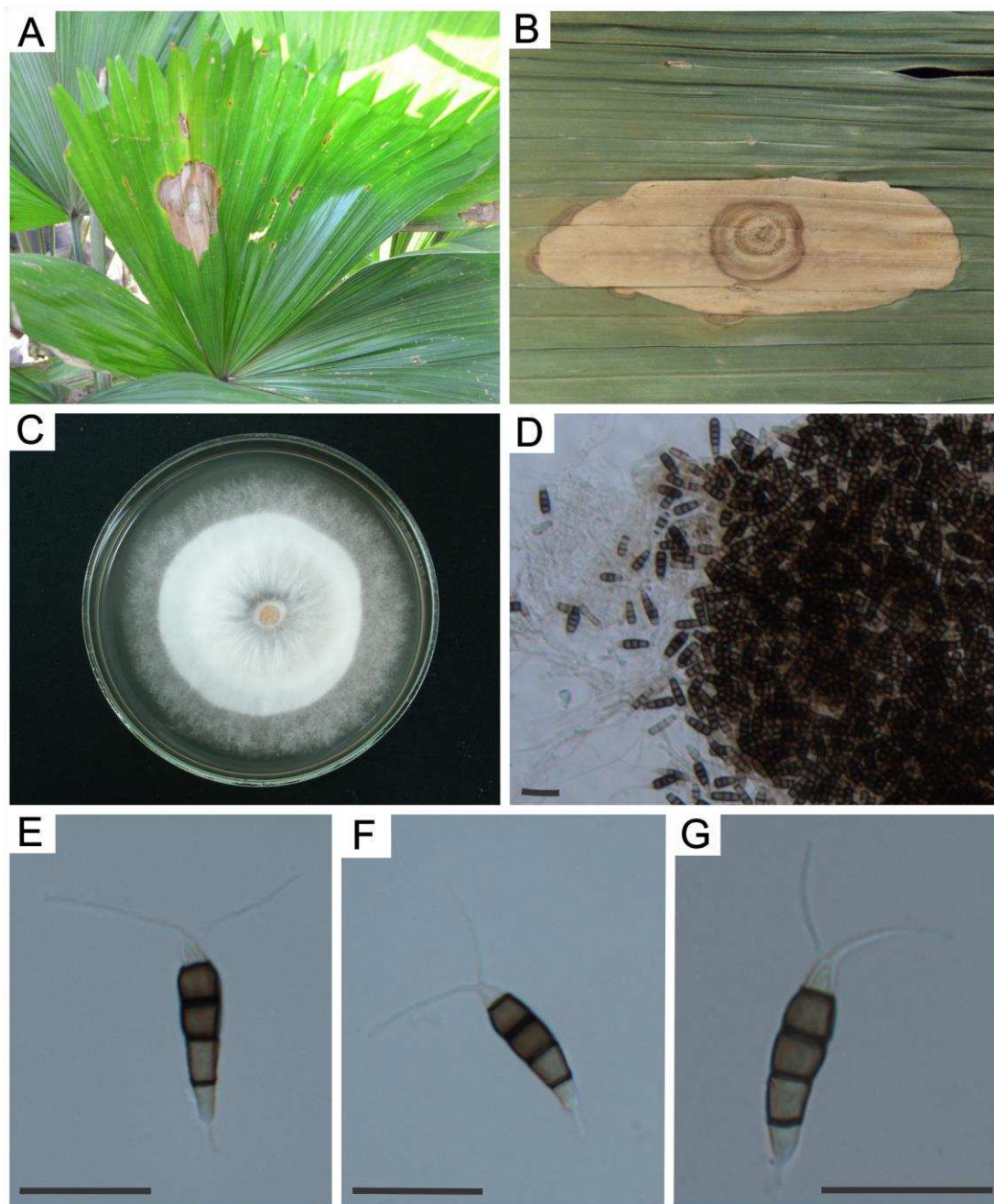


Figura 4. *Neopestalotiopsis* sp. COAD2018. **A.** Folhas de *Licuala grandis* com sintoma de mancha-de-pestalotiopsis; **B.** Detalhe da lesão; **C.** Cultura em BDA com 5 dias de crescimento; **D-G.** Conídios. Barras = 20 μ m.

