

**CAIO MATTOS PEREIRA**

**TAXONOMIA DE FUNGOS DOS GÊNEROS *Cladosporium* E *Cordyceps* COM  
POTENCIAL PARA O BIOCONTROLE DE *Hemileia vastatrix***

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*.

Orientador: Robert Weingart Barreto

**VIÇOSA – MINAS GERAIS  
2021**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

P436t  
2021  
Pereira, Caio Mattos, 1994-  
Taxonomia de fungos dos gêneros *Cladosporium* e  
*Cordyceps* com potencial para o biocontrole de *Hemileia  
vastatrix* / Caio Mattos Pereira. – Viçosa, MG, 2021.  
1 dissertação eletrônica (111 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Robert Weingart Barreto.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2021.109>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Ferrugem-do-cafeeiro. 2. Filogenia. 3. Antagonismo.  
4. Micotoxinas. I. Universidade Federal de Viçosa.  
Departamento de Fitopatologia. Programa de Pós-Graduação em  
Fitopatologia. II. Título.

CDD 22. ed. 633.7394

Bibliotecário(a) responsável: Renata de Fátima Alves CRB6/2578

**CAIO MATTOS PEREIRA**

**TAXONOMIA DE FUNGOS DOS GÊNEROS *Cladosporium* E *Cordyceps* COM  
POTENCIAL PARA O BIOCONTROLE DE *Hemileia vastatrix***

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*.

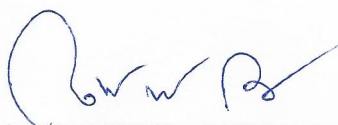
APROVADA: 23 de julho de 2021.

Assentimento:



---

Caio Mattos Pereira  
Autor



---

Robert Weingart Barreto  
Orientador

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, pois sem Ele nada disso seria possível.

Aos meus pais, Amilton e Lusmar, pessoas as quais busco me espelhar diariamente, por todo o amor incondicional, conselhos e apoio para chegar até aqui.

Ao meu avô, Levindo, pelo carinho e companhia aos fins de semana.

À Ana Carolina, por todo o carinho, compreensão, apoio e paciência.

Ao prof. Robert Weingart Barreto, por ter me recebido em seu laboratório enquanto graduando e pelos ensinamentos, orientação, conselhos e incentivo contínuo desde então.

Aos doutores Adans A. Colmán, Maria del Carmen H. Rodríguez, Carlos E. A. Perez e em especial à Sara S. Sarmiento, pelas contribuições valiosas durante o desenvolvimento dessa dissertação.

Aos membros (atuais e antigos) da Clínica de Doenças, em especial: André, Bruno, Célio, Davi, Débora, Henrique, José Orlando, Laura, Letícia, Marina, Miraine, Natanael, Nívia e Thaisa, pela amizade, contribuições, trocas de conhecimentos, conselhos e divertido convívio ao longo desses anos.

Aos avaliadores dessa dissertação: Bruno S. Vieira, Gleiber Q. Furtado e Lucas M. de Abreu, pela disponibilidade e valiosas contribuições.

Aos professores do Departamento de Fitopatologia, pelos conhecimentos transmitidos durante o treinamento.

Aos funcionários do Departamento de Fitopatologia, pela atenção, disponibilidade e serviços prestados.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos e a World Coffee Research, pelo financiamento do projeto. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

A todas as pessoas que me apoiaram e contribuíram de alguma maneira para que chegasse até aqui e concluísse mais essa etapa.

**Muito obrigado!**

## **BIOGRAFIA**

CAIO MATTOS PEREIRA, filho de Amilton Vagner Pereira e Lusmar Mattos Andrade Pereira, nasceu na cidade de São Paulo (SP), no dia 29 de agosto de 1994, onde cursou os ensinos fundamental e médio, concluindo-os em dezembro de 2012.

Em 2014, iniciou o curso de graduação em Agronomia na Universidade Federal de Viçosa, graduando-se em julho de 2019.

Em março de 2020, iniciou estudos no Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, em nível de Mestrado, na Universidade Federal de Viçosa, sob orientação do professor Robert Weingart Barreto.

## RESUMO

PEREIRA, Caio M., M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2021. **Taxonomia de fungos dos gêneros *Cladosporium* e *Cordyceps* com potencial para o biocontrole de *Hemileia vastatrix*.** Orientador: Robert Weingart Barreto.

A cafeicultura é uma das principais atividades agrícolas no mundo e seu produto, o café, movimenta bilhões de dólares anualmente. Nesse cenário, o Brasil se sobressai como maior produtor de tal *commodity*. Dentre as doenças que acometem a cultura destaca-se a ferrugem do cafeeiro, causada por *Hemileia vastatrix*. Em 2014, teve início um grande projeto em busca de potenciais antagonistas a este patógeno com coletas realizadas em diferentes localidades do Brasil, Paraguai, Quênia, Camarões e Etiópia. O levantamento resultou em mais de 1.500 isolados fúngicos endofíticos ao cafeeiro ou supostos micoparasitas de *H. vastatrix*, dentre eles, vários isolados de *Cladosporium* spp. (supostos micoparasitas) e uma espécie do gênero *Cordyceps* (endofítico). O presente trabalho teve por objetivo esclarecer a identidade de tais isolados e avaliar preliminarmente o seu potencial para o biocontrole de *H. vastatrix* através de ensaios *in vitro*. Em relação aos isolados de *Cladosporium*, inferências filogenéticas a partir de ACT e ITS identificaram quatro espécies já conhecidas (*C. asperulatum*, *C. sphaerospermum*, *C. tenuissimum* e *C. xantochromaticum*). Outros dez isolados foram reconhecidos como representantes de possíveis sete espécies novas. Nos testes *in vitro* observou-se redução significativa da germinação dos uredósporos de *H. vastatrix* tratados com determinados isolados de *Cladosporium*, quando comparados à testemunha. Não foram encontrados relatos anteriores de membros do gênero *Cladosporium* crescendo sobre urédias de *H. vastatrix* e avaliações dos seus efeitos sobre uredósporos do patógeno são também inéditos. Análises filogenéticas com base em ITS, LSU e TEF, revelaram que o isolado endofítico pertence à espécie *Cordyceps cateniannulata* e observações morfológicas confirmaram essa identificação. Testes *in vitro* demonstraram significativa redução na germinação de uredósporos do patógeno após tratamento com *C. cateniannulata*, em comparação ao controle. *Cordyceps cateniannulata* tem apresentado potencial para reduzir a severidade da ferrugem do cafeeiro e testes preliminares são discutidos. Também é discutida a observação de seu crescimento sobre urédias de *H. vastatrix*, indicando um possível micoparasitismo.

**Palavras-chave:** Ferrugem do cafeeiro. Filogenia. Antagonismo. Uredósporo. Filtrado fúngico.

## ABSTRACT

PEREIRA, Caio M., M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2021. **Taxonomy of fungi of *Cladosporium* and *Cordyceps* genera with potential for biocontrol of *Hemileia vastatrix*.** Advisor: Robert Weingart Barreto.

Coffee cultivation is one of the main agricultural activities in the world and its product, the coffee, moves billions of dollars annually. In this scenario, Brazil stands out as the largest producer of this commodity. Among the diseases that affect the culture the coffee leaf rust features, caused by the fungus *Hemileia vastatrix*. In 2014, a large project began in search of potential antagonists to this pathogen, with samples coming from different locations in Brazil, Paraguay, Kenya, Cameroon and Ethiopia. This survey resulted in more than 1,500 fungal isolates endophytes to coffee or mycoparasites of *H. vastatrix*, among them several isolates of *Cladosporium* spp. (supposed mycoparasites) and a species of *Cordyceps* genus (endophytic). The present study aimed to clarify the identity of this isolates and preliminarily evaluate their potential for the biocontrol of *H. vastatrix* through *in vitro* assays. Regarding to *Cladosporium*, phylogenetic inferences from ACT and ITS identified four species already known (*C. asperulatum*, *C. sphaerospermum*, *C. tenuissimum* e *C. xantochromaticum*). Another ten isolates were recognized as representatives of possible seven new species. During *in vitro* tests it was observed a significant reduction of *H. vastatrix* uredospores germination treated with certain *Cladosporium* isolates, when compared to the control. No previous reports were found about members of the *Cladosporium* genus growing over *H. vastatrix* uredia and evaluations of theirs effects over the pathogen uredospores are unpublished. Phylogenetic analysis based on ITS, LSU and TEF, revealed that the endophytic isolate belongs to the *Cordyceps cateniannulata* species and morphological observations confirmed this identification. *In vitro* tests demonstrated a significant reduction in the germination of *H. vastatrix* uredospores after treatment with *C. cateniannulata*, compared to the control. *Cordyceps cateniannulata* has shown potential to reduce the severity of coffee leaf rust and preliminarily testes are discussed. The observation of its growth over *H. vastatrix* uredia is also discussed, indicating a possible mycoparasitism.

**Keywords:** Coffee leaf rust. Phylogeny. Antagonism. Uredospore. Fungal filtrate.

## SUMÁRIO

<b>Introdução Geral .....</b>	<b>10</b>
1. O cafeeiro – Origem e relevância.....	10
2. Ferrugem do cafeeiro – importância, características e medidas de manejo .....	11
3. Fungos antagonistas de <i>Hemileia vastatrix</i> .....	14
<b>Referências.....</b>	<b>16</b>
<b>Capítulo I: <i>Cladosporium</i> spp. micoparasitas de <i>Hemileia vastatrix</i>: taxonomia e avaliação de potencial para o biocontrole.....</b>	
<b>1. Introdução.....</b>	<b>23</b>
<b>2. Material e Métodos.....</b>	<b>25</b>
2.1. Obtenção, armazenamento e preservação dos isolados.....	25
2.2. Caracterização morfológica .....	26
2.3. Caracterização molecular.....	26
2.3.1. Extração de DNA .....	26
2.3.2. PCR e sequenciamento.....	28
2.3.3. Análises filogenéticas.....	28
2.4. Cultivo e coleta de uredósporos de <i>Hemileia vastatrix</i> .....	38
2.5. Testes <i>in vitro</i> : <i>Cladosporium</i> spp. × <i>Hemileia vastatrix</i> .....	38
2.5.1. Avaliação da interferência na germinação de uredósporos de <i>Hemileia vastatrix</i> pela exposição a suspensões de conídios de <i>Cladosporium</i> spp. ....	39
2.5.2. Avaliação da interferência na germinação de uredósporos de <i>Hemileia vastatrix</i> pela exposição a filtrados de culturas de <i>Cladosporium</i> spp. livres de conídios .....	39
2.5.3. Análise dos dados.....	40
<b>3. Resultados .....</b>	<b>41</b>
3.1. Filogenia de <i>Cladosporium</i> spp. ....	41
3.2. Taxonomia de <i>Cladosporium</i> spp. ....	48

3.3. Avaliação do potencial antagonista de <i>Cladosporium</i> spp. – inibição da germinação dos uredósporos de <i>Hemileia vastatrix</i> .....	67
<b>4. Discussão .....</b>	<b>70</b>
<b>5. Referências .....</b>	<b>74</b>

**Capítulo II: Esclarecimento da identidade de um isolado de *Cordyceps*, obtido como endófito de *Coffea arabica*, e avaliação de seu potencial para o biocontrole de *Hemileia vastatrix* .....**

<b>1. Introdução .....</b>	<b>84</b>
<b>2. Material e Métodos .....</b>	<b>86</b>
2.1. Obtenção, armazenamento e preservação do isolado.....	86
2.2. Caracterização morfológica .....	86
2.3. Caracterização molecular.....	87
2.3.1. Extração de DNA.....	87
2.3.2. PCR e sequenciamento .....	87
2.3.3. Análises filogenéticas.....	88
2.4. Produção e obtenção dos uredósporos de <i>Hemileia vastatrix</i> .....	93
2.5. Avaliação do potencial de biocontrole mediante testes <i>in vitro</i> .....	93
2.5.1. Efeito de suspensão de conídios de COAD 3349 sobre germinação de uredósporos de <i>Hemileia vastatrix</i> .....	93
2.5.2. Efeito do filtrado de cultura de COAD 3349 sobre germinação de uredósporos de <i>Hemileia vastatrix</i> .....	94
2.5.3. Análise dos dados.....	94
<b>3. Resultados .....</b>	<b>94</b>
3.1. Filogenia .....	94
3.2. Taxonomia .....	97
3.3. Efeito de suspensão de conídios de COAD 3349 e de seu filtrado sobre germinação de uredósporos de <i>Hemileia vastatrix</i> .....	99

<b>4. Discussão .....</b>	<b>99</b>
<b>5. Referências .....</b>	<b>104</b>
<b>Conclusões Gerais.....</b>	<b>111</b>

## Introdução Geral

### 1. O cafeeiro – Origem e relevância

Dentre as espécies vegetais cultivadas em larga escala o cafeeiro é uma das mais relevantes. Tanto pela sua grande importância econômica, pois seu produto, o café, sustenta um setor que movimenta bilhões de dólares anualmente (DAVIS et al., 2020), quanto pela popularidade de sua bebida, uma das mais consumidas mundialmente (SAKIYAMA, 2015). Destaca-se ainda o seu valor histórico e cultural, uma vez que muitos movimentos políticos e culturais nos séculos XIX e XX no Brasil e em outros países foram influenciados pela tradição da socialização para o consumo da bebida (CHALFOUN; REIS, 2010; LAWS, 2010).

O cafeeiro pertence à família Rubiaceae e ao gênero *Coffea*. Grande parte dos representantes desse gênero são oriundos da África, mas espécies descritas mais recentemente têm origem na Ásia e Oceania (DAVIS et al., 2011). Segundo Davis et al. (2011), existem 124 espécies de cafeeiros descritas, porém, somente duas têm relevância econômica para produção da bebida e, portanto, se destacam economicamente, sendo elas: *Coffea arabica* (café arábica) e *Coffea canephora* (café conilon). Estima-se que, juntas, as espécies serão responsáveis por uma produção global de aproximadamente 10,53 milhões de toneladas de café na safra 2020/21 (United States Department of Agriculture – USDA, 2021), sendo quase 60% desse valor oriundo de *C. arabica* e o restante de *C. canephora* (International Coffee Organization – ICO, 2021).

Desde a sua introdução no Brasil, no início do século XVIII (CHALFOUN; REIS, 2010), a cafeicultura foi ganhando destaque na agricultura nacional, tornando-se uma das principais atividades agrícolas do país (SAKIYAMA, 2015). Atualmente, ambas as espécies (*C. arabica* e *C. canephora*) são cultivadas no Brasil, sendo o país o maior produtor dessa commodity, responsável por aproximadamente 40% do café produzido no mundo (ICO, 2021). Ressalta-se ainda sua posição de maior exportador mundial de café (USDA, 2021).

Portanto, o cafeeiro é uma planta extremamente relevante em diversos aspectos e, como todas as outras, está constantemente sujeito a desordens fisiológicas devido a dois grandes motivos: a) a ocorrência de estresses abióticos (deficiência nutricional, hídrica, estresse salino, calor e frio, por exemplo) e b) estresses bióticos resultantes da competição com plantas daninhas e o ataque por pragas e agentes patogênicos, como fungos, vírus, nematoides e bactérias

(SUZUKI et al., 2014). Tais fatores são responsáveis por limitar a produção, aumentar os custos de produção e reduzir a qualidade da bebida produzida.

## 2. Ferrugem do cafeeiro – importância, características e medidas de manejo

Dentre as doenças que acometem a cultura do cafeeiro, a ferrugem é uma das mais importante, ocasionando reduções na produção de 30 a 50%, o que resulta em perdas econômicas anuais de aproximadamente US\$1–2 bilhões (KOUTOULEAS et al., 2019; TALHINHAS et al., 2017; ZAMBOLIM, 2016; McCOOK, 2006). A doença foi encontrada pela primeira vez no mundo em 1861 (CARVALHO et al., 2010) e teve seu agente etiológico descrito em 1869, ano em que ocorreu um grande surto de ferrugem em cafezais no Ceilão (atual Sri Lanka), o que resultou no completo abandono da cultura naquela região (McCOOK; VANDERMEER, 2015; BERKELEY; BROOME, 1869). Mais recentemente, países da América Latina sofreram com surtos severos de ferrugem, a saber: Colômbia, entre 2008 e 2011; países da América Central e México, entre 2012 e 2013; e no Peru e Equador, em 2013. A doença foi responsável por diminuir a produção consideravelmente, impactando a vida de produtores, trabalhadores e desencadeando graves problemas econômicos e sociais (AVELINO et al., 2015; McCOOK; VANDERMEER, 2015). No Brasil, os primeiros relatos do patógeno datam de 1970, em uma ocorrência no sul da Bahia. Atualmente a doença encontra-se presente em todas as regiões brasileiras produtoras de café arábica e café conilon (ZAMBOLIM, 2018), mas sem causar perdas como nos países citados anteriormente – principalmente graças ao cultivo de materiais com certa resistência genética e, ainda mais, devido a ampla aplicação de fungicidas.

A ferrugem do cafeeiro é causada por *Hemileia vastatrix*, um fungo membro da ordem *Pucciniales* e da família *Zaghouaniaceae* (AIME; McTAGGART, 2021). Trata-se de um organismo parasita obrigatório (biotrófico) capaz de infectar todas as espécies cultivadas do gênero *Coffea*, causando doença severa particularmente em *C. arabica* (KOUTOULEAS et al., 2019; AGRIOS, 2005).

O processo infeccioso tem início com a chegada do uredósporo às plantas. Na presença de água livre ocorre sua germinação, formação de tubo germinativo e desenvolvimento do apressório que penetra o tecido através dos estômatos e forma a hifa de penetração (TALHINHAS et al., 2017). O fungo cresce entre as células da planta e forma os haustórios,

que são responsáveis pela absorção de nutrientes. Aproximadamente 25 a 30 dias após o início da infecção novos uredósporos surgirão através dos estômatos dando continuidade ao ciclo da doença (AGRIOS, 2005). O fungo forma ainda outros dois tipos de esporos: os teliósporos (são menos comuns e aparecem em lesões velhas) e os basidiósporos (não infectam cafeeiros e seu papel no ciclo de vida do patógeno é desconhecido). Os estádios de pícnio e écio são desconhecidos na natureza (ZAMBOLIM, 2016; CARVALHO et al., 2010).

Os sintomas da doença são observados nas folhas. Inicialmente, na face abaxial, nota-se pequenas manchas de cor amarelo-pálida, com diâmetro variável entre 1 e 3 mm. Com o desenvolvimento do patógeno tais manchas crescem, podendo chegar a até 2 cm de diâmetro. Além disso, assumem aspecto pulverulento (em função dos uredósporos) de coloração amarelo-alaranjada. Na face adaxial é possível se observar manchas cloróticas amareladas, correspondentes aos limites da pústula na face oposta. Folhas infectadas caem prematuramente deixando longas extensões de ramos sem folhas, resultando no atraso do desenvolvimento de plantas jovens ou debilitando plantas adultas e comprometendo, conseqüentemente, sua produção (ZAMBOLIM, 2018; ARNESON, 2011).

Dentre os métodos de manejo recomendados para a ferrugem do cafeeiro, o uso de cultivares resistentes tem sido um dos mais eficientes e o melhor do ponto de vista econômico e ambiental (TALHINHAS et al., 2017; ZAMBOLIM, 2016). Diversos programas de melhoramento vêm desenvolvendo variedades resistentes a *H. vastatrix*, objetivando uma resistência durável. Porém, o fungo apresenta grande variabilidade genética e fisiológica e grande potencial evolutivo, resultando no surgimento de raças que suplantam a resistência de novas cultivares, reduzindo sua durabilidade (ZAMBOLIM, 2016; AVELINO et al., 2015).

Outra alternativa de manejo é o controle químico, o qual é amplamente usado em países como o Brasil. Tal medida se baseia no uso de fungicidas protetores, como os cúpricos (calda bordalesa, calda Viçosa, oxiclureto de cobre, por exemplo) e/ou sistêmicos, como triazóis e estrobilurinas (TALHINHAS et al., 2017). O controle químico também apresenta grandes limitações. Uma delas é o seu custo que pode torná-lo inacessível para muitos produtores, a exemplo do que ocorre na América Latina (McCOOK; VANDERMEER, 2015). Um outro problema é o emprego incorreto de substâncias sistêmicas, o que pode levar ao desenvolvimento de populações resistentes aos fungicidas (TALHINHAS et al., 2017; ZAMBOLIM, 2016). E nos mercados consumidores internacionais, observa-se também uma rejeição crescente ao uso intensivo de fungicidas pelos produtores de café, tanto pelo impacto ambiental, que a prática

pode provocar, como pela possibilidade da presença de resíduos de tais substâncias no produto final.

O escape também é considerado uma medida eficaz para o manejo da ferrugem do cafeeiro. Os danos causados pelo patógeno têm sido limitados em cultivos em locais elevados, pois a severidade da doença tende a decrescer conforme o aumento da altitude (BELACHEW et al., 2020). No entanto, devidos às mudanças climáticas, esse cenário parece estar mudando. O aumento da temperatura e a redução da amplitude térmica está afetando o desenvolvimento do patógeno, reduzindo o período latente da doença e acelerando a ocorrência de epidemias. Na América Central, onde até então considerava-se que a ferrugem não era um problema em áreas elevadas, assim altitudes superiores a 1.000 m seriam suficientes para limitar a ocorrência da doença. Porém, surtos epidêmicos recentes na Guatemala não foram impedidos por tais altitudes. Devido às mudanças climáticas, notou-se que a severidade da ferrugem foi praticamente similar em locais com altitudes variando entre 400 e 1.400 m (AVELINO et al., 2015).

Assim, dada a dificuldade em se obter cultivares com resistência durável a *H. vastatrix*, os problemas relacionados ao uso de fungicidas e aqueles ligados às mudanças climáticas, faz-se necessário o desenvolvimento e adoção de novas medidas de controle. Nesse cenário volta-se a atenção a uma estratégia ainda pouco explorada, o controle biológico, uma alternativa sustentável, ecológica e que pode se tornar economicamente viável para o manejo da doença (World Coffee Research – WCR, 2019).

Estudos buscando potenciais agentes de biocontrole da ferrugem do cafeeiro têm sido feitos ao longo dos anos e resultados promissores foram obtidos por pesquisadores que testaram estirpes de diferentes gêneros bacterianos, tais como *Bacillus*, *Brevibacillus* e *Pseudomonas* (SILVA et al., 2012; HADDAD et al., 2009).

Em contraste, há poucos estudos envolvendo avaliação de fungos inimigos naturais de *H. vastatrix* (SALCEDO-SARMIENTO et al., 2021), apesar de seu amplo uso no manejo de diversas doenças fúngicas. Assim, há aqui uma grande oportunidade, com um nicho diverso e rico em potenciais agentes de controle biológico a ser explorado.

### 3. Fungos antagonistas de *Hemileia vastatrix*

Em 2014, teve início um projeto financiado pela organização não governamental WCR visando o levantamento de fungos inimigos naturais a *H. vastatrix*. Coletas realizadas nos Camarões, na Etiópia, no Quênia e no Brasil resultaram em uma grande diversidade de fungos (mais de 1500 isolados) que foram separados em dois grupos ecológicos arbitrários – endofíticos e micoparasitas (WCR, 2019).

Fungos endofíticos são todos aqueles capazes de colonizar o interior dos tecidos de plantas hospedeiras sem lhes causar danos aparentes (PETRINI, 1991). Dentre os benefícios que alguns desses organismos podem trazer destaca-se a capacidade de atuarem como “guarda costas”, protegendo a planta contra o ataque de insetos e patógenos (ARNOLD; LEWIS, 2005; ARNOLD et al., 2003). Isolados endofíticos de *Trichoderma*, obtidos no levantamento citado anteriormente, já apresentaram resultados promissores, sendo capazes de inibir a germinação de *H. vastatrix in vitro* e de reduzir a severidade da doença *in planta* em testes conduzidos em casa de vegetação (RODRÍGUEZ, 2019).

Já o micoparasitismo, segundo Karlsson et al. (2017), acontece quando um fungo (micoparasita) é capaz de parasitar e obter nutrientes de outro fungo (hospedeiro). Tal interação já foi observada entre diferentes espécies fúngicas e *H. vastatrix* (hospedeiro), no continente africano (COLMÁN et al., 2021; RODRIGUEZ et al., 2021) e nas Américas (JAMES et al., 2016; CARRIÓN; RICO-GRAY, 2012). Adicionalmente, alguns trabalhos já demonstraram o potencial desses organismos como agentes de controle biológico da ferrugem do cafeeiro, como o de Salcedo-Sarmiento et al. (2021). Nesse trabalho recente, foi comprovado o micoparasitismo de *Calonectria hemileiae* sobre pústulas do patógeno e observou-se uma redução significativa da germinação de uredósporos de *H. vastatrix* e da severidade da doença. Outros trabalhos se encontram ainda em andamento e já produzem resultados promissores. Espécies de *Fusarium* e *Clonostachys* coletadas nos levantamentos feitos por nosso grupo de pesquisa estão sendo identificadas e avaliadas quanto ao seu potencial como agentes de controle biológico da ferrugem do cafeeiro (NÓBREGA, 2021; NDACNOU, 2021, em elaboração).

Contudo, ainda há muito a ser explorado e esclarecido, pois, dos 1510 isolados obtidos, apenas uma pequena porção tem sido investigada. Nessa lista existem muitos outros candidatos que merecem ser avaliados quanto ao seu potencial para o biocontrole de *H. vastatrix*, aumentando as opções para o manejo da ferrugem do cafeeiro. No entanto, antes disso, é preciso conhecer-se a identidade de tais candidatos. A descrição, classificação e o estudo de novos

organismos podem levar a descobertas potencialmente inovadoras. Dentre elas, novos agentes de controle biológico úteis para o manejo de *H. vastatrix*, o agente etiológico de uma das piores doenças do cafeeiro.

## Referências

AGRIOS, G. *Plant Pathology*. 5. ed. Cambridge: Elsevier Academic Press, 2005.

AIME, M. C.; McTAGGART, A. R. A higher-rank classification for rust fungi, with notes on genera. **Fungal Systematics and Evolution**, v. 7, p. 21-47, 2020. <https://doi.org/10.3114/fuse.2021.07.02>.

ARNESON, P.A. Coffee rust. **The Plant Health Instructor**, 2011. Disponível em: <https://www.apsnet.org/edcenter/disandpath/fungalbasidio/pdlessons/Pages/CoffeeRust.aspx>. Acesso em: 15 fev. 2021.

ARNOLD, A. E.; LEWIS, L. C. Ecology and evolution of fungal endophytes, and their roles against insects. *In*: VEGA, F. E.; BLACKWELL, M. (ed.). **Insect-fungal associations: ecology and evolution**. New York: Oxford University Press, p. 74-96, 2005.

ARNOLD, A. E.; MEJÍA, L. C.; KYLLO, D.; ROJAS, E. I.; MAYNARD, Z.; ROBBINS, N.; HERRE, E. A. Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 26, p. 15649-15654, 2003. <https://doi.org/10.1073/pnas.2533483100>.

AVELINO, J. et al. The coffee rust crises in Colombia and Central America (2008–2013): impacts, plausible causes and proposed solutions. **Food Security**, v. 7, n. 2, p. 303-321, 2015. <https://doi.org/10.1007/s12571-015-0446-9>

BELACHEW, K.; SENBETA, G. A.; GAREDEW, W.; BARRETO, R. W.; DEL PONTE, E. M. Altitude is the main driver of coffee leaf rust epidemics: a large-scale survey in Ethiopia. **Tropical Plant Pathology**, v. 45, n. 5, p. 511-521, 2020. <https://doi.org/10.1007/s40858-020-00383-4>.

BERKELEY, M. J.; BROOME, C. E. *Hemileia vastatrix*. **The Gardeners' Chronicle and Agricultural Gazette**, v. 6, p. 1157, 1869.

CARRIÓN, G.; RICO-GRAY, V. Mycoparasites on the coffee rust in Mexico. **Fungal Diversity**, v. 11, p. 49-60, 2002.

CARVALHO, V. L.; CHALFOUN, S. M.; da CUNHA, R. L. Manejo de doenças do cafeeiro. *In*: REIS, P. R.; CUNHA, R. L. (ed.). **Café arábica: do plantio à colheita**. Lavras: EPAMIG, 2010. v.1, cap. 11.

CHALFOUN, S. M.; REIS, P. R. História da cafeicultura no Brasil. *In*: REIS, P. R.; CUNHA, R. L. (ed.). **Café arábica: do plantio à colheita**. Lavras: EPAMIG, 2010. v.1, cap. 1.

COLMÁN, A. A.; EVANS, H. C.; SALCEDO-SARMIENTO, S.; BRAUN, U.; BEKELE, K. B.; BARRETO, R. W. A fungus-eat-fungus world: *Digitopodium*, with particular reference to mycoparasites of the coffee leaf rust, *Hemileia vastatrix*. **IMA fungus**, v. 12, n. 1, p. 1-11, 2021. <https://doi.org/10.1186/s43008-020-00052-w>.

DAVIS, A. P.; GARGIULO, R.; FAY, M. F.; SARMU, D.; HAGGAR, J. Lost and found: *Coffea stenophylla* and *C. affinis*, the forgotten coffee crop species of west Africa. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, 2020. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00616>.

DAVIS, A. P.; TOSH, J.; RUCH, N.; FAY, M. F. Growing coffee: *Psilanthus* (Rubiaceae) subsumed on the basis of molecular and morphological data; implications for the size, morphology, distribution and evolutionary history of *Coffea*. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 167, n. 4, p. 357-377, 2011. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.2011.01177.x>.

HADDAD, F.; MAFFIA, L. A.; MIZUBUTI, E. S.; TEIXEIRA, H. Biological control of coffee rust by antagonistic bacteria under field conditions in Brazil. **Biological Control**, v. 49, n. 2, p. 114-119, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2009.02.004>.

INTERNATIONAL COFFEE ORGANIZATION (ICO). **Coffee production by exporting countries**, 2021. Disponível em: <http://www.ico.org/prices/po-production.pdf>. Acesso em: 09 fev. 2021.

JAMES, T. Y.; MARINO, J. A.; PERFECTO, I.; VANDERMEER, J. Identification of putative coffee rust mycoparasites via single-molecule DNA sequencing of infected pustules. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 82, n. 2, p. 631-639, 2016. <https://doi.org/10.1128/AEM.02639-15>.

KARLSSON, M.; ATANASOVA, L.; JENSEN, D. F.; ZEILINGER, S. Necrotrophic mycoparasites and their genomes. *In*: HEITMAN, J.; HOWLETT, B. J.; CROUS, P. W.; STUKENBROCK, E. H.; JAMES, T. Y.; GOW, N. A. (ed.). **The Fungal Kingdom**. Washington, DC: ASM Press, 2017. <https://doi.org/10.1128/9781555819583.ch50>.

KOUTOULEAS, A.; JØRGENSEN, H. J. L.; JENSEN, B.; LILLESØ, J. P. B.; JUNGE, A.; RÆBILD, A. On the hunt for the alternate host of *Hemileia vastatrix*. **Ecology and evolution**, v. 9, n. 23, p. 13619-13631, 2019. <https://doi.org/10.1002/ece3.5755>.

LAWS, B. **Fifty Plants that changed the course of history**. Buffalo: Firefly Books, 2010.

McCOOK, S. Global rust belt: *Hemileia vastatrix* and the ecological integration of world coffee production since 1850. **Journal of Global History**, v. 1, n. 2, p. 177-195, 2006. <https://doi.org/10.1017/S174002280600012X>.

McCOOK, S.; VANDERMEER, J. The big rust and the red queen: long-term perspectives on coffee rust research. **Phytopathology**, v. 105, n. 9, p. 1164-1173, 2015. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-04-15-0085-RVW>.

NDACNOU, M. K. Potencial de espécies de *Trichoderma* spp. e *Clonostachys* spp. originárias de cafeeiros do Brasil e da África para o biocontrole de *Hemileia vastatrix*. 2021, em elaboração. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, em elaboração.

NÓBREGA, T. F. **Taxonomy of *Fusarium* spp. associated with uredinia of *Hemileia vastatrix* in Brazil, Cameroon, Ethiopia and Paraguay and their biocontrol potential**. 2021. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2021.

PETRINI, O. Fungal endophytes of tree leaves. *In*: ANDREWS, J. H.; HIRANO, S. S. (ed.) **Microbial ecology of leaves**. New York: Springer, 1991. p. 179-197. [https://doi.org/10.1007/978-1-4612-3168-4\\_9](https://doi.org/10.1007/978-1-4612-3168-4_9).

RODRÍGUEZ, M. C. H. ***Trichoderma* spp. associated with coffee in Africa: taxonomy and potential uses for the biological control of coffee leaf rust (*Hemileia vastatrix*) and promotion of plant growth**. 2019. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2019.

RODRÍGUEZ, M. C. H.; EVANS, H. C.; de ABREU, L. M.; de MACEDO, D. M.; NDACNOU, M. K.; BEKELE, K. B.; BARRETO, R. W. New species and records of *Trichoderma* isolated as mycoparasites and endophytes from cultivated and wild coffee in Africa. **Scientific reports**, v. 11, n. 1, p. 1-30, 2021. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-84111-1>.

SAKIYAMA, N. O café arábica. In: SAKIYAMA, N.; MARTINEZ, H.; TOMAZ, M.; BORÉM, A. (ed.). **Café arábica: do plantio à colheita**. Viçosa: Editora UFV, 2015. cap. 1.

SALCEDO-SARMIENTO, S.; AUCIQUE-PÉREZ, C. E.; SILVEIRA, P. R.; COLMÁN, A. A.; SILVA, A. L.; MANSUR, P. S. C.; RODRIGUES, F. Á.; EVANS, H. C.; BARRETO, R. W. Elucidating the interactions between the rust *Hemileia vastatrix* and a *Calonectria* mycoparasite and the coffee plant. **iScience**, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.102352>.

SILVA, H. S.; TOZZI, J. P.; TERRASAN, C. R.; BETTIOL, W. Endophytic microorganisms from coffee tissues as plant growth promoters and biocontrol agents of coffee leaf rust. **Biological Control**, v. 63, n. 1, p. 62-67, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2012.06.005>.

SUZUKI, N.; RIVERO, R. M.; SHULAEV, V.; BLUMWALD, E.; MITTLER, R. Abiotic and biotic stress combinations. **New Phytologist**, v. 203, n. 1, p. 32-43, 2014. <https://doi.org/10.1111/nph.12797>.

TALHINHAS, P. et al. The coffee leaf rust pathogen *Hemileia vastatrix*: one and a half centuries around the tropics. **Molecular plant pathology**, v. 18, n. 8, p. 1039-1051, 2017. <https://doi.org/10.1111/mpp.12512>.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA). **Coffee: world markets and trade**, 2020. Disponível em: <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/coffee.pdf>. Acesso em: 09 fev. 2021.

WORLD COFFEE RESEARCH (WCR). **Harnessing the power of natural enemies to fight coffee leaf rust**, 2019. Disponível em: <https://worldcoffeeresearch.org/work/biocontrol-coffee-leaf-rust/harnessing-power-natural-enemies-fight-coffee-leaf-rust/>. Acesso em: 20 fev. 2021.

ZAMBOLIM, L. Current status and management of coffee leaf rust in Brazil. **Tropical Plant Pathology**, v. 41, n. 1, p. 1-8, 2016. <https://doi.org/10.1007/s40858-016-0065-9>

ZAMBOLIM, L. Doenças do cafeeiro. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; FILHO, A. BERGAMIN; CAMARGO, L. E. A (ed.). **Manual de Fitopatologia**. 5° ed., v. 2. Ouro Fino: Editora Agronômica Ceres, 2018. cap. 21.

## **CAPÍTULO I**

## ***Cladosporium* spp. micoparasitas de *Hemileia vastatrix*: taxonomia e avaliação de potencial para o biocontrole**

A cultura do cafeeiro é uma das mais importantes no agronegócio mundial e a ferrugem do cafeeiro é uma das principais doenças da cultura, tendo como agente causal o fungo *Hemileia vastatrix*. O fitopatógeno apresenta enorme potencial destrutivo e surtos da doença tem causado prejuízos para produtores e a cadeia produtiva. Estratégias de manejo consagradas (escape por plantio em regiões elevadas, uso de cultivares resistentes e aplicação de fungicidas químicos) tem falhado ou encontrado objeções crescentes. O controle biológico, ainda pouco explorado, oferece uma alternativa atraente pois tem sido bem-sucedido para o manejo de diversas doenças de grandes culturas e tem sido encontrada uma notável diversidade de microrganismos antagonistas de *H. vastatrix* em levantamentos feitos nos últimos anos, particularmente fungos endofíticos e fungos micoparasitas de urédias em projeto ora em andamento. O presente estudo teve o objetivo de identificar fungos reconhecidos como pertencendo ao gênero *Cladosporium* isolados a partir de pústulas de *H. vastatrix*, aparentemente micoparasitadas. Adicionalmente se pretendeu conduzir um estudo preliminar sobre o potencial de isolados desses fungos como agentes de controle biológico para o manejo da ferrugem do cafeeiro. Análises filogenéticas, com base em ACT e ITS, revelaram que dentre os isolados, quatro pertencem a quatro espécies já conhecidas: *C. asperulatum*, *C. sphaerospermum*, *C. tenuissimum* e *C. xanthochromaticum*. Outros dez pertencem a sete espécies a serem propostas, essas têm sua descrição apresentada em detalhes. Testes *in vitro* foram realizados avaliando a germinação dos uredósporos do patógeno quando expostos a suspensão de conídios ou filtrado de cultura fúngica das espécies de *Cladosporium* em questão. Resultados promissores foram obtidos indicando a capacidade de biocontrole por parte de alguns isolados, os valores, bem como os efeitos, são apresentados e discutidos. O presente trabalho representa uma contribuição adicional para o conhecimento da diversidade de possíveis micoparasitas associados a *H. vastatrix* do gênero *Cladosporium*. Novidades reveladas pelo estudo são a ocorrência de *H. vastatrix* como substrato para diversas espécies de *Cladosporium*, registros de novas regiões geográficas para *Cladosporium* spp. já conhecidas e sete adições para o gênero.

**Palavras-chave:** Ferrugem do cafeeiro. Antagonismo. Filogenia. Testes *in vitro*. Filtrado fúngico.

## ***Cladosporium* spp. mycoparasites of *Hemileia vastatrix*: taxonomy and assessment of potential for biocontrol**

The coffee crop is one of the most important in world agribusiness and coffee rust is one of the main diseases, having as causal agent the fungus *Hemileia vastatrix*. The phytopathogen has enormous destructive potential and outbreaks of the disease have caused losses to producers and the production chain. Established management strategies (escape by planting in elevated regions, use of resistant cultivars and application of chemical fungicides) have failed or encountered increasing objections. Biological control, still little explored, offers an attractive alternative as it has been successful for the management of several diseases of large crops and a remarkable diversity of antagonistic microorganisms to *H. vastatrix* has been found in surveys carried out in recent years, particularly fungi endophytes and mycoparasitic fungi of uredia in a project now in progress. The present study aimed to identify fungi recognized as belonging to the *Cladosporium* genus isolated from pustules of *H. vastatrix*, apparently mycoparasitized. Additionally, it was intended to conduct a preliminary study on the potential of isolates of these fungi as biological control agents for the management of coffee rust. Phylogenetic analysis based on ACT and ITS, revealed that among the isolates, four of them belong to four already known species, respectively: *C. asperulatum*, *C. sphaerospermum*, *C. tenuissimum* and *C. xantochromaticum*. Another ten belong to seven species to be proposed, these have their description presented in detail. In vitro tests were performed to evaluate the germination of the pathogen's uredospores when exposed to conidia suspension or fungal culture filtrate of the *Cladosporium* species in question. Promising results were obtained indicating the biocontrol capacity of some isolates, the values, as well as the effects, are presented and discussed. The present work represents an additional contribution to the knowledge of the diversity of possible mycoparasites associated with *H. vastatrix* of the *Cladosporium* genus. News revealed by the study are the occurrence of *H. vastatrix* as a substrate for several *Cladosporium* species, records of new geographic regions for *Cladosporium* spp. already known and seven additions to the genus.

**Keywords:** Coffee leaf rust. Antagonism. Phylogeny. *In vitro* assays. Fungal filtrate.

## 1. Introdução

Controle biológico é o “uso de organismos vivos com objetivo de suprimir a densidade populacional ou impactar diretamente um organismo considerado praga, tornando-o menos abundante ou menos danoso do que seria sem uma medida de controle” (EILENBERG et al., 2001). Os agentes de controle biológico de fitopatógenos agem de diferentes maneiras e dentre os mecanismos comumente encontrados pode-se citar: a produção de toxinas e enzimas com ação direta sobre o crescimento e fisiologia dos patógenos; a competição por espaço e nutrientes; a indução de resistência na planta hospedeira e o parasitismo do patógeno alvo (MEDEIROS et al., 2018; AGRIOS, 2005).

Quando um fungo é capaz de parasitar e obter nutrientes de outro fungo (hospedeiro) temos um relacionamento denominado micoparasitismo (KARLSSON et al., 2017). Os fungos causadores de ferrugens (Pucciniales) servem de substrato para uma grande diversidade de fungos micoparasitas. Há, inclusive, gêneros que são conhecidos por incluir apenas parasitos de ferrugens, como é o caso de fungos dos gêneros *Sphaerellopsis* e *Tuberculina* (TRAKUNYINGCHAROEN et al., 2014; LUTZ et al., 2004).

Levantamentos da diversidade de potenciais micoparasitas ocorrendo sobre espécies de algumas ferrugens de importância econômica foram feitos, mas comumente são ainda parciais e taxonomicamente imprecisos. Exemplos de organismos micoparasitas são *Acremonium* spp., *Simplicillium lanosoniveum* e *Lecanicillium psalliotae* (= *Verticillium psalliotae*), encontrados parasitando *Phakopsora pachyrhizi*, o agente causal da ferrugem asiática da soja (PILLA et al., 2019; GAUTHIER et al., 2014; SAKSIRIRAT; HOPPE, 1990). A ferrugem das mirtáceas, causada por *Austropuccinia psidii*, nativa das américas e, atualmente, invadindo ecossistemas na Australásia (Du PLESSIS et al., 2019; CARNEGIE et al., 2016), também tem tido a diversidade de seus micoparasitas investigada e diferentes fungos foram obtidos de pústulas do patógeno: *Colletotrichum melonis*, *Paraboeremia adianticola* (= *Didymella adianticola*), *Epicoccum nigrum*, *Trichothecium roseum* e espécies de *Mucor* e *Fusarium* (BORGES, 2018). Mais trabalhos de levantamento de fungos antagonistas da ferrugem das mirtáceas continuam em andamento no Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa.

Outro fungo causador de ferrugem de grande importância econômica e que tem tido sua microbiota micoparásita como objeto de estudo é *Hemileia vastatrix*, o agente etiológico da ferrugem do cafeeiro (KOUTOULEAS et al., 2019; TALHINHAS et al., 2017). Urédias de *H. vastatrix* têm se revelado um nicho repleto de micoparasitas. *Akanthomyces lecanii*

(= *Lecanicillium lecanii*) seria, de acordo com Maffia et al. (2009), a espécie encontrada mais frequentemente associada às pústulas de ferrugem. No entanto, a lista de espécies micoparasitas de *H. vastatrix* é extensa. No México, por exemplo, foi relatada a ocorrência de *Acremonium byssoides*, *Calcarisporium arbuscula*, *C. ovalisporum*, *Sporothrix guttuliformis*, *Fusarium pallidroseum* e *Lecanicillium psalliotae* (= *Verticillium psalliotae*) como micoparasitas de *H. vastatrix* (CARRIÓN; RICO-GRAY, 2002; MAHFUD et al., 2006).

Desde 2015, um estudo financiado pelo World Coffee Research (WCR, 2021), envolvendo levantamento de fungos potencialmente antagonistas de *H. vastatrix* na América do Sul (Brasil e Paraguai) e África (Camarões, Etiópia e Quênia) resultou numa coleção de mais de 1.500 isolados fúngicos. Esta coleção de isolados inclui uma grande diversidade de fungos endofíticos obtidos do cafeeiro e de fungos observados crescendo sobre urédias de *H. vastatrix*.

Algumas publicações descrevendo parte dessa micodiversidade já estão disponíveis. *Calonectria hemileiae* foi descrito em Crous et al.(2018); Colmán et al. (2021) descreveram *Digitopodium tectonae*; e Rodríguez et al. (2021) relataram diferentes espécies de *Trichoderma* (*T. aggressivum*, *T. andinense*, *T. parareesei*, *T. petersenii* e *T. pseudopyramidale*) como micoparasitas de pústulas de *H. vastatrix* ou endófitos no cafeeiro. Diversas novidades taxonômicas resultantes desse estudo estão em preparação, como os trabalhos tratando de espécies de *Fusarium* (NÓBREGA, T. F., Comunicação pessoal) e *Clonostachys* (NDACNOU, M. K., Comunicação pessoal).

Contudo, ainda há uma extensa e diversa lista de isolados que ainda não foram examinados e carecem de caracterização taxonômica e de avaliação de seu potencial como agentes de controle biológico de *H. vastatrix*, por exemplo isolados de fungos dematiáceos obtidos a partir de pústulas da ferrugem do cafeeiro e identificados, preliminarmente, como pertencentes ao gênero *Cladosporium*.

O gênero *Cladosporium* é numeroso e extremamente variado, abrigando espécies com ampla distribuição geográfica, com considerável diversidade morfológica e que ocupam diferentes nichos ecológicos, inclusive como patógenos de plantas e animais (SANDOVAL-DENIS et al., 2016; BENSCH et al., 2012). Há muitas espécies de *Cladosporium* e espécies de gêneros morfológicamente semelhantes (cladosporióides) que são conhecidos ocorrendo como micoparasitas de outros fungos. São exemplos *C. delicatulum* e *C. oxysporum*, citados como micoparasitas de *Taphrina pruni* e *Uncinula tectonae*, respectivamente (BAHARVANDI; ZAFARI, 2015; SANKAR et al., 2007). A monografia de

Heuchert et al. (2005) lista muitos cladosporiídeos fungícolas e, embora esse estudo não inclua informações moleculares, serviria de ponto de partida para um amplo reexame de fungos desse grupo que ocupam tal nicho ecológico.

Nesse cenário, o presente trabalho objetivou investigar a taxonomia de isolados de *Cladosporium* isolados de pústulas da doença durante os levantamentos na América do Sul e África, e avaliar preliminarmente seu potencial para biocontrole de *H. vastatrix*.

## 2. Material e Métodos

### 2.1. Obtenção, armazenamento e preservação dos isolados

Os isolados incluídos nesse estudo, bem como os locais de coleta, encontram-se listados na Tabela 1. Coleta, exame e isolamentos dos supostos micoparasitas seguiram a metodologia descrita por Colmán et al. (2021): em cada local de coleta, cafeeiros foram examinados em busca de pústulas de ferrugem, coletando-se folhas que apresentassem colônias de ferrugem cobertas por outros fungos ou que fossem anormais (cor e esporulação incomuns). Amostras foram secas em prensas botânicas para posterior processamento (identificação preliminar e isolamentos dos fungos ocorrendo sobre a ferrugem). Os materiais secos foram processados em até 2 semanas após a coleta. Culturas puras foram obtidas através de isolamento direto: propágulos fúngicos foram coletados das urédias de *H. vastatrix* e transferidos para placas contendo meio batata-dextrose-ágar (BDA) com auxílio de uma agulha de ponta fina estéril. Placas foram mantidas a 25°C.

Os isolados foram preservados em tubos contendo meio batata-cenoura-ágar (BCA) para o uso entre experimentos. Já a conservação a longo prazo foi realizada por armazenamento em sílica-gel e em solução aquosa de glicerol a 10% conservadas em freezer a -80 °C (GONÇALVES et al., 2016; DHINGRA; SINCLAIR, 1995). Materiais foram depositados na coleção de culturas fúngicas “Coleção Octávio Almeida Drummond” (COAD) e amostras de culturas metabolicamente inativas foram depositadas no fungário/ herbário (VIC) da Universidade Federal de Viçosa (UFV). Os códigos de COAD e VIC de cada isolado encontram-se na Tabela 1. Isolados fúngicos foram reconhecidos com base morfológica e cultural como possivelmente pertencentes a *Cladosporium* (morfortipos). A partir da sua distribuição geográfica no Brasil e na África e de seus morfortipos, 14 isolados foram

selecionados para exame e avaliação mais detalhada como representativos do táxon sobre urédias de *H. vastatrix*.

## 2.2. Caracterização morfológica

A técnica de microcultura, ou cultura em lâmina, conforme descrito por Mafía e Alfenas (2016) foi utilizada para preparação de lâminas para visualização das estruturas fúngicas e descrição da morfologia. Lâminas foram observadas sob um microscópio de luz, modelo Olympus BX-51, equipado com uma câmera digital Olympus Q-COLOR3. Dados biométricos foram tomados de ao menos 30 estruturas representativas de cada táxon.

Para a descrição das culturas fúngicas, os isolados foram repicados para o centro de placas de Petri contendo BDA e outras contendo BCA. As placas foram mantidas em câmara incubadora a  $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ , com fotoperíodo programado para 12 horas (12 horas de luz branca e 12 horas de escuro) e no escuro, ambos, por 7 dias. A descrição das características culturais foi feita seguindo-se a nomenclatura de Crous et al. (2009) e para designação da terminologia de cores utilizou-se a cartela de cores de Rayner (1970).

## 2.3. Caracterização molecular

### 2.3.1. Extração de DNA

Para realizar a extração de DNA os isolados foram transferidos para placas contendo meio líquido de batata-dextrose (BD) e mantidos a  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ , sob um fotoperíodo de 12 horas, por 7 dias. Em seguida, o micélio formado foi coletado e transferido para microtubos de centrifugação estéreis de 1,5 mL contendo beads de aço inoxidável. Para maceração do micélio, utilizou-se um disruptor mecânico de células L Beader 3 (Loccus Biotecnologia, Cotia, SP, Brasil) ajustado em 4000 rpm, 2 ciclos de 10s, cada. O DNA total foi extraído utilizando o kit Wizard Genomic DNA Purification (Promega, Madison, WI, EUA), seguindo as instruções do fabricante.

**Tabela 1.** Origem de isolados de *Cladosporium* possíveis micoparasitas de *H. vastatrix* investigados no presente estudo.

COAD <sup>1</sup>	VIC <sup>2</sup>	Código de coleta	Local de Coleta
2555	47520	RWB 2014f	Duas Barras, RJ, Brasil
2558	47521	AC 116c	Varginha, MG, Brasil
2559	47522	AC 120d	São Sebastiao da Vitória, MG, Brasil
2562	47523	RWB 2015c	Araponga, MG, Brasil
2565	47524	AC 126c	Três Pontas, MG, Brasil
2566	47525	AC 133i	Florestal, MG, Brasil
2567	47526	AC 120e	São Sebastiao da Vitória, MG, Brasil
2568	47527	DOA 1311	Jimma University College of Agriculture and Vet. Jimma, Etiópia
2570	47528	AC 112a	Lambari, MG, Brasil
2571	47529	–	Quênia
2578	47530	ILU - JL 01	Gore, Etiópia
2581	47531	168-06	Bitá, Etiópia
3350	47514	076-7454-01	Gamadro, Etiópia
3351	47515	156-148	Agaro, Etiópia

<sup>1</sup> **COAD:** isolados fúngicos vivos depositados na “Coleção Octávio Almeida Drummond” da Universidade Federal de Viçosa.

<sup>2</sup> **VIC:** amostras fixadas depositadas no fungário/ herbário da Universidade Federal de Viçosa.

### 2.3.2. PCR e sequenciamento

A partir do DNA extraído, realizou-se amplificação de regiões genômicas de interesse por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR). Foram utilizadas duas regiões gênicas de interesse para *Cladosporium*: o fragmento do gene da  $\beta$ -actina (ACT), através dos primers ACT-512F e ACT-783R (CARBONE; KOHN, 1999) e também a região espaçadora interna transcrita do DNA ribossômico (*internal transcribed spacer*, ITS), com os primers ITS-5 e ITS-4 (WHITE et al., 1990).

A reação de PCR foi realizada utilizando um volume total de 12,5  $\mu$ L, onde cada reação continha: 6,25  $\mu$ L de Dream-Taq DNA polimerase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA); 4  $\mu$ L de água ultrapura esterilizada; 1,25  $\mu$ L de BSA; 0,25  $\mu$ L de DMSO; 0,25  $\mu$ L de cada primer; e 0,25  $\mu$ L de DNA (30 ng/ $\mu$ L). As reações de PCR foram realizadas a partir uma desnaturação inicial das fitas moldes, seguida de 35-40 ciclos de desnaturação, anelamento dos primers, extensão e extensão final. As condições de temperatura e tempo seguiram as recomendações para cada par de primers.

Os produtos da PCR (4  $\mu$ L de cada reação) foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1%, corados com GelRed™ (Biotium Inc., Hayward, CA, EUA) e visualizados sob luz UV. O restante de cada reação foi tratado com kit de purificação ExoSAP IT (Amersham Biosciences, Arlington Heights, IL, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante, e os fragmentos amplificados foram sequenciados pela empresa Macrogen Inc. (Seoul, Coreia do Sul, <http://www.macrogen.com>).

### 2.3.3. Análises filogenéticas

O software SeqAssem ver. 07/2008 (HEPPERLE, 2021) foi utilizado para avaliar os eletroferogramas, corrigir possíveis nucleotídeos em posições ambíguas e gerar as sequências consensos (contigs). Informações utilizadas para as inferências filogenéticas foram extraídas dos trabalhos de Iturrieta-González et al. (2021), Zimowska et al. (2021), Bensch et al. (2018) e Sandoval-Denis et al. (2016). Outras sequências também foram adquiridas através da base de dados GenBank do National Center for Biotechnology Information (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Duas espécies de *Cercospora* foram adotadas como

grupo externo (*C. apii* CBS 116455 e *C. beticola* CBS 116456 – GROENEWALD et al., 2005). Detalhes dos isolados utilizados encontram-se na Tabela 2.

As sequências geradas, juntamente com as obtidas foram alinhadas utilizando o algoritmo MUSCLE presente no *software* MEGA X ver. 10.2.2 (KUMAR et al., 2018). Alinhamentos concatenados foram gerados através do *software* SequenceMatrix ver. 1.8 (VAIDYA et al., 2011).

Dois métodos foram utilizados para inferência filogenética com base nos genes individuais e concatenados: análise de máxima verossimilhança (maximum likelihood – ML) e inferência bayesiana (Bayesian inference – BI), ambas as metodologias utilizaram ferramentas implementadas no portal CIPRES *Science Gateway* (MILLER et al., 2010).

Previamente às análises filogenéticas, foi determinado qual o melhor modelo de substituição para cada gene/locus. Para tanto, adotou-se a ferramenta jModelTest2 ver. 2.1.6 (DARRIBA et al., 2012) também presente no portal CIPRES. Os modelos GTR + G e SYM + I + G foram adotados para as regiões ACT e ITS, respectivamente.

As árvores inferidas por meio de ML utilizaram o método RAxML-HPC ver. 8.2.12 (STAMATAKIS, 2016). A reamostragem de bootstrap foi configurada para realizar 1.000 bootstrap, buscando avaliar a estabilidade das árvores inferidas e definir a melhor árvore.

As análises de BI utilizaram a ferramenta MrBayes ver. 3.2.7a (RONQUIST; HUELSENBECK, 2003). Para procurar pelas topologias a metodologia de Monte Carlo via Cadeias de Markov (MCMC) foi iniciada, utilizando duas análises simultâneas e independentes, cada qual com quatro cadeias de MCMC. Em cada análise, árvores foram confeccionadas aleatoriamente até 5.000.000 de gerações, com amostragem a cada 500 gerações, resultando em 10.000 árvores amostradas. As primeiras 2.500 árvores (25%) foram descartadas na fase de “queima” e os valores de probabilidade posterior (PP) foram determinados na árvore consenso através das 7.500 árvores remanescentes em cada análise. As árvores resultantes da BI e ML foram visualizadas no *software* TreeGraph 2 ver. 2.15.0-887 (STÖVER; MÜLLER, 2010) e editadas em softwares gráficos.

**Tabela 2.** Detalhes e número de acesso no GenBank dos isolados utilizados nas análises filogenéticas de *Cladosporium* spp.

Espécie	Isolado <sup>1</sup>	Regiões Gênicas <sup>2</sup>	
		ITS	ACT
<b>Complexo <i>Cladosporium cladosporioides</i></b>			
<i>Cladosporium acalyphae</i>	<b>CBS 125982</b>	HM147994	HM148481
<i>C. alboflavescens</i>	<b>CBS 140690</b>	LN834420	LN834604
<i>C. angulosum</i>	<b>CBS 140692</b>	LN834425	LN834609
<i>C. angulosum</i>	CPC 11526	HM148127	HM148616
<i>C. angustisporum</i>	<b>CBS 125983</b>	HM147995	HM148482
<i>C. angustisporum</i>	UTHSC DI-13-240	LN834356	LN834540
<i>C. angustiterminale</i>	<b>CBS 140480</b>	KT600379	KT600575
<i>C. anthropophilum</i>	CBS 117483	HM148007	HM148494
<i>C. anthropophilum</i>	<b>CBS 140685</b>	LN834437	LN834621
<i>C. anthropophilum</i>	CPC 11122	HM148019	HM148506
<i>C. asperulatum</i>	CBS 126339	HM147997	HM148484
<i>C. asperulatum</i>	<b>CBS 126340</b>	HM147998	HM148485
<i>C. australiense</i>	<b>CBS 125984</b>	HM147999	HM148486
<i>C. austroafricanum</i>	<b>CBS 140481</b>	KT600381	KT600577
<i>C. caprifimosum</i>	<b>FMR 16532</b>	LR813198	LR813205
<i>C. chalastosporioides</i>	<b>CBS 125985</b>	HM148001	HM148488
<i>C. chubutense</i>	<b>CBS 124457</b>	FJ936158	FJ936165
<i>C. cladosporioides</i>	CBS 113738	HM148004	HM148491
<i>C. cladosporioides</i>	<b>CBS 112388</b>	HM148003	HM148490
<i>C. colocasiae</i>	<b>CBS 386.64</b>	HM148067	HM148555
<i>C. colocasiae</i>	CBS 119542	HM148066	HM148554
<i>C. colombiae</i>	<b>CBS 274.80B</b>	FJ936159	FJ936166
<i>C. coprophilum</i>	FMR 16101	LR813199	LR813204
<i>C. crousii</i>	<b>CBS 140686</b>	LN834431	LN834615
<i>C. cucumerinum</i>	<b>CBS 171.52</b>	HM148072	HM148561

Tabela 2. Continuação.

Espécie	Isolado <sup>1</sup>	Regiões Gênicas <sup>2</sup>	
		ITS	ACT
<i>C. cucumerinum</i>	CBS 173.54	HM148074	HM148563
<i>C. delicatulum</i>	CBS 126342	HM148079	HM148568
<i>C. delicatulum</i>	<b>CBS 126344</b>	HM148081	HM148570
<i>C. europaeum</i>	CBS 116744	HM148053	HM148540
<i>C. exasperatum</i>	<b>CBS 125986</b>	HM148090	HM148579
<i>C. exile</i>	<b>CBS 125987</b>	HM148091	HM148580
<i>C. flabelliforme</i>	<b>CBS 126345</b>	HM148092	HM148581
<i>C. flabelliforme</i>	UTHSC DI-13-267	LN834361	LN834545
<i>C. flavovirens</i>	<b>CBS 140462</b>	LN834440	LN834624
<i>C. funiculosum</i>	CBS 122128	HM148093	HM148582
<i>C. funiculosum</i>	<b>CBS 122129</b>	HM148094	HM148583
<i>C. fuscoviride</i>	<b>FMR 16385</b>	LR813200	LR813206
<i>C. gamsianum</i>	<b>CBS 125989</b>	HM148095	HM148584
<i>C. globisporum</i>	<b>CBS 812.96</b>	HM148096	HM148585
<i>C. grevilleae</i>	<b>CBS 114271</b>	JF770450	JF770473
<i>C. hillianum</i>	<b>CBS 125988</b>	HM148097	HM148586
<i>C. inversicolor</i>	CBS 143.65	HM148100	HM148589
<i>C. inversicolor</i>	<b>CBS 401.80</b>	HM148101	HM148590
<i>C. ipereniae</i>	<b>CBS 140483</b>	KT600394	KT600589
<i>C. ipereniae</i>	CPC 16855	KT600395	KT600590
<i>C. iranicum</i>	<b>CBS 126346</b>	HM148110	HM148599
<i>C. lentulum</i>	<b>FMR 16288</b>	LR813203	LR813209
<i>C. licheniphilum</i>	<b>CBS 125990</b>	HM148111	HM148600
<i>C. longicatenatum</i>	<b>CBS 140485</b>	KT600403	KT600598
<i>C. lycoperdinum</i>	CBS 574.78C	HM148115	HM148604
<i>C. lycoperdinum</i>	CBS 126347	HM148112	HM148601

Tabela 2. Continuação.

Espécie	Isolado <sup>1</sup>	Regiões Gênicas <sup>2</sup>	
		ITS	ACT
<i>C. montecillanum</i>	<b>CBS 140486</b>	KT600406	KT600602
<i>C. montecillanum</i>	CPC 15605	KT600407	KT600603
<i>C. myrtacearum</i>	<b>CBS 126350</b>	HM148117	HM148606
<i>C. neapolitanum</i>	<b>MgPo1</b>	MK387890	MK416051
<i>C. needhamense</i>	<b>CBS 143359</b>	MF473142	MF473991
<i>C. neerlandicum</i>	<b>CBS 143360</b>	KP701887	KP702010
<i>C. neopsychrotolerans</i>	<b>CGMCC 3.18031</b>	KX938383	KX938366
<i>C. oxysporum</i>	CBS 125991	HM148118	HM148607
<i>C. oxysporum</i>	CBS 126351	HM148119	HM148608
<i>C. paracladosporioides</i>	<b>CBS 171.54</b>	HM148120	HM148609
<i>C. parapendielloides</i>	<b>CBS 140487</b>	KT600410	KT600606
<i>C. perangustum</i>	<b>CBS 125996</b>	HM148121	HM148610
<i>C. perangustum</i>	CBS 126365	HM148123	HM148612
<i>C. phaenocomae</i>	<b>CBS 128769</b>	JF499837	JF499881
<i>C. phyllactiniicola</i>	CBS 126353	HM148151	HM148640
<i>C. phyllactiniicola</i>	<b>CBS 126355</b>	HM148153	HM148642
<i>C. phyllophilum</i>	<b>CBS 125992</b>	HM148154	HM148643
<i>C. phyllophilum</i>	CPC 13873	HM148155	HM148644
<i>C. pini-ponderosae</i>	<b>CBS 124456</b>	FJ936160	FJ936167
<i>C. polonicum</i>	<b>Th/lg/2334</b>	MK387894	MK416055
<i>C. pseudochalastosporioides</i>	<b>CBS 140490</b>	KT600415	KT600611
<i>C. pseudocladosporioides</i>	CBS 667.80	HM148165	HM148654
<i>C. pseudocladosporioides</i>	<b>CBS 125993</b>	HM148158	HM148647
<i>C. pseudocladosporioides</i>	CPC 13683	HM148173	HM148662
<i>C. rectoides</i>	<b>CBS 125994</b>	HM148193	HM148683
<i>C. rugulovarians</i>	<b>CBS 140495</b>	KT600459	KT600656

Tabela 2. Continuação.

Espécie	Isolado <sup>1</sup>	Regiões Gênicas <sup>2</sup>	
		ITS	ACT
<i>C. scabrellum</i>	<b>CBS 126358</b>	HM148195	HM148685
<i>C. silenes</i>	CBS 109082	EF679354	EF679506
<i>C. sinuatum</i>	<b>CGMCC 3.18096</b>	KX938385	KX938368
<i>C. sinuatum</i>	CGMCC 3.18097	KX938386	KX938369
<i>C. subuliforme</i>	<b>CBS 126500</b>	HM148196	HM148686
<i>C. subuliforme</i>	UTHSC DI-13-214	LN834394	LN834578
<i>C. tenuissimum</i>	<b>CBS 125995</b>	HM148197	HM148687
<i>C. tenuissimum</i>	CPC 10882	HM148204	HM148694
<i>C. tianshanense</i>	<b>CGMCC 3.18033</b>	KX938381	KX938364
<i>C. tianshanense</i>	CGMCC 3.18034	KX938382	KX938365
<i>C. uredinicola</i>	CPC 5390	AY251071	HM148712
<i>C. uwebraunianum</i>	<b>CBS 143365</b>	MF473306	MF474156
<i>C. uwebraunianum</i>	DTO 305-H9	MF473307	MF474157
<i>C. varians</i>	<b>CBS 126362</b>	HM148224	HM148715
<i>C. verrucocladosporioides</i>	<b>CBS 126363</b>	HM148226	HM148717
<i>C. vicinum</i>	<b>CBS 143366</b>	MF473311	MF474161
<i>C. vicinum</i>	CBS 306.84	HM148057	HM148544
<i>C. vignae</i>	CBS 121.25	HM148227	HM148718
<i>C. westerdijkiae</i>	<b>CBS 113746</b>	HM148061	HM148548
<i>C. westerdijkiae</i>	CPC 10150	HM148062	HM148549
<i>C. xantochromaticum</i>	<b>CBS 140691</b>	LN834415	LN834599
<i>C. xantochromaticum</i>	CBS 126364	HM148122	HM148611
<i>C. xantochromaticum</i>	CPC 11806	HM148129	HM148618
<i>C. xantochromaticum</i>	DTO 323-E5	MF473321	MF474171
<i>C. xylophilum</i>	<b>CBS 125997</b>	HM148230	HM148721

Tabela 2. Continuação.

Espécie	Isolado <sup>1</sup>	Regiões Gênicas <sup>2</sup>	
		ITS	ACT
<b>Complexo <i>Cladosporium herbarum</i></b>			
<i>C. aerium</i>	<b>CBS 143356</b>	MF472897	MF473747
<i>C. aerium</i>	DTO 323-G6	MF472898	MF473748
<i>C. aggregatocicatricatum</i>	<b>CBS 140493</b>	KT600448	KT600645
<i>C. allicinum</i>	<b>CBS 121624</b>	EF679350	EF679502
<i>C. allicinum</i>	CBS 374.53	KT600368	KT600564
<i>C. allii</i>	CBS 101.81	JN906977	JN906996
<i>C. angustitherbarum</i>	<b>CBS 140479</b>	KT600378	KT600574
<i>C. antarcticum</i>	<b>CBS 690.92</b>	EF679334	EF679484
<i>C. arthropodii</i>	<b>CBS 124043</b>	JN906979	JN906998
<i>C. basiinflatum</i>	<b>CBS 822.84</b>	HM148000	HM148487
<i>C. echinulatum</i>	CBS 123191	JN906980	JN906999
<i>C. floccosum</i>	<b>CBS 140463</b>	LN834416	LN834600
<i>C. herbaroides</i>	<b>CBS 121626</b>	EF679357	EF679509
<i>C. herbarum</i>	<b>CBS 121621</b>	EF679363	EF679516
<i>C. herbarum</i>	UTHSC DI-13-220	LN834378	LN834562
<i>C. iridis</i>	<b>CBS 138.40</b>	EF679370	EF679523
<i>C. limoniforme</i>	CBS 113737	KT600396	KT600591
<i>C. limoniforme</i>	<b>CBS 140484</b>	KT600397	KT600592
<i>C. macrocarpum</i>	<b>CBS 121623</b>	EF679375	EF679529
<i>C. macrocarpum</i>	UTHSC DI-13-191	LN834379	LN834563
<i>C. ossifragi</i>	<b>CBS 842.91</b>	EF679381	EF679535
<i>C. paralimoniforme</i>	<b>CGMCC 3.18103</b>	KX938392	KX938375
<i>C. paralimoniforme</i>	CGMCC 3.18104	KX938393	KX938376
<i>C. parasubtilissimum</i>	<b>CBS 143361</b>	MF473170	MF474018
<i>C. parasubtilissimum</i>	CPC 2239	MF473171	MF474019

Tabela 2. Continuação.