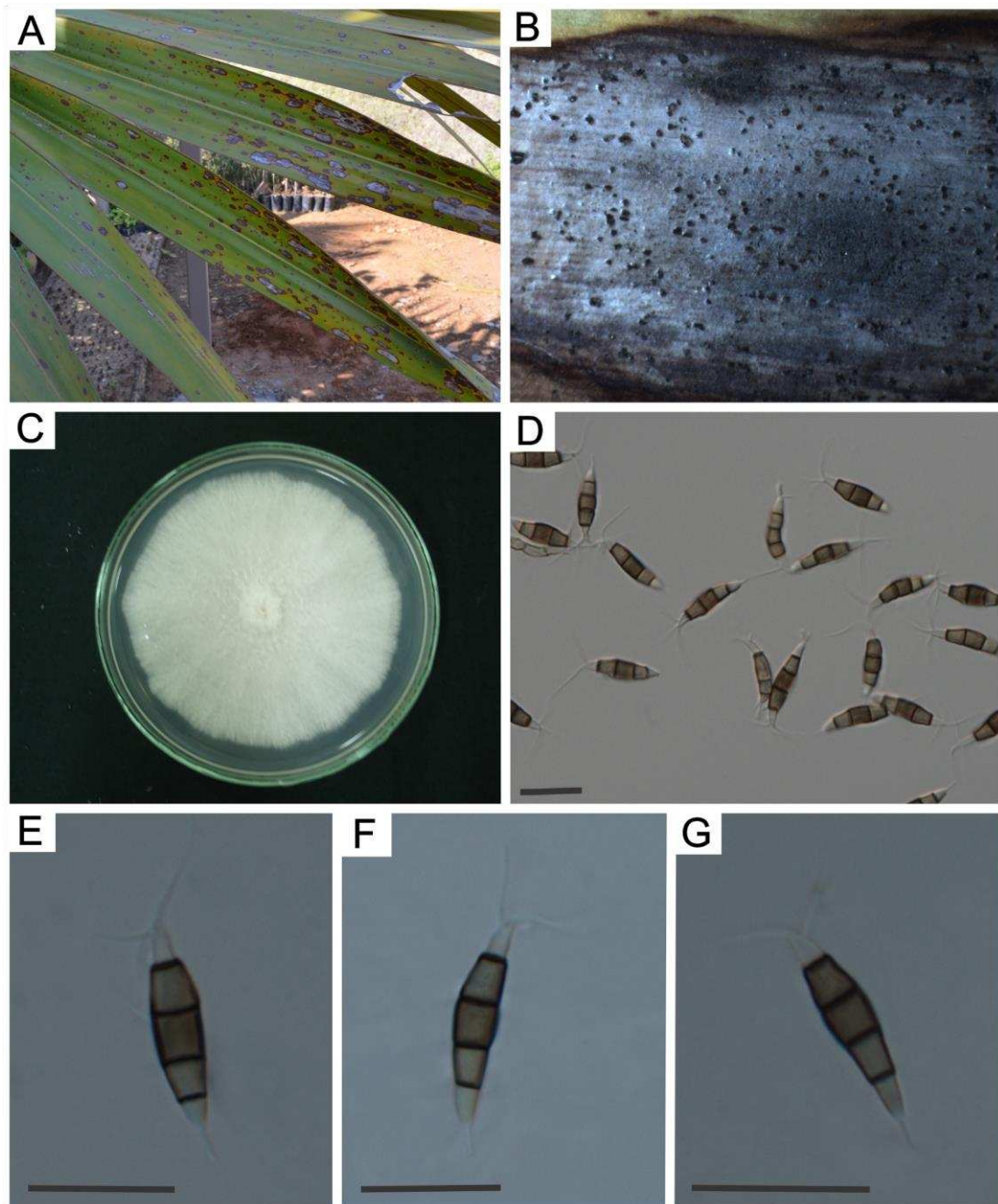


Figura 5. *Pestalotiopsis* sp. COAD2019. **A.** Folhas de *Trachycarpus fortunei* com sintoma de mancha-de-pestalotiopsis; **B.** Detalhe da lesão; **C.** Cultura em BDA com 5 dias de crescimento; **D-G.** Conídios. Barras = 20µm.