Espécie	Isolado <sup>1</sup>	Regiões Gênicas <sup>2</sup>	
		ITS	ACT
<i>C. phlei</i>	<b>CBS 358.69</b>	JN906981	JN907000
<i>C. prolongatum</i>	CGMCC 3.18035	KX938395	KX938378
<i>C. prolongatum</i>	<b>CGMCC 3.18036</b>	KX938394	KX938377
<i>C. pseudiridis</i>	<b>CBS 116463</b>	EF679383	EF679537
<i>C. pseudotenellum</i>	<b>FMR 16231</b>	LR813145	LR813146
<i>C. puyae</i>	<b>CBS 274.80</b>	KT600418	KT600614
<i>C. ramotenellum</i>	<b>CBS 121628</b>	EF679384	EF679538
<i>C. ramotenellum</i>	UTHSC DI-13-166	LN834385	LN834569
<i>C. rhusicola</i>	<b>CBS 140492</b>	KT600440	KT600637
<i>C. sinense</i>	<b>CBS 143363</b>	MF473252	MF474102
<i>C. sinuosum</i>	CBS 393.68	KT600442	KT600639
<i>C. sinuosum</i>	<b>CBS 121629</b>	EF679386	EF679540
<i>C. soldanellae</i>	<b>CBS 132186</b>	JN906982	JN907001
<i>C. spinulosum</i>	<b>CBS 119907</b>	EF679388	EF679542
<i>C. subcinereum</i>	<b>CBS 140465</b>	LN834433	LN834617
<i>C. subinflatum</i>	<b>CBS 121630</b>	EF679389	EF679543
<i>C. subinflatum</i>	UTHSC DI-13-189	LN834391	LN834575
<i>C. submersum</i>	<b>FMR 17264</b>	LR813144	LR813195
<i>C. subtilissimum</i>	<b>CBS 113754</b>	EF679397	EF679551
<i>C. tenellum</i>	<b>CBS 121634</b>	EF679401	EF679555
<i>C. tuberosum</i>	<b>CBS 140693</b>	LN834417	LN834601
<i>C. tuberosum</i>	UTHSC DI-13-219	LN834419	LN834603
<i>C. variabile</i>	<b>CBS 121635</b>	EF679402	EF679556
<i>C. verruculosum</i>	<b>CGMCC 3.18099</b>	KX938388	KX938371
<i>C. verruculosum</i>	CGMCC 3.18100	KX938389	KX938372
<i>C. versiforme</i>	<b>CBS 140491</b>	KT600417	KT600613

Tabela 2. Continuação.

Espécie	Isolado <sup>1</sup>	Regiões Gênicas <sup>2</sup>	
		ITS	ACT
<i>C. wyomingense</i>	CBS 143367	MF473315	MF474165
<b>Complexo <i>Cladosporium sphaerospermum</i></b>			
<i>C. aciculare</i>	CBS 140488	KT600411	KT600607
<i>C. aphidis</i>	CBS 132182	JN906978	JN906997
<i>C. austrohemisphaericum</i>	CBS 140482	KT600382	KT600578
<i>C. austrohemisphaericum</i>	DTO 305-E8	MF472935	MF473785
<i>C. austrohemisphaericum</i>	CPC 16250	KT600383	–
<i>C. coloradense</i>	CBS 143357	MF472945	MF473795
<i>C. cycadicola</i>	CPC 17251	KJ869122	KJ869227
<i>C. domesticum</i>	CBS 143358	MF472955	MF473805
<i>C. dominicanum</i>	CBS 119415	DQ780353	EF101368
<i>C. fusiforme</i>	CBS 119414	DQ780388	EF101372
<i>C. halotolerans</i>	CBS 119416	DQ780364	EF101397
<i>C. halotolerans</i>	UTHSC DI-13-250	LN834374	LN834558
<i>C. langeronii</i>	CBS 189.54	DQ780379	EF101357
<i>C. lebrasiae</i>	CBS 138283	KJ596568	KJ596631
<i>C. longissimum</i>	CBS 300.96	DQ780352	EF101385
<i>C. neolangeronii</i>	CBS 109868	DQ780377	EF101362
<i>C. neolangeronii</i>	CBS 797.97	MF473143	MF473992
<i>C. parahalotolerans</i>	CBS 139585	KP701955	KP702077
<i>C. parahalotolerans</i>	CPC 22336	MF473152	MF474000
<i>C. penidielloides</i>	CBS 140489	KT600412	KT600608
<i>C. psychrotolerans</i>	CBS 119412	DQ780386	EF101365
<i>C. pulvericola</i>	CBS 109788	MF473225	MF474074
<i>C. pulvericola</i>	CBS 143362	MF473226	MF474075
<i>C. ruguloflabelliforme</i>	CBS 140494	KT600458	KT600655

Tabela 2. Continuação.

Espécie	Isolado <sup>1</sup>	Regiões Gênicas <sup>2</sup>	
		ITS	ACT
<i>C. salinae</i>	<b>CBS 119413</b>	DQ780374	EF101390
<i>C. sloanii</i>	<b>CBS 143364</b>	MF473253	MF474103
<i>C. sphaerospermum</i>	<b>CBS 193.54</b>	DQ780343	EU570269
<i>C. sphaerospermum</i>	UTHSC DI-13-237	LN834390	LN834574
<i>C. succulentum</i>	<b>CBS 140466</b>	LN834434	LN834618
<i>C. velox</i>	<b>CBS 119417</b>	DQ780361	EF101388
<b>Grupo externo</b>			
<i>Cercospora beticola</i>	<b>CBS 116456</b>	NR_121315	AY840458
<i>Cercospora apii</i>	<b>CBS 116455</b>	AY840519	AY840450

<sup>1</sup> Identificações em negrito representam espécimes tipo.

<sup>2</sup> **ACT**: fragmento do gene  $\beta$ - actina; **ITS**: espaçador interno transcrito do DNA ribossômico.

#### 2.4. Cultivo e coleta de uredósporos de *Hemileia vastatrix*

Uredósporos do patógeno foram produzidos e coletados seguindo metodologia descrita em Salcedo-Sarmiento et al. (2021): cafeeiros cv. Caturra com 7 meses de idade foram selecionados e dispostos em câmara de crescimento sob umidade relativa de  $85 \pm 5\%$ , a  $22^\circ\text{C}$  e regime luminoso de 12h por 15 dias, até a inoculação do patógeno. Uredósporos de *H. vastatrix* raça II, fornecidos pelo Laboratório de Biotecnologia do Cafeeiro da UFV, foram suspensos em solução de Tween 20 a 0,05%, a suspensão foi calibrada para  $1 \times 10^5$  uredósporos/ mL e utilizada para inoculação das plantas. Com um borrifador, aplicou-se a suspensão de esporos em folha completamente expandidas até que se observasse o escoamento. As plantas inoculadas foram mantidas em câmara úmida, no escuro e a  $22^\circ\text{C}$  por 48h. Em seguida, foram alocadas na câmara de crescimento sob as condições descritas anteriormente. Quando se observou esporulação intensa, 30-45 após inoculação, foi realizada a coleta dos uredósporos. Com uma cápsula gelatinosa, raspou-se cuidadosamente os esporos da superfície foliar, que em seguida foram transferidos para microtubos de 1,5 mL estéreis para uso imediato.

#### 2.5. Testes *in vitro*: *Cladosporium* spp. $\times$ *Hemileia vastatrix*

Isolados de *Cladosporium* (COADs 2570, 2558, 2559, 2565, 2566, 2571, 2568, 3350 e 2578) representativos de cada espécie foram utilizados em testes *in vitro* para se avaliar seu efeito sobre a germinação dos uredósporos de *H. vastatrix*.

Os isolados COAD 2567 (*C. asperulatum*) e COAD 2581 (*Cladosporium* sp. 6) não foram incluídas nessa fase do estudo por apresentarem crescimento muito lento, não esporulando o suficiente para que se pudesse obter a concentração-padrão de inóculo adotada para os testes ( $1 \times 10^6$  conídios/mL). O isolado COAD 2558 (*C. tenuissimum*) apresentou rápido crescimento em meio líquido, no entanto a concentração padrão não foi atingida, assim apenas o tratamento com filtrado do cultivo de tal isolado foi adotado.

### 2.5.1. Avaliação da interferência na germinação de uredósporos de *Hemileia vastatrix* pela exposição a suspensões de conídios de *Cladosporium* spp.

Os isolados enumerados acima foram semeados sob condição asséptica em frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 75 mL de meio líquido BD e mantidos sob agitação e temperatura constantes (160 rpm, a 25°C) por 10 dias. Uma amostra de 15 mL do cultivo de cada isolado foi tomada e calibrada em câmara de Neubauer para  $1 \times 10^6$  conídios/mL. Cada lâmina de microscopia foi preparada para uso através de limpeza com álcool 70%. Duas gotas com 10 µL de suspensão de *H. vastatrix* ( $1 \times 10^5$  uredósporos/mL) foram depositadas no centro de duas metades de cada lâmina. Sobre cada gota de suspensão de uredósporos foi depositada uma gota com 10 µL da suspensão calibrada de cada antagonista isoladamente e a ponteira da micropipeta foi utilizada para misturar as duas gotas. As lâminas foram colocadas no escuro por 6h a  $22 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ . Após esse período a germinação de uredósporos e antagonistas foi interrompida pela adição de uma gota de 10 µL de lactofucsina sobre cada gota e mistura de esporos. Para avaliação do percentual de germinação, 100 uredósporos foram examinados em cada gota e foram considerados germinados aqueles uredósporos que apresentassem o tubo germinativo mais longo que o diâmetro do uredósporo a partir do qual foi formado. O controle consistiu em lâminas com 10 µL da suspensão de *H. vastatrix* crescidas de 10 µL de água estéril.

### 2.5.2. Avaliação da interferência na germinação de uredósporos de *Hemileia vastatrix* pela exposição a filtrados de culturas de *Cladosporium* spp. livres de conídios

Também foi conduzido um experimento para testar a eventual inibição de germinação de uredósporos de *H. vastatrix*, como efeito da exposição de uredósporos ao filtrado obtido após o cultivo de cada isolado representativo de *Cladosporium* spp. O experimento foi montado conforme descrito acima, com a diferença de que o restante do volume de cada frasco, após o período de incubação, foi tratado para remoção da biomassa fúngica (micélio e conídios). A fração líquida foi separada, primeiro, por passagem em um coador de nylon de uso doméstico. Em sequência o líquido foi centrifugado por 15 min a 3.500 rpm. O sobrenadante foi recolhido e filtrado em funil de Büchner, utilizando membrana filtrante Durapore® com poros de 0,22 µm (Merck Millipore, Burlington, MA, EUA). De posse dos filtrados de cada isolado selecionado de *Cladosporium* procedeu-se a montagem do teste para avaliação de uma possível inibição de

germinação de uredósporos. O procedimento usado foi equivalente ao descrito acima, com a diferença de que em vez de uma gota de suspensão de conídios de *Cladosporium* foi depositada uma gota de 10 µL do filtrado de cada isolado (separadamente) sobre cada gota de 10 µL de suspensão de *H. vastatrix* ( $1 \times 10^5$  uredósporos/mL). O procedimento de avaliação, bem como o controle utilizado foram iguais ao descrito para o experimento anterior.

Ambos os experimentos foram conduzidos duas vezes.

### 2.5.3. Análise dos dados

Os dados foram analisados mediante ANOVA e as médias de porcentagem de germinação foram comparadas pelo teste de Scott-Knott ( $\alpha = 0,05$ ) utilizando o software SASM-AGRI (CANTERI et al., 2001). Adicionalmente, foi calculada a porcentagem de inibição da germinação de cada tratamento de acordo com a seguinte equação (SILVA-CASTRO et al., 2018):

$$\text{Inibição da germinação (\%)} = \frac{(c - x)}{c} \times 100$$

Onde, “c” é a quantidade de uredósporos germinados no controle e “x” é a quantidade de uredósporos germinados no tratamento avaliado.

### 3. Resultados

#### 3.1. Filogenia de *Cladosporium* spp.

A análise filogenética com genes combinados de *Cladosporium* spp. (Fig. 1) foi composta por 184 isolados representando 133 espécies já descritas; 14 isolados/morfotipos de possíveis micoparasitas obtidos de pústulas de ferrugem do cafeeiro; e dois isolados utilizados de outro gênero para enraizar a árvore: *Cercospora beticola* CBS 116456 e *Cercospora apii* CBS 116455 (GROENEWALD et al., 2005). O alinhamento concatenado de ACT e ITS foi composto por 768 nucleotídeos (ACT: 278; ITS: 490), onde: foram considerados conservados 429 nucleotídeos (ACT: 62; ITS: 367), 327 posições foram variáveis (ACT: 212; ITS: 115) e 253 foram consideradas informativas para parcimônia (ACT: 157; ITS: 96).

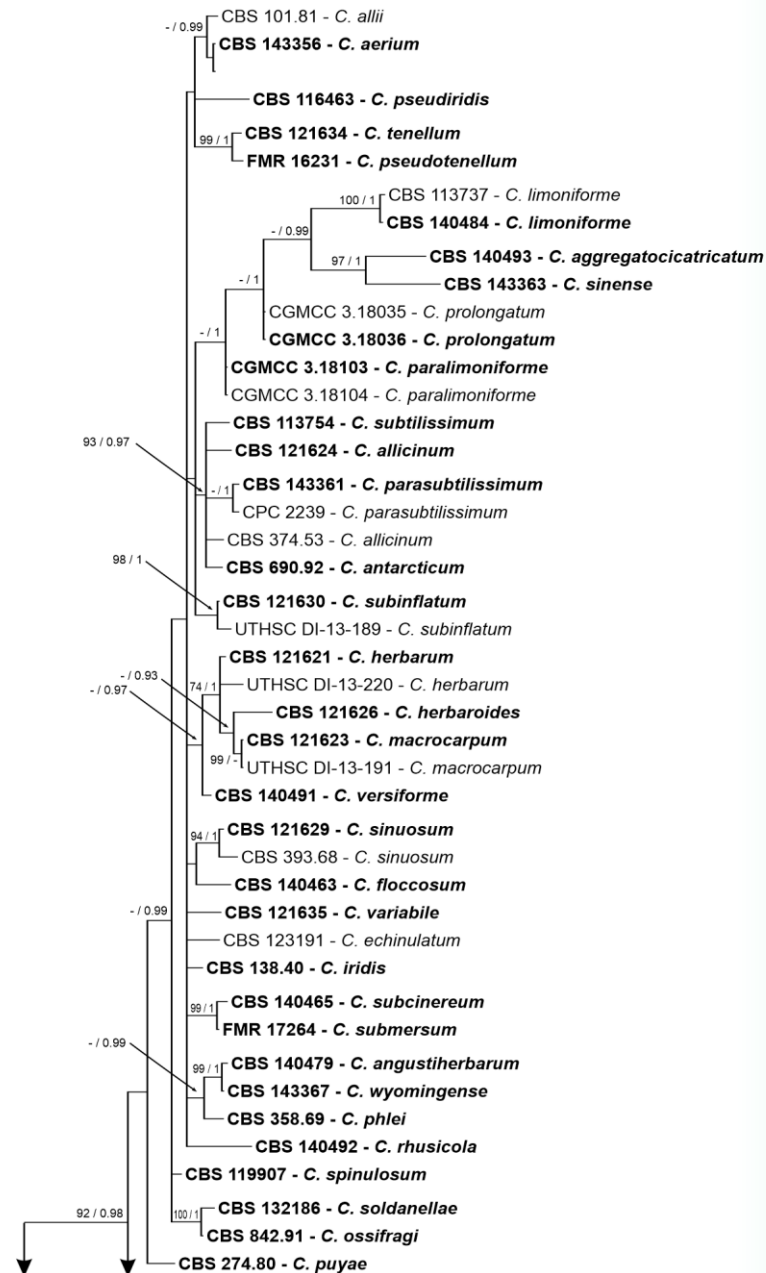
Dos isolados em estudos: dez pertencem ao Complexo *Cladosporium cladosporioides*; quatro estão relacionados ao Complexo *C. sphaerospermum*.

Quatro isolados se agruparam com espécies de *Cladosporium* já conhecidas:

- O isolado COAD 2578 agrupou-se com o isolado UTHSC DI-13-237 de *C. sphaerospermum* com baixo suporte (PP = 0,77), no entanto ambos os isolados formam um clado bem suportado (VB = 90 e PP = 1) com o tipo de *C. sphaerospermum*;
- O isolado COAD 2567 formou um clado com o espécime tipo de *C. asperulatum*, porém tal grupo possui suporte muito baixo (VB = 28 e PP = 0,66). Utilizando apenas as regiões ACT e ITS, a espécie *C. asperulatum* se mostrou polifilética. Assim, o sequenciamento de uma ou mais regiões seria necessário para resolver a filogenia desse grupo e melhor esclarecer a identidade do isolado COAD 2567;
- O isolado COAD 2558 se agrupou com *C. tenuissimum* CBS 125995 com alto suporte (VB = 94 e PP = 1) e ambos os isolados formaram um grupo monofilético com *C. tenuissimum* CPC 10882 com valor de bootstrap igual a 93;
- O isolado COAD 2559 formou um grupo com outros isolados já identificados como *C. xantochromaticum*, formando um grupo parafilético (em relação a *C. verruculosum*) com alto suporte (VB = 80 e PP = 0,96). Apesar da espécie *C. verruculosum* ser considerada como pertencente ao Complexo *C. herbarum* (MA et al., 2017), juntamente ao isolado COAD 2559, agrupou-se com isolados do Complexo *C. cladosporioides*, assim, possivelmente novas regiões gênicas serão necessárias para melhor posicionar *C. verruculosum* próxima a espécies do seu complexo e para verificar se há formação efetiva de um grupo monofilético entre isolados de *C. xantochromaticum* e COAD 2559.

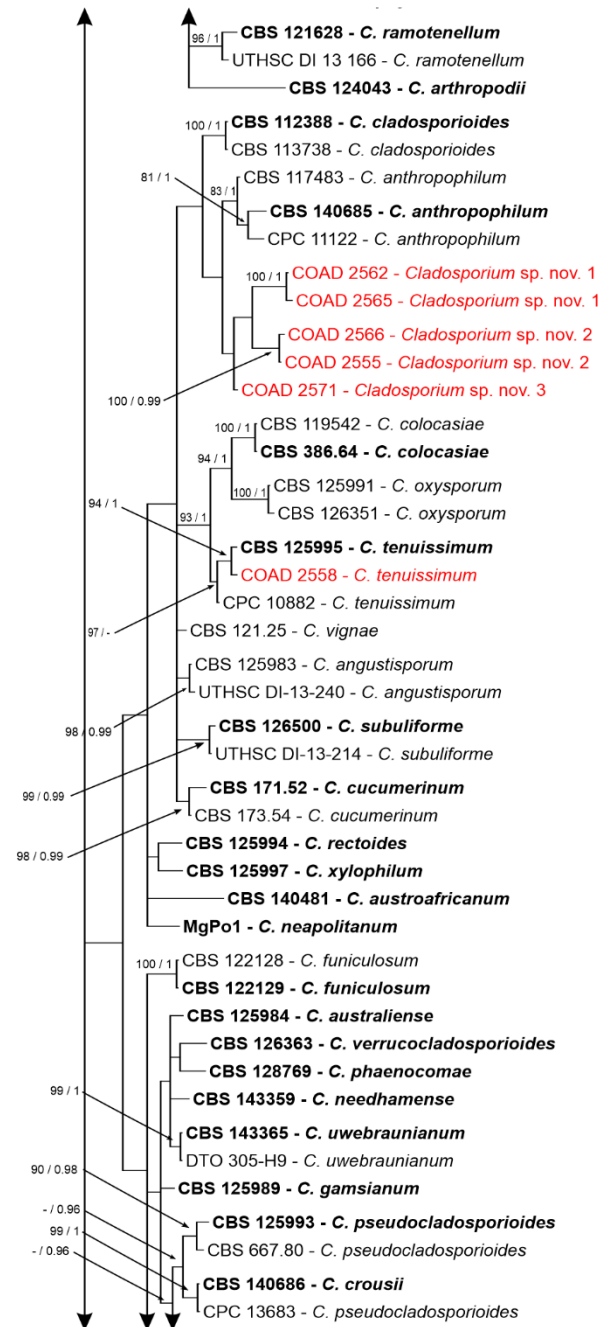
Os demais isolados não agruparam com outros *taxa* e, portanto, representam espécies consideradas aqui como novas para a ciência, dependendo de uma comparação da sua morfologia com a de espécies de *Cladosporium* para as quais não existam sequências das regiões-chave confiáveis, disponíveis nos bancos de dados públicos. Os isolados COAD 2562 e 2565, (*Cladosporium* sp. 1), formam um clado bem suportado (VB = 100 e PP = 1) irmão ao clado que inclui COAD 2566 e 2555 (*Cladosporium* sp. 2), o qual também apresenta alto suporte (VB = 100 e PP = 0,99). O isolado COAD 2571, *Cladosporium* sp. 3, se relaciona aos indivíduos citados anteriormente formando um ramo distinto, porém com baixo suporte (VB = 26 e PP = 0.78).

Os isolados COAD 3350, COAD 2570 e COAD 2581 (*Cladosporium* sp. 4, *Cladosporium* sp. 5 e *Cladosporium* sp. 6, respectivamente) formam ramos distintos, porém todos com baixa resolução. Já os isolados COAD 2568 e COAD 3351, *Cladosporium* sp. 7, pertencem ao Complexo *C. sphaerospermum* e formam um clado com baixo suporte (VB = 60 e PP = 0,8), no entanto diferem de *C. austrohemisphaericum* com alto suporte (V= 99 e PP = 1).



Complexo *C. herbarum*

**Figura 1.** Topologia de inferência bayesiana. Árvore baseada na concatenação das sequências de ACT e ITS. Nós bem suportados apresentam os valores de bootstrap (>70%) da ML e probabilidade posterior (>0.9) da BI. Os isolados em estudo encontram-se destacados em vermelho e espécimes tipo em negrito. Árvore enraizada com *Cercospora apii* (CBS 116455) e *Cercospora beticola* (CBS 116456).



Complexo *C. herbarum*

Complexo *C. cladosporioides*

Figura 1. Continuação.

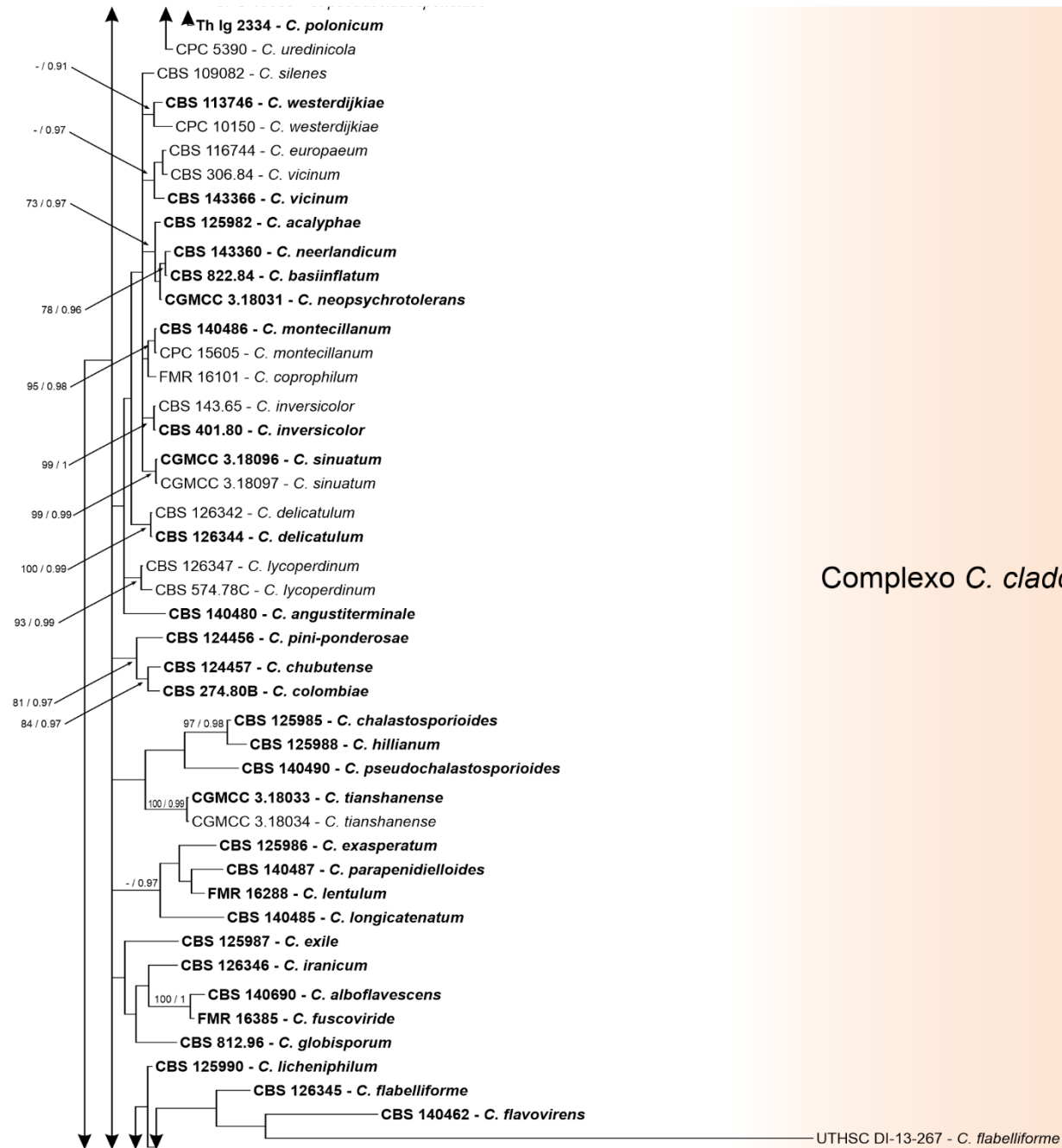


Figura 1. Continuação.

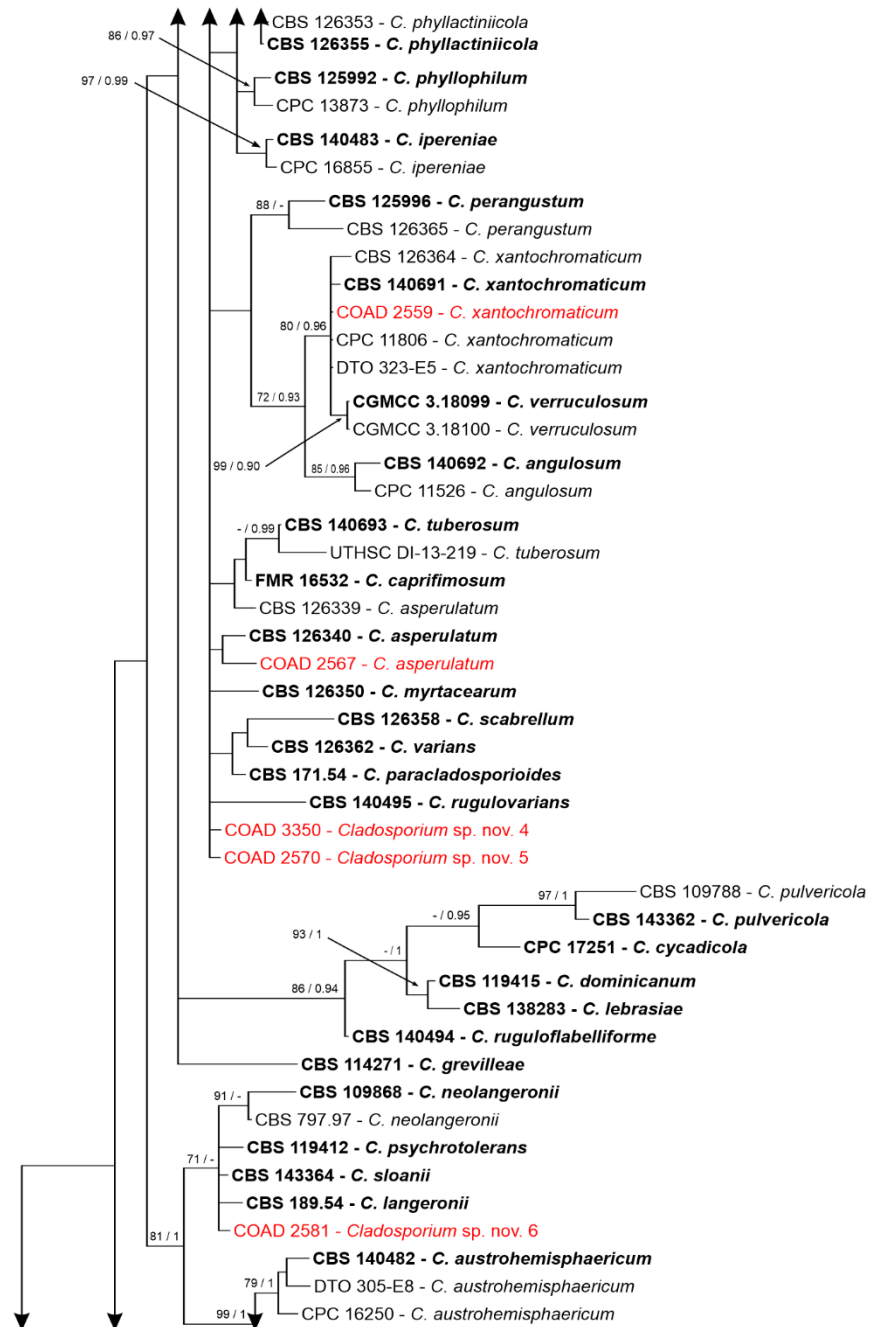
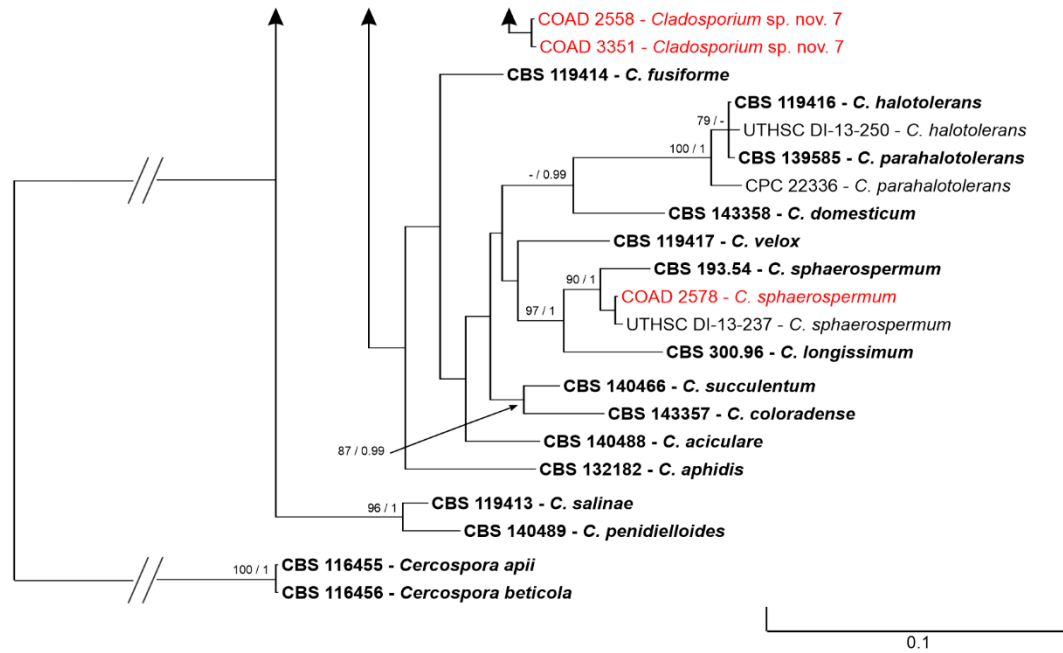
Complexo *C. cladosporioides*Complexo *C. sphaerospermum*

Figura 1. Continuação.



Complexo *C. sphaerospermum*

Figura 1. Continuação.

### 3.2. Taxonomia de *Cladosporium* spp.

A partir das análises filogenéticas foi possível identificar quatro espécies já descritas e outras sete possivelmente novas. As identidades das espécies já descritas são apresentadas a seguir, bem como características culturais e microscópicas. Além disso, apresenta-se as descrições das potenciais espécies novas.

***Cladosporium asperulatum*** Bensch, Crous & U. Braun – em Bensch et al., *Stud. Mycol.* 67: 21, 2010. MycoBank: MB517072.

*Material examinado* – BRASIL: Minas Gerais, São Sebastiao da Vitória, isolado de pústulas de *Hemileia vastatrix* em folhas de *Coffea arabica*. A. C. Colmán (isolado COAD 2567).

Características culturais (Fig. 2 A1 – A4) e microscópicas (Fig. 3 a-c) são apresentadas abaixo. Para uma descrição detalhada vide Bensch et al. (2018; 2010).

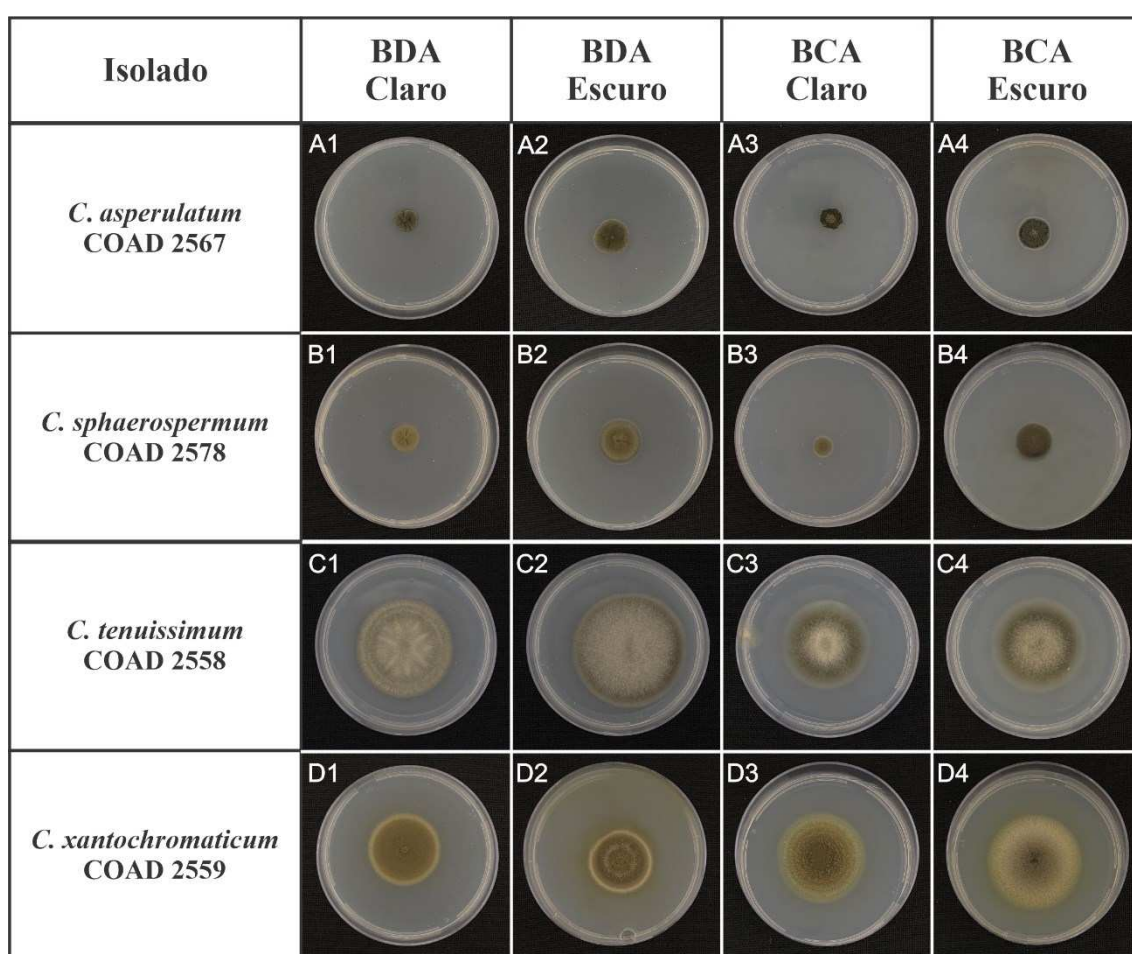
*Notas*: Características culturais do espécime avaliado diferem daquelas apresentadas por Bensch et al. (2018), porém medidas morfológicas são bem próximas. Espécimes de *C. asperulatum* foram obtidos em diferentes localidades (Índia, Portugal e Estados Unidos), isolados do ar e de diferentes substratos: serrapilheira de *Eucalyptus*, de *Protea susannae* e de gemas de videiras (BENSCH et al., 2018; 2010), porém não foram encontrados registros dessa espécie como micoparasita de *H. vastatrix* ou qualquer outro fungo. O registro geográfico no Brasil é também novo para a ciência.

***Cladosporium sphaerospermum*** Penzig – em Saccardo, *Michelia* 2 (8): 473, 1882. MycoBank: MB119529.

*Material examinado* – ETIÓPIA: Gore, isolado de pústulas de *Hemileia vastatrix* anormais, em folhas de *Coffea arabica* (isolado COAD 2578).

Ilustrações de culturas e estruturas microscópicas são apresentadas nas Fig. 2 (B1 – B4) e Fig. 3 (d, e), respectivamente. Para uma descrição completa da morfologia, vide Bensch et al. (2018).

*Notas:* O isolado avaliado tem morfologia muito similar à descrita por Bensch et al. (2018). *Cladosporium sphaerospermum* é um fungo cosmopolita e encontrado em uma grande variedade de substratos (BENSCH et al., 2018). Originalmente essa espécie foi descrita a partir de folhas e caules de *Citrus* sp. (SACCARDO, 1882). Na literatura há registro de testes visando avaliar o potencial para o controle biológico de um isolado dessa espécie contra diferentes espécies de *Puccinia* spp., no entanto o isolado não apresentou bons resultados em comparação aos outros fungos aplicados, a saber: *Akanthomyces lecanii* e *Aphanocladium album* (SRIVASTAVA et al., 1985). Não há registro anterior na literatura de *C. sphaerospermum* como micoparasita em pústulas de *H. vastatrix*.



**Figura 2.** Características culturais de espécies de *Cladosporium* já descritas em meios BDA e BCA, sob fotoperíodo (12h com luz/12h sem luz) e escuro (24h sem luz) após 7 dias. (A1 – A4) *C. asperulatum* COAD 2567; (B1 – B4) *C. sphaerospermum* COAD 2578; (C1 – C4) *C. tenuissimum* COAD 2558; (D1 – D4) *C. xanthochromaticum* COAD 2559.

*Cladosporium tenuissimum* Cooke – em Cooke, *Grevillea* 6 (40): 140, 1878.  
Mycobank: 145672.

*Material examinado* – BRASIL: Minas Gerais, Varginha, isolado de urédias de *Hemileia vastatrix* em folhas de *Coffea arabica*. 05 de julho de 2015, A. C. Colmán (isolado COAD 2558).

Para uma descrição detalhada da morfologia, vide Ilustrações de culturas e estruturas microscópicas são apresentadas em Bensch et al. (2018; 2010). Fig. 2 (C1 – C4) e Fig. 3 (f, g), respectivamente.

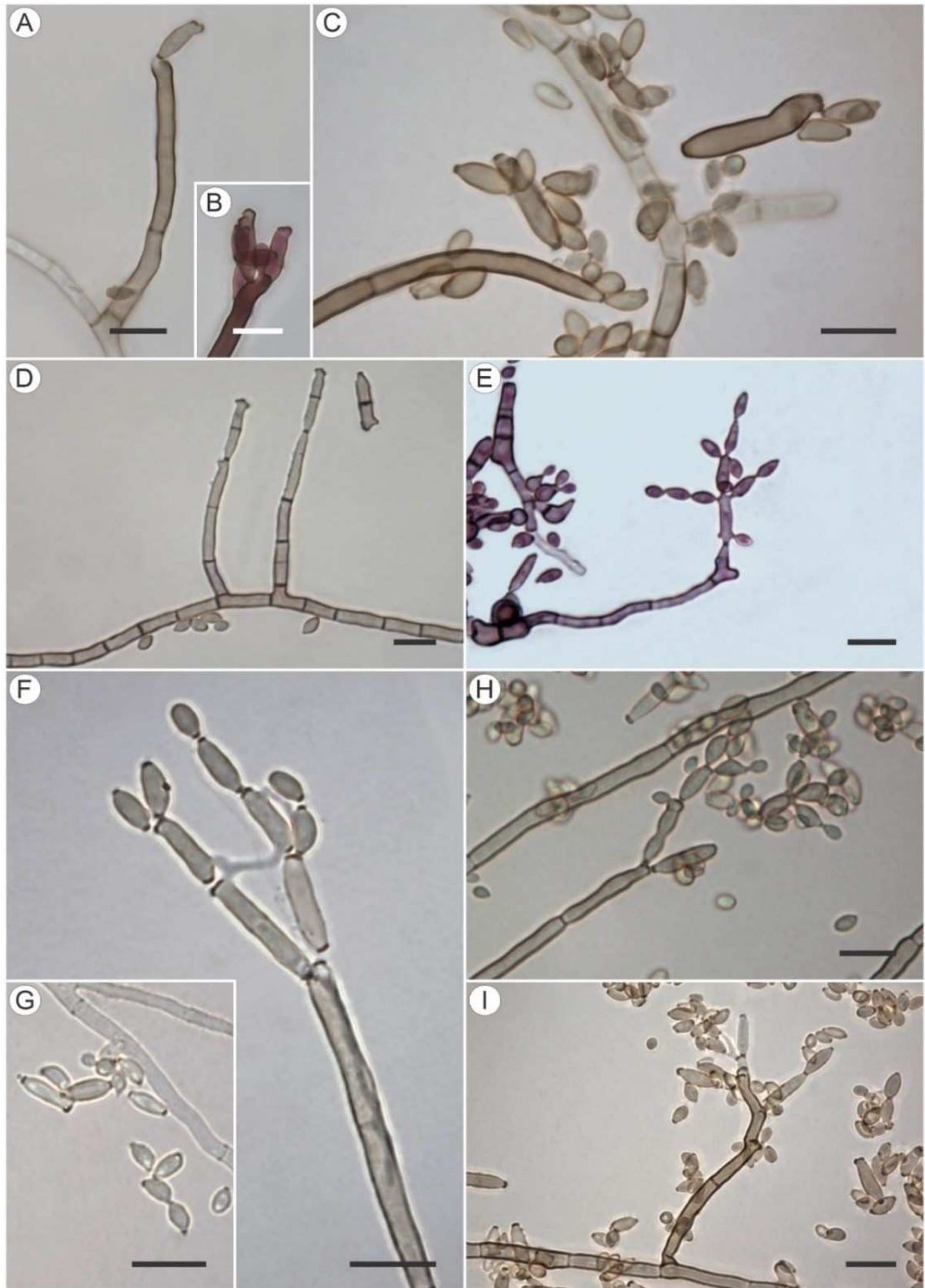
*Notas:* O isolado estudado apresentou morfologia similar as apresentadas nas descrições de Bensch et al. (2018; 2010). *Cladosporium tenuissimum* também é um fungo cosmopolita e é comumente isolado de muitos substratos (BENSCH et al., 2018; 2010), inclusive sendo relatado como agente etiológico de doenças em diferentes plantas, como morangueiros e pepinos (NAM et al., 2015; BATTA, 2004). Há registro dessa espécie como micoparasita em pústulas de *Cronartium flaccidum*, *C. pini* e *Uromyces appendiculatus* (MORICCA et al., 2007; ASSANTE et al., 2004). Não há registro anterior de sua associação com *H. vastatrix*.

***Cladosporium xantochromaticum*** Sandoval-Denis et al. – em Sandoval-Denis et al., *Persoonia* 36: 295,2016. MycoBank: MB815340.

*Material examinado* – BRASIL: Minas Gerais, São Sebastiao da Vitória, isolado de urédias de *Hemileia vastatrix* em folhas de *Coffea arabica*. A. C. Colmán. (isolado COAD 2559).

Para uma descrição completa da morfologia, vide Sandoval-Denis et al, (2016). Ilustrações de culturas e estruturas microscópicas são apresentadas nas Figs 3 (D1 –D4) e 4 (h, i), respectivamente.

*Notas:* Trata-se de um fungo descrito recentemente e o isolado tipo foi encontrado em fluido de lavagem broncoalveolar de humano nos Estados Unidos (SANDOVAL-DENIS et al, 2016). O fungo foi isolado também do ar, de amostras de solo e até mesmo a partir de plantas de diferentes localidades, como *Eucalyptus* sp. e *Musa* sp. na Índia e *Strelitzia* sp. e *Triticum aestivum* na África do Sul, (BENSCH et al. 2018). Pelo que é de nosso conhecimento ainda não há relatos de *C. xantochromaticum* na América do Sul e nem tendo outros fungos como substrato, assim a associação com *H. vastatrix* é inédita.



**Figura 3.** Características microscópicas de espécies de *Cladosporium* já descritas. *C. asperulatum* COAD 2567: (A) Conidióforo e (B, C) e conídios em detalhes; *C. sphaerospermum* COAD 2578: (D) Conidióforos e ramoconídios e (E) conídios em cadeia; *C. tenuissimum* COAD 2558: (F) Conidióforo com ramoconídios dando origem a conídios e (G) conídios. *C. xanthochromaticum* COAD 2559: (H) Célula conidiogênica com ramoconídios dando origem a conídios em cadeia e (I) Conidióforo com conídios. – Barras de escala: 10 µm.

***Cladosporium* sp. nov. 1** – Fig. 4 e Fig. 5 (A1 – A4).

*Materiais examinados* – BRASIL: Minas Gerais, Três Pontas, plantio comercial, isolado de urédias de *Hemileia vastatrix* em folhas de *Coffea arabica*. A. C. Colmán (isolado COAD 2565); Minas Gerais, Araponga, plantio comercial, isolado de urédias de *Hemileia vastatrix* em folhas de *Coffea arabica*. 03 de maio de 2015, R. W. Barreto (isolado COAD 2562).

*Características culturais*: Colônia em BDA sob fotoperíodo (Fig. 6-A1) atingindo 28 mm diam após 7 dias a 25°C; dull green a grey olivaceous e bordas esbranquiçadas; reverso olivaceous black e bordas brancas; colônia com aspecto pulverulento, plana, bordas inteiras e crescimento irradiado; micélio aéreo moderado, nota-se zonação diurna; esporulação abundante. Colônia em BDA no escuro (Fig. 6-A2) atingindo 37 mm diam após 7 dias a 25°C; centro em dull green a olivaceous, mudando para zona greenish grey com tons em dark green, periferia em herbage green e bordas esbranquiçadas; reverso olivaceous black, centralmente, mudando para região herbage green e bordas brancas; colônia aveludada, convexa, com bordas inteiras e crescimento irradiado; micélio aéreo denso; esporulação moderada.

Colônia em BCA e sob fotoperíodo (Fig. 6-A3) atingindo 27 mm diam após 7 dias a 25°C; centro em grey olivaceous, periferia em greenish glaucous e bordas esbranquiçadas; reverso olivaceous black com bordas brancas; colônia feltrosa, convexa a levemente convexa, com bordas inteiras e crescimento irradiado; micélio aéreo denso; esporulação abundante. Colônia em BCA e no escuro (Fig. 6-A4) atingindo 30 mm diam após 7 dias a 25°C; centro grey olivaceous, seguido de região greenish grey, na periferia herbaceous green e bordas esbranquiçadas; reverso olivaceous black, mudando para dark herbage green e bordas brancas; colônia feltrosa, convexa, com bordas inteiras e crescimento irradiado; micélio aéreo denso ao centro, com formação de tufos; esporulação moderada.

*Descrição*: *Micélio* imerso e superficial, hifas pouco ramificadas, 1,5–4,5 µm diam, septadas com algumas constrições, marrom claras a marrom acinzentadas, liso e espesso. *Conidióforos* macro- e micronematosos, surgindo lateralmente ou terminalmente a hifa. *Conidióforo macronematoso* solitário, ereto, as vezes sinuoso, não ramificado, 89–427,5 × 3–5 µm, 4–14 septos, marrom escuro, superfície lisa e grossa. *Célula conidiogênica* integrada, terminal, 10–41 × 2,5–5 µm e com proliferação simpodial. *Loci conidiogênicos* de 1 a 4, conspicuos, convexos, 1–2 µm, escuros e espessos. *Conidióforo micronematoso* pouco distinto e lateral a hifa, mais ou menos abundante, curto, cilíndrico, não ramificado, 18–100,5 × 2,5–6 µm, 1–5 septos, marrom claro, lisos, parede espessa. *Célula conidiogênica* integrada, terminal,

levemente cilíndrica a cônica e com um único locus. *Ramoconídio* cilíndrico estreitando-se em direção à base,  $7\text{--}28 \times 3\text{--}4,5 \mu\text{m}$ , 0–1 septos, com uma cicatriz basal e 1–3 apical, ápice obtuso e base truncada, marrom acinzentado, lisos, paredes finas. *Conídios* catenulados em cadeias acrópetas e ramificadas. *Ramoconídio secundário* elipsoide a oblongo ou ovoide,  $5,5\text{--}28 \times 3\text{--}4,5 \mu\text{m}$ , 0–1 septos, ápice truncado e base levemente curvada, cicatrizes terminais 2-3, marrom pálido, superfície lisa e fina. *Conídio intercalar* limoniforme a elipsoide,  $4\text{--}7 \times 2\text{--}3,5 \mu\text{m}$ , asseptado, cicatrizado nas duas extremidades, marrom pálido, lisos, finos. *Conídio terminal* subgloboso a elipsóide,  $3\text{--}6 \times 2\text{--}3,5 \mu\text{m}$ , asseptado, ápice arredondado, base com uma cicatriz truncada, marrom pálido, liso, parede fina.

*Notas:* *Cladosporium* sp. nov. 1 forma um grupo monofilético irmão a *Cladosporium* sp. nov. 2 dentro do Complexo *C. cladosporioides*, porém tais espécies são



**Figura 4.** Características morfológicas de *Cladosporium* sp. nov. 1 (COAD 2565). (A,B) Conidiofóro dando origem a conídios. (C) Detalhes durante a formação de conídios em cadeia. (D) Parte de célula conidiogênica e conídios. – Barras de escala: 10  $\mu\text{m}$ .

distintas em relação as características culturais e microscópicas. Além disso *Cladosporium* sp. nov. 1 parece ter distribuição geográfica limitada, tendo sido encontrado apenas no Brasil, no estado de Minas Gerais.

***Cladosporium* sp. nov. 2** – Fig. 5 (B1 – B4) e Fig. 6.

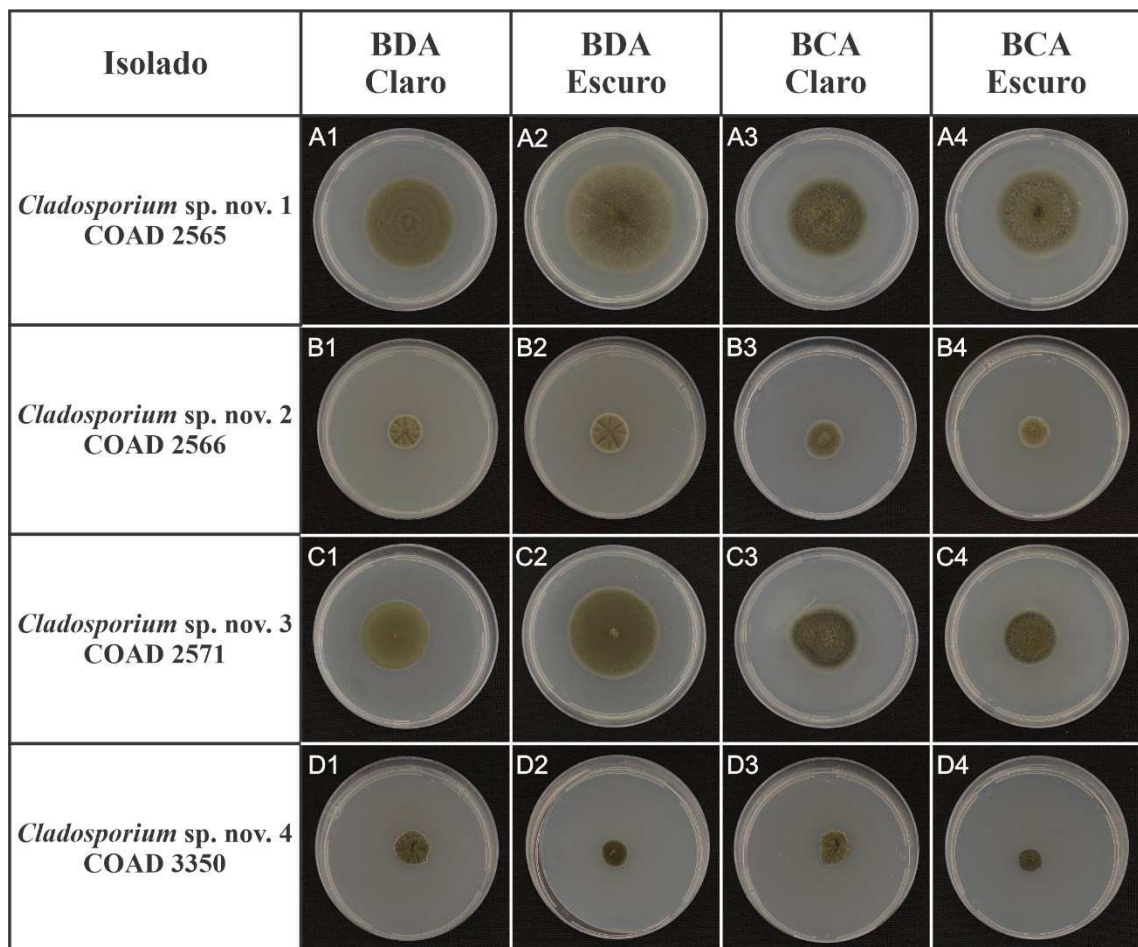
*Materiais examinados* – BRASIL: Minas Gerais, Florestal, Campus da Universidade Federal de Viçosa, isolado de pústulas de *Hemileia vastatrix* em folhas de *Coffea arabica*. 19 de junho de 2015, A. C. Colmán (isolado COAD 2566); Rio de Janeiro, Duas Barras, Fazenda do Campo, plantio comercial, isolado de pústulas de *Hemileia vastatrix* em folhas de *Coffea arabica*. 02 de maio de 2015, R. W. Barreto (isolado COAD 2555).

*Características culturais*: Colônia em BDA sob fotoperíodo, e no escuro, com morfologia equivalente (Fig. 6-B1 e 6-B2) atingindo 12 e 14 mm diam, respectivamente, após 7 dias a 25°C; centro grey olivaceous, faixa em dark herbage green e bordas brancas; reverso olivaceous black e bordas brancas; colônia aveludada, levemente convexa, bordas inteiras com algumas pequenas ondulações, zonação diurna presente, micélio aéreo moderado, formando aglomerados ao centro; esporulação abundante.

Colônia em BCA e sob fotoperíodo (Fig. 6-B3) e no escuro (Fig. 6-B4) atingindo 14 e 10 mm diam, respectivamente, após 7 dias a 25°C; grey olivaceous e bordas brancas; reverso olivaceous black e bordas brancas; colônia aveludada a feltrosa, levemente convexa, com bordas inteiras e crescimento irradiado; micélio aéreo moderado, formando tufo elevados ao centro; esporulação moderada.

*Descrição*: *Micélio* imerso e superficial, hifas ramificadas, 2,5–6 µm diam, septado, sem constrições, subhialinas a marrom claras, liso, paredes mais ou menos finas. *Conidióforos* ambos, macro- e micronematosos, surgindo lateralmente ou terminalmente a hifa. *Conidióforo macronematoso* solitário, reto e as vezes sinuoso, não ramificado, 31–281,5 × 3,5–5,5 µm, 2–10 septos, marrom escuro, lisos, parede espessa. *Célula conidiogênica* integrada, terminal, proliferando simpodialmente 2–3 vezes, 11–50 × 2–5,5 µm. *Loci conidiogênicos*, conspícuos, truncados, 1,5–2,5 µm, escuros, espessados. *Conidióforo micronematoso* distinguível e lateral a hifa, mais ou menos abundante, curto, cilíndrico, não ramificados, 27–160 × 3–5 µm, 1–5 septos, marrom claro, liso, parede um pouco espessa. *Célula conidiogênica* integrada, terminal, levemente cilíndrica e com um locus. *Ramoconídio* cilíndrico a clavado, 12–31,5 × 2,5–5 µm,

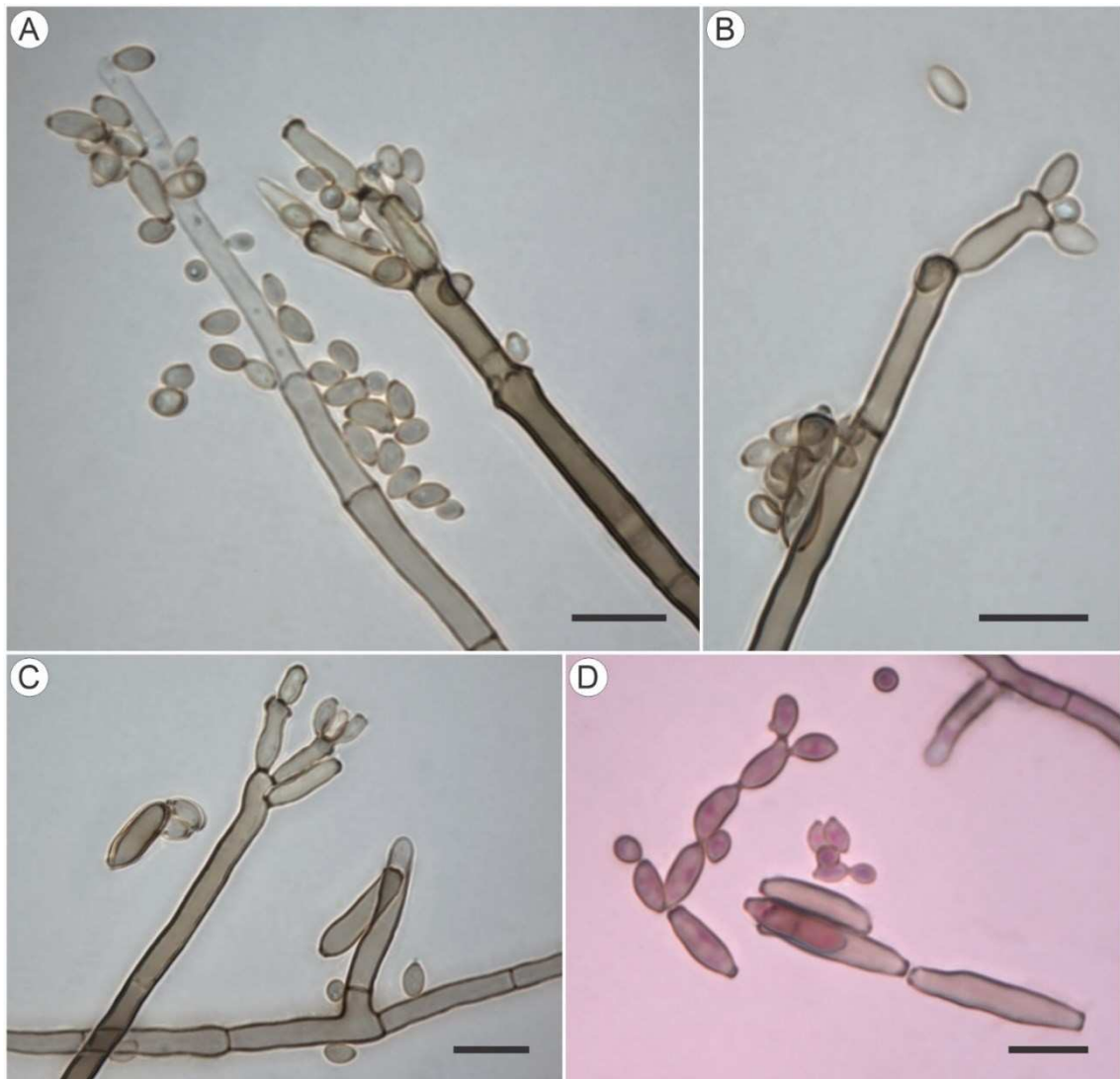
0–2 septos, ápice e base truncada, marrom pálido, liso, parede espessa. *Conídios* catenulados e em cadeias acrópetas ramificadas. *Ramoconídio secundário* elipsoide e a cilíndrico,  $4,5\text{--}12 \times 2,5\text{--}3,5 \mu\text{m}$ , aseptados, marrom pálido, lisos, parede fina, ápice obtuso, com dois hilos, discretos, convexos, finos e escuros. *Conídio intercalar* limoniforme, elipsoide a oblongo,  $4\text{--}13,5 \times 2\text{--}4 \mu\text{m}$ , asseptado, marrom pálido, lisos, parede fina, cicatriz presente, porém as vezes de difícil visualização. *Conídio terminal* globoso, proeminente terminalmente,  $3,5\text{--}6,5 \times 2,5\text{--}6,5 \mu\text{m}$ , asseptado, marrom pálido, liso, parede um pouco espessa, com cicatriz pouco evidente.



**Figura 5.** Características culturais de *Cladosporium* spp. em meios BDA e BCA, sob fotoperíodo (12h com luz/12h sem luz) e escuro (24h sem luz) após 7 dias. (A1 – A4) *Cladosporium* sp. nov. 1 COAD 2565; (B1 – B4) *Cladosporium* sp. nov. 2 COAD 2566; (C1 – C4) *Cladosporium* sp. nov. 3 COAD 2571; (D1 – D4) *Cladosporium* sp. nov. 4 COAD 3350.

*Notas:* *Cladosporium* sp. nov. 2 pertence ao Complexo *C. cladosporioides* e os isolados avaliados formam um clado bem suportado. Dentre os isolados de *Cladosporium*, tal espécie também foi observada somente no Brasil, no entanto sua distribuição geográfica aparenta ser

mais ampla em comparação a *Cladosporium* sp. nov. 1, já que os espécimes foram obtidos de MG e RJ.



**Figura 6.** Características morfológicas de *Cladosporium* sp. nov. 2 (COAD 2566). (A,B, C) Conidifóros dando origem a conídios. (D) Detalhes de conídios em cadeia curta. – Barras de escala: 10  $\mu$ m.

***Cladosporium* sp. nov. 3** – Fig. 5 (C1 – C4) e Fig. 7.

*Material examinado* – QUÊNIA: isolado de urédias de *Hemileia vastatrix* em folhas de *Coffea arabica* (Isolado COAD 2571).

*Características culturais*: Colônia em BDA e sob fotoperíodo (Fig. 6-C1) atingindo 23 mm diam após 7 dias a 25°C; dull green clareando em direção as periferias de cor herbage green e bordas brancas; reverso olivaceous black e bordas brancas; colônia aveludada/ pulverulenta, plana, com bordas inteiras, zonação diurna e crescimento irradiado; micélio aéreo moderado;

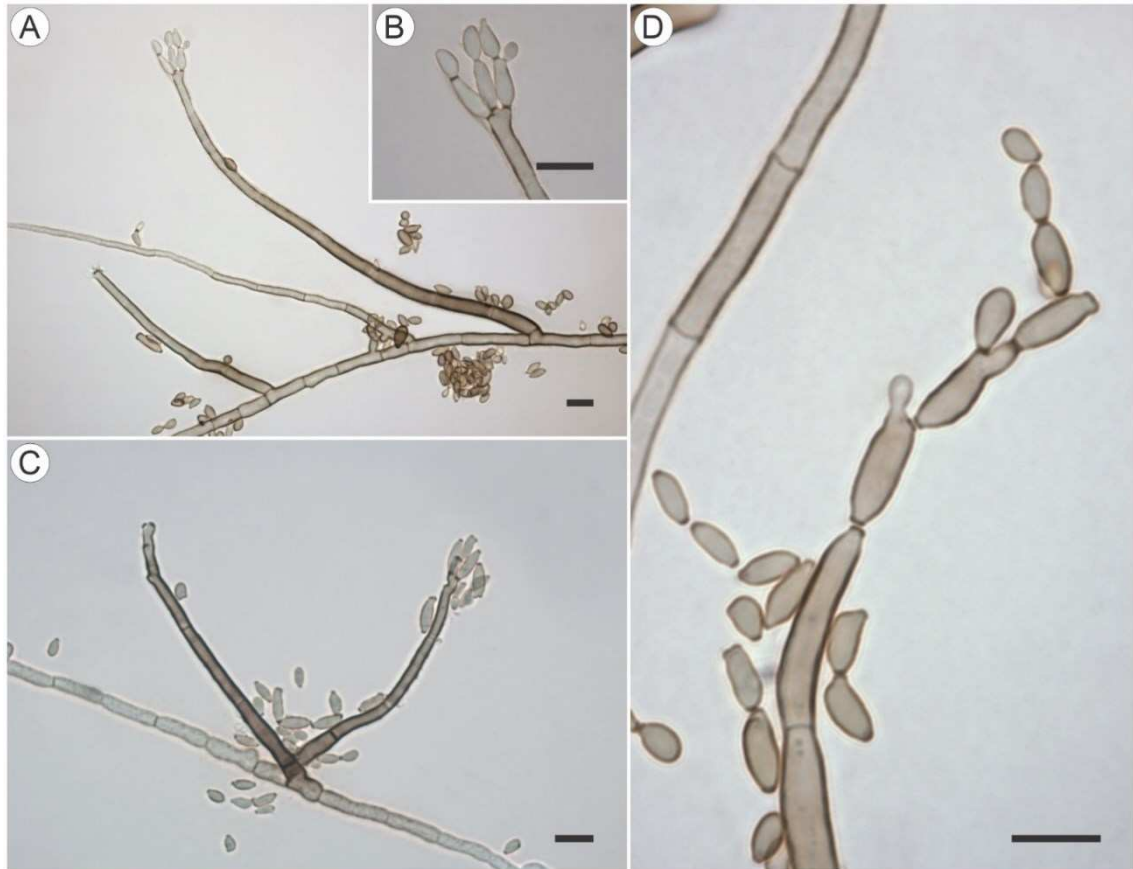
esporulação abundante. Colônia em BDA e no escuro (Fig. 6-C2) atingindo 30 mm diam após 7 dias a 25°C; grande área em grey olivaceous, dull green subjacente, periferia em herbage green e bordas esbranquiçadas; reverso olivaceous black, mudando a dark herbage green e bordas brancas; colônia pulverulenta, plana, com crescimento irradiado e bordas inteiras; micélio aéreo moderado a ralo, com pequeno tufo ao centro; esporulação abundante.