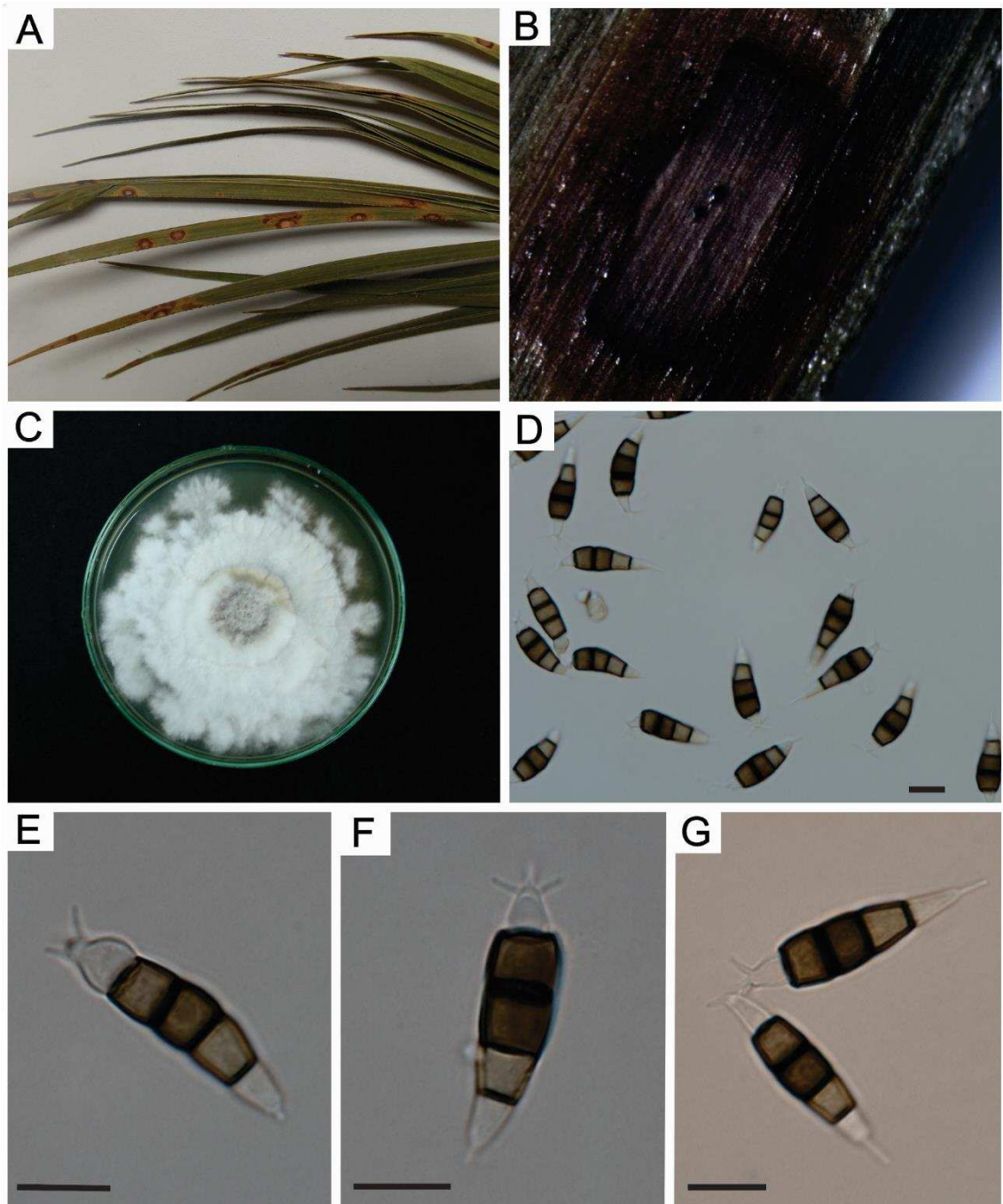


Figura 6. *Neopestalotiopsis* sp. COAD2020. **A.** Folhas de *Phoenix roebelenii* com sintoma de mancha-de-pestalotiopsis; **B.** Detalhe da lesão; **C.** Cultura em BDA com 5 dias de crescimento; **D-G.** Conídios. Barras = 10 μ m.