Colônia em BCA e sob fotoperíodo (Fig. 6-C3) atingindo 23 mm diam após 7 dias a 25°C e no escuro (Fig. 6-C4) alcançando 19 mm diam; centro em grey olivaceous, seguido de região dull green a olivaceous black, periferia herbage green e bordas brancas; reverso olivaceous black e bordas brancas; colônia com aspecto pulverulento/ feltroso, plana a levemente convexa, com bordas inteiras e crescimento irradiado; micélio aéreo moderado, formando tufos ao centro e ralo no restante da colônia; esporulação abundante.

*Descrição:* Micélio imerso e superficial, hifas muito pouco ramificadas, 3–6,5 µm diam, septadas, marrom claras, lisas e pouco espessas. *Conidióforos* ambos, macro- e micronematosos, surgindo lateralmente ou terminal a hifa. *Conidióforo macronematoso* solitário, reto, as vezes sinuoso, raramente ramificado basalmente, 34,5–160 × 2,5–7 µm, 2–7 septos, marrom claro a marrom, lisos, paredes grossas. *Célula conidiogênica* integrada e terminal subcilíndrica, proliferando simpodialmente 1–5 vezes, 11,5–81 × 2,5–6,5 µm. *Loci conidiogênicos* conspícuos, truncados, 1–2 µm, escuros, espessados. *Conidióforo micronematoso* facilmente distinguível e lateral a hifa, pouco abundante, curto, cilíndrico, não ramificados, 10,5–64,5 × 2,5–6,5 µm, 1–3 septos, marrom claro, lisos, finos. *Célula conidiogênica* integrada, terminal ou conidióforo reduzido às células conidiogênicas, cilíndricas a levemente cônicas e com um único locus. *Ramoconídio* cilíndrico a clavado, 9–50,5 × 2–5,5 µm, 0–1 septos, marrom, liso, fino e base truncada. *Conídios* em cadeias acrópetas ramificadas. *Ramoconídio secundário* elipsoide a oblongo com a base truncada, 4–10,5 × 2,5–5 µm, asseptados, marrom, lisos, finos, ápice plano, com 2-3 hilos discretos, truncados, finos e marrom escuro. *Conídio intercalar* limoniforme, 5,5–12,5 × 2,5–5 µm, asseptado, marrom claro, liso, fino, cicatriz as vezes visível de cor escura. *Conídio terminal* globoso a elipsoide ou apiculado, 3–6 × 2–3,5 µm, asseptado, marrom, lisos, finos, cicatriz pouco evidente.

*Notas:* *Cladosporium* sp. nov. 3 forma um grupo único com as espécies citadas acima dentro do Complexo *C. cladosporioides*, no entanto forma um ramo distinto. Além das características filogenéticas, *Cladosporium* sp. nov. 3 difere de *Cladosporium* sp. nov. 1 e *Cladosporium* sp. nov. 2 por fatores morfológicos, como a presença de conidióforos

macronematosos ramificados (o que não se observou nas demais espécies). Apenas uma amostra desse fungo foi obtida no levantamento em ocorrência isolada no Quênia.



**Figura 7.** Características morfológicas de *Cladosporium* sp. nov. 3 (COAD 2571). (A, C) Conidifóro dando origem a conídios. (B) Detalhes durante da formação de conídios. (D) Diferentes conídios em cadeia. – Barras de escala: 10 µm.

***Cladosporium* sp. nov. 4** – Fig. 5 (D1 – D4) e Fig. 8.

*Material examinado* – ETIÓPIA: Gamadro, isolado de urédias de *Hemileia vastatrix* em folhas de *Coffea arabica* (isolado COAD 3350).

*Características culturais*: Colônia em BDA e sob fotoperíodo (Fig. 6-D1) atingindo 11 mm diam após 7 dias a 25°C grey olivaceous e bordas brancas; reverso olivaceous black e bordas brancas; colônia aveludada, convexa com superfície rugosa e com bordas onduladas; micélio aéreo moderado; esporulação abundante. Colônia em BDA e no escuro (Fig. 6-D2) atingindo 11 mm diam após 7 dias a 25°C; grey olivaceous a dull green e bordas brancas; reverso olivaceous black e bordas brancas; colônia feltrosa, elevada e com bordas lobadas; micélio aéreo moderado, formando alguns tufos ao centro; esporulação abundante.

Colônias em BCA e sob fotoperíodo (Fig. 6-D3) e no escuro (Fig. 6-D4) atingindo 9 e 8 mm diam, respectivamente, após 7 dias a 25°C; micélio grey olivaceous, dull green subjacente, bordas esbranquiçadas; olivaceous black e bordas brancas; colônia aveludada/pulverulenta, plana, com bordas inteiras, mas um pouco onduladas e crescimento irradiado; micélio aéreo moderado, formando agregados ao centro; esporulação abundante.



**Figura 8.** Características morfológicas de *Cladosporium* sp. nov. 4 (COAD 3350). (A, C) Conidiofóros dando origem a conídios. (B) Detalhes de célula conidiogênica e ramoconídio (D) Detalhes de conídios. – Barras de escala: 10 µm.

*Descrição:* Micélio imerso e superficial, hifas bem ramificadas, 2–4,5 µm diam, septadas, acinzentadas a marrom claras, lisas, parede mais ou menos espessa. *Conidióforos* ambos, macro- e micronematosos, surgindo lateralmente ou terminal a hifa. *Conidióforo macronematoso* solitário, reto, não ramificado, 7,5–165 × 3–5,5 µm, 1–8 septos, marrom oliváceo a marrom escuro, liso, paredes mais ou menos espessas. *Célula conidiogênica* integrada, terminal, proliferando simpodialmente 1–3 vezes, 17,5–38,5 × 2,5–5 µm. *Loci conidiogênicos* conspícuos, protuberantes, convexos, 1,5–2 µm e escuros. *Conidióforo micronematoso* pouco distinto, lateral a hifa, pouco abundante, curto, subcilíndrico, não ramificado, 4,5–83 × 2,5–6 µm, 1–4 septos, marrom claro, lisos, parede fina. *Célula conidiogênica* integrada, terminal ou as vezes conidióforo reduzido a células conidiogênicas, cilíndrica a subcilíndrica e com um único locus conidiogênico. *Ramoconídio* cilíndrico a clavado com a base truncada, 7,5–24,5 × 2–6 µm, 0–4 septos, marrom acinzentado, lisos, parede um pouco espessa. *Conídios* catenulados, em cadeias acrópetas e ramificadas. *Ramoconídio secundário* elipsoide a oblongo, 3,5–14 × 1,5–5,5 µm, 0–1 septos, marrom acinzentado, lisos, parede fina, ápice truncado e com dois hilos, os quais são destacados, convexos, finos e escuros. *Conídio intercalar* limoniforme a elipsoide, 3,5–20 × 1,5–4 µm, predominantemente asseptado, mas as vezes com um septo transversal, de cor marrom acinzentado, lisos, parede fina e cicatriz visível, de cor escura. *Conídio terminal* globoso a apiculado, 2,5–6 × 2–4 µm, asseptados, marrom acinzentado, lisos, parede fina e com cicatriz evidente e escura.

*Notas:* *Cladosporium* sp. nov. 4 é membro do Complexo *C. cladosporioides*, no entanto não apresentou proximidade filogenética com outras espécies já conhecidas, formando um ramo único e distinto. Apenas um único isolado desse fungo foi obtido, oriundo da Etiópia.

***Cladosporium* sp. nov. 5** – Fig. 9 e Fig. 10 (A1-A4).

*Material examinado* – BRASIL: Minas Gerais, Lambari, isolado de urédia de *Hemileia vastatrix* em folhas de *Coffea arabica*. 19 de junho de 2015, A. C. Colmán (isolado COAD 2570).

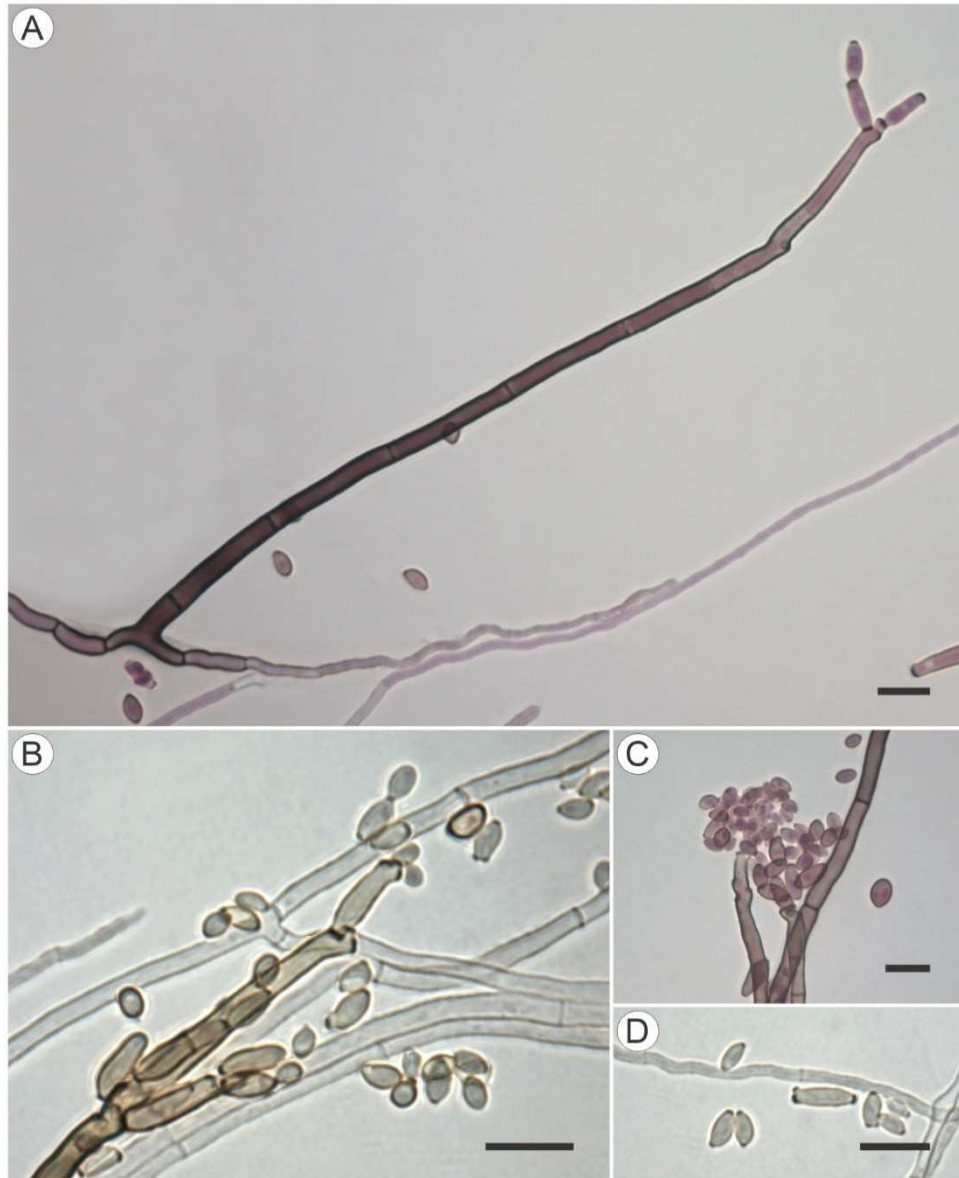
*Características culturais:* colônia em BDA e sob fotoperíodo (Fig. 11-A1) atingindo 15 mm diam após 7 dias a 25°C; ao centro grey olivaceous, mudando para dull green e clareando em direção à periferia dark herbage green, bordas brancas; reverso olivaceous black; colônia aveludada, plana a levemente convexa e com bordas inteiras; micélio aéreo moderado, com formação de tufos ao redor do centro; esporulação abundante. Colônia em BDA, no escuro (Fig.

11-A2) atingindo 14 mm diam após 7 dias a 25°C, semelhante ao crescimento sob fotoperíodo, no entanto nota-se presença de setor branco.

Colônia em BCA e sob fotoperíodo e no escuro (Fig. 11-A3 e A4, respectivamente) atingindo 16 mm diam em ambos os regimes após 7 dias a 25°C; micélio superficial smoke grey,, coloração subjacente olivaceous grey a dull green ao centro, mudando para herbage green e bordas brancas; reverso olivaceous black, seguido de greenish glaucous e bordas brancas; colônia feltrosa, convexa, com crescimento irradiado e bordas inteiras; micélio aéreo abundante, formando tufos ao centro; esporulação moderada.

*Descrição:* Micélio imerso e superficial, hifas pouco ramificadas, 1–6 µm, septadas, as vezes com constrições, subhialinas a marrom claras, lisas, paredes espessas. *Conidióforos* ambos, macro- e micronematosos, surgindo lateralmente ou terminal às hifas. *Conidióforo macronematoso* solitário, reto ou algumas vezes levemente sinuoso, não ramificado, 65–233 × 2,5–8,5 µm, 4–9 septos, marrom claro, liso, paredes espessas. *Célula conidiogênica* integrada, terminal, 15–106 × 2–8 µm. *Loci conidiogênicos* conspicuos, 1–5, protuberantes, arredondados, 1,5–2 µm, espessados, pretos. *Conidióforo micronematoso* dificilmente distinguível e lateral a hifa, frequente, curto, cilíndrico, não ramificado, 7,5–79 × 2–7 µm, 1–5 septos, subhialino, sem constrições, parede lisa e fina. *Célula conidiogênica* integrada, terminal, subcilíndrica ou filiforme, com um único locus conidiogênico. *Ramoconídio* cilíndrico, 8–17 × 2,5–4 µm, 0–1 septos, marrom claro, parede lisa e fina, base plana e cicatriz conspícua. *Conídios* catenulados, em cadeias acrópetas pouco ramificadas. *Ramoconídio secundário* cilíndrico a clavado com ápice truncado a levemente convexo e base truncada, 3,5–9,5 × 2,5–4 µm, asseptado, marrom claro, liso, parede fina. *Conídio intercalar* limoniforme, 4–10,5 × 2,5–4 µm, asseptado, marrom claro, liso, parede fina, com cicatriz presente e escura. *Conídio terminal* globoso a elipsoide, 3–7 × 2–4,5 µm, asseptado, marrom claro, superfície lisa, cicatriz presente, mas as vezes de difícil distinção e escura.

Notas: *Cladosporium* sp. nov. 5 também é membro do Complexo *C. cladosporioides* e não apresentou relacionamento próximo a outras espécies já descritas, formando um ramo único e distinto. Um único isolado desse fungo foi obtido (no Brasil, estado de MG).



**Figura 9.** Características morfológicas de *Cladosporium* sp. nov. 5 (COAD 2570). (A) Conidiofóro dando origem a conídios. (B) Detalhes durante a formação de conídios. (C, D) Detalhes de diferentes conídios. – Barras de escala: 10 µm.

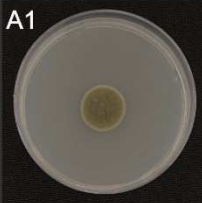







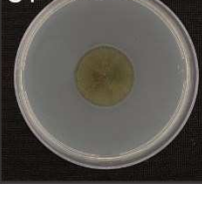



***Cladosporium* sp. nov. 6** – Fig. 10 (B1 – B4) e Fig. 11.

*Material examinado* – ETIÓPIA: Bitá, isolado de urédias de *Hemileia vastatrix* em folhas de *Coffea arabica* (isolado COAD 2581).

*Características culturais:* Colônia em BDA e sob fotoperíodo (Fig. 11-B1) atingindo 3 mm diam após 7 dias a 25°C; colônia grey olivaceous com periferia olivaceous black e bordas esbranquiçadas; reverso olivaceous black e bordas brancas; colônia com aspecto aveludado, elevada e com bordas onduladas; micélio aéreo ralo; esporulação abundante. Colônia em BDA no escuro (Fig. 11-B2) atingindo 6 mm diam após 7 dias a 25°C; centro grey olivaceous e

restante em olivaceous black; reverso olivaceous black; colônia aveludada, com aparência rugosa, elevada e de bordas onduladas; micélio aéreo ralo; esporulação abundante.

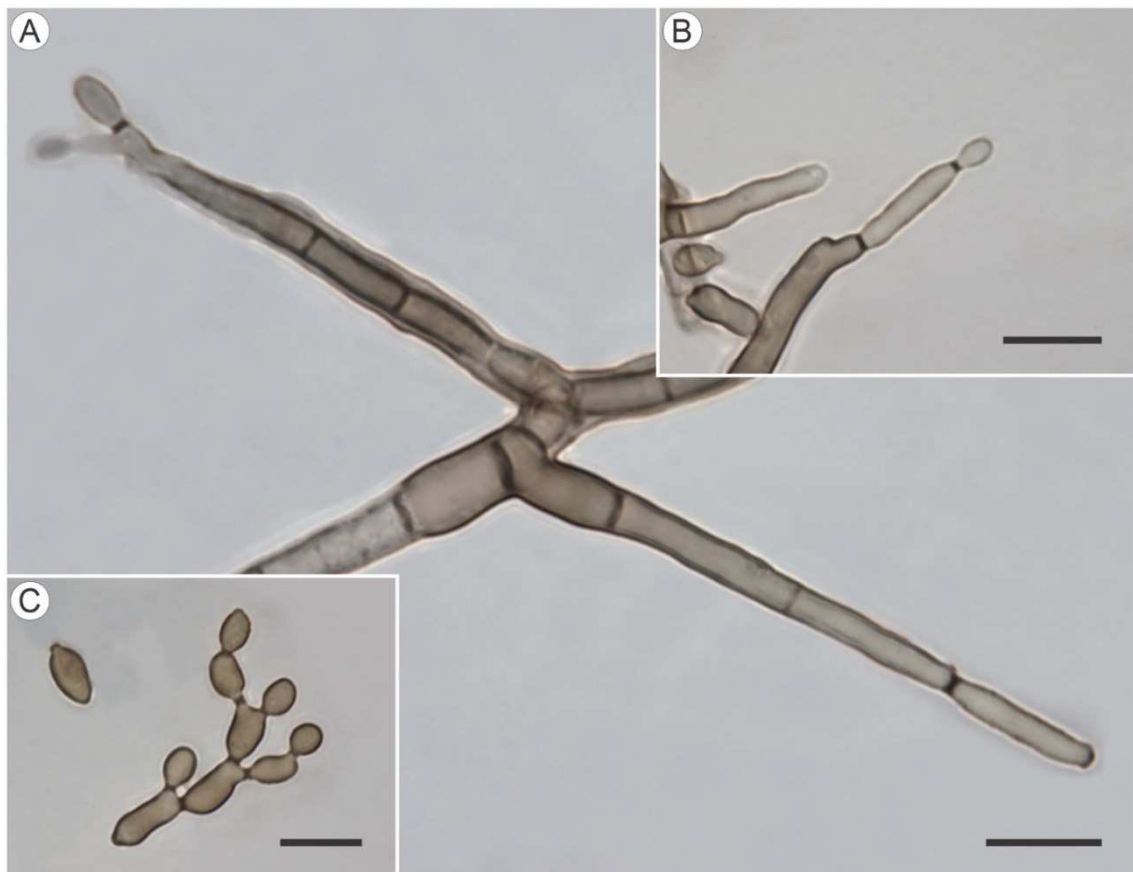
Colônia em BCA e sob fotoperíodo (Fig. 11-B3) atingindo 4 mm diam após 7 dias a 25°C; centro em grey olivaceous e restante em olivaceous black; reverso olivaceous black e bordas brancas; colônia aveludada, elevada e com as bordas serradas; micélio aéreo ralo; esporulação abundante. Colônia em BCA e no escuro (Fig. 11-B4) atingindo 5 mm diam após 7 dias a 25°C; centro em grey olivaceous e restante em olivaceous black; reverso olivaceous black e bordas brancas; colônia aveludada, levemente convexa, com bordas onduladas e crescimento irradiado; micélio aéreo ralo; esporulação abundante.

Isolado	BDA Claro	BDA Escuro	BCA Claro	BCA Escuro
<i>Cladosporium</i> sp. nov. 5 COAD 2570	A1 	A2 	A3 	A4 
<i>Cladosporium</i> sp. nov. 6 COAD 2581	B1 	B2 	B3 	B4 
<i>Cladosporium</i> sp. nov. 7 COAD 2568	C1 	C2 	C3 	C4 

**Figura 10.** Características culturais de *Cladosporium* spp. em meios BDA e BCA, sob fotoperíodo (12h com luz/12h sem luz) e escuro (24h sem luz) após 7 dias. (A1 – A4) *Cladosporium* sp. nov 5 COAD 2570; (B1 – B4) *Cladosporium* sp. nov 6 COAD 2581; (C1 – C4) *Cladosporium* sp. nov 7 COAD 2568.

*Descrição:* Micélio imerso e superficial, hifas mais ou menos ramificadas, 4,3–6,5 µm, septadas, com constrictões e algumas vezes inchaços, marrom claras, lisa, paredes grossas. Conidióforos ambos, macro- e micronematosos, surgindo lateralmente ou terminalmente a hifa. Conidióforo macronematoso solitário, reto, as vezes curvo, não ramificado, 14,5–67,5 × 2,5–5 µm, 2–6 septos, as vezes com constrictões na base, marrom claro, lisos, paredes espessas. Célula conidiogênica integrada, terminal ou as vezes intercalar, com 1–8 proliferações simpodiais, 10–

$24 \times 2,5-4 \mu\text{m}$ . *Loci conidiogênicos*, conspícuos, truncados,  $1-2,5 \mu\text{m}$ , espessos e escuros. *Conidióforo micronematoso* quase indistinto, lateral a hifa, raro, curto, cônico a levemente cilíndrico, não ramificado,  $5-33,5 \times 3-7 \mu\text{m}$ , 1-3 septos, subhialino a marrom claro, sem constrições, lisos, parede fina. *Célula conidiogênica* integrada e terminal, subcilíndrica a filiforme, com um único locus conidiogênico. *Ramoconídio* cilíndrico,  $5,5-18 \times 2,5-4 \mu\text{m}$ , 0-2 septos, ápice levemente convexo e base truncada, marrom claro, liso, parede fina. *Conídios* catenulados em cadeias acrópetas ramificadas. *Ramoconídio secundário* elipsoide a oblongo,  $4,5-9 \times 2,5-5 \mu\text{m}$ , 0-1 septos, marrom claro, lisos, finos, ápice obtuso, base truncada, com dois hilos terminais, liso, parede fina, marrom escura. *Conídio intercalar* de globoso a elipsoide e fusiforme,  $4-8 \times 2,5-4 \mu\text{m}$ , asseptado ocasionalmente com um septo, marrom claro, lisos, finos. *Conídio terminal* subgloboso,  $3-6,5 \times 2,5-4,5 \mu\text{m}$ , asseptado, marrom claro, com a lisos, finos, cicatriz as vezes visível e escura.



**Figura 11.** Características morfológicas de *Cladosporium* sp. nov. 6 (COAD 2581). (A) Conidiófóros dando origem a conídios. (B) Detalhes durante a formação de conídio. (C) Conídios em cadeia curta. – Barras de escala:  $10 \mu\text{m}$ .

*Notas:* *Cladosporium* sp. nov. 6 é membro do Complexo *C. sphaerospermum* e se encontra no mesmo grupo que *C. langeronii*, *C. neolangeronii*, *C. psychrotolerans* e *C. sloanii*.

*Cladosporium* sp. nov. 6. Sua morfologia é distinta da de outras espécies desse complexo por apresentar conidióforos, células conidiogênicas e conídios menores (com exceção do conídio terminal, que é o maior dentre os membros do complexo). As espécies do grupo foram registradas na Europa, Austrália e Américas (BENSCH et al. 2018). Essa é a primeira espécie desse complexo descrita no continente africano. Não há registros anteriores de espécies desse complexo ocorrendo como micoparasitas.

***Cladosporium* sp. nov. 7** – Fig. 10 (C1 – C4) e Fig. 12.

*Materiais examinados* – ETIÓPIA: Jimma, Jimma University College of Agriculture and Veterinary, isolado de urédias de *Hemileia vastatrix* em folhas de *Coffea arabica*. 30 de maio de 2017, Gerba Daba (isolado COAD 2568); Agaro, isolado de urédias de *Hemileia vastatrix* em folhas de *Coffea arabica* (isolado COAD 3351).

*Características culturais*: Colônia em BDA e sob fotoperíodo (Fig. 11-C1) atingindo 20 mm diam após 7 dias a 25°C; centro em grey olivaceous, seguido de pequeno anel em dull green e clareando para herbage green em direção à periferia, bordas esbranquiçadas; reverso olivaceous black e bordas brancas; colônia felpuda a aveludada, plana, com bordas inteiras e anéis concêntricos; micélio aéreo moderado, formando tufos ao centro; esporulação abundante. Colônia em BDA no escuro (Fig. 11-C2) atingindo 25 mm diam após 7 dias a 25°C; dull green a herbage green com bordas esbranquiçadas; reverso olivaceous black e bordas brancas; colônia pulverulenta, plana, com bordas inteiras; micélio aéreo moderado; esporulação abundante.

Colônia em BCA sob fotoperíodo (Fig. 11-C3) e no escuro (Fig. 11-C4) atingindo 13 e 21 mm diam, respectivamente, após 7 dias a 25°C; centro grey olivaceous, seguido de zona olivaceous black e outro anel em dull green, bordas esbranquiçadas; reverso olivaceous black e bordas brancas; colônia com textura felpuda/ pulverulenta, plana a levemente convexa, com bordas inteiras e crescimento irradiado; micélio aéreo moderado e formando tufos ao centro, ralo na periferia; esporulação abundante.

*Descrição*: Micélio imerso e superficial, hifas pouco ramificadas, 6,5–2 µm, septadas, subhialinas, cinzas a marrom claro, quando mais velhas, lisas e com parede espessa. Conidióforos ambos, macro- e micronematosos, surgindo lateralmente ou terminalmente a hifa. Conidióforo macronematoso solitário, reto, as vezes flexuoso, raramente com ramificação basal, 16–185 × 2,5–5,5 µm, 2–9 septos, marrom escuro, superfície lisa e paredes grossas.

*Célula conidiogênica* integrada, terminal, cilíndrica, com 1–4 proliferações simpodiais, 8,5–34 × 2–4 µm. *Loci conidiogênicos* conspícuos, convexos, 1–2,5 µm, espessos, escuros. *Conidióforo micronematoso* lateral às hifas, curto, cilíndrico a filiforme, não ramificado, 5–54,5 × 2–5,5 µm, 1–5 septos, marrom claro, liso, parede fina. *Célula conidiogênica* integrada, terminal ou as vezes conidióforo reduzido à célula conidiogênica, cilíndrica a subcilíndrica, com somente um locus. *Ramoconídio* cilíndrico, 5,5–22,5 × 2–5 µm, 0–1 septos, marrom claro, com parede lisa e fina e base truncada, mas as vezes arredondada. *Conídios* catenulados, em cadeias acrópetas ramificadas. *Ramoconídio secundário* cilíndrico a elipsoide, 2,5–8,5 × 1–3,5 µm, asseptado, ápice obtuso, base truncada, com 2–3 hilos, marrom claro, lisos, parede fina. *Conidiogênese microcíclica* presente. *Conídio intercalar* elipsoide a limoniforme, as vezes cilíndrico, 4,5–12 × 2,5–4,5 µm, asseptado, hilos, marrom claro, liso, paredes finas. *Conídio terminal* globoso apiculado, 2,5–5 × 2–4,5 µm, asseptado, com um único hilo, marrom claro, liso, parede fina.

*Notas:* *Cladosporium* sp. nov. 7 é membro do Complexo *C. sphaerospermum*. Os dois isolados encontrados nesse estudo formam um clado distinto, porém com baixo suporte, irmão de isolados de *C. austrohemisphaericum*. As espécies em questão diferem por algumas características morfológicas: *C. austrohemisphaericum* apresenta conídios terminais e intercalares com paredes rugosas, o que não se observa em *Cladosporium* sp. 7. Além disso, *Cladosporium* sp. nov. 7 possui células conidiogênicas, ramoconídios e ramoconídios secundários menores em comparação à *C. austrohemisphaericum* (BENSCH et al., 2018; 2015). Nota-se também diferenças culturais das duas espécies em BDA, como superfície da colônia, presença de micélio e esporulação, tais características são irregulares, ausente para esparsa e profusa, respectivamente, para a espécie *C. austrohemisphaericum* (BENSCH et al., 2018). *Cladosporium austrohemisphaericum* parece ter hábito fúngicola, já que um isolado foi obtido de mofo preto sobre frutos de *Lagunaria patersonia* (BENSCH et al., 2018), no entanto não há relatos de crescimento sobre urédias de *H. vastatrix*. Por fim, *Cladosporium* sp. nov. 7 parece estar restrito à Etiópia, enquanto que *C. austrohemisphaericum* já foi relatado na África do Sul, Austrália e Nova Zelândia (BENSCH et al., 2018; 2015).



**Figura 12.** Características morfológicas de *Cladosporium* sp. nov. 7 (COAD 2568). (A) Detalhes da célula conidiogênica e diferentes tipos de conídios. (B) Conidiofóros macronematosos. (C) Detalhes durante a formação de conídios. (D) Conídios em cadeia curta. – Barras de escala: 10 µm.

### 3.3. Avaliação do potencial antagonista de *Cladosporium* spp. – inibição da germinação dos uredósporos de *Hemileia vastatrix*

É possível notar que resultados foram muito variáveis (Tabela 3). Valores de germinação de uredósporos variaram entre 11 e 70%, nas duas repetições. No primeiro teste, todos os 14 tratamentos foram superiores à testemunha e se dividiram em quatro grupos estaticamente distintos segundo o teste de Scott-Knott ( $\alpha = 0,05$ ): dois tratamentos promoveram

uma melhor resposta para inibição de germinação de uredósporos, ficando entre 18 e 24%; seis tratamentos produziram resultados supramedianos, com valores de germinação variando entre 29 e 35,%; cinco tratamentos produziram resultados medianos e o valor de germinação ficou entre 37 e 47%; e somente um tratamento foi inferior, mas ainda estaticamente diferente da testemunha, com germinação igual a 52%.

Já na segunda repetição do experimento, dos 16 tratamentos aplicados, seis foram estatisticamente iguais à testemunha, com germinação entre 61 e 70%. Os demais tratamentos foram superiores ao controle, se dividindo em três grupos distintos de acordo com o teste de Scott-Knott ( $\alpha = 0,05$ ): quatro tratamentos resultaram em germinação entre 48 e 55%, para quatro tratamentos a germinação de uredósporos ficou entre 34 e 44%; e dois tratamentos resultaram em valores inferiores de germinação de uredósporos – 11 a 17%.

Na repetição do experimento, os resultados foram díspares quando comparados aos do primeiro experimento, pois alguns tratamentos não produziram resultados equivalentes na primeira e segunda repetição. Por exemplo, a aplicação de conídios do isolado COAD 2571: no primeiro experimento, tal tratamento teve o pior resultado em relação aos demais, inibindo em somente 17,1% a germinação dos uredósporos do patógeno, quando comparado à testemunha; já no segundo teste, o mesmo tratamento resultou em um dos melhores resultados – 75% de redução na germinação de uredósporos, em comparação com a testemunha.

Para os isolados COAD 2570 e COAD 2568, os tratamentos com conídios e filtrados, forneceram respostas medianas no primeiro teste (germinação entre 39,67 e 47,50%), já na segunda repetição, não diferiram estatisticamente do controle (germinação de 61 a 69,67%). Os tratamentos COAD 2571 – Filtrado; e COAD 2566 (Filtrado e Conídios) foram similares em ambos os experimentos, fornecendo resultados intermediários de germinação do patógeno (30,17 a 53%) em relação aos demais tratamentos.

Em ambas as repetições, é possível notar que o filtrado do isolado COAD 2578 (*C. sphaerospermum*) produziu respostas superiores de inibição de germinação de uredósporos quando comparado à aplicação de suspensão dos seus conídios. O mesmo foi observado para os isolados COAD 2559, COAD 2566 e COAD 2565.

Apesar de existirem alguns resultados promissores, uma terceira execução do experimento é necessária para validação das respostas obtidas, pois entre alguns tratamentos houve grande variação nos resultados observados entre os dois testes conduzidos.

**Tabela 3.** Porcentagem de germinação e de inibição da germinação de uredósporos de *Hemileia vastatrix* mediante tratamento com isolados micoparasitas de *Cladosporium*.

Espécie	Isolado	Tratamento	Experimento 1		Experimento 2	
			Germinação (%) <sup>1</sup>	Inibição da Germinação (%)	Germinação (%) <sup>1</sup>	Inibição da Germinação (%)
	Testemunha		63,17 a	–	70,33 a	–
<i>C. sphaerospermum</i>	COAD 2578	Conídios	31,67 d	49,87	69 a	1,89
		Filtrado	24,5 e	61,22	55,67 b	20,84
<i>C. tenuissimum</i>	COAD 2558	Filtrado	32,33 d	48,82	11,67 d	83,41
<i>C. xanthochromaticum</i>	COAD 2559	Conídios	–	–	44,17 c	37,20
		Filtrado	–	–	34,33 c	51,19
<i>Cladosporium</i> sp. nov. 1	COAD 2565	Conídios	29,17 d	53,82	36,67 c	47,86
		Filtrado	18 e	71,51	35,83 c	49,05
<i>Cladosporium</i> sp. nov. 2	COAD 2566	Conídios	37,67 c	40,37	51 b	27,48
		Filtrado	35,5 d	43,80	48,17 b	31,51
<i>Cladosporium</i> sp. nov. 3	COAD 2571	Conídios	52,33 b	17,16	17,33 d	75,36
		Filtrado	30,17 d	52,24	53 b	24,64
<i>Cladosporium</i> sp. nov. 4	COAD 3350	Conídios	35,67 d	43,53	70,17 a	0,23
<i>Cladosporium</i> sp. nov. 5	COAD 2570	Conídios	47,5 c	24,81	61 a	13,27
		Filtrado	42,5 c	32,72	69,67 a	0,94
<i>Cladosporium</i> sp. nov. 7	COAD 2568	Conídios	39,67 c	37,20	64,5 a	8,29
		Filtrado	41 c	35,10	62 a	11,84
	CV (%)		22,24	–	17,15	–

<sup>1</sup> Valores seguidos da mesma letra na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ( $\alpha = 0,05$ ).

#### 4. Discussão

*Cladosporium* é um gênero grande e variado e novas adições são feitas constantemente a esse grupo, como as proposições recentes de Iturrieta-González et al. (2021) e Zimowska et al. (2021). O presente trabalho contribui para a expansão do conhecimento sobre a distribuição geográfica de duas espécies de *Cladosporium* conhecidas, *C. asperulatum* e *C. xantochromaticum*, anteriormente desconhecidas para o Brasil. Nenhuma das espécies já conhecidas obtidas nos levantamentos era conhecida por ter como substrato estruturas de *H. vastatrix*.

Do levantamento, também resultaram dez isolados adicionais que foram aqui reconhecidos representando sete espécies de *Cladosporium* novas para a ciência. No entanto, para se confirmar sua proposição uma terceira região gênica relevante para a filogenia no gênero *Cladosporium* (gene do fator de alongação 1- $\alpha$ , TEF1- $\alpha$ ) será ainda sequenciada e incorporada no estudo. Com isso, espera-se esclarecer de forma mais completa a taxonomia das espécies potencialmente novas.

O micoparasitismo relacionado a *Cladosporium* spp. não é algo novo para a ciência. Várias espécies de *Cladosporium* já foram relatadas parasitando outros fungos, inclusive membros da ordem Pucciniales. Por exemplo, isolados de *C. cladosporioides* e *C. pseudocladosporioides* já foram observados crescendo sobre pústulas de *Puccinia horiana* em folhas de crisântemo e tiveram sua ação parasítica comprovada (TORRES, et al., 2017), e isolados de *C. tenuissimum* já foram isolados a partir de pústulas causadas por *Cronartium flaccidum* e *C. pini* em diferentes espécies de *Pinus* (MORICCA, et al., 2001).

Os organismos aqui apresentados foram todos encontrados crescendo sobre pústulas de *H. vastatrix* em folhas de *C. arabica*. Pode-se alegar, corretamente, que a simples presença de um fungo sobre pústulas de *H. vastatrix* não é suficiente para concluir que ele seja um micoparásita do agente da ferrugem do cafeeiro. Na verdade, talvez a única demonstração experimental de micoparasitismo, envolvendo os passos dos postulados de Koch, para um fungo associado a *H. vastatrix*, tenha sido publicada recentemente pelo nosso grupo (SARMIENTO-SALCEDO, et al. 2021). As evidências de micoparasitismo comumente aceitas são meramente circunstanciais. No entanto, a interação fungo-fungo pode envolver um leque bastante diversificado de opções (SUN et al., 2019), inclusive algumas que não envolveriam parasitismo, tais como comensalismo (aproveitamento de exsudatos da ferrugem ou do hospedeiro, uso do ferimento como porta de entrada para acessar tecido morto da planta,

por exemplo) ou saprofitismo sobre estruturas mortas do fungo sem danos às estruturas vivas do “hospedeiro”.

Pelo que é de nosso conhecimento, não havia registro algum de membros de *Cladosporium* ocorrendo sobre pústulas de *H. vastatrix* até a preparação desse trabalho. Deve-se notar, no entanto, que há dois fungos que possuem a morfologia muito semelhante à de *Cladosporium* (cladosporioides), e que foram descritos na literatura em associação com urédias de *H. vastatrix*: *Cladosporium hemileiae* (STEYAERT, 1930) – hoje transferido para o gênero *Digitopodium* e re combinado como *Digitopodium hemileiae* (HEUCHERT et al., 2005); e *Digitopodium tectonae* – recentemente re combinado em estudo de nosso grupo (COLMÁN et al, 2021). Assim, os isolados em estudo representam, até o momento, os únicos membros do gênero *Cladosporium* encontrados crescendo sobre lesões da ferrugem do cafeeiro. É provável que existam muitas outras espécies de *Cladosporium* ainda não relatadas com capacidade de colonizar urédias de *H. vastatrix*.

Os testes *in vitro* feitos para se avaliar, preliminarmente, o potencial de isolados de *Cladosporium* spp. contra *H. vastatrix* foram demasiadamente variáveis para permitir conclusões confiáveis. A aplicação de filtrado fúngico de *C. tenuissimum* COAD 2558 promoveu inibição da germinação de uredósporos de *H. vastatrix* entre 49% (primeiro experimento) e 83% (segundo experimento). Tivemos indícios de que outros filtrados de culturas de *Cladosporium* spp. também inibiram a germinação de uredósporos. Com *C. sphaerospermum* COAD 2578, *C. xantochromaticum* COAD 2559 e *Cladosporium* sp. nov. 1 COAD 2565, observou-se redução significativa da germinação de uredósporos em comparação à testemunha. Surpreendentemente, notou-se que a aplicação do filtrado fúngico reduziu mais acentuadamente a germinação de uredósporos que a aplicação da suspensão de conídios do respectivo isolado. O motivo para tal é incerto, mas a hipótese de que tenha ocorrido diluição de compostos durante a calibração da suspensão fúngica é considerada. Reconhece-se aqui que uma nova execução do experimento com mais repetições e condições mais bem controladas é necessária para se poder chegar a uma conclusão confiável.

Isolados de *Cladosporium tenuissimum* já foram estudados como agentes de controle biológico de *U. appendiculatus*, o agente da ferrugem do feijoeiro. Testes realizados por Assante et al. (2004) estudaram o micoparasitismo por parte de *C. tenuissimum* e avaliaram seus efeitos no biocontrole da ferrugem do feijoeiro. Os autores observaram que, após 6h, houve interferência na germinação dos esporos do patógeno mediante contato com os conídios de *C. tenuissimum*, passando de 83,3% no controle para 69,5%, uma redução de aproximadamente

20%. No teste, *in planta* foi observado que plantas tratadas com suspensão de conídios desenvolveram sintomas da mesma forma que as plantas inoculadas somente com o patógeno. Os autores avaliaram também os efeitos de um filtrado do cultivo fúngico de *C. tenuissimum* sobre o patógeno. Plantas inoculadas com *U. appendiculatus* e tratadas com filtrado de *C. tenuissimum* permaneceram saudáveis, uma vez que os uredósporos do patógeno não germinaram.

No mesmo trabalho, Assante et al. (2004) também realizaram testes em folhas destacadas. Folhas inoculadas com *U. appendiculatus* e tratadas com suspensão de conídios de *C. tenuissimum* apresentaram leve redução na severidade da doença em 13%, quando comparadas ao controle. Folhas inoculadas e tratadas com filtrado do cultivo de *C. tenuissimum* permaneceram saudáveis, pois, segundo os autores, não houve germinação dos esporos do patógeno.

Testes semelhantes também foram realizados anteriormente (dados não publicados) com isolados de *Cladosporium* (COADs 2558, 2565, 2566, 2570 e 2571) em confronto com uredósporos de *H. vastatrix*. Foram utilizados discos de folha de cafeeiros que foram inoculados com suspensão de *H. vastatrix* e *Cladosporium* spp. em diferentes intervalos de tempo. De modo geral, os tratamentos aplicados não reduziram significativamente a severidade da doença e, em alguns casos, houve inclusive incremento na severidade da ferrugem com a aplicação de suspensão de *Cladosporium* em comparação à testemunha (dados não mostrados). Os resultados dos ensaios aqui apresentados e citados sugerem que os efeitos de inibição da germinação do patógeno advêm de metabólitos produzidos durante o cultivo em meio líquido. O inóculo dos isolados de *Cladosporium* utilizados nos testes em folha de cafeeiros foi obtido pela lavagem superficial de culturas esporulantes crescidas em placas contendo BDA. Tal estudo carece de repetição, incluindo novos isolados e envolvendo também a comparação dos efeitos de suspensões de conídios obtidas a partir da lavagem de placas, oriundas do cultivo em meio líquido, bem como de filtrados de cultura fúngica.

A atividade que metabólitos secundários produzidos por *Cladosporium* apresentaram sobre diferentes fitopatógenos já foi investigada em alguns estudos. Nestes concluiu-se que substâncias produzidas por *C. cladosporioides* ou *C. tenuissimum* têm efeito de controle sobre espécies de *Colletotrichum*, *Diaporthe* e *U. appendiculatus* (WANG et al., 2013; NASINI et al., 2004). Esse é um nicho a ser explorado futuramente para os isolados de *Cladosporium* aqui identificados.

Este foi um estudo pioneiro sobre *Cladosporium* spp. coletados em urédias de *H. vastatrix*, o fitopatógeno mais importante na cafeicultura mundial e o primeiro passo, para permitir a atribuição de nomes aos nossos isolados, foi dado.

É digno de nota que, durante os estudos dos isolados cladosporiídeos, um isolado de *Digitopodium* não incluído nos trabalhos de Colmán et al. (2021) foi detectado e receberá atenção especial no futuro. Ao contrário de *D. tectonae* – não incluído nas avaliações de potencial de biocontrole por ter crescimento lento e não esporular – esse “novo isolado” apresenta esporulação em cultura. Além disso, fungos cladosporiídeos do gênero *Ochroconis* começaram a ser avaliados e serão estudados complementarmente no âmbito desse projeto. Por fim, outros isolados cladosporiídeos, pertencentes a gêneros ainda incertos e que foram obtidos endofiticamente de *Coffea* spp. na África, também merecerão atenção em etapas adicionais desse projeto, uma vez que dentre eles pode haver algum ótimo agente de controle biológico a ser explorado contra a ferrugem do cafeeiro.

## 5. Referências

AGRIOS, G. N. Control of plant diseases. In: AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**, 5 ed. Londres, Elsevier Academic Press, 2004.

ASSANTE, G.; MAFFI, D.; SARACCHI, M.; FARINA, G.; MORICCA, S.; RAGAZZI, A. Histological studies on the mycoparasitism of *Cladosporium tenuissimum* on urediniospores of *Uromyces appendiculatus*. **Mycological Research**, v. 108, n. 2, p. 170-182, 2004. <https://doi.org/10.1017/S0953756203008852>.

BAHARVANDI, H. A.; ZAFARI, D. Identification of *Cladosporium delicatulum* as a mycoparasite of *Taphrina pruni*, **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, v. 48, n. 8, p. 688-697, 2015. <https://doi.org/10.1080/03235408.2015.1099886>.

BATTA, Y. A. *Cladosporium tenuissimum* Cooke (Deuteromycotina: Hyphomycetes) as a causal organism of new disease on cucumber fruits. **European Journal of Plant Pathology**, v. 110 n. 10, p. 1003-1009, 2004. <https://doi.org/10.1007/s10658-004-1604-7>.

BENSCH, K.; BRAUN, U.; GROENEWALD, J. Z.; CROUS, P. W. The genus *Cladosporium*. **Studies in Mycology**, v. 72, p. 1-401, 2012. <http://dx.doi.org/10.3114/sim0003>.

BENSCH, K.; GROENEWALD, J. Z.; BRAUN, U.; DIJKSTERHUIS, J.; YÁÑEZ-MORALES, M. J.; CROUS, P. W. Common but different: the expanding realm of *Cladosporium*. **Studies in Mycology**, v. 82, p. 23-74, 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.simyco.2015.10.001>.

BENSCH, K.; GROENEWALD, J. Z.; DIJKSTERHUIS, J.; STARINK-WILLEMSE, M.; ANDERSEN, B.; SUMMERELL, B. A.; SHIN, H. D.; DUGAN, F. M.; SCHROERS, H. J.; BRAUN, U. Species and ecological diversity within the *Cladosporium cladosporioides* complex (*Davidiellaceae*, *Capnodiales*). **Studies in Mycology**, v. 67, p. 1-94, 2010. <http://dx.doi.org/10.3114/sim.2010.67.01>.

BENSCH, K.; GROENEWALD, J. Z.; MEIJER, M.; DIJKSTERHUIS, J.; JURJEVIC, Ž.; ANDERSEN, B.; HOUBRAKEN, J.; CROUS, P. W.; SAMSON, R. A. *Cladosporium* species in indoor environments. **Studies in Mycology**, v. 89, p. 177-301, 2018. <http://dx.doi.org/10.1016/j.simyco.2018.03.002>.

BORGES, L. L. **Micoparasitas de *Austropuccinia psidii* e escala diagramática para avaliação da ferrugem do eucalipto**. 2018. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2018.

CANTERI, M. G.; ALTHAUS, R. A.; VIRGENS FILHO, J. S.; GIGLIOTI, E. A.; GODOY, C. V. SASM-AGRI: Sistema para a análise e separação de médias em experimentos agrícolas pelos métodos Scott-Knott, Tukey e Duncan. **Revista Brasileira de Agrocomputação**, v. 1, p. 18–24, 2001. <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/175651/1/SASM-AGRI.pdf>.

CARBONE, I.; KOHN, L. M. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. **Mycologia**, v. 91, n. 3, p. 553-556, 1999. <https://doi.org/10.1080/00275514.1999.12061051>.

CARNEGIE, A. J.; KATHURIA, A.; PEGG, G. S.; ENTWISTLE, P.; NAGEL, M.; GIBLIN, F. R. Impact of the invasive rust *Puccinia psidii* (myrtle rust) on native Myrtaceae in natural ecosystems in Australia. **Biological Invasions**, v. 18, n. 1, p. 127-144, 2016. <https://doi.org/10.1007/s10530-015-0996-y>.

CARRIÓN, G., RICO-GRAY, V. Mycoparasites on the coffee rust in Mexico. **Fungal Diversity**, v. 11, p. 49-60, 2002.

COLMÁN, A. A.; EVANS, H. C.; SALCEDO-SARMIENTO, S.; BRAUN, U.; BEKELE, K. B.; BARRETO, R. W. A fungus-eat-fungus world: *Digitopodium*, with particular reference to mycoparasites of the coffee leaf rust, *Hemileia vastatrix*. **IMA fungus**, v. 12, n. 1, p. 1-11, 2021. <https://doi.org/10.1186/s43008-020-00052-w>.

CROUS, P. W.; VERKLEY, G. J. M.; GROENEWALD, J. Z.; SAMSON, R. A. **CBS: Fungal Biodiversity**. The Netherlands, Utrecht: CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, 2009.

CROUS, P.W., et al. *Calonectria hemileiae*. In: Fungal Planet description sheets: 823. **Persoonia**, v. 41, p. 324-325, 2018.

DARRIBA, D.; TABOADA, G. L.; DOALLO, R.; POSADA, D. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. **Nature Methods**, v. 9, n. 8, p. 772, 2012. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2109>.

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

Du PLESSIS, E.; GRANADOS, G. M.; BARNES, I.; HO, W. H.; ALEXANDER, B. J. R.; ROUX, J.; McTAGGART, A. R. The pandemic strain of *Austropuccinia psidii* causes myrtle rust in New Zealand and Singapore. **Australasian Plant Pathology**, v. 48, n. 3, p. 253-256, 2019. <https://doi.org/10.1007/s13313-019-0624-x>.

EILENBERG, J.; HAJEK, A.; LOMER, C. Suggestions for unifying the terminology in biological control. **BioControl**, v.46, n.4, p. 387-400, 2001.

GAUTHIER, N. W.; MARUTHACHALAM, K.; SUBBARAO, K. V.; BROWN, M.; XIAO, Y.; ROBERTSON, C. L.; SCHNEIDER, R. W. Mycoparasitism of *Phakopsora pachyrhizi*, the soybean rust pathogen, by *Simplicillium lanosoniveum*. **Biological Control**, v. 76, p. 87-94, 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2014.05.008>.

GONÇALVES, R. C.; ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. Armazenamento de microrganismos em cultura com ênfase em fungos fitopatogênicos. *In*: ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. (ed.). **Métodos em Fitopatologia**. Viçosa: Editora UFV, 2016.

GROENEWALD, M.; GROENEWALD, J. Z.; CROUS, P. W. Distinct species exist within the *Cercospora apii* morphotype. **Phytopathology**, v. 95. n. 8, p. 951-959, 2005.

HEPPERLE, D. **SeqAssem - Contig Sequence Assembly Software**, 2021. Klein Raden, Alemanha: SequentiX - Digital DNA Processing. Disponível em: [https://www.sequentiX.de/software\\_seqassem.php](https://www.sequentiX.de/software_seqassem.php) . Acessado em 02 fev. 2021.

HEUCHERT, B.; BRAUN, U.; SCHUBERT, K. (2005). Morphotaxonomic revision of fungicolous *Cladosporium* species (hyphomycetes). **Schlechtendalia**, v. 13, p. 1-78, 2005.

ITURRIETA-GONZÁLEZ, I.; GARCÍA, D.; GENÉ, J. Novel species of *Cladosporium* from environmental sources in Spain. **Myckeys**, v. 77, p. 1-25, 2021. <http://dx.doi.org/10.3897/myckeys.77.60862>.

KARLSSON, M.; ATANASOVA, L.; JENSEN, D. F.; ZEILINGER, S. Necrotrophic mycoparasites and their genomes. *In*: HEITMAN, J.; HOWLETT, B. J.; CROUS, P. W.; STUKENBROCK, E. H.; JAMES, T. Y.; GOW, N. A. (ed.). **The Fungal Kingdom**. Washington, DC: ASM Press, 2017. <https://doi.org/10.1128/9781555819583.ch50>.

KOUTOULEAS, A.; JØRGENSEN, H. J. L.; JENSEN, B.; LILLESØ, J. P. B.; JUNGE, A.; RÆBILD, A. On the hunt for the alternate host of *Hemileia vastatrix*. **Ecology and evolution**, v. 9, n. 23, p. 13619-13631, 2019. <https://doi.org/10.1002/ece3.5755>.

KUMAR, S.; STECHER, G.; LI, M.; KNYAZ, C.; TAMURA, K. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. **Molecular biology and evolution**, v. 35, n. 6, p. 1547-1549, 2018. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>.

LUTZ, M.; BAUER, R.; BEGEROW, D.; OBERWINKLER, F.; TRIEBEL, D. *Tuberculina*: rust relatives attack rusts. **Mycologia**, v. 96, n. 3, p. 614-626, 2004. <http://dx.doi.org/10.1080/15572536.2005.11832957>.

MA, R.; CHEN, Q.; FAN, Y.; WANG, Q.; CHEN, S.; LIU, X.; CAI, L.; YAO, B. Six new soil-inhabiting *Cladosporium* species from plateaus in China. **Mycologia**, v. 109, n. 2, p. 244-260, 2017. <http://dx.doi.org/10.1080/00275514.2017.1302254>.

MAFFIA, L. A.; HADDAD, F.; MIZUBUTI, E. S. G. Controle biológico da ferrugem do cafeeiro. In: BETTIOL W.; MORANDI, M. A. B. (eds.). **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna, Embrapa Meio Ambiente, 2019.

MAFIA, R. G.; ALFENAS, A. C. Preparações e observações microscópicas de espécimes fúngicos. In: ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. (eds.). **Métodos em Fitopatologia**. Viçosa: Editora UFV, 2016.

MAHFUD, M. C.; ZA, M. A.; MEON, S.; KADIR, J. In vitro and in vivo tests for parasitism of *Verticillium psalliotae* on *Hemileia vastatrix*. **Malaysian Journal of Microbiology**, v. 2, n. 1, p. 46-50, 2006.

MEDEIROS, F. H. V.; SILVA, J. C. P.; PASCHOLATI, S. F. Controle biológico de doenças de planta. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; FILHO, A. BERGAMIN; CAMARGO, L. E. A (eds.). **Manual de Fitopatologia**. 5º ed., v. 1. Ouro Fino: Editora Agronômica Ceres, 2018. cap. 17.

MILLER, M. A.; PFEIFFER, W.; SCHWARTZ, T. Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. **Gateway Computing Environments Workshop (GCE)**. New Orleans, EUA, 2011. <https://doi.org/10.1109/GCE.2010.5676129>.

MORICCA, S.; RAGAZZI, A.; MITCHELSON, K. R.; ASSANTE, G. Antagonism of the two-needle pine stem rust fungi *Cronartium flaccidum* and *Peridermium pini* by *Cladosporium tenuissimum* in vitro and in planta. **Phytopathology**, v. 91, n. 5, p. 457-468, 2001.

NAM, M. H.; PARK, M. S.; KIM, H. S.; KIM, T. I.; KIM, H. G. *Cladosporium cladosporioides* and *C. tenuissimum* cause blossom blight in strawberry in Korea. **Mycobiology**, v. 43, n. 3, p. 354-359, 2015. <https://doi.org/10.5941/MYCO.2015.43.3.354>.

NASINI, G.; ARNONE, A.; ASSANTE, G.; BAVA, A.; MORICCA, S.; RAGAZZI, A. Secondary mould metabolites of *Cladosporium tenuissimum*, a hyperparasite of rust fungi. **Phytochemistry**, v. 65, n. 14, p. 2107-2111, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2004.03.013>.

NDACNOU, M. K. Potencial de espécies de *Trichoderma* spp. e *Clonostachys* spp. originárias de cafeeiros do Brasil e da África para o biocontrole de *Hemileia vastatrix*. 2021, em elaboração. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, em elaboração.

NÓBREGA, T. F. **Taxonomy of *Fusarium* spp. associated with uredinia of *Hemileia vastatrix* in Brazil, Cameroon, Ethiopia and Paraguay and their biocontrol potential.** 2021. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2021.

PENZIG, A. J. O. Funghi agrumicoli. **Michelia**, v. 2, n. 8, p. 385–508, 1882.

PILLA, T. C. S.; SILVA, E.; GRAÇA, J. P.; LUZ, M. A. M.; BAIL, J.; NUNES, E.; SILVA, C. P.; PILAU, E. J.; BONUGLI-SANTOS, R. C.; SEIXAS, C. D. S. Caracterização de um micoparasita de *Phakopsora pachyrhizi*, agente causal da ferrugem-asiática da soja. In: JORNADA ACADÊMICA DA EMBRAPA SOJA, 14, 2019, Londrina. **Embrapa Soja-Artigo em anais de congresso (ALICE)**. Londrina: Embrapa Soja, 2019.

RAYNER, R. W. **A mycological colour chart.** England, Surrey: Mycological institute & British Mycological Society, 1970.

RODRÍGUEZ, M. C. H.; EVANS, H. C.; de ABREU, L. M.; de MACEDO, D. M.; NDACNOU, M. K.; BEKELE, K. B.; BARRETO, R. W. New species and records of *Trichoderma* isolated as mycoparasites and endophytes from cultivated and wild coffee in Africa. **Scientific reports**, v. 11, n. 1, p. 1-30, 2021. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-84111-1>

RONQUIST, F.; HUELSENBECK, J. P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics**, v. 19, n. 12, p. 1572-1574, 2003. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btg180>.

SAKSIRIRAT, W.; HOPPE, H.-H. Light- and scanning electron microscopic studies on the development of the mycoparasite *Verticillium psalliotae* Treschow on uredospores of the soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi* Syd.). **Journal of Phytopathology**, v. 128, n. 4, p. 340-344, 1990. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0434.1990.tb04283.x>.

SALCEDO-SARMIENTO, S.; AUCIQUE-PÉREZ, C. E.; SILVEIRA, P. R.; COLMÁN, A. A.; SILVA, A. L.; MANSUR, P. S. C.; RODRIGUES, F. Á.; EVANS, H. C.; BARRETO, R. W. Elucidating the interactions between the rust *Hemileia vastatrix* and a *Calonectria* mycoparasite and the coffee plant. **Iscience**, v. 24, n. 4, 2021. <http://dx.doi.org/10.1016/j.isci.2021.102352>.

SANDOVAL-DENIS, M.; GENÉ, J.; SUTTON, D. A.; WIEDERHOLD, N. P.; CANO-LIRA, J. F.; GUARRO, J. New species of *Cladosporium* associated with human and animal infections. **Persoonia - Molecular phylogeny and evolution of fungi**, v. 36, n. 1, p. 281-298, 2016. <http://dx.doi.org/10.3767/003158516x691951>.

SANKAR, N. R.; SREE, D. S.; SREERAMULU, A. *Cladosporium oxysporum* as a mycoparasite on *Uncinula tectonae* - a new record. **Journal of Plant Disease Sciences**, v. 2, n. 2, p. 182-183, 2007.

SILVA-CASTRO, I; BARRETO, R. W.; RODRÍGUEZ, M. C. H.; MATEI, P. M.; MARTÍN-GIL, J. Control of coffee leaf rust by chitosan oligomers and propolis. **Agriculture for Life, Life for Agriculture**, v. 1, n. 1, p. 311 – 315, 2018. <https://doi.org/10.2478/alife-2018-0046>.

SRIVASTAVA, A. K.; DÉFAGO, G.; KERN, H. Hyperparasitism of *Puccinia horiana* and other microcyclic rusts. **Journal of Phytopathology**, v. 114, n. 1, p. 73-78, 1985. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.1985.tb04338.x>

STAMATAKIS, A. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. **Bioinformatics**, v. 30, n. 9, p. 1312-1313, 2014. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu033>.

STEYAERT, R. L. *Cladosporium hemileiae* n. spec. Un parasite de l'*Hemileia vastatrix* Berk. et Br. **Bull Soc R Bot Belge**, v. 63, n. 1, p. 46-48, 1930.

STÖVER, B. C.; MÜLLER, K. F. TreeGraph 2: combining and visualizing evidence from different phylogenetic analyses. **BMC bioinformatics**, v. 11, n. 1, p. 1-9, 2010. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-11-7>.

SUN, J. Z.; LIU, X. Z.; MCKENZIE, E. H.; JEEWON, R.; LIU, J. K. J.; ZHANG, X. L.; ZHAO, Q.; HYDE, K. D. Fungicolous fungi: terminology, diversity, distribution, evolution, and species checklist. **Fungal Diversity**, v. 95, n. 1, p. 337-430, 2019. <https://doi.org/10.1007/s13225-019-00422-9>.

TALHINHAS, P. et al. The coffee leaf rust pathogen *Hemileia vastatrix*: one and a half centuries around the tropics. **Molecular plant pathology**, v. 18, n. 8, p. 1039-1051, 2017. <https://doi.org/10.1111/mpp.12512>.

TORRES, D. E.; ROJAS-MARTÍNEZ, R. I.; ZAVALETA-MEJÍA, E.; GUEVARA-FEFER, P.; MÁRQUEZ-GUZMÁN, G. J.; PÉREZ-MARTÍNEZ, C. *Cladosporium cladosporioides* and *Cladosporium pseudocladosporioides* as potential new fungal antagonists of *Puccinia horiana* Henn., the causal agent of chrysanthemum white rust. **PloS one**, v. 12, n. 1, 2017. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170782>.

TRAKUNYINGCHAROEN, T.; LOMBARD, L.; GROENEWALD, J. Z.; CHEEWANGKON, R.; TOANUN, C.; ALFENAS, A. C.; CROUS, P. W. Mycoparasitic species of *Sphaerellopsis*, and allied lichenicolous and other genera. **IMA fungus**, v. 5, n. 2, p. 391-414, 2014. <https://doi.org/10.5598/ima fungus.2014.05.02.05>.

VAIDYA, G.; LOHMAN, D. J.; MEIER, R. (2011). SequenceMatrix: concatenation software for the fast assembly of multi-gene datasets with character set and codon information. **Cladistics**, v. 27, n. 2, p. 171-180, 2011. <https://doi.org/10.1111/j.1096-0031.2010.00329.x>.

WANG, X.; RADWAN, M. M.; TARÁWNEH, A. H.; GAO, J.; WEDGE, D. E.; ROSA, L. H.; CUTLER, H. G.; CUTLER, S. J. Antifungal activity against plant pathogens of metabolites from the endophytic fungus *Cladosporium cladosporioides*. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 61, n. 19, p. 4551-4555, 2013. <https://doi.org/10.1021/jf400212y>.

WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. W. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M. A.; GELFAND, D. H.; SNINSKY, J. J.; WHITE, T. J. (ed.). **PCR protocols: a guide to methods and applications**. New York, EUA: Academic Press, Inc., 1990.

WORLD COFFEE RESEARCH (WCR). **Harnessing the power of natural enemies to fight coffee leaf rust**, 2019. Disponível em: <https://worldcoffeeresearch.org/work/biocontrol-coffee-leaf-rust/harnessing-power-natural-enemies-fight-coffee-leaf-rust/>. Acesso em: 20 fev. 2021.

ZIMOWSKA, B.; BECCHIMANZI, A.; KROL, E. D.; FURMANCZYK, A.; BENSCH, K.; NICOLETTI, R. New *Cladosporium* species from normal and galled flowers of Lamiaceae. **Pathogens**, v. 10, p. 369, 2021. <https://doi.org/10.3390/pathogens10030369>.

## **CAPÍTULO II**

## **Esclarecimento da identidade de um isolado de *Cordyceps*, obtido como endófito de *Coffea arabica*, e avaliação de seu potencial para o biocontrole de *Hemileia vastatrix***

Espécies de *Cordyceps* são comumente reconhecidas por serem parasitas de insetos de diversas ordens, no entanto, já surgem alguns relatos de espécies com capacidade endofítica. Dentre centenas de isolados coletados a partir de tecidos de cafeeiros saudáveis, um isolado apresentava morfologia semelhante a espécies de *Paecilomyces*. O presente trabalho objetivou identificar a espécie desse isolado, coletado no Quênia, e avaliar seu potencial como agente de controle biológico da ferrugem do cafeeiro através de testes *in vitro*. Inferências filogenéticas, baseadas em ITS, LSU e TEF, e análises morfológicas permitiram concluir que o isolado pertence à espécie *Cordyceps cateniannulata*. Nos testes *in vitro*, observou-se que após aplicação de suspensão de conídios e filtrado do cultivo fúngico de *C. cateniannulata*, houve redução significativa na germinação dos uredósporos de *Hemileia vastatrix*, em comparação à testemunha. Os uredósporos do patógeno germinaram, em média, 41,6% e 46,1% após tratamento com suspensão de conídios e filtrado do cultivo fúngico, respectivamente. *Cordyceps cateniannulata* tem ampla distribuição geográfica, no entanto, nunca havia sido relatado na África. Essa espécie é conhecida como patógeno de coleópteros e lepidópteros, porém seu hábito endofítico era anteriormente desconhecido. Observações do provável micoparasitismo exercido por *C. cateniannulata* sobre urédias de *H. vastatrix* são apresentadas e discutidas.

**Palavras-chave:** Ferrugem do cafeeiro. Antagonismo. Uredósporos. Micoparasitismo.

**Elucidating the identity of a *Cordyceps* isolate, obtained as an endophyte of *Coffea arabica*, and evaluation of its potential for the biocontrol of *Hemileia vastatrix***

*Cordyceps* species are commonly recognized for being parasites of insects of different orders, however, there are already some reports of species with endophytic capacity. Among hundreds of isolates collected from healthy coffee tissue, one isolate had similar morphology to *Paecilomyces* species. The present study aimed to identify the species of this isolate, collected in Kenya, and evaluate its potential as biocontrol agent of coffee leaf rust through *in vitro* assays. Phylogenetic inferences based on ITS, LSU and TEF, and morphological analyses allowed to conclude that this isolate belongs to the *Cordyceps cateniannulata*. During *in vitro* tests, it was observed that after application of conidial suspension and fungal filtrate of *C. cateniannulata*, there was a significant reduction of germination of *Hemileia vastatrix* uredospores, compared to the control. The pathogen uredospores germinated, on average, 41,6% and 46,1% after treatment with conidial suspension and fungal growth filtrate, respectively. *Cordyceps cateniannulata* has a wide distribution, however, has never been reported in Africa. This species is known as a coleopteran and lepidopteran pathogen, but its endophytic habit was previously unknown. Notes of a possible mycoparasitism by *C. cateniannulata* over the pathogen uredia are presented and discussed.

**Keywords:** Coffee leaf rust. Antagonism. Uredospores. Mycoparasitism.

## 1. Introdução

O café é um dos produtos agrícolas mais importantes na economia mundial, representando um setor que movimenta bilhões de dólares anualmente (DAVIS et al., 2020). A ferrugem do cafeeiro, causada por *Hemileia vastatrix* é a principal doença da cultura, ocasionando prejuízos anuais estimados em US\$ 1–2 bilhões (TALHINHAS et al., 2017; McCOOK, 2006).

Embora a doença e o fungo tenham sido reconhecidos pela ciência desde o século 19 (BERKELEY; BROOME, 1869) e tenham sido investigados por mais de 150 anos, o manejo da doença continua a desafiar os pesquisadores e a doença persiste sendo uma ameaça para a segurança econômica e o bem estar social de muitos países do mundo que dependem da cultura como atividade econômica relevante.

Entre 2011 e 2012, tiveram início severas epidemias de ferrugem do cafeeiro em países cafeicultores do norte da América do Sul e na América Central (McCOOK; VANDERMEER, 2015). As dificuldades ou falhas na implementação das estratégias de manejo da ferrugem que causaram esses problemas (mudanças climáticas, “quebra” de resistência de variedades cultivadas e objeções ou inviabilidade econômica de uso de controle químico) têm estimulado a busca por alternativas de manejo inovadoras (ZAMBOLIM, 2016; AVELINO et al., 2015).