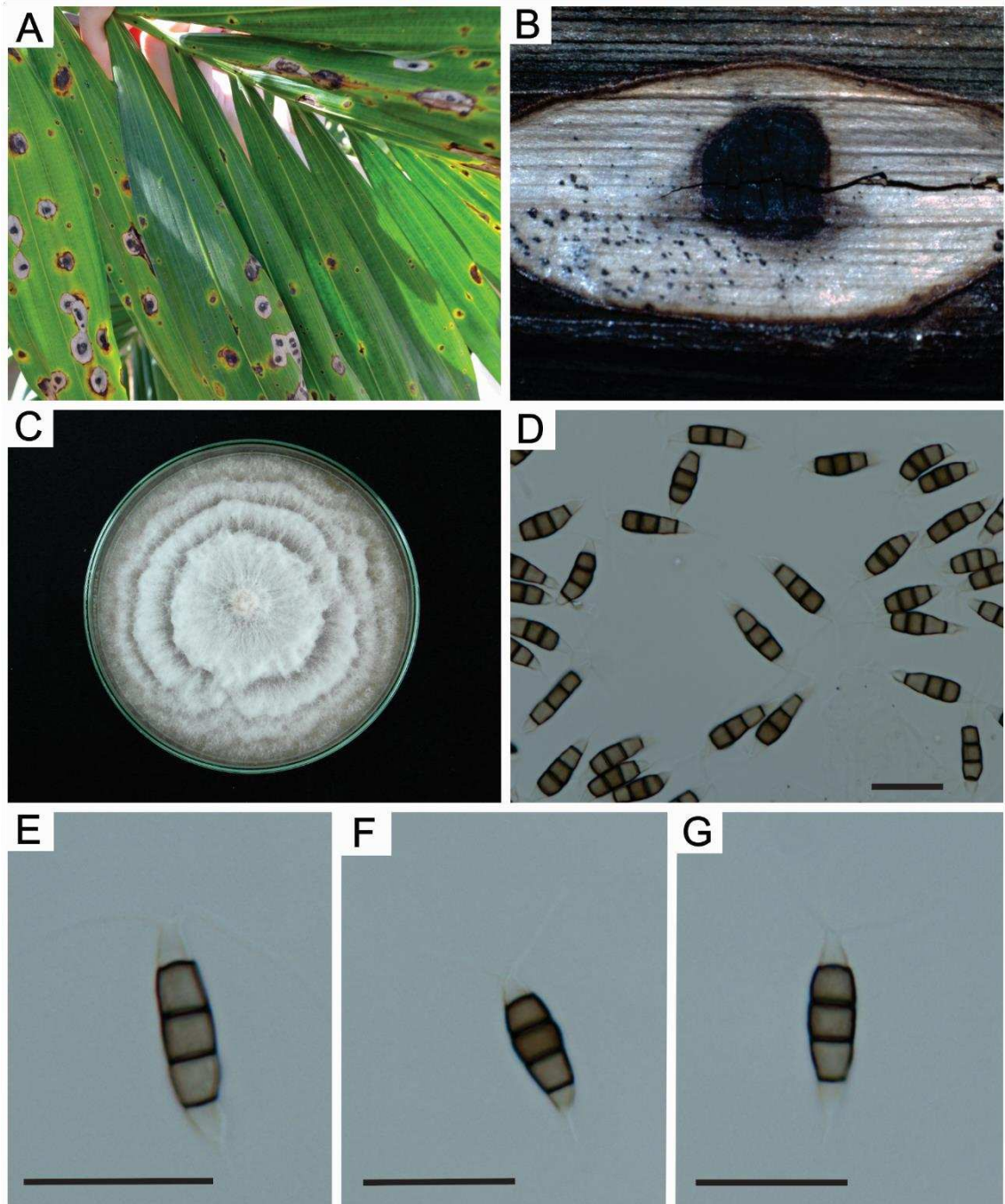


Figura 7. *Neopestalotiopsis* sp. COAD2021. **A.** Folhas de *Ptychosperma elegans* com sintoma de mancha-de-pestalotiopsis; **B.** Detalhe da lesão; **C.** Cultura em BDA com 5 dias de crescimento; **D-G.** Conídios. Barras = 20 μ m.

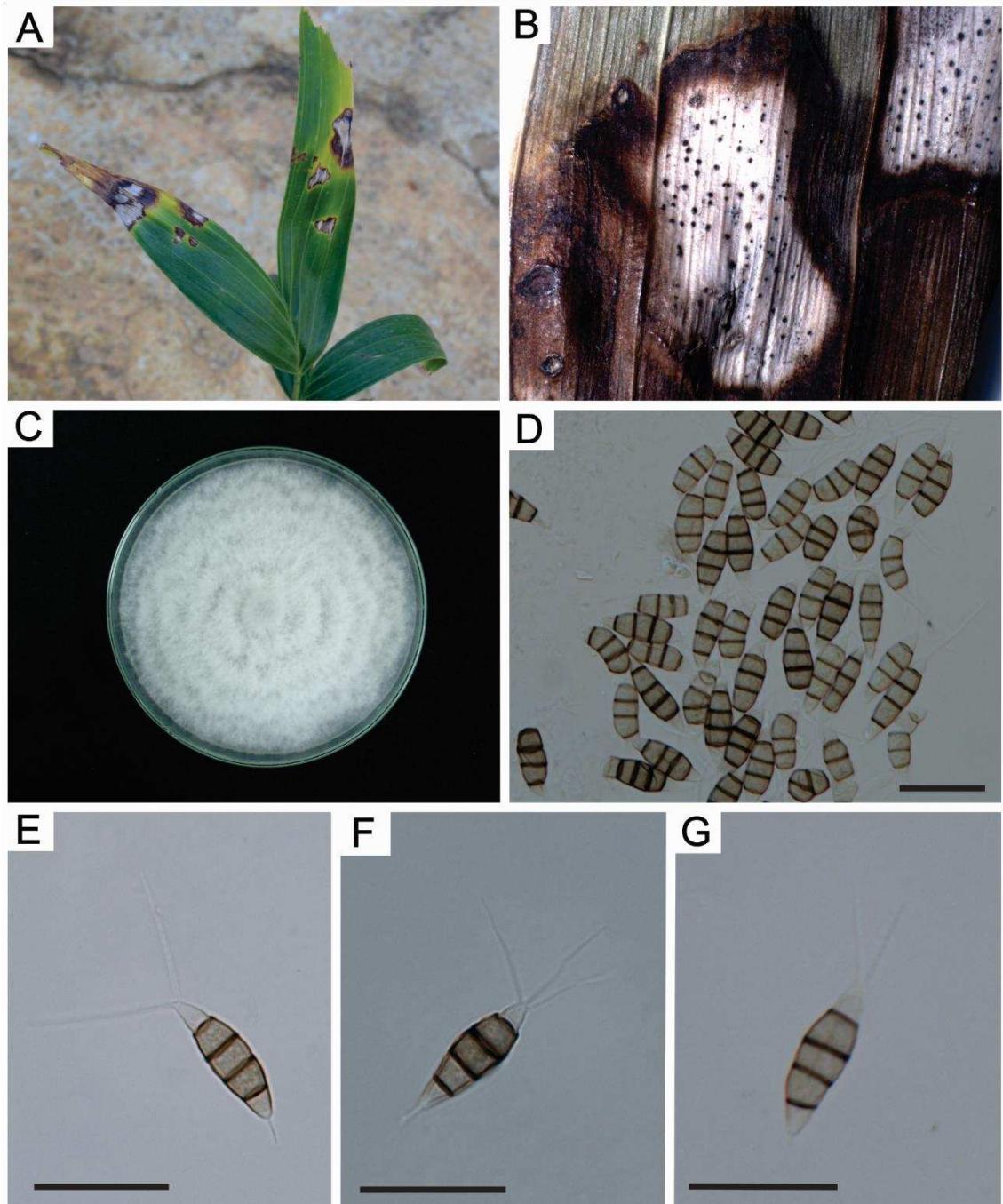


Figura 8. *Neopestalotiopsis surinamensis* COAD2022 sp. 4. **A.** Folhas de *Wodyetia bifuscata* com sintoma de mancha-de-pestalotiopsis; **B.** Detalhe da lesão; **C.** Cultura em BDA com 5 dias de crescimento; **D-G.** Conídios. Barras = 10 μ m.