Em 2014, um estudo financiado pela organização World Coffee Research (2021) e com as atividades centralizadas no Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa teve início. Tal atividade objetivou revisar a abordagem do controle biológico da ferrugem do cafeeiro, com foco no estudo dos fungos antagonistas de *H. vastatrix*. O trabalho partiu de um levantamento de fungos feito no Brasil e Paraguai, e sobretudo na África (Camarões e Etiópia). Isolados de fungos endofíticos – obtidos de tecidos sadios (hastes, folhas e frutos) – e fungos supostamente micoparasitas – coletados de pústulas de ferrugem colonizadas – foram obtidos e formaram uma grande coleção, com mais de 1.600 isolados. Antes de uma caracterização detalhada, foi realizada uma triagem desses isolados e rejeitados os que não esporularam ou que foram reconhecidos arbitrariamente como desinteressantes, por pertencerem a gêneros de fungos que incluem possíveis fitopatógenos do cafeeiro (*Colletotrichum*, *Pestalotiopsis*, *Phoma*, *Phomopsis*, dentre outros). O grande número de isolados restante foi testado *in vitro* devido a possíveis indícios de antagonismo contra *H. vastatrix*, como descrito em Salcedo-Sarmiento et al. (2021) e Rodríguez (2019). Dentre os

isolados que se destacaram por terem um bom potencial como antagonista, apenas um apresentava morfologia típica de *Paecilomyces* spp. (*Hypocreales*).

A ordem *Hypocreales*, composta por mais de 400 gêneros fúngicos (Catalogue of Life, 2021), inclui organismos com reconhecida capacidade em parasitar insetos e até mesmo outros fungos. Gêneros como *Ophiocordyceps*, *Trichoderma*, *Clonostachys*, *Metarhizium*, *Lecanicillium*, *Beauveria* e *Cordyceps* (ARAÚJO et al., 2021; RAJANI et al., 2021; YANG et al., 2021; SARVEN et al., 2020; JACKSON et al., 2012; OWNLEY et al., 2008; SUNG et al., 2007) abrigam espécies com tais características.

*Cordyceps* é o maior gênero dentro da família *Cordycipitaceae* e compreende mais de 400 espécies distribuídas globalmente (SUNG et al., 2007). O uso tradicional de estromas de *Cordyceps sinensis* como suplemento alimentar ou medicamento em países asiáticos e as aplicações na agricultura como agentes de controle biológico de insetos são bastante conhecidos (OLATUNJI et al., 2018). O gênero apresenta grande diversidade em termos de adaptação ao parasitismo de uma ampla variedade de insetos, sendo conhecidos como parasitas de insetos de muitas ordens. Além disso, há ainda espécies que combinam em seu estilo de vida o parasitismo de artrópodes com a capacidade de crescimento endofítico (DOHERTY et al., 2021; SUN et al., 2020; CHANG et al., 2020).

Pesquisas acerca do crescimento endofítico de espécies de *Cordyceps* e suas consequências para a planta hospedeira são ainda incipientes e limitadas aos dois casos citados acima. Aparentemente, não há material publicado a respeito de fungos do gênero *Cordyceps* spp. encontrados crescendo endofiticamente no cafeeiro.

Já com relação aos fungos endofíticos de *Coffea* spp., diferentes membros da ordem *Hypocreales* já foram encontrados crescendo endofiticamente em tecidos sadio de cafeeiro, como *Beauveria bassiana* e *Clonostachys rosea*, (VEGA et al, 2008); e mais recentemente, diferentes espécies de *Trichoderma* obtidas de *Coffea* spp. (RODRÍGUEZ et al., 2021).

Considerando que nunca uma espécie de *Cordyceps* foi observada como antagonista de *H. vastatrix* e nem de qualquer outra Pucciniales, o objetivo do presente trabalho foi o de se investigar esse isolado, caracterizando-o, elucidando sua taxonomia e avaliando preliminarmente seu potencial como agente de controle biológico, por meio de testes *in vitro*.

## 2. Material e Métodos

### 2.1. Obtenção, armazenamento e preservação do isolado

O isolado de *Cordyceps* sp. em estudo foi obtido de ramos de *Coffea arabica* no Quênia. Ele foi um dos muitos isolados obtidos seguindo-se o protocolo descrito por Rodríguez et al. (2021): em campo, plantas adultas tiveram a casca do caule limpa superficialmente com algodão embebido em álcool 70% e em seguida removida com facão flambado. O tecido exposto foi ainda mais limpo com um bisturi flambado e nivelado com uma lâmina menor também flambada. Lascas triangulares de aproximadamente 8 × 5 mm foram removidas do alburno exposto e transferidas para placa de Petri contendo meio batata-dextrose-ágar (BDA) acrescido de solução de 10 mg/L de penicilina e estreptomicina). As placas foram seladas e armazenadas em caixas plásticas. Chegando ao laboratório as placas foram mantidas à 25 °C e examinadas regularmente durante oito semanas. Na medida em que surgiam colônias fúngicas sobre ou ao redor das amostras de madeira foi sendo realizada a coleta de pontas de hifas ou esporos e esses foram transferidos para novas placas contendo meio batata-cenoura-ágar (BCA) para obtenção de colônias puras. As placas de BCA foram colocadas sob luz negra à 25 °C com a finalidade de promover esporulação.

A conservação do isolado foi feita pelo armazenamento em sílica-gel e em solução aquosa de glicerol a 10% conservadas em ultrafreezer a -80 °C (GONÇALVES et al., 2016; DHINGRA; SINCLAIR, 1995). Para manutenção da cultura para uso entre experimentos, subculturas do fungo foram mantidas em tubos contendo meio BCA em geladeira a 5 °C. A cultura pura foi depositada na coleção de culturas fúngicas “Coleção Octávio Almeida Drummond” (COAD) da Universidade Federal de Viçosa e uma amostra da colônia metabolicamente inativa foi depositada no fungário/ herbário (VIC) da Universidade Federal de Viçosa (UFV) sob os códigos COAD 3349 e VIC 47513.

### 2.2. Caracterização morfológica

Visualizações e descrições das estruturas fúngicas foram feitas pela preparação de lâminas por raspagem de estruturas fúngicas diretamente do meio de cultura ou pela técnica de microcultura conforme descrito em Mafia e Alfenas (2016).

Em sequência, lâminas foram examinadas sob um microscópio de luz, modelo Olympus BX-51, equipado com uma câmera digital Olympus Q-COLOR3. Imagens foram capturadas e processadas com o *software* CorelDRAW Graphics Suite 2017. Dados biométricos foram tomados de pelo menos 30 estruturas representativas.

Para a descrição das culturas fúngicas, o isolado foi repicado para o centro de placas de Petri contendo meio BDA e também outras contendo BCA. As placas foram deixadas em incubadora ajustada para  $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ , com fotoperíodo programado para 12 horas (12 horas de luz branca e 12 horas de escuro) e no escuro, por 7 dias. As características culturais foram descritas seguindo a nomenclatura de Crous et al. (2009) e para designação de cores utilizou-se a terminologia da cartela de cores de Rayner (1970).

### 2.3. Caracterização molecular

#### 2.3.1. Extração de DNA

Para realizar a extração de DNA, o isolado COAD 3349 foi transferido para placas contendo batata-dextrose (BD) e incubado a  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ , sob um fotoperíodo de 12 horas, por 5 dias. Passado esse período de crescimento, o micélio acumulado foi coletado e transferido para microtubos de centrifugação estéreis de 1,5 mL contendo três esferas de aço inoxidável. Para maceração do micélio, os microtubos foram colocados em um disruptor mecânico de células L Beader 3 (Loccus Biotecnologia, Cotia, SP, Brasil) ajustado para 4000 rpm, 2 ciclos de 10s, cada. O DNA total foi extraído utilizando o kit Wizard Genomic DNA Purification (Promega, Madison, WI, EUA), seguindo as instruções do fabricante.

#### 2.3.2. PCR e sequenciamento

A partir do DNA extraído, realizou-se amplificação por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR) de regiões genômicas comumente utilizadas na família *Cordycipitaceae* (KEPLER et al., 2017) com os pares de primers listados na Tabela 1.

A reação de PCR foi realizada utilizando um volume total de 12,5  $\mu\text{L}$ , onde cada reação continha: 6,25  $\mu\text{L}$  de Dream-Taq DNA polimerase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA); 4  $\mu\text{L}$  de água ultrapura esterilizada; 1,25  $\mu\text{L}$  de BSA; 0,25  $\mu\text{L}$  de DMSO; 0,25  $\mu\text{L}$  de

cada primer; e 0.25 µL de DNA (30 ng/µl). As reações de PCR foram realizadas a partir uma desnaturação inicial das fitas moldes, seguida de 35-40 ciclos de desnaturação, anelamento dos primers, extensão e extensão final. As condições de temperatura e tempo seguiram as recomendações para cada par de primers.

**Tabela 1.** Regiões gênicas e *primers* utilizados na caracterização molecular.

Região Gênica <sup>1</sup>	Primer	Sequência	Referência
ITS	ITS-5	5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3'	White et al. (1990).
	ITS-4	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'	
LSU	LROR	5'-ACCCGCTGAACTTAAGC-3'	Vilgalys e Hester (1990).
	LR5	5'-TCCTGAGGGAACTTCG-3'	
TEF1-α	983F	5'-GCYCCYGGHCAYCGTGAYTTYAT-3'	Rehner e Buckley (2005).
	2218R	5'-ATGACACCRACRGCACRGTGTG-3'	

<sup>1</sup>ITS: espaçador interno transcrito do DNA ribossomal; TEF1-α: fator de alongação da tradução 1-α; LSU: subunidade maior do DNA ribossomal.

Os produtos da PCR (4 µL de cada reação) foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1%, corado com GelRed™ (Biotium Inc., Hayward, CA, EUA) e visualizados sob luz UV. O produto restante de cada reação foi tratado com kit de purificação ExoSAP IT (Amersham Biosciences, Arlington Heights, IL, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante. Os fragmentos amplificados foram enviados para a empresa MacroGen Inc. (Seul, Coréia do Sul, <http://www.macrogen.com>) para o sequenciamento.

### 2.3.3. Análises filogenéticas

De posse dos resultados do sequenciamento, o *software* SeqAssem ver. 07/2008 (HEPPERLE, 2021) foi utilizado para avaliar os eletroferogramas, corrigir possíveis nucleotídeos em posições ambíguas e gerar as sequências consenso (contigs). Informações utilizadas para inferências filogenéticas foram extraídas dos trabalhos de Hu et al. (2021),

Mongkolsamrit et al. (2018), Kepler et al. (2017), Tasanathai et al. (2016) e Luangsa-Ard et al. (2005). As sequências geradas, juntamente com as obtidas nos trabalhos citados acima e outras adquiridas da base de dados GenBank do National Center for Biotechnology Information (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) (Tabela 2) foram alinhadas utilizando o algoritmo MUSCLE presente no *software* MEGA X ver. 10.2.2 (KUMAR et al., 2018). Sequências derivadas de dois espécimes de *Purpureocillium lilacinum* (LUANGSA-ARD et al., 2005) foram utilizados para enraizar a árvore. Alinhamentos concatenados foram gerados através do *software* SequenceMatrix ver. 1.8 (VAIDYA et al., 2011).

Reconstruções filogenéticas com base nos genes individuais e concatenados foram realizadas por dois métodos: análise de máxima verossimilhança (maximum likelihood – ML) e inferência bayesiana (Bayesian inference – BI). Para ambas as metodologias se utilizaram ferramentas disponíveis no portal CIPRES *Science Gateway* (MILLER et al., 2010). Previamente às análises filogenéticas, foi determinado qual o melhor modelo de substituição para cada gene/locus. Para tanto, adotou-se a ferramenta jModelTest2 ver. 2.1.6 (DARRIBA et al., 2012) também disponível no portal CIPRES. O modelo evolutivo GTR+I+G foi utilizado para todas as regiões gênicas em estudo.

As árvores inferidas por meio de ML utilizaram o método RAxML-HPC ver. 8.2.12 (STAMATAKIS, 2016). A reamostragem de bootstrap foi configurada para realizar 1.000 bootstraps, objetivando definir a melhor árvore.

Para as análises de BI, utilizou-se a ferramenta MrBayes ver. 3.2.7a (RONQUIST; HUELSENBECK, 2003). Para procurar pelas topologias, a metodologia de Monte Carlo via Cadeias de Markov (MCMC) foi iniciada utilizando duas análises simultâneas e independentes, cada qual com quatro cadeias de MCMC. Em cada análise, árvores foram confeccionadas aleatoriamente até 5.000.000 de gerações, com amostragem a cada 500 gerações, resultando em 10.000 árvores amostradas. As primeiras 2.500 árvores (25%) foram descartadas na fase de “queima” e os valores de probabilidade posterior (PP) foram determinados na árvore consenso através das 7.500 árvores remanescentes em cada análise. As árvores resultantes da BI e ML foram visualizadas no *software* TreeGraph 2 ver. 2.15.0-887 (STÖVER; MÜLLER, 2010) e editadas em *softwares* gráficos.

**Tabela 2.** Detalhes e número de acesso no GenBank dos isolados utilizados nas análises filogenéticas.

Espécie	Isolado <sup>1</sup>	Substrato/ Hospedeiro	Regiões Gênicas <sup>2</sup>		
			ITS	TEF1- $\alpha$	LSU
<i>Cordyceps agriotidis</i>	ARSEF 5692	Coleoptera	–	DQ522322	DQ518754
<i>C. amoene-rosea</i>	<b>CBS 107.73</b>	Larva de Coleoptera	AY624168	–	MG665224
<i>C. amoene-rosea</i>	CBS 729.73	Nitidulidae (Coleoptera)	AY624169	HM161732	MG665225
<i>C. bifusispora</i>	EFCC 8260	Larva de Lepidoptera	AY245627	EF468747	EF468807
<i>C. bifusispora</i>	EFCC 5690	Larva de Lepidoptera	–	EF468746	EF468806
<i>C. blackwelliae</i>	<b>TBRC 7256/ BBH 40750</b>	Larva de Coleoptera	MF140736	MF140822	MF140702
<i>C. blackwelliae</i>	TBRC 7253/ BBH 23883	Lepidoptera	MF140739	MF140825	MF140705
<i>C. brongniartii</i>	NBRC 101394	Larva de Coleoptera	JN943297	–	JN941381
<i>C. brongniartii</i>	NBRC 101395	Larva de Coleoptera	JN943298	–	JN941382
<i>C. cateniannulata</i>	<b>CBS 152.83</b>	Adulto de Coleoptera	AY624172	JQ425687	MG665226
<i>C. cateniannulata</i>	TBRC 7258	Araneae; aranha	MF140753	MF140850	MF140729
<i>C. cateniannulata</i>	BUC207	–	–	MH879663	MH879589
<i>C. cateniobliqua</i>	<b>CBS 153.83</b>	<i>Adoxophyes privatana</i>	AY624173	JQ425688	–
<i>C. cateniobliqua</i>	ARSEF 6283	Orthoptera	GU734763	GU734749	–
<i>C. chiangdaoensis</i>	BCC75734	Larva de Coleoptera	KT261394	KT261404	–
<i>C. chiangdaoensis</i>	BCC75733	Larva de Coleoptera	KT261397	KT261407	–
<i>C. coleopterorum</i>	CBS 102.73	Lampyridae (Coleoptera)	AY624176	–	–
<i>C. coleopterorum</i>	<b>CBS 110.73</b>	Larva de Coleoptera	AY624177	JF416028	JF415988
<i>C. farinosa</i>	CBS 240.32	Pupa de Lepidoptera	AY624178	JF416019	JF415979
<i>C. farinosa</i>	OSC 111005	Pupa de Lepidoptera	–	DQ522348	DQ518773
<i>C. farinosa</i>	OSC 111006	Pupa de Lepidoptera	–	EF469065	EF469080
<i>C. fumosorosea</i>	CBS 375.70	Alimento	AY624183	HM161736	MG665229
<i>C. fumosorosea</i>	<b>CBS 107.10</b>	–	AY624184	HM161735	MG665227
<i>C. ghanensis</i>	<b>CBS 105.73</b>	Pupa de Lepidoptera	AY624185	–	–
<i>C. javanica</i>	<b>CBS 134.22</b>	<i>Stephanoderis hampei</i>	AY624186	JQ425683	MG665231

Tabela 2. Continuação.

Espécie	Isolado <sup>1</sup>	Substrato/ Hospedeiro	Regiões Gênicas <sup>2</sup>		
			ITS	TEF1- $\alpha$	LSU
<i>C. javanica</i>	TBRC 7259/ BBH 40411	Lepidoptera	MF140745	MF140831	MF140711
<i>C. kintrischica</i>	ARSEF 7218	<i>Agelastica alni</i>	EU553278	GU734751	–
<i>C. kintrischica</i>	ARSEF 8058	<i>Agelastica alni</i>	GU734764	GU734750	–
<i>C. kyusyuensis</i>	EFCC 5886	Larva de Lepidoptera	–	EF468754	EF468813
<i>C. lepidopterorum</i>	<b>TBRC 7263/ BBH 40735</b>	Larva de Lepidoptera	MF140765	MF140819	MF140699
<i>C. lepidopterorum</i>	TBRC 7264/ BBH 40737	Larva de Lepidoptera	MF140766	MF140820	MF140700
<i>C. liangshanensis</i>	EFCC 1523	Larva de Lepidoptera	–	EF468755	EF468814
<i>C. liangshanensis</i>	EFCC 1452	Larva de Lepidoptera	–	EF468756	EF468815
<i>C. militaris</i>	OSC 93623	Larva de Lepidoptera	JN049825	DQ522332	AY184966
<i>C. militaris</i>	NBRC 100741	Pupa	JN943437	AB968606	JN941386
<i>C. morakotii</i>	<b>BCC 68398</b>	Pupa de formiga	KT261388	KT261398	MF140730
<i>C. morakotii</i>	BCC 55820	Pupa de formiga	KT261389	KT261399	MF140731
<i>C. ninchukispora</i>	BCC 30937	Lepidoptera	FJ765274	–	FJ765242
<i>C. ninchukispora</i>	BCC 1422	–	FJ765278	FJ765262	–
<i>C. ninchukispora</i>	EGS 38.165	<i>Beilschmiedia erythrophloia</i>	–	EF468795	EF468846
<i>C. ningxiaensis</i>	<b>HMJAU 25074</b>	Pupa de Diptera	KF309668	–	KF309671
<i>C. ningxiaensis</i>	HMJAU 25076	Pupa de Diptera	KF309670	–	KF309673
<i>C. ochraceostromata</i>	ARSEF 5691	Lepidoptera	–	EF468759	EF468819
<i>C. piperis</i>	CBS 116719	Exsúvia de inseto	–	DQ118749	AY466442
<i>C. pruinosa</i>	ARSEF 5413	<i>Iragoides fasciata</i>	JN049826	DQ522351	AY184968
<i>C. pruinosa</i>	HKAS 102537	–	MT012347	MT025053	MT012354
<i>C. pruinosa</i>	EFCC 5693	Pupa de Lepidoptera	–	EF468762	EF468821
<i>C. qingchengensis</i>	MFLU 17-1022	Pupa de Lepidoptera	KY423506	–	MK761211
<i>C. roseostromata</i>	ARSEF 4870	Larva	EF368022	–	–
<i>C. roseostromata</i>	ARSEF 4871	Pupa	–	–	AF339523

Tabela 2. Continuação.

Espécie	Isolado <sup>1</sup>	Substrato/ Hospedeiro	Regiões Gênicas <sup>2</sup>		
			ITS	TEF1- $\alpha$	LSU
<i>C. spegazzinii</i>	ARSEF 7850	–	DQ196435	–	DQ196435
<i>C. takaomontana</i>	BCC 12688	Pupa de Lepidoptera	EU807996	–	–
<i>C. takaomontana</i>	BCC 28612	Pupa de Lepidoptera	FJ765285	FJ765268	FJ765252
<i>C. tenuipes</i>	<b>ARSEF 5135</b>	Pupa de Lepidoptera	AY624196	JF416020	JF415980
<i>C. tenuipes</i>	TBRC 7266/ BBH 41248	Pupa de Lepidoptera	MF140742	MF140828	MF140708
<i>Purpureocillium lilacinum</i>	CBS 431.87	Massa de ovos de <i>Meloidogyne</i>	AY624188	EF468791	EF468844
<i>Purpureocillium lilacinum</i>	<b>CBS 284.36</b>	Solo	AY624189	EF468792	FR775484

<sup>1</sup> Identificações em negrito representam espécimes tipo;

<sup>2</sup> **ITS**: espaçador interno transcrito do DNA ribossômico; **TEF1-  $\alpha$** : fator de alongação da tradução 1- $\alpha$ ; **LSU**: subunidade maior do DNA ribossômico.

## 2.4. Produção e obtenção dos uredósporos de *Hemileia vastatrix*

Uredósporos de *H. vastatrix* foram produzidos seguindo metodologia descrita por Salcedo-Sarmiento et al. (2021): mudas saudáveis de *C. arabica* (cv. “Caturra”) com sete meses de idade foram selecionadas e mantidas em câmara úmida com umidade relativa de  $85 \pm 5 \%$ , a  $22 \text{ }^\circ\text{C}$  e sob regime luminoso de 12 h por 15 dias anteriormente à inoculação com *H. vastatrix*.

Amostras da raça II do patógeno foram fornecidas pelo Laboratório de Biotecnologia do Cafeeiro (BioCafé) da UFV. Foi preparada uma suspensão de uredósporos ( $1 \times 10^5$  uredósporos/mL) em solução de Tween 20 a 0,05 % e um borrifador foi utilizado para aplicar a suspensão calibrada nas folhas das plantas até que houvesse o escoamento. Em seguida, as plantas inoculadas foram mantidas em câmara úmida, no escuro, a  $22^\circ\text{C}$  por 48 h e após esse intervalo, foram transferidas para bancadas sob as mesmas condições mencionadas anteriormente.

Passados 30-45 dias, quando a esporulação era intensa, uredósporos foram coletados cuidadosamente da superfície foliar com auxílio de cápsulas gelatinosas e transferidos para microtubos de 1,5 mL para uso imediato.

## 2.5. Avaliação do potencial de biocontrole mediante testes *in vitro*

### 2.5.1. Efeito de suspensão de conídios de COAD 3349 sobre germinação de uredósporos de *Hemileia vastatrix*

Para realização dos testes *in vitro* o isolado COAD 3349 foi cultivado em frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 75 mL de meio líquido BD, sob agitação e temperatura constantes (160 rpm, a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ) por 10 dias. Uma alíquota de 15 mL do cultivo do isolado foi obtida e sua concentração foi calibrada, com um hemacitômetro, para  $1 \times 10^6$  conídios/mL. Dessa suspensão calibrada, 10  $\mu\text{L}$  foram coletados e depositados em lâminas de vidro contendo uma gota de 10  $\mu\text{L}$  de suspensão de uredósporos de *H. vastatrix* ( $1 \times 10^5$  uredósporos/mL). A ponteira da micropipeta foi utilizada para misturar as duas gotas. As lâminas foram colocadas no escuro a  $22 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ , onde permaneceram por 6 h. A germinação dos uredósporos foi interrompida com adição de 10  $\mu\text{L}$  de lactofucsina. A avaliação foi realizada pela contagem de 100 uredósporos em cada área de análise e foram considerados germinados aqueles uredósporos que apresentaram tubos germinativos maiores que seus diâmetros.

### 2.5.2. Efeito do filtrado de cultura de COAD 3349 sobre germinação de uredósporos de *Hemileia vastatrix*

O líquido remanescente do cultivo descrito acima foi separado da biomassa fúngica (micélio e conídios) do isolado COAD 3349 através da passagem por um coador de nylon de uso doméstico. Em seguida, o líquido foi centrifugado por 15 min a 3.500 rpm. O sobrenadante foi recolhido e filtrado em funil de Büchner, utilizando membrana filtrante Durapore® com poros de 0,22 µm (Merck Millipore, Burlington, MA, EUA) com poros de 0,22 µm. De posse do filtrado, procedeu-se a montagem do teste: lâminas de microscopia receberam 10 µL de suspensão de *H. vastatrix* ( $1 \times 10^5$  uredósporos/mL), sobre a gota de suspensão foi pipetada uma alíquota de 10 µL do filtrado de COAD 3349 e as duas gotas foram misturadas com a ponteira da micropipeta. Um controle foi adotado para ambos os tipos de tratamentos (suspensão de conídios e filtrado de cultura) e consistiu em lâminas com 10 µL da suspensão de *H. vastatrix* acrescidas de 10 µL de água estéril.

O procedimento de incubação e avaliação foi o mesmo descrito anteriormente. Os experimentos foram conduzidos duas vezes.

### 2.5.3. Análise dos dados

Para os dois experimentos, os dados foram analisados por ANOVA e as médias de porcentagem de germinação foram comparadas pelo teste de Tukey ( $\alpha = 0,05$ ) utilizando o *software* Minitab v. 18.

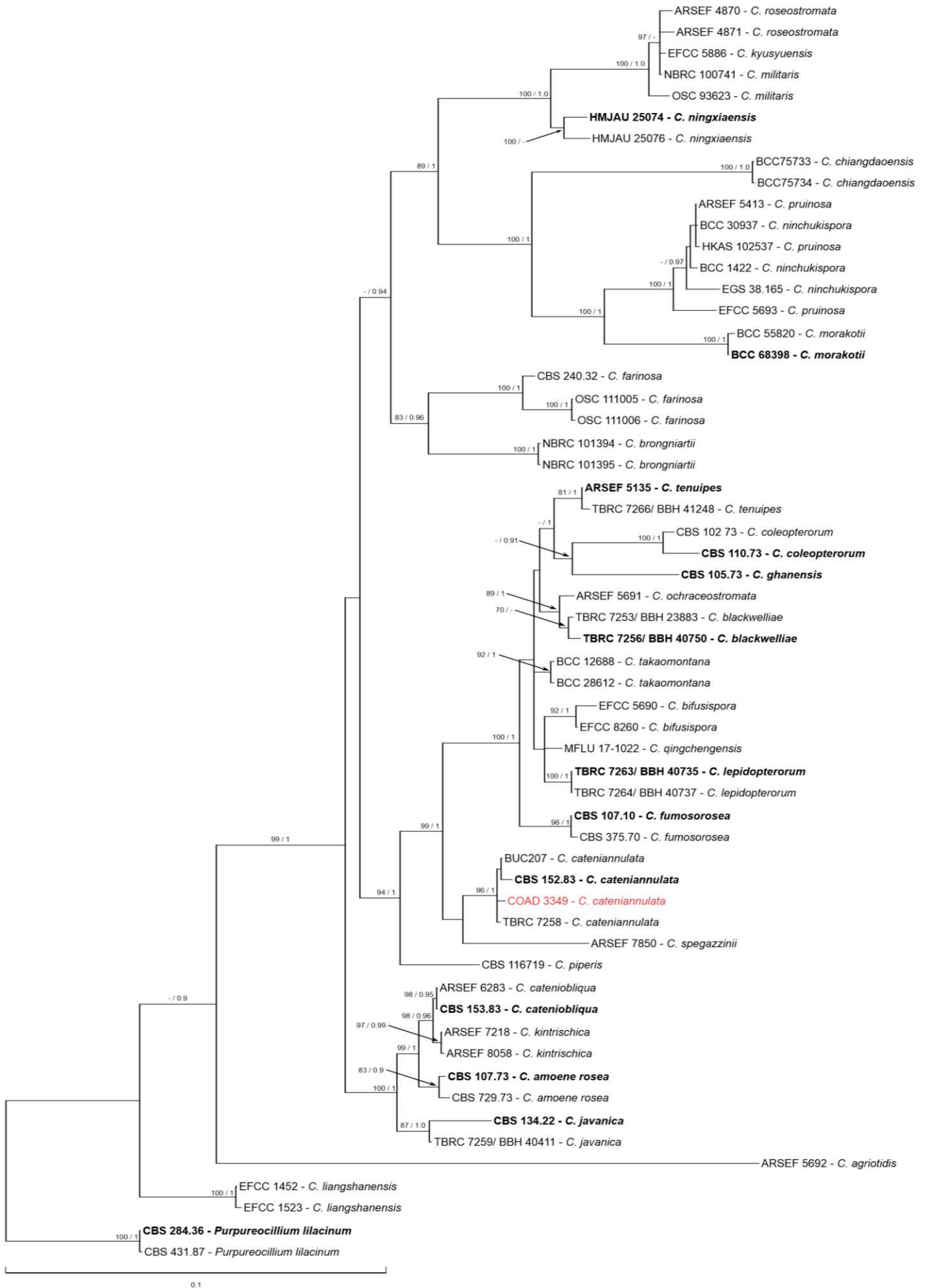
## 3. Resultados

### 3.1. Filogenia

O alinhamento final de sequências de *Cordyceps* para construção das árvores filogenéticas incluiu: 55 isolados de 29 espécies de *Cordyceps* já conhecidas, o isolado da espécie encontrada crescendo endofiticamente no cafeeiro e duas sequências de *Purpureocillium lilacinum* CBS 431.87 e CBS 284.36 (LUANGSA-ARD et al., 2005) como grupo externo para o enraizamento da árvore. O alinhamento combinado de ITS, LSU e TEF incluiu de 2270 caracteres (ITS: 549; LSU: 815; TEF: 906), dos quais: 1585 foram conservados

(ITS: 347; LSU: 686; TEF: 552), 675 foram considerados variáveis (ITS: 201; LSU: 128; TEF: 346) e 549 (ITS: 162; LSU: 83; TEF: 304) foram considerados informativos para parcimônia.

A análise filogenética concatenada revelou que o isolado em estudo formou um clado bem suportado (96% de suporte de bootstrap e 1.0 de probabilidade posterior) com isolados de *C. cateniannulata* já descritos (Fig. 1).



**Figura 1.** Topologia de inferência bayesiana. Árvore baseada na concatenação das sequências de ITS, LSU e TEF. Nós bem suportados apresentam os valores de bootstrap (>70%) da ML e probabilidade posterior (>0.9) da BI. O isolado em estudo encontra-se destacado em vermelho e espécimes tipo em negrito. Árvore enraizada com *Purpureocillium lilacinum* (CBS 284.36 e CBS 431.87).

### 3.2. Taxonomia

*Cordyceps cateniannulata* (Z.Q. Liang) Kepler, B. Shrestha & Spatafora – em Kepler et al., *IMA Fungus* 8 (2): 346, 2017. MycoBank: 820976.

≡ *Paecilomyces cateniannulatus* Z.Q. Liang – em Liang, *Acta phytopath. sin.* 21 (1): 33, 1981.

= *Isaria cateniannulata* (Z.Q. Liang) Samson & Hywel-Jones – em Luangsa-Ard, *Mycol. Res.* 109 (5): 588, 2005.

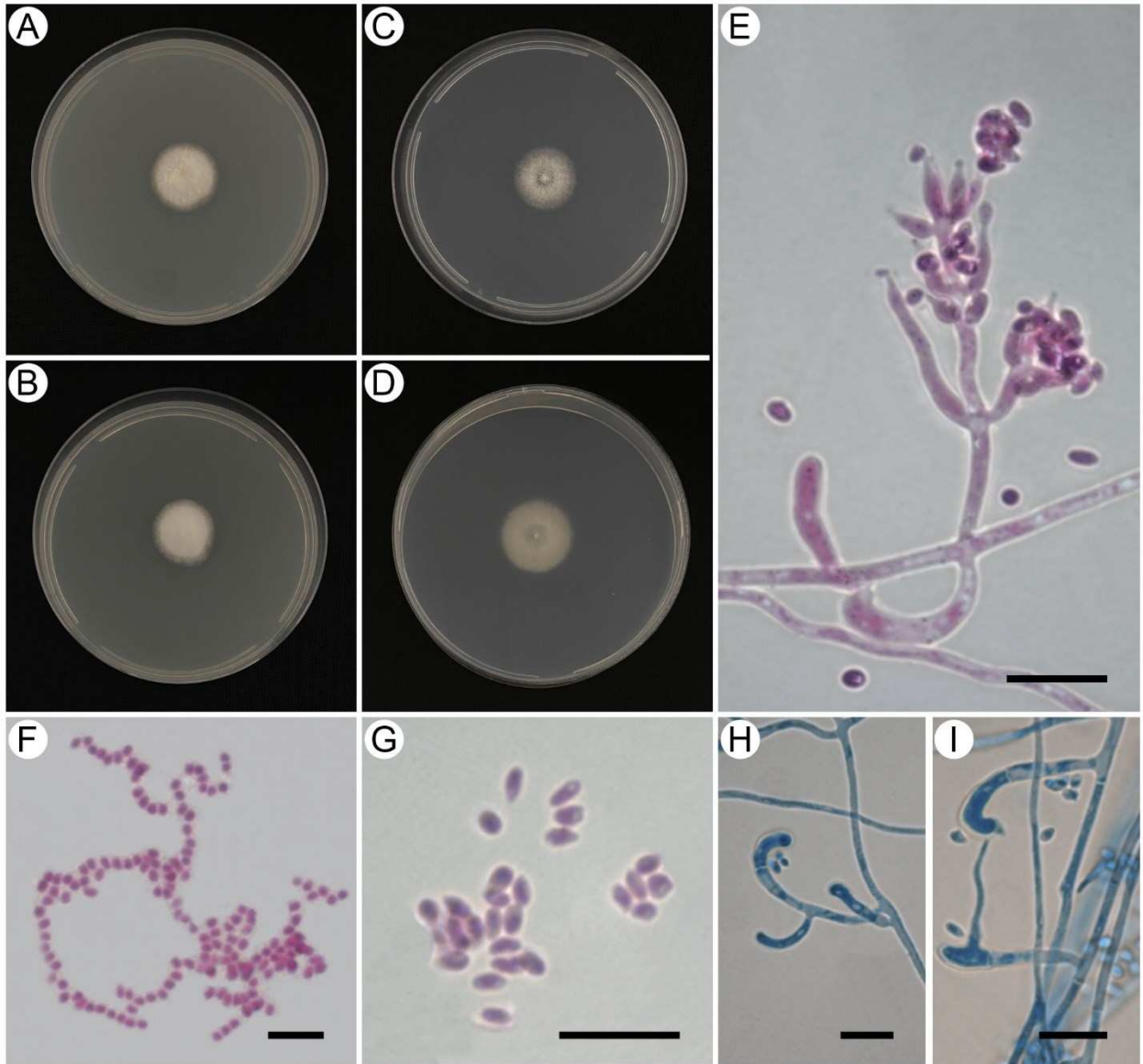
*Material examinado* – QUÊNIA: crescendo endofiticamente em ramos de *Coffea arabica* adulto. 2017, H. C. Evans & R. W. Barreto (isolado COAD 3349).