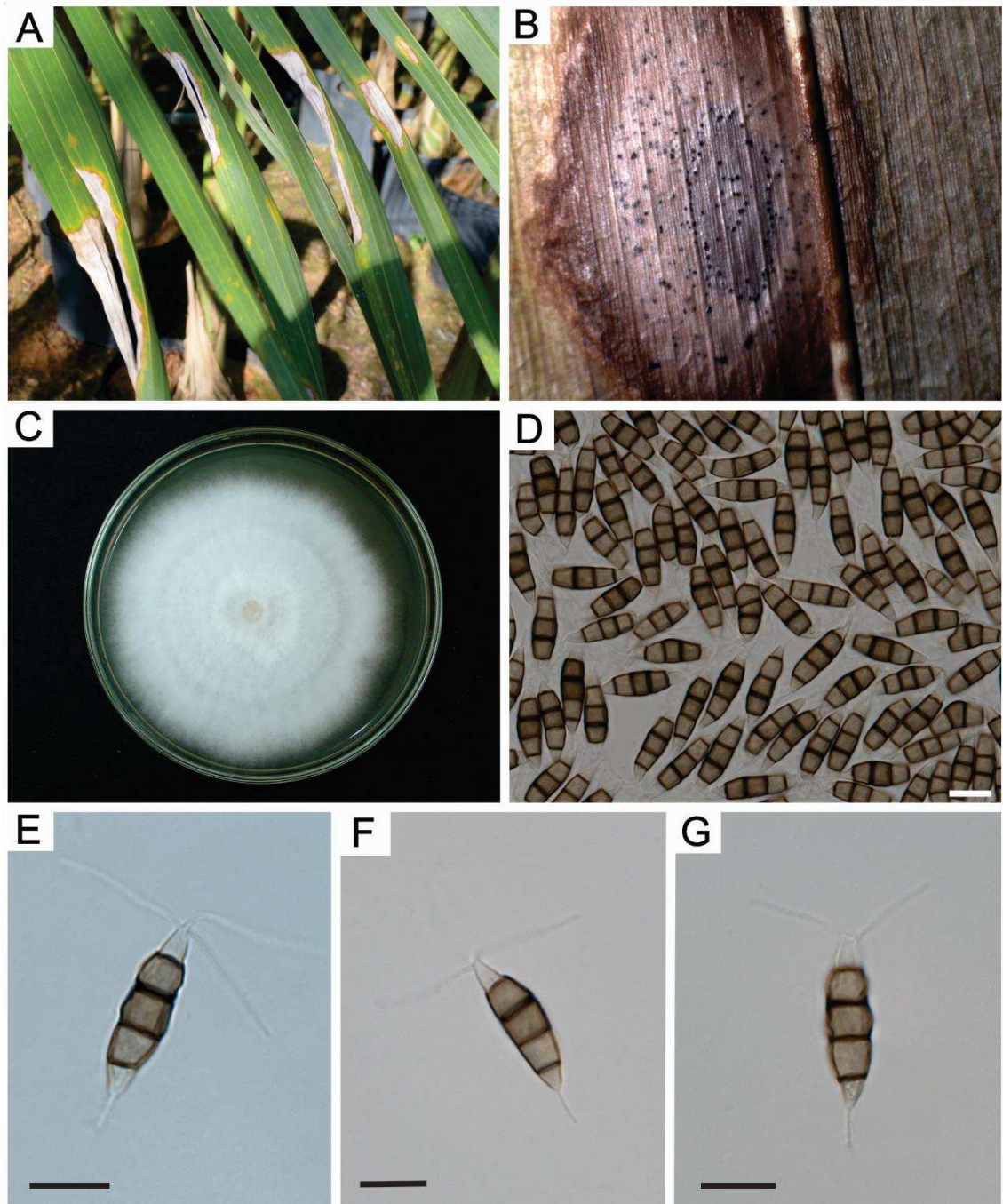


Figura 9. *Neopestalotiopsis foedans* COAD2023. **A.** Folhas de *Cocus nucifera* com sintoma de mancha-de-pestalotiopsis; **B.** Detalhe da lesão; **C.** Cultura em BDA com 5 dias de crescimento; **D-G.** Conídios. Barras = 10 μ m.

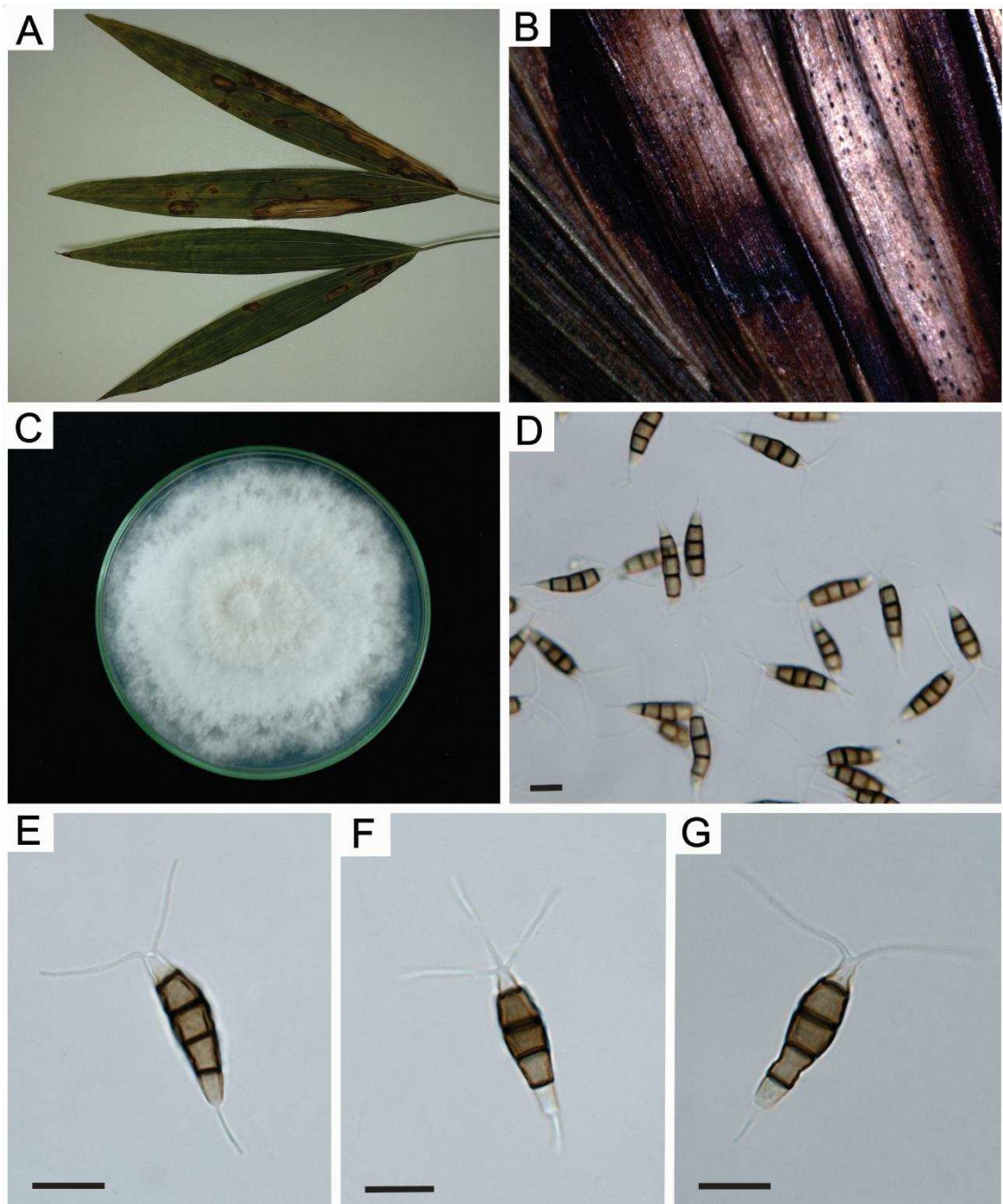


Figura 10. *Neopestalotiopsis surinamensis* COAD2024. **A.** Folhas de *Euterpe edulis* com sintoma de mancha-de-pestalotiopsis; **B.** Detalhe da lesão; **C.** Cultura em BDA com 5 dias de crescimento; **D-G.** Conídios. Barras = 10 μ m.