Descrição baseada no isolado COAD 3349.

*Características culturais:* em BDA (Fig. 2a e 2b) – crescimento lento (22–25 mm diam após 7 dias), colônias planas ou plano-convexas, bordas inteiras, micélio aéreo aveludado/cotonoso, branco, zonação diurna; esporulação abundante. Em BCA (Fig. 2c e 2d) – crescimento lento (20–21 mm diam após 7 dias), colônias planas a plano-convexas, com bordas inteiras, micélio aéreo feltroso ou ralo, irradiado, branco; esporulação abundante.

*Descrição:* *Forma sexuada*, ausente. *Micélio* hialino, septado, 1–2 µm diam. *Propágulos vegetativos* (gemas) claviformes, encurvados ou ganchosos, 10–60,5 × 1,5–3,5 µm, base constricta 1–3 µm, 0–4 septos, hialinas, parede finas e lisas. *Conidióforos* verticilados, ligeiramente sinuosos, 6,5–81 × 1,5–2,5 µm, 0–7 septos, hialinos, lisos, *Células conidiogênicas* fialídicas, ampuliformes, 3–8(–11,5) × 1–2,5 µm, hialinas e lisas. *Conídios* catenulados, numerosos, em cadeias longas, que as vezes formam anéis com 12–40 µm diam, ovoides ou elipsoides, 2–3,5 × 1–2 µm, hialinos e lisos.

*Notas:* *Cordyceps cateniannulata* foi originalmente descrito por Liang (1981) como *Paecilomyces cateniannulata* ocorrendo como entomopatógeno sobre adultos de coleóptero não identificado e pupas de lepidóptero da espécie *Archips ingentanus* na China. Apenas a forma assexuada dessa espécie é conhecida. Posteriormente ela foi recombinada como *Isaria cateniannulata* (LUANGSA-ARD, 2005) com base em estudos filogenéticos.



**Figura 2.** *Cordyceps cateniannulata* (COAD 3349). Colônias com 7 dias em BDA nos regimes (A) 12 hs de fotoperíodo diário e (B) no escuro e em BCA no regime (C) com fotoperíodo e (D) no escuro. (E) Conidióforo verticilado com células conidiogênicas filídicas dando origem a conídios. (F) Conídios em cadeias formando anéis. (G) Conídios em detalhes. (H) Gemas em desenvolvimento. (I) Gemas emitindo tubos germinativos. – Barras de escala: 10  $\mu\text{m}$ .

Finalmente, obedecendo às novas normas nomenclaturais em vigor (*one fungus = one name*) foi feita nova recombinação para o nome atual (KEPLER et al, 2017). As informações disponíveis sobre a morfologia deste fungo estão restritas à descrição original da espécie (LIANG, 1981), que é bastante limitada em informações e não apresenta ilustrações a respeito dessa espécie. O autor informou que as filídes são geralmente formadas a partir da hifa aérea e tem base globosa ( $3-8 \times 1.5-3 \mu\text{m}$ ) e os conídios são ovoides a elipsoides ( $2-3.5 \times 1-1.5 \mu\text{m}$ ) hialinos e lisos e formam cadeias irregulares, “imbricadas” e formando anéis com cerca de 30  $\mu\text{m}$  diam. O isolado obtido do cafeeiro e aqui descrito apresenta estruturas com formas e

dimensões semelhantes às descritas por Liang (1981). No entanto há dúvidas sobre o aspecto imbricado de conídios em cadeia, citados na descrição original, e aqui não foi vista uma organização que fosse reconhecida como tal. As estruturas aqui interpretadas como sendo gemas (propágulos vegetativos), por apresentarem base constricta, sugerindo fácil destacamento a partir das hifas, e por emitirem tubos germinativos regularmente, são um aspecto evidente no nosso isolado, porém não citado na descrição original.

### 3.3. Efeito de suspensão de conídios de COAD 3349 e de seu filtrado sobre germinação de uredósporos de *Hemileia vastatrix*

A exposição de uredósporos de *H. vastatrix* a conídios de *C. cateniannulata* resultou em inibição significativa da germinação dos uredósporos (Tab. 3). A porcentagem de inibição da germinação foi, respectivamente, de 34 e 38,4% nos experimentos 1 e 2. A adição apenas do filtrado à suspensão de uredósporos, resultou em valores semelhantes de inibição da germinação, sendo 35,1% no primeiro e 30,6% no segundo experimento.

**Tabela 3.** Porcentagem de germinação dos uredósporos de *H. vastatrix* mediante tratamento com *C. cateniannulata* COAD 3349.

Tratamento	Germinação (%) <sup>1</sup>	
	Experimento 1	Experimento 2
Testemunha	63,2 a	70,3 a
Suspensão de conídios	41,7 b	48,8 b
Filtrado	41,0 b	43,3 b
CV (%)	23,4	23,5

<sup>1</sup> Médias seguidas da mesma letra na mesma coluna não são significativamente diferentes entre si de acordo com o teste de Tukey ( $\alpha = 0,05$ ).

## 4. Discussão

Sabe-se que muitas espécies de *Cordyceps* têm capacidade de parasitar diferentes insetos. Ainda assim, a combinação de crescimento endofítico e antagonismo contra um fungo

fitopatogênico, possivelmente caracterizando um efeito “guarda-costas”, nunca foi antes reportada. Trabalhos recentes relatam que *C. fumosorosea* é capaz de crescer endofiticamente em *Citrus × insitorum* e *Solanum melongena* (DOHERTY et al., 2021; SUN et al., 2020) e *C. ninchukispora* foi obtido de sementes de *Beilschmiedia erythrophloia* (CHANG et al., 2020). Apesar de preliminares, tais pesquisas sugerem que o crescimento endofítico não seja incomum no gênero *Cordyceps*.

O registro geográfico de *C. cateniannulata* (= *Isaria cateniannulata* = *Paecilomyces cateniannulatus*) para o Quênia é também novo para a ciência. Apesar de existirem registros anteriores dessa espécie para países como: China, Japão, Colômbia e até mesmo no Brasil (DOMINGUES, 2021; MONTES-BAZURTO et al., 2020; ZHOU et al., 2020; LAZO, 2012; SHIMAZU, 2001), esse fungo nunca havia sido encontrado no continente africano.

Nos testes realizados *in vitro*, observou-se uma redução significativa da germinação dos uredósporos de *H. vastatrix* em relação ao controle. No entanto os tratamentos com conídios e o filtrado não diferiram entre si, sugerindo que os efeitos sobre os uredósporos possam advir unicamente de metabólitos produzidos por COAD 3349. Há muitos registros da produção de substâncias bioativas por espécies de *Cordyceps* havendo, inclusive, registro de moléculas com atividade antifúngica (CHEN et al., 2020). *C. cateniannulata* é uma espécie pouco estudada e ainda pouco se sabe sobre os metabólitos que produz. O único trabalho sobre metabólitos produzidos por essa espécie relata a síntese de um composto espirocíclico com atividade sobre células de HeLa (YANG et al., 2012). Tal informação nos permite acreditar que *C. cateniannulata* possa produzir outros compostos com atividade biológica sobre outras células, inclusive as fúngicas.

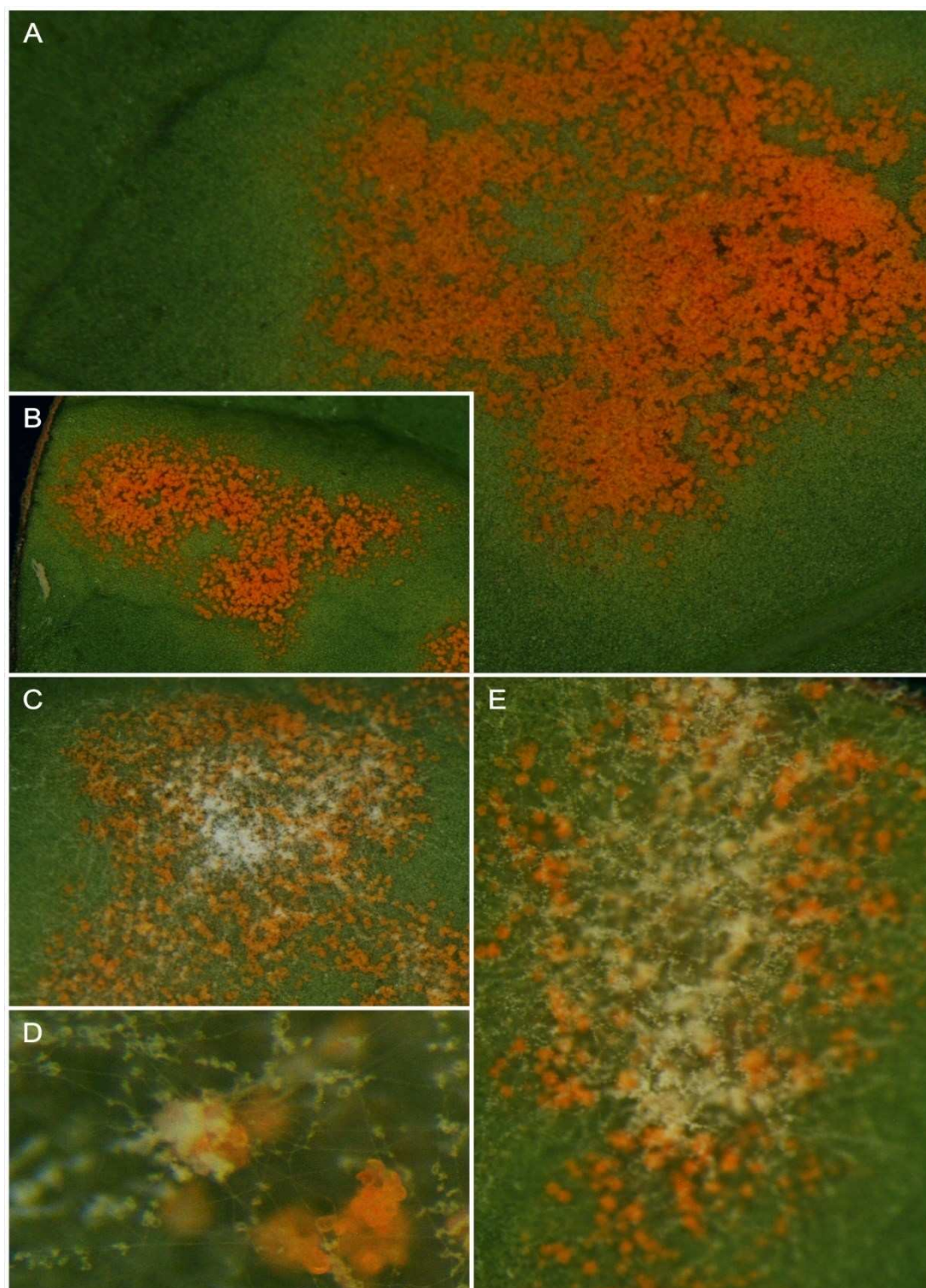
Recentemente, o isolado COAD 3349 teve seu potencial como agente de controle biológico contra a ferrugem do cafeeiro parcialmente avaliado. Testes conduzidos com tratamento prévio de discos de folha de cafeeiro antes da inoculação com suspensão de uredósporos de *H. vastatrix* ou simultaneamente foram realizados por Rodríguez (2019). Os resultados se mostraram muito promissores, observando-se uma redução da severidade da doença em comparação a testemunha em 89,6% e 94,33% quando *C. cateniannulata* foi aplicado 72h e 24h, respectivamente, previamente ao tratamento com *H. vastatrix*. Esses resultados colocaram COAD 3349 entre os melhores isolados para fins de biocontrole da ferrugem do cafeeiro.

Durante avaliação do experimento também se notou evidências visuais de micoparasitismo de COAD 3349 sobre as urédias (Fig. 3). Portanto, esse isolado parece combinar a produção de metabólitos, que inibem a germinação de uredósporos de *H. vastatrix*, e o micoparasitismo do agente da ferrugem do cafeeiro. Essas evidências precisam ser investigadas com maior profundidade e estudos mais detalhados acerca do estabelecimento de COAD 3349 como endófito e sua persistência, bem como um possível efeito de proteção do cafeeiro contra a ferrugem merecem atenção.

Rodríguez (2019) também conduziu um teste preliminar *in planta* em condições de casa de vegetação com tratamento de plantas de cafeeiro com suspensão de COAD 3349, seguida (após 72h) de inoculação das plantas com *H. vastatrix*. Observou-se uma redução da severidade da doença de 64% em relação à testemunha inoculada apenas com *H. vastatrix*. No entanto, segundo Rodríguez (Comunicação pessoal), este teste merece ser conduzido novamente, pois houve grande variabilidade entre os tratamentos e os resultados não foram estatisticamente significativos.

Há algum tempo, *C. cateniannulata* vem sendo estudado como potencial agente para o controle biológico de insetos. Estudos realizados em várias localidades demonstraram a patogenicidade de *C. cateniannulata* a diferentes insetos-praga, como *Spodoptera frugiperda* (ZHOU et al., 2020) na China e a *Glycaspis brimblecombei* no Brasil (DOMINGUES, 2021). Considerando-se esses estudos e os vários registros de *C. cateniannulata* como entomopatógeno, há a possibilidade de que COAD 3349 seja também um patógeno dos dois principais insetos-praga da cultura do cafeeiro: o coleóptero *Hypothenemus hampei* (broca do cafeeiro) e o lepidóptero *Leucoptera coffeella* (bicho mineiro). Seria admirável e valioso a combinação de efeitos de biocontrole de COAD 3349 sobre uma das principais doenças do cafeeiro e algum dos insetos-praga mais importantes da cultura.

Trabalhos anteriores já indicaram que alguns fungos, mais conhecidos como entomopatogênicos, também podem ter efeito de controle sobre fungos fitopatogênicos que atacam culturas (CANASSA et al., 2020; JABER, 2015). *Beauveria bassiana*, por exemplo, é um reconhecido entomopatogéno de *H. hampei* (REHNER et al., 2006) e, recentemente, foram obtidas evidências de que *B. bassiana* também protege frutos de café contra a podridão dos frutos, causada por diferentes espécies de *Colletotrichum* (SERRATO-DIAZ et al., 2020). Seria especialmente relevante se tal “efeito duplo ou múltiplo” fosse também encontrado para outro membro da família *Cordycipitaceae*, como *C. cateniannulata*.



**Figura 3.** *Cordyceps cateniannulata* COAD 3349 colonizando pústulas de *Hemileia vastatrix* após inoculação de plantas sintomáticas. (A – B) Controle não tratado com suspensão de COAD 3349. (C – E) Pústulas apresentando colônias de COAD 3349 30-40 dias após inoculação. Fotos: Maria del Carmen H. Rodríguez.

Os estudos pioneiros aqui apresentados centrados na caracterização, identificação e avaliação preliminar de COAD 3349 devem estimular novas pesquisas em diversas frentes

sobre *C. cateniannulata* como agente de biocontrole para o manejo de doenças e pragas do cafeeiro, mas sobretudo visando o manejo de uma das piores doenças da cultura, a ferrugem do cafeeiro.

## 5. Referências

ARAÚJO, J. P. M.; MORIGUCHI, M. G.; UCHIYAMA, S.; KINJO, N.; MATSUURA, Y. *Ophiocordyceps salganeicola*, a parasite of social cockroaches in Japan and insights into the evolution of other closely-related *Blattodea*-associated lineages. **IMA Fungus**, v. 12, n. 3, 2021. <https://doi.org/10.1186/s43008-020-00053-9>.

AVELINO, J. et al. The coffee rust crises in Colombia and Central America (2008–2013): impacts, plausible causes and proposed solutions. **Food Security**, v. 7, n. 2, p. 303-321, 2015. <https://doi.org/10.1007/s12571-015-0446-9>.

BERKELEY, M. J.; BROOME, C. E. *Hemileia vastatrix*. **The Gardeners' Chronicle and Agricultural Gazette**, v. 6, p. 1157, 1869.

CANASSA, F.; ESTECA, F. C.; MORAL, R. A.; MEYLING, N. V.; KLINGEN, I.; DELALIBERA, I. Root inoculation of strawberry with the entomopathogenic fungi *Metarhizium robertsii* and *Beauveria bassiana* reduces incidence of the twospotted spider mite and selected insect pests and plant diseases in the field. **Journal of Pest Science**, v. 93, n. 1, p. 261-274, 2020. <https://doi.org/10.1007/s10340-019-01147-z>.

CATALOGUE OF LIFE (CoL). **Cordycipitaceae**. Disponível em: <https://www.catalogueoflife.org/data/taxon/8K4>. Acesso em: 15 jun. 2021.

CHANG, H. S.; CHENG, M. J.; WU, M. D.; CHAN, H. Y.; HSIEH, S. Y.; LIN, C. H.; YECH, Y. J.; CHEN, I. S. Secondary metabolites produced by an endophytic fungus *Cordyceps ninchukispora* from the seeds of *Beilschmiedia erythrophloia* Hayata. **Phytochemistry Letters**, v. 22, p. 179-184, 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.phytol.2017.08.005>.

CHEN, B.; SUN, Y.; LUO, F.; WANG, C. Bioactive metabolites and potential mycotoxins produced by *Cordyceps* fungi: a review of safety. **Toxins**, v. 12, n. 6, p. 410, 2020. <http://dx.doi.org/10.3390/toxins12060410>.

CROUS, P. W.; VERKLEY, G. J. M.; GROENEWALD, J. Z.; SAMSON, R. A. **CBS: Fungal Biodiversity**. The Netherlands, Utrecht: CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, 2009.

DAVIS, A. P.; GARGIULO, R.; FAY, M. F.; SARMU, D.; HAGGAR, J. Lost and found: *Coffea stenophylla* and *C. affinis*, the forgotten coffee crop species of west Africa. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, 2020. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00616>.

DARRIBA, D.; TABOADA, G. L.; DOALLO, R.; POSADA, D. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. **Nature Methods**, v. 9, n. 8, p. 772, 2012. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2109>.

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

DOHERTY, E. M.; AVERY, P. B.; DUREN, E. B.; CANO, L. M.; ROSSI, L. In planta localization of endophytic *Cordyceps fumosorosea* in carrizo citrus. **Microorganisms**, v. 9, n. 2, 2021. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9020219>.

DOMINGUES, M. M. **Prospecção de fungos entomopatogênicos e princípios ativos para o manejo do psíldeo-de-concha do eucalipto *Glycaspis brimblecombei* (Hemiptera: Aphalaridae)**. 2021. Dissertação (Mestrado em Agronomia – Proteção de Plantas) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Botucatu, SP, 2021.

GONÇALVES, R. C.; ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. Armazenamento de microrganismos em cultura com ênfase em fungos fitopatogênicos. *In*: ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. (ed.). **Métodos em Fitopatologia**. Viçosa: Editora UFV, 2016.

HEPPERLE, D. **SeqAssem - Contig Sequence Assembly Software**, 2021. Klein Raden, Alemanha: SequentiX - Digital DNA Processing. Disponível em: [https://www.sequentiX.de/software\\_seqassem.php](https://www.sequentiX.de/software_seqassem.php). Acessado em 02 fev. 2021.

HU, J.; DAI, D.; ZHAO, G. P.; GUO, D. Z.; TUO, Y. L.; RAO, G.; QI, Z. X.; ZHANG, Z. H.; LI, Y.; ZHANG, B. Morphology and molecular study of three new Cordycipitoid fungi and its related species collected from Jilin Province, Northeast China. Preprint, 2021. Disponível em: Research Square: <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-422247/v1>.

JABER, L.R. Grapevine leaf tissue colonization by the fungal entomopathogen *Beauveria bassiana s.l.* and its effect against downy mildew. **BioControl**, v. 60, n. 1, p. 103–112, 2015. <https://doi.org/10.1007/s10526-014-9618-3>.

JACKSON, D.; SKILLMAN, J.; VANDERMEER, J. Indirect biological control of the coffee leaf rust, *Hemileia vastatrix*, by the entomogenous fungus *Lecanicillium lecanii* in a complex coffee agroecosystem. **Biological Control**, v. 61, n. 1, p. 89-97, 2012. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2012.01.004>.

KEPLER, R. M.; LUANGSA-ARD, J. J.; HYWEL-JONES, N. L.; QUANDT, C. A.; SUNG, G. H.; REHNER, S. A.; AIME, M. C.; HENKEL, T. W.; SANJUAN, T.; ZARE, R. A. phylogenetically-based nomenclature for *Cordycipitaceae* (Hypocreales). **Ima Fungus**, v. 8, n. 2, p. 335-353, 2017. <http://dx.doi.org/10.5598/imafungus.2017.08.02.08>.

KUMAR, S.; STECHER, G.; LI, M.; KNYAZ, C.; TAMURA, K. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. **Molecular biology and evolution**, v. 35, n. 6, p. 1547-1549, 2018. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>.

LAZO, M. L. S. R. **Caracterização e patogenicidade de fungos entomopatogênicos isolados do percevejo-bronzeado do eucalipto, *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae)**. 2012. Dissertação (Mestrado em Agronomia – Proteção de Plantas) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Botucatu, SP, 2012.

LIANG Z. Q. Entomogenous Fungi from the Pests of Tea-Plants. **Acta Phytopathologica Sinica**, v. 11, n. 4, p. 9-16, 1981.

LUANGSA-ARD, J. J.; HYWEL-JONES, N. L.; MANOCH, L.; SAMSON, R. A. On the relationships of *Paecilomyces* sect. *Isarioidea* species. **Mycological Research**, v. 109, n. 5, p. 581-589, 2005. <http://dx.doi.org/10.1017/s0953756205002741>.

McCOOK, S. Global rust belt: *Hemileia vastatrix* and the ecological integration of world coffee production since 1850. **Journal of Global History**, v. 1, n. 2, p. 177-195, 2006. <https://doi.org/10.1017/S174002280600012X>.

McCOOK, S.; VANDERMEER, J. The big rust and the red queen: long-term perspectives on coffee rust research. **Phytopathology**, v. 105, n. 9, p. 1164-1173, 2015. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-04-15-0085-RVW>.

MAFIA, R. G.; ALFENAS, A. C. Preparações e observações microscópicas de espécimes fúngicos. In: ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. (ed.). **Métodos em Fitopatologia**. Viçosa: Editora UFV, 2016.

MILLER, M. A.; PFEIFFER, W.; SCHWARTZ, T. Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. **Gateway Computing Environments Workshop (GCE)**. New Orleans, EUA, 2011. <https://doi.org/10.1109/GCE.2010.5676129>.

MONGKOLSAMRIT, S.; NOISRIPOOM, W.; THANAKITPIPATTANA, D.; WUTIKHUN, T.; SPATAFORA, J. W.; LUANGSA-ARD, J. Disentangling cryptic species with *Isaria*-like morphs in Cordycipitaceae. **Mycologia**, v. 110, n. 1, p. 230-257, 2018. <http://dx.doi.org/10.1080/00275514.2018.1446651>.

MONTES-BAZURTO, L. G.; BUSTILLO-PARDEY, A. E.; MEDINA-CÁRDENAS, H. C. *Cordyceps cateniannulata*, a novel entomopathogenic fungus to control *Stenoma impressella* (Lepidoptera: Elachistidae) in Colombia. **Journal of Applied Entomology**, v. 144, n. 9, p. 788-796, 2020. <http://dx.doi.org/10.1111/jen.12818>.

OLATUNJI, O. J.; TANG, J.; TOLA, A.; AUBERON, F.; OLUWANIYI, O.; OUYANG, Z. The genus *Cordyceps*: an extensive review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. **Fitoterapia**, v. 129, p. 293-316, 2018. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fitote.2018.05.010>.

OWNLEY, B. H.; GRIFFIN, M. R.; KLINGEMAN, W. E.; GWINN, K. D.; MOULTON, J. K.; PEREIRA, R. M. *Beauveria bassiana*: endophytic colonization and plant disease control. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 98, n. 3, p. 267-270, 2008. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2008.01.010>.

RAJANI, P.; RAJASEKARAN, C.; VASANTHAKUMARI, M. M.; OLSSON, S. B.; RAVIKANATH, G.; SHAANKER, R. U. Inhibition of plant pathogenic fungi by endophytic *Trichoderma* spp. through mycoparasitism and volatile organic compounds. **Microbiological research**, v. 242, 126595, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126595>.

RAYNER, R. W. **A mycological colour chart**. England, Surrey: Mycological institute & British Mycological Society, 1970.

REHNER, S. A.; BUCKLEY, E. A *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1- $\alpha$  sequences: evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps* teleomorphs. **Mycologia**, v. 97, n. 1, p. 84-98, 2005. <https://doi.org/10.1080/15572536.2006.11832842>.

REHNER, S. A.; POSADA, F.; BUCKLEY, E. P.; INFANTE, F.; CASTILLO, A.; VEGA, F. E. Phylogenetic origins of African and Neotropical *Beauveria bassiana* s.l. pathogens of the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 93, n. 1, p. 11-21, 2006. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2006.04.005>.

RODRÍGUEZ, M. C. H. ***Trichoderma* spp. associated with coffee in Africa: taxonomy and potential uses for the biological control of coffee leaf rust (*Hemileia vastatrix*) and promotion of plant growth**. 2019. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2019.

RODRÍGUEZ, M. C. H.; EVANS, H. C.; de ABREU, L. M.; de MACEDO, D. M.; NDACNOU, M. K.; BEKELE, K. B.; BARRETO, R. W. New species and records of *Trichoderma* isolated as mycoparasites and endophytes from cultivated and wild coffee in Africa. **Scientific reports**, v. 11, n. 1, p. 1-30, 2021. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-84111-1>.

RONQUIST, F.; HUELSENBECK, J. P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics**, v. 19, n. 12, p. 1572-1574, 2003. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btg180>.

SALCEDO-SARMIENTO, S.; AUCIQUE-PÉREZ, C. E.; SILVEIRA, P. R.; COLMÁN, A. A.; SILVA, A. L.; MANSUR, P. S. C.; RODRIGUES, F. Á.; EVANS, H. C.; BARRETO, R. W. Elucidating the interactions between the rust *Hemileia vastatrix* and a *Calonectria* mycoparasite and the coffee plant. **iScience**, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.102352>.

SARVEN, M. S.; HAO, Q.; DENG, J.; YANG, F.; WANG, G.; XIAO, Y.; XIAO, X. Biological Control of Tomato Gray Mold Caused by *Botrytis Cinerea* with the entomopathogenic fungus *Metarhizium Anisopliae*. **Pathogens**, v. 9, p. 213, 2020. <https://doi.org/10.3390/pathogens9030213>.

SERRATO-DIAZ, L. M.; MARIÑO, Y. A.; BAYMAN, P. Pathogens causing anthracnose and fruit rots of coffee associated with the coffee berry borer and the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* in Puerto Rico. **Phytopathology**, v. 110, n. 9, p. 1541-1552, 2020. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-02-20-0057-R>.

SHIMAZU, M. *Paecilomyces cateniannulatus* Liang, a commonly found, but an unrecorded entomogenous fungus in Japan. **Applied Entomology and Zoology**, v. 36, n. 3, p. 283-288, 2001. <https://doi.org/10.1303/aez.2001.283>.

STAMATAKIS, A. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. **Bioinformatics**, v. 30, n. 9, p. 1312-1313, 2014. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu033>.

STÖVER, B. C.; MÜLLER, K. F. TreeGraph 2: combining and visualizing evidence from different phylogenetic analyses. **BMC bioinformatics**, v. 11, n. 1, p. 1-9, 2010. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-11-7>.

SUN, T.; SHEN, Z.; SHAUKAT, M.; DU, C.; ALI, S. Endophytic isolates of *Cordyceps fumosorosea* to enhance the growth of *Solanum melongena* and reduce the survival of whitefly (*Bemisia tabaci*). **Insects**, v. 11, n. 2, p. 78, 2020. <http://dx.doi.org/10.3390/insects11020078>.

SUNG, G.; HYWEL-JONES, N. L.; SUNG, J.; LUANGSA-ARD, J. J.; SHRESTHA, B.; SPATAFORA, J. W. Phylogenetic classification of *Cordyceps* and the clavicipitaceous fungi. **Studies in Mycology**, v. 57, p. 5-59, 2007. <http://dx.doi.org/10.3114/sim.2007.57.01>.

TALHINHAS, P. et al. The coffee leaf rust pathogen *Hemileia vastatrix*: one and a half centuries around the tropics. **Molecular plant pathology**, v. 18, n. 8, p. 1039-1051, 2017. <https://doi.org/10.1111/mpp.12512>.

TASANATHAI, K.; THANAKITPIPATTANA, D.; NOISRIPOOM, W.; KHONSANIT, A.; KUMSAO, J.; LUANGSA-ARD, J. J. Two new *Cordyceps* species from a community forest in Thailand. **Mycological progress**, v. 15, n. 28, 2016. <https://doi.org/10.1007/s11557-016-1170-3>.

VAIDYA, G.; LOHMAN, D. J.; MEIER, R. (2011). SequenceMatrix: concatenation software for the fast assembly of multi-gene datasets with character set and codon information. **Cladistics**, v. 27, n. 2, p. 171-180, 2011. <https://doi.org/10.1111/j.1096-0031.2010.00329.x>.

VEGA, F. E.; POSADA, F.; AIME, M. C.; PAVA-RIPOLL, M.; INFANTE, F.; REHNER, S. A. Entomopathogenic fungal endophytes. **Biological control**, v. 46, n. 1, p. 72-82, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2008.01.008>.

VILGALYS, R.; HESTER, M. (1990). Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. **Journal of bacteriology**, v. 172, n. 8, p. 4238-4246, 1990. <https://doi.org/10.1128/jb.172.8.4238-4246.1990>.

WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. W. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M. A.; GELFAND, D. H.; SNINSKY, J. J.; WHITE, T. J. (ed.). **PCR protocols: a guide to methods and applications**. New York, EUA: Academic Press, Inc., 1990.

WORLD COFFEE RESEARCH (WCR). **Harnessing the power of natural enemies to fight coffee leaf rust**, 2019. Disponível em: <https://worldcoffeeresearch.org/work/biocontrol-coffee-leaf-rust/harnessing-power-natural-enemies-fight-coffee-leaf-rust/>. Acesso em: 20 fev. 2021.

YANG, X. L.; LI, Z. Z.; ZHANG, S.; YU, H.; ZHU, H. J.; LUO, D. Q. A new spirocyclic compound from the liquid culture of entomogenous fungus *Isaria cateniannulata*. **Journal of Asian Natural Products Research**, v. 14, n. 11, p. 1093-1096, 2012. <https://doi.org/10.1080/10286020.2012.707650>.

YANG, Z.; WU, Q.; FAN, J.; HUANG, J.; WU, Z.; LIN, J.; BIN, S.; SHU, B. Effects of the entomopathogenic fungus *Clonostachys rosea* on mortality rates and gene expression profiles in *Diaphorina citri* adults. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 179, p. 107539, 2021. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2021.107539>.

ZHOU, Y. M.; XIE, W.; YE, J. Q.; ZHANG, T.; LI, D. Y.; ZHI, J. R.; ZOU, X. New potential strains for controlling *Spodoptera frugiperda* in China: *Cordyceps cateniannulata* and *Metarhizium rileyi*. **Biocontrol**, v. 65, n. 6, p. 663-672, 2020. <http://dx.doi.org/10.1007/s10526-020-10035-w>.

ZAMBOLIM, L. Current status and management of coffee leaf rust in Brazil. **Tropical Plant Pathology**, v. 41, n. 1, p. 1-8, 2016a. <https://doi.org/10.1007/s40858-016-0065-9>.

### Conclusões Gerais

- Catorze isolados de *Cladosporium* spp. obtidos crescendo sobre urédias do patógeno em coletas realizadas no Brasil, no Quênia e na Etiópia foram identificados. Quatro pertencem a quatro espécies já conhecidas (*C. asperulatum*, *C. sphaerospermum*, *C. tenuissimum* e *C. xantochromaticum*) e os demais foram reconhecidos como pertencentes a sete espécies a serem descritas como novas para a ciência;
- Os isolados de *Cladosporium* spp. mostraram capacidade de reduzir a germinação dos uredósporos de *H. vastatrix* entre 17 e 83%, e alguns podem ter potencial para o uso como agente de biocontrole da ferrugem do cafeeiro;
- Os isolados de *Cladosporium* spp. COAD 2559, COAD 2565, COAD 2566 e COAD 2578 apresentaram respostas numericamente superiores de inibição da germinação de uredósporos do patógeno após aplicação do filtrado fúngico em comparação à aplicação de seus respectivos conídios.
- Dentre os isolados fúngicos obtidos em coletas realizadas na África e América do Sul, um único isolado, oriundo do Quênia, (COAD 3349) foi identificado como *Cordyceps cateniannulata*;
- Após tratamento com suspensão de conídios ou filtrado do cultivo fúngico de *Cordyceps cateniannulata* COAD 3349, uredósporos de *Hemileia vastatrix* apresentaram redução significativa de sua germinação, em comparação à testemunha;