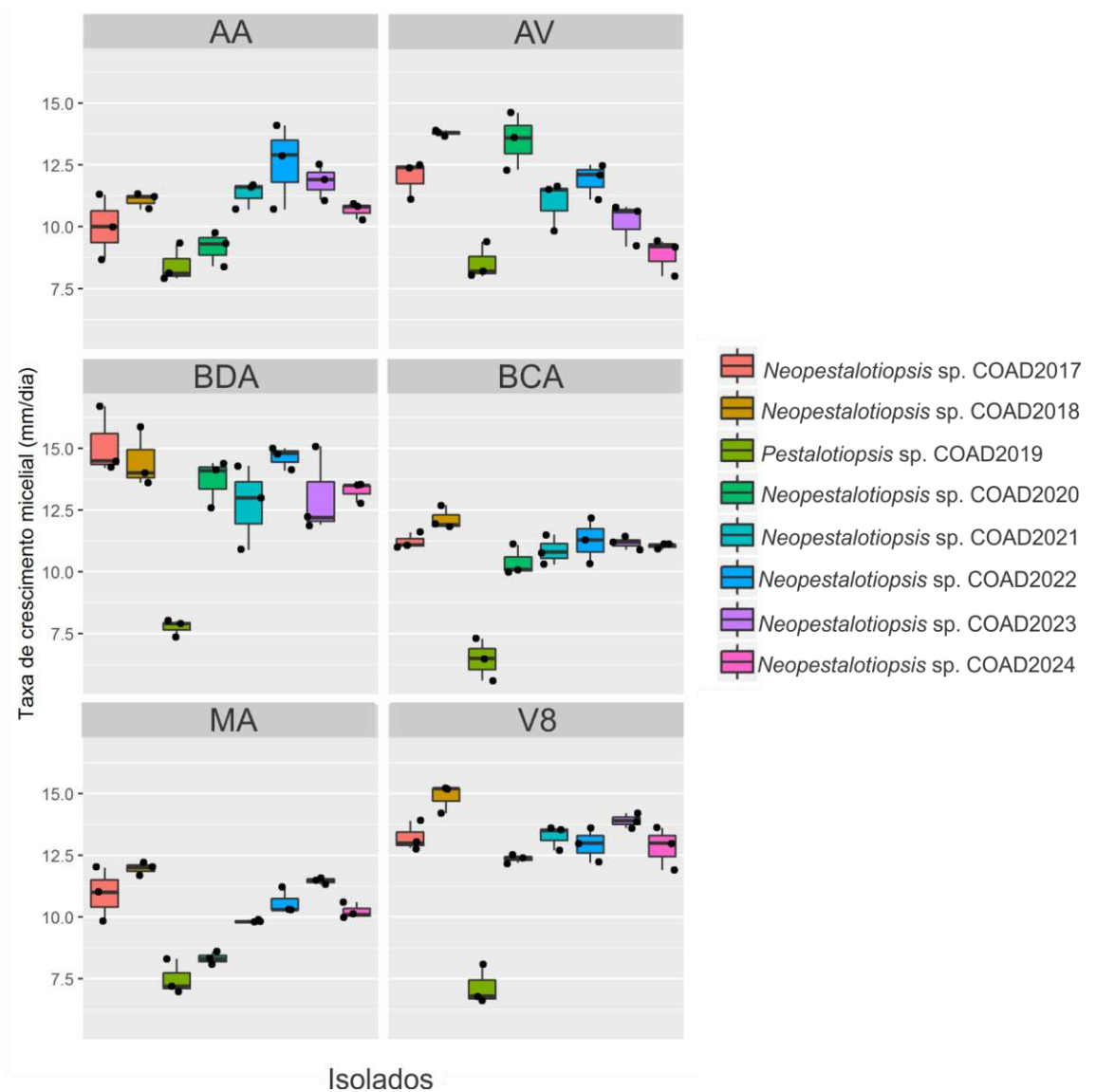


Figura 11. Taxa de crescimento micelial de espécies de *Neopestalotiopsis* e *Pestalotiopsis* em diferentes meios de cultura: Ágar-Água (AA), Aveia (AV), Batata-Cenoura-Ágar (BCA), Batata-Dextrose-Ágar (BDA), Milho-Ágar (MA) e suco V8 (V8).